

INRS-IAF-Institut Armand-Frappier

Université du Québec à Montréal

DÉVELOPPEMENT D'UN VACCIN ADÉNOVIRAL EXPRIMANT LA
NUCLÉOCAPSIDE DU CIRCOVIRUS PORCIN DE TYPE 2

Par

Benoît Charbonneau

Mémoire

présenté pour l'obtention du
grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation :

Présidente du jury
et examinatrice interne

Dre. Véronika Von Messling, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Dr. Martin Lessard, Agriculture et Agroalimentaire Canada

Directeur de recherche

Dr. Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier

© droits réservés de Benoît Charbonneau, 2005

Remerciement

J'aimerais remercier avant tout mon directeur de recherche, le Dr. Yves St-Pierre. Je suis très reconnaissant puisque suite au décès du Dr. Serge Dea, il a pris en main le projet. De plus, il a été disponible à répondre à mes interrogations et me conseiller tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais aussi remercier tout le personnel de l'édifice 27, personnel de soutien et étudiants pour leur aide précieuse et leur encouragement. Un merci tout spécial au Dr. Ali Kheyar pour son écoute attentive et ses merveilleux conseils.

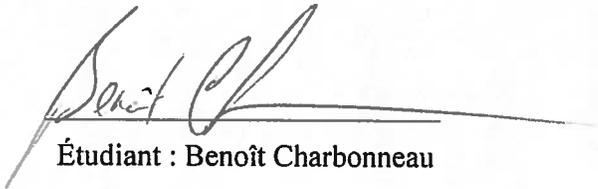
De plus, j'aimerais remercier ma famille, mon père Gérard et ma mère Diane, pour leur support financier et moral tout au long de mes études ainsi qu'à mes frères, Martin et Luc.

Enfin, j'aimerais remercier tout mes amis, et en particulier Stéphane, qui a su me faire sourire dans les moments difficiles.

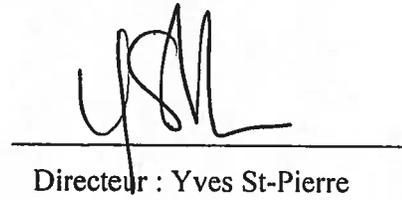
Résumé

Le circovirus porcin de type 2 (CVP2) est un virus à ADN simple brin, non enveloppé, a été découvert en 1988. Ce virus est l'agent étiologique du syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage (SDMPS), une maladie décrite pour la première fois dans l'Ouest Canadien en 1991. Le SDMPS est caractérisé par une émaciation, des problèmes respiratoires et un problème de croissance chez les porcelets âgés entre 5 et 12 semaines. Aujourd'hui répandue dans plusieurs pays, y compris en Europe, cette maladie entraîne des pertes économiques majeures pour les producteurs de porcs. Aucun agent prophylactique n'existe sur le marché pour contrer le développement de cette maladie. L'objectif de ce projet consiste donc à produire un vecteur d'expression pour l'ORF2 dans le but de développer un vaccin potentiel basé sur l'utilisation d'un vecteur viral à partir de l'adénovirus humain de type 5 (hAd). L'ORF2 a été choisi car elle code pour la seule protéine qui compose la nucléocapside (NC). Pour ce faire, la séquence de l'ORF2 du CVP2 a été isolée à partir du vecteur d'expression pCEP5-6H-ORF2 et sous-cloné dans le plasmide de transfert pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp qui code pour la protéine fluorescente verte (GFP). La reconstitution fonctionnelle de l'ORF2 dans ce vecteur a été mesurée *in vitro* par immunobuvardage de type Western suite à une transfection dans les cellules humaines 293. Le vecteur viral hAd-ORF2 a ensuite été produit par recombinaison suite à une transfection / infection avec le plasmide de transfert recombinant et l'adénovirus hAd parental contenant une délétion pour les gènes codant pour les protéines E1, E3 et la protéase virale. Les plages de lyses contenant l'hAd-ORF2 ont été identifiées par la présence de foyer de fluorescence induite par l'expression de la GFP et utilisés afin de récupérer le virus recombinant. Des tests *in vitro* aux niveaux du gène et de la protéine ont ensuite été réalisés afin de confirmer l'expression fonctionnelle de l'ORF2 par l'hAd recombinant. Une production à grande échelle du virus a été réalisée et une préparation de vecteur adénoviral contenant l'ORF2 du CVP2 a été purifiée par gradient de chlorure de césium. La capacité de ce vecteur à induire des anticorps spécifiques, et ce dans une cinétique comparable à celle obtenue avec le virus CVP2, a finalement été confirmée *in vivo* chez des souris CD-1. L'ensemble de ces travaux laisse entrevoir que ce vecteur pourrait être efficace dans l'élaboration d'une réponse

humorale contre la nucléocapside du CVP2 chez le porc, et ainsi représenter un outil important dans la lutte contre le SDMPS.



Étudiant : Benoît Charbonneau



Directeur : Yves St-Pierre

Table des matières

Remerciement.....	ii
Résumé.....	iii
Table des matières	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux	vii
Liste des abréviations.....	viii
Introduction	1
Chapitre 1	3
Revue bibliographique	3
1.1 Historique	3
1.2 La maladie	5
1.2.1 Le Syndrome de dépérissement multisystémique en post sevrage (SDMPS)	5
1.2.1.1 Signes cliniques et lésions	5
1.2.1.2 Infection expérimentale	6
1.2.1.3 Aspect immunologique	8
1.2.1.4 Prophylaxie et diagnostic.....	12
1.2.1.5 Autres syndromes liés au CVP2.....	15
1.3 Le circovirus porcin	15
1.3.1 Taxonomie	15
1.3.2 Tropisme cellulaire du CVP	16
1.3.3 Épidémiologie	17
1.3.4 Structure du circovirus	19
1.3.4.1 Morphologie et propriétés physico-chimiques.....	19
1.3.4.2 Organisation et réplication génomique.....	19
1.3.4.3 Protéines virales	22
1.4. Hypothèses de travail	25
Chapitre 2	26
Matériel et méthodes.....	26
2.1 Cultures cellulaires.....	26
2.1.1 Lignées cellulaires.....	26
2.1.2 Passages cellulaires	26
2.2 Clonage de l'ORF2 du CVP2	27
2.3 Plasmide recombinant pAdCMV5P2DC/GFPq/K7PSmlp-ORF2.....	28
2.3.1 Amplification du vecteur pAdCMV5P2DC/GFPq/K7PSmlp et sous-clonage de l'ORF2.....	28
2.3.2 Purification de l'ADN recombinant	29
2.3.3 Expression transitoire du plasmide recombinant dans les cellules 293.....	29
2.3.4 Immunobuvardage de type Western.....	30
2.4 Production de l'adénovirus recombinant pour l'ORF2	31
2.4.1 Construction de l'adénovirus recombinant pour l'ORF2	31
2.4.2 Sélection d'adénovirus recombinant	32
2.4.3 Production d'un stock d'adénovirus recombinant.....	33
2.4.3.1 Amplification du virus recombinant.....	33

2.4.3.2 Séquençage de l'ORF2 de l'hAd-ORF2	34
2.4.3.3 Titrage.....	34
2.5 CVP2	35
2.5.1 Amplification du CVP2	35
2.5.2 Titrage.....	35
2.6 Immunisation et test de détection des anticorps	36
2.6.1 Immunisation chez la souris	36
2.6.2 Immunofluorescence indirect.....	36
Chapitre 3	38
Résultats	38
3.1 Amplification de l'ORF2 du CVP2	38
3.2 Production du plasmide recombinant pAdCMV5-P2DC GFPq/K7PSmlp/ORF2	39
3.3 Expression de l'ORF2 à partir d'un vecteur adénoviral recombinant	43
3.4 Analyse de séquence.	46
3.5 Immunisation expérimentale.	48
Chapitre 4	52
Discussion	52
4.1 Contexte.....	52
4.2 Le vecteur adénoviral : contexte et justification.....	53
4.3 L'ORF2 comme gène cible	55
4.4 Perspectives des vaccins viraux vis-à-vis des approches traditionnelles et des nouvelles approches dans le développement de vaccins	58
4.5 Alternatives et problèmes associés aux vaccins viraux.....	63
Chapitre 5	65
Conclusion et perspective	65
Référence.....	66
Annexe I.....	91

Liste des figures

Figure 1 : Photographie par microscopie électronique de particules virales du CVP2.	4
Figure 2 : Organigramme représentant la famille <i>Circoviridae</i>	16
Figure 3 : Organisation génomique du circovirus porcin.....	21
Figure 4 : Schéma de l'organisation de l'origine de réplication du CVP2.	21
Figure 5 : Cartographie du vecteur d'expression pCEP5-6H-ORF2.	38
Figure 6 : Clonage de l'ORF2 du circovirus porcin dans le vecteur pCEP-5-6H.	39
Figure 7 : Cartographie du plasmide pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp.	40
Figure 8 : Criblage par PCR sur différentes colonies démontrant la présence ainsi que l'orientation de l'ORF2 dans le pAdCMV5P2DCGFPq/K7PSmlp -ORF2.	41
Figure 9 : Expression transitoire de l'ORF2 dans les cellules 293A transfectées avec le plasmide recombinant pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp/ORF2 par immuno-buvardage... ..	42
Figure 10 : Détection d'une plage virale de l'adénovirus recombinant pour l'ORF2 quatre jours après l'infection avec l'adénovirus recombinant pour l'ORF2.	44
Figure 11 : Profil électrophorétique directionnel sur gel d'agarose de l'ORF2 de six différents clones adénoviraux.	45
Figure 12 : Expression de la nucléocapside du CVP2 porcin <i>in vitro</i> par l'adénovirus recombinant hAd-ORF2 dans les cellules 293.	46
Figure 13 : Comparaison de séquence entre l'ORF2 du CVP2 (IAF-2897, GenBank AF408635) et l'ORF2 de l'adénovirus recombinant.	47
Figure 14 : Test d'immunofluorescence indirecte pour la détection d'anticorps contre l'ORF2 de CVP2 porcin chez des souris immunisées avec l'hAd-ORF2.	50
Figure 15 : Induction d'une réponse humorale contre l'ORF2 du CVP2 porcin suite à l'immunisation avec l'AdV-ORF2.	51

Liste des tableaux

Tableau I : Détection de la réponse humorale contre l'ORF2 du CVP2 porcin suite à l'immunisation avec l'AdV-ORF2.	49
--	----

Liste des abréviations

aa	acide aminé
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messagé
BBTV	virus de la houppe supérieure de la banane «banana bunchy top virus»
BFDV	maladie du bec et des plumes de Psittacine
°C	degré Celsius
CaCV	circovirus du canari
CAV	virus de l'anémie du poulet
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CsCl	chlorure de césium
CT	tremblement congénital
CVP	circovirus porcin
CVP1	circovirus porcin de type 1
CVP2	circovirus porcin de type 2
CymR	répresseur du cumate
ELISA	épreuve immuno-enzymatique «enzyme-linked immunosorbant assay»
GFP	protéine fluorescente verte «green fluorescent protein»
hAd	adénovirus humain
hAd-rec	adénovirus humain recombinant
HEK 293	cellule embryonnaire humaine de rein «human embryonic kidney cell»
HIS	hybridation <i>in situ</i>
IFI	immunofluorescence indirect
Ig	immunoglobuline
IHC	immunohistochimie
Ig	Immunoglobuline
IL	interleukine
INF	interferon

kDa	kilo Dalton
KLH	keyhole limpet hemocyanine
NC	nucléocapside
NK	cellule tueuse naturelle « natural killer»
Nt	nucléotide
ORF	cadre de lecture ouvert « open reading frame»
ORF1	région codante pour la réplicase
ORF2	région codante pour la nucléocapside
pb	paire de base
PBMC	cellule mononuclée du sang périphérique
Pcap	promoteur pour la nucléocapside
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
cPRC	réaction de polymérisation en chaîne compétitif
PEI	polyéthylèneimine
PFT	cellules de la trompe de Fallope de truie
PI	post immunisation
PiCV	circovirus du pigeon
PKA	cellule de rein de porc exempt de CVP 1
PK-15	cellule de rein de porc infecté avec CVP1
POD	peroxydase
Prep	promoteur pour la réplicase
PPV	parvovirus porcin
PS	gène de la protéase
RT-PCR	transcriptase inverse- réaction de polymérisation en chaîne
Rep	réplicase
Rep'	forme tronqué de la réplicase
SDMPS	syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage
SDNP	syndrome de dermatite et néphropathie porcine
SDS	sodium dodécylsulfate
SFB	sérum foetal bovin

SIDA	syndrome immunodéficience acquise
SPF	exempt de pathogène spécifique «specific pathogen free»
SRRP	syndrome reproducteur et respiratoire porcin
TAN	test d'acide nucléique
Th	lymphocyte T « helper »
TTV	virus <i>Torque teno</i>
TUNEL	« Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d'UTP-nick end labelling »
V	volt
VERO	cellules de rein de primates
VIRO R1	ligné cellulaire de rétine de porc foetal

Introduction

L'élevage d'animaux de consommation a été l'objet de plusieurs transformations au cours des dernières années. En réponse au besoin des consommateurs et plus récemment à la mondialisation des marchés, la modernisation des méthodes d'élevage chez le porc a été marquée par une transition d'une production simple, à faible échelle, à une production d'envergure, donnant naissance à des « méga-porcheries ». Cette nouvelle tendance engendre de nouveaux problèmes, notamment la transmission de nouveaux agents pathogènes et l'apparition de nouvelles maladies qui y sont associées.

En 1991, un groupe de chercheurs a découvert chez des porcelets une nouvelle maladie affectant plusieurs systèmes, dont les systèmes respiratoire et immunitaire. Puisque c'est une maladie affectant de multiples systèmes, le nom de syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage (SDMPS) lui fut attribué. L'agent étiologique de cette maladie demeura inconnu jusqu'en 1998, alors que le circovirus porcin de type 2 (CVP2), différent du CVP1 non pathogène, fut isolé à partir des lésions des porcs affectés. Plusieurs études subséquentes vinrent démontrer l'implication du CVP2 dans le SDMPS, bien que le mécanisme de pathogenèse demeure largement mal défini encore aujourd'hui. Les études ont néanmoins confirmé que le CVP2 possède un tropisme pour les cellules du système immunitaire. De plus, des études comparatives ont démontré qu'il y a seulement environ 68% d'identité entre le CVP1 et le CVP2; la majeure partie des différences se situe au niveau de l'ORF2, le gène codant pour la protéine de la nucléocapside (NC), qui contient les déterminants antigéniques majeurs de types spécifiques. La NC serait aussi impliquée dans la pathogénécité, ce qui en fait une bonne cible potentielle dans la production d'un vaccin.

Le projet décrit dans ce mémoire a été conçu dans l'optique de produire un vecteur exprimant l'ORF2 du CVP2 IAF2897, isolé au Québec à partir de porc atteint de SDMPS, et ce dans l'éventualité de développer à plus ou moins long terme un vaccin contre cette maladie. Le

mémoire décrit la génération d'un vecteur adénoviral recombinant contenant l'ORF2 du CVP2 et décrit ses propriétés antigéniques *in vivo*.

Le mémoire est divisé en cinq chapitres. Le premier chapitre consiste à apporter une vue d'ensemble de la littérature sur le CVP2. Le second chapitre traite de la méthodologie utilisée afin de réaliser les différents objectifs. Le troisième chapitre décrit en détails les résultats obtenus durant le projet. Les résultats ont été divisés en trois sections, soit l'expression de l'ORF2 à partir du plasmide de transfert, à partir du l'adénovirus recombinant pour l'ORF2, ainsi que les résultats de l'immunisation chez la souris. Finalement, le quatrième chapitre contient une discussion générale sur les résultats obtenus et leur impact dans le domaine de la recherche. Le cinquième chapitre présente une conclusion générale du mémoire ainsi que les perspectives. Enfin, un article, auquel j'ai participé, est présenté en annexe.

Chapitre 1

Revue bibliographique

1.1 Historique

C'est en 1974 que le premier circovirus animal fut découvert. Celui-ci a été isolé à partir de la lignée cellulaire de rein de porc PK-15 (ATCC-CC1-33), chroniquement infectée (Tischer *et al.*, 1974). Originellement rapportée comme une particule similaire au picornavirus, une famille de virus à ARN de très petite taille, ce n'est qu'en 1982, avec des études plus approfondies, que l'on a découvert que ce virus était composé d'ADN circulaire simple brin (Tischer *et al.*, 1982); le nom de circovirus porcine (CVP) fut alors donné à ce nouveau virus. Avec un manque de parenté avec les autres virus à ADN simple brin, il a ensuite été classé dans une nouvelle famille, celle des *circoviridae*. Cette famille regroupe plusieurs virus dont le BFDV (maladie du bec et des plumes de Psittacine) et le CAV (virus de l'anémie du poulet), puisque ceux-ci ressemblent au CVP, du fait qu'ils sont composés d'un génome viral d'ADN et qu'ils sont de très petites tailles.

Suite à la découverte du CVP, plusieurs études sur la prévalence et l'infectivité ont été réalisées. Divers échantillons sanguins ont permis d'établir un taux d'anticorps de 77 à 95 % dirigé contre le CVP (Tischer *et al.*, 1986) dans la population porcine par la technique d'immunofluorescence indirecte. Pour ce qui est de sa pathogénécité, des infections expérimentales ne démontrent aucun effet cytopathique (Tischer *et al.*, 1986; Allan *et al.*, 1995).

En 1991, une nouvelle maladie, le syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage (SDMPS), fut rapportée dans l'Ouest canadien. Ce n'est qu'en 1998, que l'agent étiologique de cette maladie fut découvert. Ce virus ayant un génome à ADN simple brin a été identifié comme un circovirus porcine (Figure 1). Cependant, par analyse de séquences, on se

rendit compte que ce CVP était distinct du premier CVP décrit par Tischer et son équipe. Pour différencier les deux virus, le nom de CVP1 fut donc attribué pour le circovirus dit non pathogène et de CVP2 pour celui associé au SDMPS. Au niveau génomique, il y a entre le CVP1 et le CVP2 un taux d'homologie de 68 % (Hamel *et al.*, 1998). Entre les souches de CVP2, on retrouve une homologie de plus de 94 %.

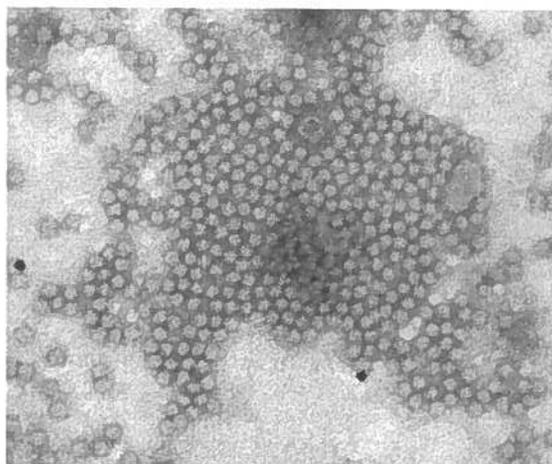


Figure 1 : Photographie par microscopie électronique de particules virales du CVP2. Le CVP2 purifié a été photographié à un grossissement d'environ 300 000x par Robert Alain, du service de MET de l'INRS-IAF.

Suite à la première description de la maladie en 1991, le SDMPS a pris une proportion alarmante. L'apparition de la maladie a été observée dans plusieurs pays producteurs de porc de consommation, entre 1996 et 1999 aux Etats-Unis (Daft *et al.*, 1996), en France (LeCann *et al.*, 1997), en Espagne (Segales *et al.*, 1997), en Grande Bretagne (Allan *et al.*, 1999a), en Allemagne et l'Italie (Allan et Ellis, 2000).

1.2 La maladie

1.2.1 Le Syndrome de dépérissement multisystémique en post sevrage (SDMPS)

1.2.1.1 Signes cliniques et lésions

Le SDMPS, de par son nom, est une maladie qui affecte plusieurs systèmes. Cependant, le degré et l'intensité de la maladie peuvent varier selon l'hôte, entraînant un répertoire de signes cliniques varié. Il y a cependant six signes cliniques étroitement liés et reconnus comme étant caractéristiques du SDMPS; l'émaciation, la dyspnée, une hypertrophie des nœuds lymphatiques, la diarrhée, une pâleur de la peau, et la jaunisse (Harding, 2004).

L'ensemble des signes cliniques a été observé lors de cas d'infections naturelles et expérimentales (Allan *et al.*, 1999b; Okuda *et al.*, 2003; Opriessnig *et al.*, 2004). Puisque cette maladie est multisystémique, certains signes cliniques sont observés avec une plus faible prévalence. On observe également chez l'hôte infecté de la toux, des méningites, et la présence d'ulcères gastriques. La sévérité de la maladie, et donc des signes cliniques, peut être influencée par différents facteurs, dont la salubrité. Comme dans la plupart des maladies virales, certains ont soulevé la possibilité que la génétique ait une influence sur la maladie (Lopez-Soria *et al.*, 2004).

A niveau macroscopique, on observe plusieurs lésions; dans une très grande proportion, celles-ci sont observées au niveau du poumon ainsi que dans les nœuds lymphatiques. Lors de la nécropsie, on observe une induration pulmonaire ainsi qu'une consolidation pulmonaire (Allan et Ellis, 2000), expliquant les problèmes respiratoires. Au niveau des nœuds lymphatiques, on y retrouve une hypertrophie généralisée. Certaines autres lésions peuvent être également observées, soit des ulcères d'estomac et la présence de plaques oedémateuses aux poumons (Rosell *et al.*, 1999; Allan et Ellis, 2000).

L'analyse des différentes lésions microscopiques démontrent une déplétion sévère des lymphocytes au niveau des ganglions, de la rate, des amygdales et des plaques de Peyer (Rosell *et al.*, 1999; Sarli *et al.*, 2001). Cette déplétion est accompagnée d'une infiltration d'histiocytes. Des corps d'inclusions intracytoplasmiques et basophiliques dans les histiocytes ont été rapportés (Segales *et al.*, 2004) ainsi que la présence de syncytiums dans les organes lymphoïdes (Kiupel *et al.*, 1998; Darwich *et al.*, 2002; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002).

1.2.1.2 Infection expérimentale

Différentes infections expérimentales ont été tentées afin de reproduire la maladie et de valider le postulat de Koch permettant de conclure que le CVP2 était à l'origine du SDMPs. Les premiers essais ont été faits avec un broyat de tissus lymphatiques et pulmonaires (Balasch *et al.*, 1999; Albina *et al.*, 2001). Ces expériences, malgré l'apparition de lésions typiques du syndrome, telles qu'une lymphadénopathie généralisée, une pneumonie interstitielle, une gastrite, et une néphrite, n'ont cependant pas permis de reproduire les signes cliniques caractéristiques de la maladie (Ellis *et al.*, 1999). D'autres études ont tenté de reproduire la maladie avec le CVP2 purifié. Cette méthode a permis de reproduire plus fidèlement les signes cliniques de la maladie, tels que la présence d'un état léthargique, de l'ictère occasionnel, et la mort chez 26% des sujets infectés. L'ensemble de ces signes était sévèrement accentué en présence du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) (Bolin *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2003) ou du parvovirus porcin (PPV) (Allan *et al.*, 1999b). Il est à noter cependant que ces expériences ont été réalisées avec des porcelets provenant d'une césarienne et privé de colostrum. Néanmoins, ces résultats indiquent que le CVP2 peut dans certaines circonstances donner lieu au SDMPs. Il faut cependant noter que les porcelets utilisés lors de ces expériences ne représentent pas la réalité de la population cible retrouvée sur les fermes. En fait, une expérience réalisée sur des porcs âgés de quatre semaines provenant d'élevage sain (SPF; specific-pathogen free) en utilisant un clone infectieux ont démontré que le virus, dérivé du clone infectieux, et l'injection du clone infectieux au niveau du nœud lymphatique ne peuvent

reproduire les signes cliniques associés au SDMPs, malgré leur capacité à induire des lésions spécifiques au SDMPs (Fenaux *et al.*, 2002). D'autres études chez des porcelets CVP2-négatifs SPF âgés de trois semaines ont démontré cependant que le CVP2 peut induire le développement de la forme sévère de la maladie chez un bon nombre d'individus (environ 40%) après 35 jours post-infection (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002), ce qui suggère que l'infection atteint les jeunes porcs lorsque ceux-ci ont des taux maternels d'Ac bas, i.e. vers l'âge de trois-cinq semaines. Il est donc possible que le CVP2, bien qu'essentiel au développement de la maladie, requiert la présence d'autres co-facteurs (statut immunitaire, variations génétiques, conditions sanitaires, etc.) ou agents infectieux pour induire les signes cliniques typiques associées aux formes avancées du SDMPs. Cette hypothèse est appuyée par plusieurs études ayant démontré la présence d'autres agents infectieux lors d'infections naturelles avec le CVP2 (Choi et Chae, 2000; Ellis *et al.*, 2000), ce qui a mené à des expériences de co-infection avec le parvovirus porcin, le SRRP ainsi qu'avec un mycoplasme. (Harms *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003a; Opriessnig *et al.*, 2004). Toutes ces expériences de co-infections ont effectivement démontré que la co-infection induit des signes cliniques et des lésions spécifiques au SDMPs plus sévères que lors d'une infection avec le CVP2 seul. On y note particulièrement une déplétion lymphocytaire modérée à sévère ainsi que d'un retard de croissance.

Parmi les co-facteurs possiblement impliqués dans le développement du SDMPs, le rôle du système immunitaire, ou plus spécifiquement le rôle de sa suppression sur la maladie, a bien entendu été exploré. Il a ainsi été démontré que le CVP2 peut se répliquer dans les monocytes/macrophages (Sanchez *et al.*, 2003), un type cellulaire qui joue un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire, notamment durant la présentation antigénique. Des expériences ont donc tenté de vérifier l'effet de l'activation du système immunitaire sur la sévérité de la maladie. L'activation du système immunitaire a été fait soit avec le Keyhole limpet hemocyanines (KLH) dans de l'adjuvant de Freund incomplet (KLH-ICFA) (Krakowka *et al.*, 2001; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002) ou des vaccins commerciaux (Kyriakis *et al.*, 2002; Opriessnig *et al.*, 2003). Afin de démontrer un lien entre l'activation du système immunitaire, soit la présence de

monocytes/macrophages et le SDMP5, un analogue de la thymidine, le bromodeoxyuridine (BrdU) a été utilisé. L'étude démontre, au niveau du nœud lymphatique, une incorporation plus importante de BrdU au niveau des porcelets infectés ayant reçu le KLH-ICFA comparativement au porcelets infectés seulement (Krakowka *et al.*, 2001). Les conclusions à tirer des résultats obtenus lors de ces études, notamment en ce qui a trait à celles conduites avec le KLH, ne sont toutefois pas unanimes et ne permettent pas de tirer une conclusion claire quant à l'impact de l'immunostimulation sur le déroulement de la maladie, les deux études ayant des différences fondamentales au niveau de leurs résultats et de leurs méthodologies. Sans doute que des expériences supplémentaires avec un suivi plus précis et avec des approches complémentaires sur la modulation du système immunitaire pourront permettre de mieux résoudre à cette question.

1.2.1.3 Aspect immunologique

Le CVP2 a été retrouvé dans le cytoplasme de macrophages et de cellules dendritiques (Gilpin *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2003). Puisque ces cellules jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire, il est probable que la présence du CVP2 au niveau intracellulaire peut affecter la fonction des macrophages et des cellules dendritiques, notamment du fait que, comme nous l'avons mentionné précédemment, le CVP2 serait en mesure de se répliquer dans les monocytes/macrophages. Théoriquement, cette réplication pourrait réduire ou éliminer l'efficacité des fonctions du macrophage, notamment celles reliées au développement d'une réponse antigénique. Des études, utilisant le CVP1, ont été réalisées et les résultats ont démontré que la fonction de phagocytose n'est pas altérée (McNeilly *et al.*, 1996). Aucune étude n'a été cependant été réalisée à ce jour en ce sens avec le CVP2, notamment sur sa capacité à moduler la synthèse de molécules du CMH de classe II ou encore à moduler la présentation de peptides antigéniques dans le contexte du CMH de classe II à des lymphocytes T.

Des études ont néanmoins examiné si le CVP2 avait un effet sur la modulation de différentes cytokines produites au niveau des monocytes lymphocytaires périphériques (PBMC). Il y a une réduction ou une absence de production d'interleukine (IL)-4, IL-2 ou de l'interferon (INF)- γ après stimulation avec un superantigène, l'enterotoxine B du staphylocoque, ou un mitogène, la phytohaemagglutinine, de préparations de PBMC fraîchement isolées de porcs infectés (Darwich *et al.*, 2003a). De plus, cette même étude a démontré que seul le CVP2 induit une diminution ou une absence de libération d'IL-4 et d'IL-2 en plus de stimuler la production d'IL-1 de préparation de PBMC de porcs infectés et non infectés. Ces cytokines sont tous impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire cellulaire et humorale. Une analyse par transcription inverse et PCR (RT-PCR) démontre une variation dans le niveau de transcription de certaines cytokines, dont l'IL2, IL-4 et l'IL-10, dans la majorité des nœuds lymphatiques analysés (Darwich *et al.*, 2003b). Au niveau du thymus, une corrélation a été démontrée entre une augmentation d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire associée avec une fonction immunosuppressive au niveau de la présentation antigénique, et le niveau de déplétion thymique (Darwich *et al.*, 2003b). Ces observations laissent supposer que le CVP2 pourrait diminuer l'efficacité de la réponse immunitaire en induisant un état d'immunosuppression local. Ces résultats suggèrent que le CVP2 a une influence sur la fonction des lymphocytes T.

Afin de mieux connaître l'interaction du système immunitaire et du virus lors du cycle d'infection chez son hôte, différents outils ont été élaborés afin de mieux évaluer la réponse immunitaire humorale spécifique contre le CVP2 chez le porc. Il a été bien établi que suite à une infection avec le CVP2, la séroconversion au CVP2 est détectable au environ du quatorzième jour post-infection (pi), et ce tant chez le porc asymptomatique que chez le porc atteint de SDMPs (Pogranichnyy *et al.*, 2000). De plus, c'est à partir de ce moment que l'on observe une diminution de la virémie, puisque chez la majorité des porcs, aucune virémie n'est détectable au jour 21 pi (Pogranichnyy *et al.*, 2000). L'apparition de la maladie se fait chez les porcelets âgés entre 7 et 12 semaines (Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2002). Il y a une séroconversion au CVP2 de jeunes porcelets de fermes ayant ou non les caractéristiques de la maladie. Les

profils de séroconversion au CVP2 sont cependant différents; chez les sujets âgés entre 11 et 17 semaines, les porcelets atteints de SDMPS étaient positifs à 93% pour des Ac anti-ORF2, comparativement à 54% chez les porcs infectés mais sans signes de SDMPS (Blanchard *et al.*, 2003b). Cette même étude, effectuée à partir de sérum prélevés d'élevages de porcs en France, a démontré une séroconversion vers la 13^e semaines chez les porcs malades, et à la 18^e semaines chez les porcs infectés seulement, ce qui laisse suggérer que l'infection à bas âge induit plus souvent l'apparition du SDMPS.

Jusqu'à maintenant aucune étude sur la caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire spécifique contre le CVP2 n'a été rapportée. Néanmoins, des observations au niveau de la lymphadénopathie chez les porcs infectés a permis de démontrer des changements dans la circulation périphérique au niveau de la population de lymphocytes lors de l'infection (Allan et Ellis, 2000; Shibahara *et al.*, 2000; Segales *et al.*, 2001; Darwich *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2003). Ces changements ont fait l'objet de plusieurs études afin de déterminer les lymphocytes affectés. Par cytométrie en flux, un groupe a démontré une baisse des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺CD8⁺ ainsi que des lymphocytes B IgM⁺ (Darwich *et al.*, 2002). Cette réduction est observée tant chez les porcs atteints de SDMPS que des porcs infectés avec le CVP2. Une étude similaire démontre aussi une baisse des lymphocytes T et B (Segales *et al.*, 2001). Toutefois, une diminution de la population de lymphocyte B et une augmentation du nombre de monocytes dans le sang périphérique ont été observées (Shibahara *et al.*, 2000). En utilisant l'immunohistochimie, des résultats similaires ont été rapportés, soit une diminution de lymphocytes B et T et une augmentation du nombre de macrophages dans les ganglions lymphatiques (Sarli *et al.*, 2001; Chianini *et al.*, 2003). De plus, lors d'une étude par triple marquage, une diminution du nombre de cellules NK (CD3⁻CD4⁻CD8⁺) et des cellules T_H naïfs (CD3⁺CD4⁺CD8⁻) et activés (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) (Nielsen *et al.*, 2003) a été observée. L'ensemble de ces résultats démontre que le CVP2, par un mécanisme inconnu jusqu'à maintenant, mais qui pourrait possiblement impliquer les macrophages, peut moduler la réponse immunitaire afin d'induire le SDMPS.

Puisque la population lymphocytaire est à la baisse lors d'une infection avec le CVP2, des recherches ont été entreprises afin de déterminer si l'induction de l'apoptose pouvait être impliquée. L'utilisation de la technique de TUNEL (« Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d'UTP-nick end labelling ») pour visualiser les cellules apoptotique, a démontré un haut taux d'apoptose chez la population de lymphocytes CD79a⁺ (Shibahara *et al.*, 2000) chez les porcs infectés avec le CVP2 comparativement à des porcs témoins non-infectés. Une étude récente a découvert une nouvelle protéine, nommée ORF3, qui a la capacité d'induire l'apoptose par la voie de la caspase-8 (Liu *et al.*, 2005). Cependant, d'autres études affirment plutôt que l'apoptose ne serait pas la cause du développement du SDMPS (Mandrioli *et al.*, 2004; Resendes *et al.*, 2004). Cependant, l'on rapporte qu'il y a une augmentation de l'apoptose au niveau du nœud lymphatique inguinal superficiel au premier stade, comparativement au stade intermédiaire et final. Ces stades sont dépendants du degré de déplétion des follicules et des lymphocytes (Mandrioli *et al.*, 2004). Cette même étude démontre que le taux de prolifération lymphocytaire serait le facteur le plus important dans le développement du SDMPS que de l'apoptose. Notons qu'une corrélation positive a été établie avec la déplétion lymphocytaire et la quantité de virus retrouvée au niveau du ganglion lymphatique (Darwich *et al.*, 2002). Malgré tous, nous ne pouvons affirmer avec certitude que l'apoptose ne joue aucun rôle dans le développement de la maladie. Les résultats semblent indiquer que le développement du SDMPS soit attribuable au potentiel du CVP2 à induire l'apoptose dans les premiers instants de l'infection suivie du potentiel à moduler la réponse immunitaire.

Lorsqu'un état d'immunosuppression est présent, il y a possibilité que des infections secondaires se produisent. Des infections par des agents opportunistes ont effectivement été rapportées (Sato *et al.*, 2000; Krakowka *et al.*, 2001) dans le cas de porcs atteints de SDMPS. Cette observation est consistante avec l'hypothèse que le CVP2 induit une immunosuppression locale. L'ensemble de ces observations a donc mené à un consensus qui suggère que le CVP2

infecte les macrophages des amygdales, pour ensuite être disséminé dans l'organisme tout en se répliquant dans les monocytes du sang (Rosell *et al.*, 1999).

1.2.1.4 Prophylaxie et diagnostic

Plusieurs études ont démontré que le CVP2 était l'agent étiologique de cette maladie (Morozov *et al.*, 1998; Balasch *et al.*, 1999). À ce jour, il n'y a aucun outil prophylactique disponible. Cependant, quelques études ont démontré le potentiel de l'ORF2 comme protéine immunogénique afin de produire un vaccin (Nawagitgul *et al.*, 2000a; Liu *et al.*, 2001). Une approche proposée a été de produire un vaccin à ADN; soit l'injection d'un plasmide recombinant exprimant l'ORF2. L'immunisation de souris avec ce plasmide a conduit à une production d'Ac spécifique chez l'hôte suite à une immunisation répétée (trois) avec le vecteur plasmidique par voie sous-cutanée avec l'aide d'un « gene gun » (Kamstrup *et al.*, 2004). Il est toutefois à noter que deux immunisations ont été requises afin de détecter des Ac au jour 52 post-vaccination, et qu'une troisième immunisation a été requise afin d'obtenir des titres d'anticorps significatifs dans la majorité des animaux vaccinés. Des expériences de vaccination en utilisant des protéines produites à partir de systèmes de purification de baculovirus ont également été utilisées afin de tester l'immunogénéicité de ces préparations vaccinales. La purification d'ORF1 et ORF2 recombinante du CVP2 a été réalisée par la colonne d'affinité en ajoutant une séquence de poly-histidine dans la région en N-terminale de la protéine. Comme le cas du vaccin plasmidique, l'utilisation de protéines recombinantes pures en présence d'adjuvants a permis d'induire chez des porcelets la présence d'anticorps spécifiques (Blanchard *et al.*, 2003a). Toutefois, en comparant avec l'ADN plasmidique contenant un ORF2, les auteurs ont pu déterminer que la protéine de la nucléocapside pure était beaucoup plus efficace à induire des Ac (dès la deuxième semaine post-immunisation contrairement à cinq-six semaines post-immunisation chez les porcs ayant reçu le plasmide). De plus, les auteurs ont pu déterminer que seuls les porcs ayant été immunisés avec l'ORF2 avaient une protection, du moins partielle, contre une infection défi avec le CVP2, et non ceux immunisés avec l'ORF1. L'élaboration et l'utilisation de stratégies vaccinales variées contre le CVP2 pourront sûrement permettre d'offrir

un meilleur éventail d'outil qui permettront aux chercheurs et aux éleveurs de mieux contrôler les ravages dus à la maladie que ce virus cause.

Un second moyen de limiter la propagation de la maladie est de développer des outils de diagnostics performants. Cependant, le SDMPs est caractérisé par différentes lésions, lesquelles peuvent varier d'un porc à l'autre, ce qui rend le diagnostic difficile. Afin de rendre le diagnostic plus précis, trois critères doivent être respectés. Le premier est l'apparition de signes cliniques, tel que la perte de poids et la présence de problèmes respiratoires. Le deuxième critère est la présence de lésions caractéristiques du SDMPs, tel que la lymphadénopathie, l'hépatisation des poumons et la présence de corps d'inclusions. Finalement, la détection d'Ac ou d'ADN viral dans les différentes lésions confirme le diagnostic. Cette approche est utilisée pour confirmer la maladie puisque le porc doit être sacrifié pour confirmer le diagnostic. Afin de faciliter celui-ci, différents tests ont donc été récemment élaborés pour détecter la présence du CVP2 au niveau du sang ainsi que la présence d'Ac. Dans le cas du CVP1, des tests diagnostics ont été élaborés par les techniques d'immunohistochimie (IHC) (Allan *et al.*, 1994a) et d'hybridation *in situ* (HIS)(Allan *et al.*, 1998b). Cette dernière a d'ailleurs pu être utilisée dans la détection du CVP2. De plus, des études au niveau de l'homologie entre les ORF2 des virus CVP1 et CVP2 et l'analyse des séquences nucléotidiques de plusieurs génomes du CVP2 à permis d'élaborer de nouveaux tests d'hybridation *in situ* plus sensibles (Choi et Chae, 1999; Kim et Chae, 2001; Sirinarumitr *et al.*, 2001). Cependant, ces tests sont utilisés post mortem et ne peuvent donc pas être utilisés pour donner une idée précise de l'état de la situation réelle au niveau des troupeaux.

D'autres tests de diagnostic ont été élaborés afin de détecter la présence d'antigènes viraux de façon directe, soit par des tests d'acides nucléiques (TAN) faisant appel à la technique d'amplification par PCR, soit de façon indirecte, en utilisant la technique d'ELISA. Puisque les séquences génomiques du CVP1 et CVP2 sont connues, des amorces reconnaissant spécifiquement l'ORF2 du CVP1 et du CVP2 ont été produites. Des analyses des amplicons à partir de sérum (Liu *et al.*, 2000; Calsamiglia *et al.*, 2002) ainsi que de tissus ont donc été

réalisés (Morozov *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2000). Cependant, l'utilisation de TAN pour la détection de virus au niveau des tissus n'est pas quantitative (Segales et Domingo, 2002), puisqu'elle ne démontre que la présence du virus. Le CVP2 est retrouvé de façon endémique, ce qui aura pour effet d'obtenir des faux positifs. Un PCR compétitif (cPCR) quantitatif a été élaboré (Liu *et al.*, 2000) afin de palier à ce problème. Une étude comparative a été réalisée afin de comparer les différentes techniques (IHC, HIS, cPCR) et a démontré que les techniques d'IHC et d'ELISA peuvent différencier les infections cliniques des non cliniques comparativement au PCR (McNeilly *et al.*, 2002). Une autre étude a cependant démontré que l'IHC serait plus adéquate pour démontrer l'association entre la quantité de CVP2 et les lésions retrouvées (Choi *et al.*, 2000). Une nouvelle approche par PCR a été mise au point afin de différencier simultanément le CVP1 du CVP2 (Larochelle *et al.*, 1999; Ouardani *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001b). Des tests PCR multiplex sont utilisés afin de détecter simultanément le CVP2 et différents virus, tel que le PPV pathogène (Kim *et al.*, 2001a; Kim *et al.*, 2003b) et le SRRP (Segales *et al.*, 2002).

La technique d'immunofluorescence indirect (IFI) a également certains avantages dans le cas du CVP2. Avec des Ac spécifiques contre le CVP2, elle permet la détection de virus dans les cellules lors de l'isolement et lors de la propagation *in vitro* du virus. De plus, l'IFI est utilisée dans les laboratoires afin de détecter la présence d'Ac dans le sérum des animaux. Cette dernière est produite sur des feuillettes de cellules infectées avec le CVP2. Une méthode complémentaire a été mise au point en utilisant le plasmide d'expression pCEP5 contenant le gène de l'ORF2. Des plateaux de cellules 293 transfectées avec le pCEP5-6H-ORF2 ont été fixés de même que des plateaux de cellules PKA infectées avec le CVP2. La sensibilité a été étudiée en utilisant des sérums de porc provenant de différentes fermes. Les résultats ont démontré que 23 sérums étaient positifs lorsque le test était effectué avec des cellules infectées avec le virus comparativement à 35 sérums lorsque celles-ci étaient transfectées avec le vecteur, démontrant une meilleure détection des Ac (Racine *et al.*, 2004).

Malgré les progrès significatifs effectués au niveau des différents tests de diagnostic produits par les différents laboratoires de recherche, aucun n'a encore été commercialisé. Néanmoins, certains d'entre eux, dont celui faisant appel à la détection par PCR, sont déjà utilisés par différents services et/ou laboratoires de recherche pour le diagnostic du CVP2.

1.2.1.5 Autres syndromes liés au CVP2

Plusieurs maladies ont été liées au CVP2, soit le syndrome de dermatite et néphropathie porcine (SDNP), le tremblement congénital (CT) ainsi que l'avortement spontané et porcelet mort né. Le SDNP, identifié en 1993 en Grande Bretagne (Mackinnon, 2000), touche sévèrement le rein et cause des lésions au niveau de la peau et certains autres organes. La présence du CVP2 a été démontrée dans les lésions au niveau des tissus lymphatiques, des amygdales, de la rate et du foie (Allan *et al.*, 2000; Rosell *et al.*, 2000). Le CT est caractérisé par une perte de contrôle involontaire suite à une perte de myéline au niveau des cellules nerveuses. On y retrouve le CVP2 dans le cerveau de porcelets atteints dans les différents organes (Stevenson *et al.*, 2001). Cependant, l'association entre le CVP2 et le CT demeure controversée. Suite à une étude rétrospective sur des échantillons de porcs atteints de CT, aucun ADN n'a été détecté au niveau du système immunitaire (Stevenson *et al.*, 2001). Finalement, le CVP2 serait impliqué dans les cas de maladie de l'avortement spontanée et du mort-né. (West *et al.*, 1999; Meehan *et al.*, 2001). Suite à une infection de truies gestantes, 35% des naissances étaient des porcelets morts.

1.3 Le circovirus porcine

1.3.1 Taxonomie

Depuis la description du circovirus par Tischer en 1982 et l'introduction de la nouvelle famille des *Circoviridae* (Lukert *et al.*, 1995), plusieurs changements ont été apportés au niveau de la classification entourant les circovirus. Notons entre autre que la famille des *Circoviridae*

est maintenant composée de trois genres, soit le circovirus, le gyrovirus et l'anellovirus (Figure 2). Pour les membres du genre circovirus, on retrouve les circovirus porcins de type 1 et de type 2 ainsi que d'autres virus tel le circovirus du pigeon (PiCV) et du canari (CaCV). Pour le genre gyrovirus, reconnu en 1999 (Pringle, 1999), on retrouve un seul virus, soit le virus de l'anémie du poulet (CAV). Le genre anellovirus, créé officiellement en 2004 (Mayo, 2004), contient un virus type nommé TTV (*Torque teno virus*), isolé chez l'humain. De plus, notons que les virus des plantes, tel le BBTV, anciennement dans la famille Circoviridae, sont maintenant classés dans une nouvelle famille, le *Nanoviridae*.

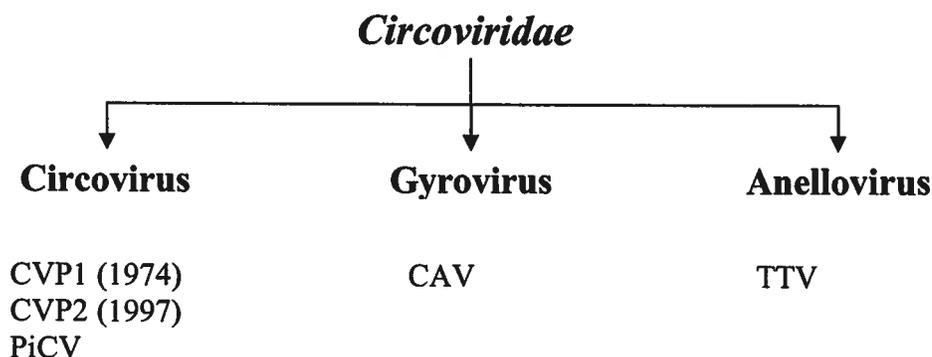


Figure 2 : Organigramme représentant la famille *Circoviridae*.

1.3.2 Tropisme cellulaire du CVP

La propagation virale du CVP1 et CVP2 se fait dans la majorité des cas sur les cellules PK-15 ou PKA (Todd *et al.*, 2001). En effet, comme nous l'avons mentionné auparavant, le CVP1 a été découvert grâce à la lignée cellulaire PK-15, qui est chroniquement infectée par ce virus (Tischer *et al.*, 1974). De plus, l'infection chronique ne produit aucun effet cytopathique visible, rendant difficile la détection par microscopie conventionnelle. Différentes tentatives ont été effectuées afin de propager le CVP2 dans différents types cellulaires. La lignée cellulaire de

rétilne de porc foetal (VIRO R1), exprimant le gène E1 de l'adénovirus humain de type 5, a été utilisée avec un certain succès (Liu *et al.*, 2001). Puisque le gène E1 peut induire la phase S de répllication, la possibilité de répllication du CVP2 est accrue. D'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées afin de propager le virus, notamment les cellules de la trompe de Fallope de truie (PFT) et les macrophages alvéolaires de poumon (Ouardani, Mémoire de maîtrise, 2001), de même que les cellules de rein de primates (VERO) (Liu *et al.*, 2001). Certaines cellules sont permissives au virus mais ne permettent pas la répllication virale. C'est le cas, par exemple, des cellules de bovins et d'ovins (Edwards et Sands, 1994), et des cellules dendritiques porcines (Vincent *et al.*, 2003). Il a été démontré cependant que le CVP2 peut se répliquer dans des cellules du système immunitaire, comme les monocytes/macrophages (Allan *et al.*, 1994b) et les lymphocytes B et T (Shibahara *et al.*, 2000; Kim et Chae, 2003). De plus, des expériences in vivo ont démontré que le tropisme du CVP2 était différent entre le foetus et le porcelet nouveau-né (Sanchez *et al.*, 2003). Chez le foetus, le virus a été détecté au niveau des cardiomyocytes, des hépatocytes et des macrophages. Vers la fin du développement embryonnaire, le tropisme diminue progressivement dans les cardiomyocytes et les hépatocytes, alors que chez le nouveau-né, une infection avec le CVP2 démontre un tropisme marqué pour les macrophages (Sanchez *et al.*, 2003). Chez l'humain, la ligné cellulaire, Hep2, démontre une répllication du CVP2 (Hattermann *et al.*, 2004) suite à une transfection. Cependant, les particules virales n'ont démontré aucune infectivité.

1.3.3 Épidémiologie

Depuis la découverte du SDMPs dans l'Ouest canadien au début des années 1990 (Harding et Clark, 1997), l'expansion de cette maladie a pris une telle ampleur qu'elle est maintenant décrite à travers le monde. Le SDMPs a été recensé, depuis les dernières années, au Canada (Liu *et al.*, 2002), aux États-Unis (Allan *et al.*, 1998b; Fenaux *et al.*, 2000), au Mexique (Trujano *et al.*, 2001) et dans différents pays d'Europe (Allan *et al.*, 1998b; Spillane *et al.*, 1998; Plana-Duran *et al.*, 1999; Labarque *et al.*, 2000). Par analyse de séquences nucléotidiques, un

arbre phylogénétique a été construit et démontre que les souches canadiennes, américaines et européennes sont hautement reliées (Larochelle *et al.*, 2002). Cette apparition soudaine et simultanée du SDMPS n'a pu être expliquée jusqu'à maintenant. Cependant, plusieurs hypothèses ont été proposées, notamment celles reliées à des changements au niveau de la pratique sanitaire ou encore l'influence de la génétique du porc, pourraient avoir une incidence importante sur l'épidémiologie de cette maladie au niveau mondial. Une expérience a d'ailleurs démontré un possible lien entre la génétique du porc et la susceptibilité à cette maladie (Lopez-Soria *et al.*, 2004). De plus, des études ont démontré que le CVP2 était présent dans des lésions ressemblant au SDMPS depuis 1985 au Japon (Sato *et al.*, 2000) et même en Espagne (Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2003). Hors, du virus a été retrouvé dans des tissus de porcs décédés, dans les années 60, de tremblement congénital, maladie associée récemment avec le CVP2 (Choi *et al.*, 2002).

Avec le développement récent d'outils pour le diagnostic de la maladie, il a été possible de déterminer l'étendue de la présence du CVP2 dans la population porcine ainsi que de faire un lien possible entre le taux d'Ac et le stade de la maladie. Il a ainsi été démontré que 36 % des porcs atteints de SDMPS avaient un taux en Ac faible, comparativement à 11% chez les porcs avec un titre en Ac élevé (Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2000). De tous les porcs atteints de SDMPS, un test par détection au niveau du génome viral (Test d'Acide Nucléique; TAN) démontre une présence de PCV2 dans 94% des cas (Ouardani *et al.*, 1999), consistant avec les travaux démontrant que le SDMPS est causé par le CVP2, mais laissant également supposer qu'une faible proportion pourrait être causé par un autre virus. Par contre, plusieurs cas de co-infection ont été rapportés chez les animaux infectés par le CVP2. Les plus retrouvés sont le parvovirus porcine (PPV) (Choi et Chae, 2000; Ellis *et al.*, 2000) et le virus du SRRP (Pogranichniy *et al.*, 2002; Drolet *et al.*, 2003; Wellenberg *et al.*, 2004). De façon parallèle, des Ac contre le CVP ont été détectés chez la souris, la vache et l'homme (Tischer *et al.*, 1995).

Malgré tout, on connaît très peu de chose sur la dissémination du virus. Certaines études ont démontré la présence de CVP2 dans les fèces et dans les sécrétions nasales (Shibata *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003) ainsi que dans le sperme (Larochelle *et al.*, 2000). Ce virus semble être capable de traverser la barrière placentaire puisque du CVP2 a été détecté chez le fœtus, suite à un avortement spontané, et chez des porcelets mort-nés (West *et al.*, 1999; Bogdan *et al.*, 2001).

1.3.4 Structure du circovirus

1.3.4.1 Morphologie et propriétés physico-chimiques

Le circovirus porcin est un petit virus à ADN simple brin non-enveloppé (Tischer *et al.*, 1982) avec une capsidie à symétrie icosaédrique. Les virions ont un diamètre variant entre 16.8 et 20.7 nm. Cette dernière caractéristique leur confère d'ailleurs une qualité particulière; ils sont en effet les plus petits virus de mammifères pouvant se répliquer de façon autonome (Niagro *et al.*, 1998).

Le CVP a une masse moléculaire de 0.58×10^6 daltons (Tischer *et al.*, 1986). Il possède un gradient de densité dans le CsCl de 1.36-1.38 g/ml (Allan *et al.*, 1994c) et un coefficient de sédimentation sur gradient de sucrose de 52S (Tischer *et al.*, 1982). Le CVP résiste à une température de 70°C pendant 15 minutes, à une incubation à pH 3, ou à un traitement au chloroforme (Allan *et al.*, 1994c).

1.3.4.2 Organisation et répllication génomique

L'analyse de la séquence nucléotidique a démontré que le génome du CVP1 est plus petit que celui du CVP2, avec une taille de 1759 bases (Meehan *et al.*, 1997) comparativement à 1768 bases pour celui du CVP2 (Allan *et al.*, 1998a). L'homologie de séquence entre les souches de CVP1 et CVP2 varient entre 68 et 76% (Hamel *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1998). L'homologie entre les différentes souches d'une même espèce est égale ou supérieure à 96%

(Meehan *et al.*, 1997). L'analyse de la séquence du génome viral laisse supposer la présence de sept cadres (ORF) de lecture potentiels codant pour des protéines de plus 5 kDa.

L'isolement de l'ADN viral de cellules infectées avec le CVP a permis de discerner une forme d'ADN double brin. Cet ADN bicaténaire suggère qu'il est l'intermédiaire dans le processus de réplication du génome virale (Tischer et Buhk, 1988). Cette forme est à l'origine de la transcription du gène de l'ORF2, soit la nucléocapside (NC), puisqu'il a été démontré que des séquences de polyadénylation ont été retrouvées sur les deux brins (Meehan *et al.*, 1997), démontrant ainsi un génome ambisens (Figure 3). De plus, les promoteurs P_{rep} et P_{cap} ont été caractérisés. Le P_{rep} a été localisé entre les régions 1627 à 24 nucléotides, au niveau de l'origine de réplication tandis que le P_{cap} a été identifié dans la région située de 556 à 480 nucléotides chez le CVP1 (Mankertz et Hillenbrand, 2002).

L'origine de réplication du CVP1 a été identifiée et localisée dans la région englobant les nucléotides 1715 à 66 (Mankertz *et al.*, 1997). Elle comprend plusieurs motifs dont certains ont une forte homologie avec ceux retrouvés chez les Gémimivirus et les Nanovirus (Mankertz *et al.*, 2000). Elle est caractérisée par une séquence palindromique de 11 nucléotides ainsi qu'une séquence conservée de neuf nucléotides, région d'initiation de la réplication, qui est situé dans la structure en tête d'épingle (Figure 4) (Mankertz *et al.*, 1997; Cheung, 2004a). La tête d'épingle est composée de 12 nucléotides dans le cas du CVP1 mais en contient 10 dans le cas du CVP2 (Cheung, 2004a). Une étude a démontré que la réplication virale est diminuée suite à une mutation au niveau de la tête d'épingle (Cheung, 2004a) et aucune influence au niveau de région palindromique, soit au niveau des séquences donnant la tige de la structure en tête d'épingle (Cheung, 2004b).

La réplication virale se fait par le mécanisme de cercle roulant (Mankertz *et al.*, 1998) via une forme réplivative double brin. Elle est initiée suite à une cassure de l'ADN au niveau de

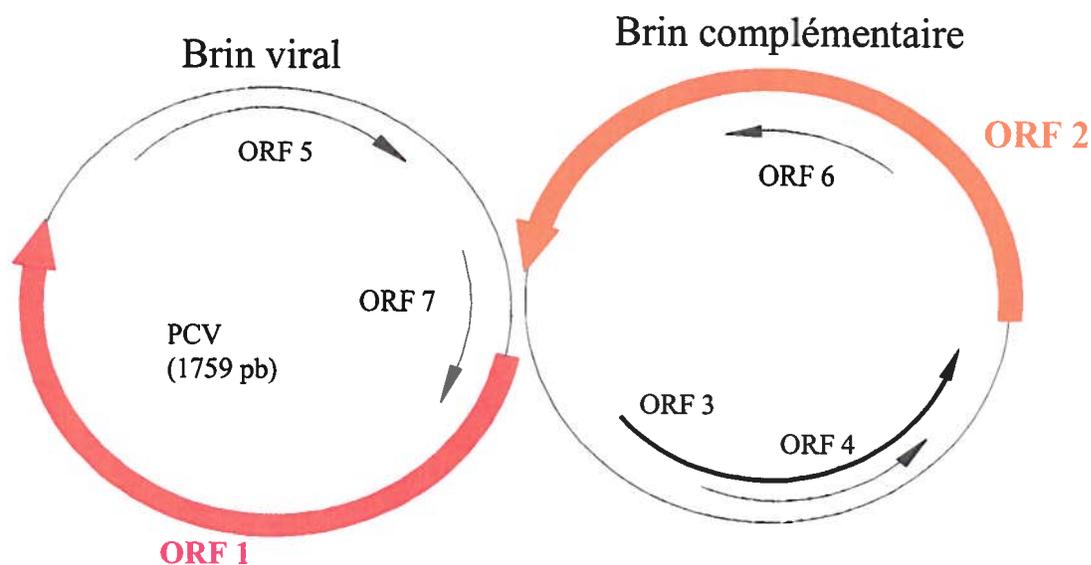


Figure 3 : Organisation génomique du circovirus porcin.

Au niveau du brin viral, il y a l'ORF1, codant pour la réplicase. L'on retrouve aussi les ORF théoriques ORF5 et ORF7. Le brin complémentaire comprend 2 ORF théoriques, l'ORF3 et l'ORF4 et l'ORF2, codant pour la nucléocapside.

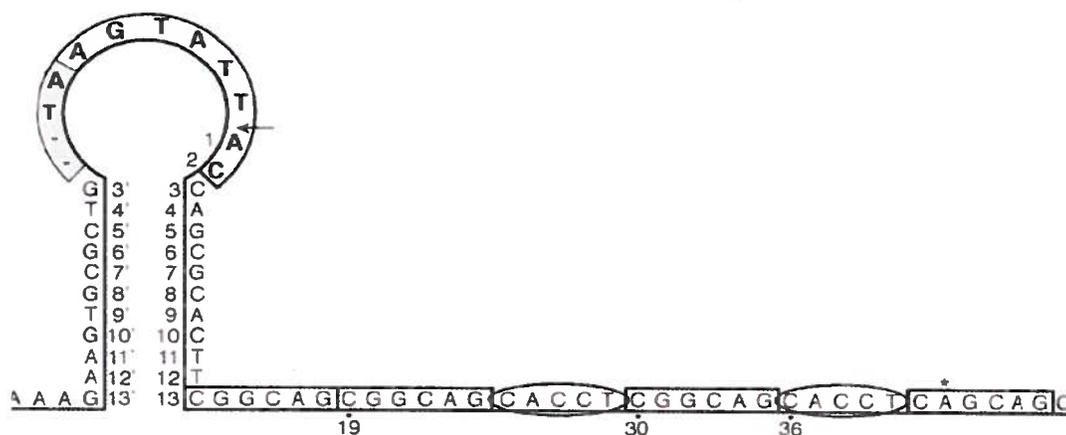


Figure 4 : Schéma de l'organisation de l'origine de réplication du CVP2.

(Extrait de Cheung, 2004).

Ce schéma contient la séquence palindromique de 11 nt (3-13), l'octamère, dans la structure en tête d'épingle (région blanche) et quatre séquences répétées.

l'octamère à l'origine de réplication par la liaison des protéines, *Rep* et *Rep'* (Steinfeldt *et al.*, 2001), codé par l'ORF1. La réplication ne pourra être réalisée que si les deux réplicases sont présentes (Mankertz et Hillenbrand, 2001). Le brin complémentaire nouvellement synthétisé contient le gène codant pour la protéine structurale, la NC.

L'étude de la cinétique de réplication du CVP2 démontre la présence de trois ARNm viraux à partir de 18 heures post-infection. Le transcrit le plus abondant, correspondant à un ARNm de 950 nt, représente la NC, soit l'ORF2. Un ARNm de 750 et 450 nt représentent les réplicases *Rep* et *Rep'*. Ce n'est qu'à partir de 30 heures PI que les premiers virions sont détectés (Cheung et Bolin, 2002).

L'infection de feuillet cellulaire avec le CVP2 n'induit que peu de nouveaux virions, ce qui représente d'ailleurs une des principales difficultés rencontrées non seulement dans la mise au point d'un vaccin contre ce virus, mais également dans les études reliées à ce virus en général. Une raison de ce faible rendement est le fait que le CVP2 soit dépendant du cycle cellulaire, nécessitant la phase S de réplication (Tischer *et al.*, 1987). Le recours à un traitement des lignées cellulaires avec la glucosamine est utilisé afin d'obtenir un meilleur taux de réplication virale (Tischer *et al.*, 1987; Darwich *et al.*, 2004) étant donné que celle-ci favorise l'entrée des cellules en mitose. Après une incubation de 24 heures, le feuillet cellulaire infecté avec le CVP est traité avec la glucosamine pour une durée moyenne de 30 minutes. Cependant, plusieurs ont rapporté que ce traitement semble induire une dégénérescence cellulaire, réduisant ainsi son efficacité (Stevenson *et al.*, 1999; Allan et Ellis, 2000).

1.3.4.3 Protéines virales

Comme nous l'avons brièvement abordé plus tôt, le CVP comporte plusieurs cadres de lecture ouvert (ORF). Une analyse du génome viral démontre qu'il peut y avoir jusqu'à sept ORF codant pour des protéines avec une taille de plus de 5 kDa dans le cas du CVP2 et de huit

pour le CVP1 (Hamel *et al.*, 1998). Parmi tous ces ORF, cependant, on en retrouve deux principaux, soit les ORF1 et ORF2.

L'ORF1 est retrouvé sur le brin viral situé entre les nucléotides 5 à 995 et code pour une protéine de 312 aa d'une masse moléculaire d'environ 36 kDa. La séquence entre les ORF1 du CVP1 et du CVP2 est très similaire, avec un taux d'homologie d'environ 82% (Hamel *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 1998). De plus, une analyse sur des séquences de différentes espèces a démontré une homologie significative avec une protéine impliquée dans la réplication (Rep) chez d'autres virus, dont le *break and feather disease virus* (BFDV) et les géminivirus (Niagro *et al.*, 1998). Cette fonction de l'ORF1 a d'ailleurs été confirmée (Mankertz *et al.*, 1998). Des études sur la transcription du gène ont également révélé une seconde protéine produite suite à un épissage alternatif (Mankertz et Hillenbrand, 2001). Cette protéine serait également essentielle à la réplication du génome viral (Steinfeldt *et al.*, 2001).

Le gène de l'ORF2, quant à lui, est situé entre les nucléotides 1735 à 1034, sur le brin complémentaire. D'une longueur de 702 pb, il code pour une protéine de 233 aa dont la masse moléculaire est d'environ 28 kDa. Malgré la découverte du CVP1 en 1974 (Tischer *et al.*, 1974), la fonction précise de l'ORF2 avait été un mystère jusqu'à tout récemment alors qu'elle a été associée à la protéine structurale, la NC (Nawagitgul *et al.*, 2000a). Avant cette découverte, l'hypothèse était que l'ORF1, suite à un épissage alternatif, produisait la NC (Meehan *et al.*, 1998). Pour déterminer la fonction de l'ORF2, le gène a été amplifié et cloné dans un plasmide afin de construire un baculovirus recombinant exprimant l'ORF2. À partir d'un lysat cellulaire infecté avec le baculovirus recombinant, l'ORF2 a été détecté par immunobuvardage de type Western avec un sérum polyclonal de lapin infecté avec le CVP2. Ce lysat a été soumis à une purification sur gradient de chlorure de césium pour purifier l'ORF2. La visualisation de l'ORF2 révéla alors un auto-assemblage de capsides virales vides (Nawagitgul *et al.*, 2000a). Des études utilisant des anticorps spécifiques contre l'ORF2 sur des cellules infectées avec le CVP2 vinrent confirmer que l'ORF2 code pour la protéine de la NC du CVP2.

Avec la certitude que l'ORF2 code pour la NC, plusieurs recherches ont été menées afin de la caractériser davantage. L'un de ces objectifs de recherche a été de déterminer la localisation de l'ORF2 dans les cellules. Pour y arriver, des études en immunofluorescence utilisant un sérum de lapin immunisé avec l'ORF2 furent réalisées sur des cellules infectées avec le CVP2 et vinrent confirmer que l'ORF2 se retrouve au niveau du noyau cellulaire (Liu *et al.*, 2001). De plus la protéine GFP (protéine fluorescente verte) a été fusionnée à l'ORF2 afin de valider ces observations et de déterminer si une région pouvait contenir un signal de localisation nucléaire. Suite à la transfection avec la protéine complète, la fluorescence a été retrouvée exclusivement dans le noyau, confirmant les résultats précédents. L'utilisation de mutants de délétion a toutefois permis de déterminer que le signal de localisation nucléaire se retrouve à l'intérieur des 41 premiers acides aminés en position N-terminal, laquelle contient plusieurs acides aminés basiques (Liu *et al.*, 2001).

Un autre objectif des recherches sur l'ORF2 a été axé sur l'étude de ses propriétés immunogéniques. Bien que peu d'études aient été réalisées sur la localisation des épitopes immunogéniques, l'une d'entre elle a néanmoins pu comparer les épitopes de l'ORF2 du CVP1 et du CVP2. En utilisant un sérum de porc infecté avec le CVP2, une réaction croisée entre le CVP1 et le CVP2 a pu être observée (Mahe *et al.*, 2000). Une telle réaction croisée au niveau de l'ORF1 du CVP1 et du CVP2 a également pu être observée avec un sérum d'un lapin immunisé avec l'ORF1 du CVP1. Par contre, l'utilisation de sérum spécifique contre l'ORF2 du CVP2 ne semble pas réagir contre l'ORF2 du CVP1. Cette étude a permis d'établir que les épitopes immunogéniques principaux qui distinguent les deux virus sont principalement localisés sur la NC, laissant supposer qu'il y a des différences au niveau de l'ORF2 du CVP1 et du CVP2. La conception de tests de diagnostic par PCR multiplex (Larochelle *et al.*, 1999; Ouardani *et al.*, 1999), ELISA (Walker *et al.*, 2000; Nawagitgul *et al.*, 2002) ou hybridation *in situ* (Nawagitgul *et al.*, 2000b) dans le but de distinguer les deux souches de virus est donc légitime.

Afin d'identifier les épitopes précis que reconnaissent les Ac dirigés contre les ORF2, des analyses par la technique de PEPSCAN, une approche qui consiste à utiliser, sur membrane de nitrocellulose, des peptides correspondant à la séquence en acides aminés de l'ORF2, ont été réalisées. Suite à une incubation avec les Ac spécifiques à l'ORF2 du CVP2, les résultats ont permis d'identifier quatre régions de l'ORF2 du CVP2 réagissant fortement avec ces Ac (Mahe *et al.*, 2000). Ces épitopes sont situés dans les régions suivantes : 25-39 aa, 73-87 aa, 121-147 aa et 169-183 aa. Une seconde étude a démontré, au moyen de la même approche, deux épitopes majeurs, situés dans les régions entre 69-83 aa et 117-131 aa, confirmant ainsi au moins deux régions avec un potentiel immunogénique important (Truong *et al.*, 2001). Cependant, la construction de protéines chimériques résultant du remplacement de la région de l'ORF2 du CVP2 par celle de l'ORF2 du CVP1 a démontré que les Ac reconnaissent principalement des épitopes situés dans les régions 47-63 et 165-200 (Lekcharoensuk *et al.*, 2004). Ces résultats laissent supposer que la conformation de la NC pourrait jouer un rôle important dans l'immunogénéité des épitopes du CVP2 et expliquer les différences observées (Mahe *et al.*, 2000; Lekcharoensuk *et al.*, 2004).

1.4. Hypothèses de travail

Le CVP2 est responsable du syndrome de dépérissement multisystémique post-sevrage des porcs, une maladie caractérisée par une perte de poids progressive, des troubles respiratoires, et de la jaunisse, et qui affecte présentement les porcs de la plupart des pays producteurs. Notre hypothèse est que la construction d'un vecteur adénoviral recombinant contenant l'ORF2 du CVP2 a le potentiel d'induire une réponse immunitaire protectrice contre le CVP2. Pour ce faire, nous devons 1) produire le vecteur de transfert contenant l'ORF2 du CVP2; 2) démontrer l'expression *in vitro* de l'ORF2 à partir du vecteur dans une lignée cellulaire ; 3) générer un adénovirus recombinant contenant l'ORF2 (hAd-ORF2) et le purifier ; 4) vérifier l'intégrité de hAd-ORF2 au niveau de la séquence nucléotidique ; 5) produire un stock de travail de hAd-ORF2 ; et 6) déterminer le potentiel immunogénique chez la souris.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1 Cultures cellulaires

2.1.1 Lignées cellulaires

La lignée cellulaire de rein de porc PK-15A (PKA) a été obtenue du Dr A. Afshar (Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada, Nepean, Ontario, Canada). Cette lignée a comme caractéristique première d'être exempte de circovirus porcin de type 1 (CVP1) (Dulac et Afshar, 1989). Les lignées cellulaires de rein embryonnaire humaine 293 et 293/CymR ont été obtenues du Dr Bernard Massie de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB) (Conseil National de la recherche du Canada, Montréal, Québec, Canada). La lignée 293 contient dans son génome le gène E1 de l'adénovirus humain de type 5 (Graham *et al.*, 1977). Elle peut donc être infectée efficacement par les adénovirus humain de type 1, 2, 5 et 7. La lignée cellulaire 293/CymR exprime le CymR, un répresseur puisqu'il se fixe à l'opérateur cumate et empêche de ce fait la transcription du transgène (Eaton, 1997).

2.1.2 Passages cellulaires

Les lignées cellulaires PKA et 293 ont été maintenues de façon routinière par passages cellulaires selon les techniques standards dans des flacons de cultures cellulaires de 75 ou 150 cm² (Corning) en utilisant une concentration de 100 000 cellules/mL pour l'ensemencement et un milieu minimal essentiel contenant une base de Earle (MEM-Earle) (Gibco-BRL, Mississauga, ON, Canada) pour les cellules PKA et de DMEM pour les cellules 293. Les milieux de cultures ont été supplémentés de 1% de L-glutamine (Gibco-BRL) et 5% de sérum fœtal bovin (SFB, Gibco-BRL) en plus de 1% de pyruvate de sodium (Gibco-BRL) dans le cas des cellules PKA. Les passages ont été effectués lorsque les feuillets cellulaires avaient atteint

une confluence de plus de 90 % en utilisant une solution de trypsine (0,25%)/EDTA (0.04 % ; acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA ; Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, É-U). Les cultures cellulaires ont été maintenues à une température de 37°C avec un environnement de 5% en dioxyde de carbone.

2.2 Clonage de l'ORF2 du CVP2

L'ORF2 du CVP2 utilisé lors de la production du vecteur de transfert provient du vecteur pCEP5-6H-ORF2 généré dans notre laboratoire (Racine *et al.*, 2004). Cet ORF2 provient de la souche IAF-2897 isolé à partir de jeunes porcelets de fermes du Québec et présentant des symptômes caractéristiques du syndrome de dépérissement multisystémique en postsevrage (SDMPS). Le génome de cet isolat a été entièrement séquencé par le groupe du Dr Dea (GenBank No d'accès AF408635). Pour le sous-clonage, la souche *Escherichia coli* DH5 α fut transformée avec 1 μ L de ce vecteur et ensemencé sur un pétri contenant du milieu LB gélifié avec de l'agar à 1.5 % (Fisher, NJ, É-U) supplémenté d'ampicilline à une concentration de 100 μ g/mL. Une colonie positive a été sélectionnée et ensemencée dans 3 mL de milieu liquide 2x YT avec ampicilline à 37°C toute la nuit. Par la suite, 750 μ L de cette culture a été mélangé avec du DMSO (Fisher) pour conserver ce clone bactérien au congélateur et les 2.25 mL restant ont été utilisés pour inoculer 150 mL de milieu 2x YT avec ampicilline 37°C toute la nuit. Cette culture a été centrifugée à 4 000 g pour 15 minutes à 4°C afin de récupérer les bactéries. Le plasmide a été purifié par la méthode de lyse alcaline standard. Après dosage, 10 μ L du plasmide a été digéré avec deux unités d'enzyme de restriction BamHI (NEB) pour une durée de quatre heures afin de récupérer la région codante pour l'ORF2. La réaction de digestion a été visualisée sur gel d'agarose 1% (Boehringer Mannheim, PQ) préalablement préparé dans une solution de TAE 1x (40 mM Tris base, 2 mM EDTA, 1.15 mL acide acétique) dont était ajouté 40 μ L d'une solution de 100 μ g/mL de bromure d'éthidium et la séquence de l'ORF2 a été purifiée avec l'aide

de la trousse QIAEX II (Qiagen, ON) selon le protocole du manufacturier. L'ADN a été resuspendu dans un volume de 15 μ L d'eau distillé stérile.

2.3 Plasmide recombinant pAdCMV5P2DC/GFPq/K7PSmlp-ORF2

2.3.1 Amplification du vecteur pAdCMV5P2DC/GFPq/K7PSmlp et sous-clonage de l'ORF2

Le vecteur plasmidique pAdCMV5P2DC/GFPq/K7PSmlp a été obtenu du Dr Bernard Massie et amplifié tel que décrit ci-haut en utilisant la souche *Escherichia coli* DH5 α . Le vecteur plasmidique a été digéré avec une unité d'enzyme de restriction BglII pendant deux heures suivi d'une précipitation à l'isopropanol. Le plasmide linéarisé a été resuspendu dans 20 μ L d'eau. Ce plasmide ainsi que l'ORF2 digéré (voir section 2.2) ont ensuite été dosés par électrophorèse sur gel d'agarose par comparaison de l'intensité des fragments d'ADN du marqueur de poids moléculaire « High DNA Mass Ladder » et « Low DNA Mass Ladder » (Gibco, Invitrogen) respectivement. Suite à cette estimation, un ratio de 1 : 3 (vecteur / insert) a été réalisé pour permettre la ligation de l'ORF2 dans le vecteur. Dans un volume final de 20 μ L comprenant les ADN, 2 μ L de tampon 10X OPA, 2 μ L de 10 mM ATP (Invitrogen) et 1 U de T4 ADN ligase (NEB). Ce mélange a été incubé à 16°C pendant 16 h.

Suite à la ligation, 10 μ L de la réaction de ligation a été utilisé pour transformer 50 μ L de bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5 α en utilisant la méthode standard de choc thermique décrite ci-haut. Les résistantes à l'ampicilline ont été criblées pour la présence de l'ORF2 par PCR. Pour ce faire, des colonies ont été piquées avec un embout stérile et diluées dans 25 μ L d'eau stérile. Cette solution a également servi à strier un pétri contenant du milieu LB gélifié avec 100 μ g/mL d'ampicilline. Pour le PCR, une amorce sens retrouvée à l'intérieur du vecteur dans la région « *Enhancer* » (5'-GAGTACTCCCTCTCAAAAGCG-3') et une

amorce anti-sens spécifique pour l'extrémité C-terminale du gène de l'ORF2 (F2C-R ; 5'-CGCCGCGGATCCGCGCCCAAGCTTGGGTAGGGTTAAGTGGGGGGT-3') ont été utilisées. L'utilisation de ces amorces ne permet une amplification que dans le cas où le gène de l'ORF2 est inséré dans la bonne orientation. Un volume de 5 μ L de la suspension bactérienne, préalablement incubée à 95°C pendant 4 minutes, a été utilisée pour la réaction de PCR dans un volume final de 20 μ L contenant 20 pmoles de chacune des amorces, le tampon PCR (1X), 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M d'oligonucléotides et 2 U de Taq polymérase (Invitrogen). Les conditions d'amplification utilisées ont été d'une incubation de 5 min (dénaturation) à 95°C suivie de 34 cycles à 95°C pendant une minute ; à 56°C pour 30 secondes et à 72°C pendant une minute. Une dernière étape d'élongation pour 10 minutes à 72°C termine la réaction. Par la suite, l'analyse d'amplicons s'est effectuée sur gel d'agarose 1% en utilisant 15 μ L de la réaction de PCR.

2.3.2 Purification de l'ADN recombinant

À partir de la striation, les clones positifs ont été mis en culture dans 150 mL de milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline pendant 16 h à 37°C. L'ADN recombinant a ensuite été extrait de la culture bactérienne par la technique de lyse alcaline selon les techniques habituelles. L'ADN a ensuite été purifié par extraction au phénol/chloroforme et par précipitation avec l'isopropanol en présence d'acétate d'ammonium, puis rincé avec une solution d'éthanol 70%. L'ADN recombinant a finalement été suspendu dans 100 μ L d'eau stérile.

2.3.3 Expression transitoire du plasmide recombinant dans les cellules 293

Des feuilletts confluents de cellules 293 (40 000 cellules/puits) préparés dans des plaques de 96 puits ou des pétris de 60 mm² de diamètres (10⁶ cellules/pétri) avec du milieu minimal essentiel (DMEM) contenant 5% de sérum et 1% L-glutamine ont été préparé 24 heures avant la transfection. Les cellules ont ensuite été transfectées gouttes à gouttes avec 20 μ L d'un mélange d'ADN et de polyéthylèneimine (PEI) linéaire de 25 kDa (PolyScience, Niles, IL, É-U) dans le

cas des plateaux de 96 puits et de 100 μL pour un pétri de 60 mm^2 . Les différents mélanges contenaient entre 0.5 et 4 μg d'ADN plasmidique recombinant et 0.5 et 4 μg de PEI. Après 72 heures, le taux de transfection a été analysé par microscopie à fluorescence en prenant avantage de la présence du gène GFP dans l'ADN recombinant. Les plateaux de 96 puits ont été utilisés afin de déterminer les conditions optimales pour les expériences à plus grandes échelles dans les pétris de 60 mm^2 dans le cadre des infections transitoires. Dans ce cas, en utilisant les mêmes conditions que décrites ci-haut, des pétris de 60 mm^2 de cellules 293 ont été transfectées et après trois jours d'incubation, les cellules ont été lysées avec un ml de tampon de lyse (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5% Nonidet P-40 (NP-40), 2.5% sodium deoxycholate, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)) contenant l'antiprotéase PEFABLOC (Roche) à une concentration finale de 0.5 mg/mL. Les lysats ont ensuite été analysés par immunobuvardage de type Western afin de déterminer la présence du produit de l'expression de l'ORF2 au niveau protéique.

2.3.4 Immunobuvardage de type Western

La séparation des protéines a été faite avec un gel de séparation de polyacrylamide 12% et un gel de concentration de 5% en utilisant le système d'électrophorèse « MINI PROTEAN II » (Bio-Rad, ON) par SDS-PAGE. Une fois l'acrylamide polymérisé, un échantillon de 40 μL des lysats cellulaires a été dénaturé à 90°C pour une durée maximale de cinq minutes en présence du tampon de chargement. L'électrophorèse des échantillons a été réalisée à 120 V pour une durée approximative de 2 heures 30 minutes. Comme marqueur de poids moléculaire, le marqueur à double couleur («dual color») a été utilisé selon les recommandations du manufacturier (Bio-Rad).

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) en utilisant l'appareil 'Trans Blot Cell' (Bio-Rad) dans un tampon Tris contenant 20% éthanol et 0.02% SDS. Les membranes ont été incubées dans une solution de blocage (PBS, 0.05% Tween

20, 4% lait écrémé) pour une durée minimum de 2 heures à température pièce ou toute la nuit à 4°C, puis avec les sérums expérimentaux ou témoins. Un sérum de porc infecté expérimentalement avec le CVP2 (157J74) et un sérum de porc négatif pour le CVP2 provenant d'une expérience antérieure sur le virus du SRRP, dilués 1 : 200 dans la solution de blocage, ont notamment été utilisés pour ces expériences. Après une incubation de 1,5 heure en présence de ces sérums, les membranes ont été lavées trois fois avec la solution de lavage (PBS, 0.05% Tween 20) (5min/lavage), puis incubées 1 heure avec une solution contenant un anticorps spécifique contre les IgG porcine (Sigma) conjugué à la peroxydase (POD) dilué 1 : 1500. Après trois lavages de cinq minutes chacun avec la solution de lavage et un avec du PBS, la présence de protéine a été détectée soit avec le 4-chloro-1-naphtol (Sigma) ou en utilisant le kit « ECL Plus Western Blotting Detection Reagents » (Amersham Bioscience). Dans le premier cas, cela consistait à ajouter de la solution de révélation (80% PBS, 20% 4-chloro-1-naphtol, 0.67% peroxyde d'hydrogène 3%) afin de produire un précipité visible par dégradation du chloro-naphtol par la peroxydase. Cette réaction était arrêtée par un lavage avec de l'eau distillée. La seconde technique, plus sensible, consistait en la production d'éther d'acridinium, qui produit une chemiluminescence détectable sur pellicule photosensible (Kodak). Suite à une incubation de cinq min avec 400 µL de la solution de révélation, préparée selon les directives du manufacturier, les membranes étaient mises dans une cassette pour exposition. Le temps d'exposition variait entre 30 secondes et 5 minutes.

2.4 Production de l'adénovirus recombinant pour l'ORF2

2.4.1 Construction de l'adénovirus recombinant pour l'ORF2

Un adénovirus recombinant a été généré suite à une recombinaison homologue *in vitro* entre le plasmide recombinant linéarisé (pAdCMV5P2DC/GFPq/K7PSmlp-ORF2) et l'ADN de l'adénovirus humain de type 5 (hAd) déficient pour les gènes E1, E3 et la protéase (PS) dans les cellules 293. Pour ce faire, 10 µg de l'ADN plasmidique recombinant pour l'ORF2 a été

linéarisé avec l'enzyme de restriction Pac I et purifié sur gel d'agarose 1% en utilisant la trousse commerciale QIAEX II (Qiagen, ON). Les transfections ont été réalisées selon la technique décrite précédemment à la section 2.3.3 en utilisant 3 μL d'ADN plasmidique recombinant linéarisé sur des cellules 293 mises en culture dans un pétri de 60 mm 24 h avant la transfection. Suite à cette transfection, une infection a été réalisée avec l'hAd déféctif avec un MOI de un.

Après une incubation de quatre jours à 37°C, trois cycles de gel-dégel ont été effectués, puis le surnageant a été centrifugé à 2 000 g pour cinq minutes à 4°C. L'infection de cellules 293 dans des plateaux de six puits a été fait avec 1 mL des dilutions de 10^{-1} à 10^{-5} . Après six heures, le milieu a été retiré et remplacé par du milieu préalablement chauffé à 37°C pour ensuite être recouvert de milieu DMEM complet contenant de l'agarose SeaPlaque (BMA, ME, É-U). Environ deux semaines plus tard, les virus recombinant étaient identifiables par les foyers fluorescents et par plage de lyses.

2.4.2 Sélection d'adénovirus recombinant

Les plages de lyses contenant l'hAd-ORF2 ont été identifiées par la présence de foyer de fluorescence induit par l'expression de la GFP. Différents foyers fluorescents isolés ont été récupérés par aspiration pour poursuivre la purification de notre virus recombinant. Les mêmes étapes décrites au point 2.4.1 ont été alors utilisées. De plus, un aliquot de 100 μL a été utilisé pour infecter un puit sur une plaque de 24 puits contenant des cellules 293 afin d'amplifier le virus. Le surnageant des amplifications des virus sur 24 puits était utilisé afin de déterminer, par PCR, la présence de l'insert. Pour ce faire, les amorces sens (Enh) et anti-sens (F2C-R) ont été utilisées. L'analyse par PCR s'est faite tel que décrit précédemment. Ces étapes ont été répétées 5 fois afin d'obtenir un hAd-ORF2 purifié. Cette hAd-ORF2 est dit non répliatif par le fait que le gène E1, essentiel pour la répliation viral, est délété.

2.4.3 Production d'un stock d'adénovirus recombinant

2.4.3.1 Amplification du virus recombinant

Après avoir confirmé l'obtention d'un adénovirus recombinant pour l'ORF2 pure, l'étape de production à grande échelle a été entreprise. Des cellules 293 à confluence d'environ 85% cultivées dans un flacon de culture de 75 cm² ont été infectées avec l'éluat viral pure et incubées à 37°C. Lorsque les dommages au feuillet cellulaires suites aux effets cytopathiques ont atteints un niveau approximatif de 90%, trois cycles de gel/dégel ont été réalisés et une autre culture cellulaire dans un second flacon de 75 cm² a été réalisée dans les mêmes conditions. Les deux surnageants ont été mis en commun et la solution virale a été clarifiée par centrifugation à 2 000 g pendant 5 minutes à une température de 4°C. Par la suite, 25 flacons de 150 cm² contenant des feuillets de cellules 293 ont été infectés avec 1 mL de la suspension virale clarifiée et utilisée pour la production de nouveaux stocks tel que décrits ci-haut.

Suite à la production de grande quantité d'hAd-ORF2, celui-ci a été purifié par ultracentrifugation sur gradient continu et discontinu de chlorure de césium (ICN, OH, É-U). Pour ce faire, des solutions de CsCl de densité de 1.2 et 1.4 ont été préparées dans une solution de Tris-HCl (pH 7.9). Premièrement, une première ultracentrifugation isopycnique du surnageant à 100 000 g pour une durée chacune de 90 minutes à 4°C a été faite avec un gradient discontinue 1.2-1.4 de CsCl en utilisant des tubes de cellulose nitrate (Beckman) avec le rotor SW25.1. Deux bandes ont été observées, l'une correspondant à l'hAd-ORF2 viable et la seconde à des particules virales défectives. La bande correspondant à l'hAd-ORF2 a été extraite (bande du bas) par fraction d'environ 2 mL avec une seringue et une aiguille de 25G. Les extrait viraux ont été mis en commun et avant la seconde étape de purification par gradient continue, un ajout de Tris-HCl stérile a été réalisé afin de diminuer la densité du mélange afin de produire un gradient continu de CsCl. Le virus a été ultracentrifugé et récupéré selon les mêmes conditions et procédures que précédemment. La fraction a été dialysée toute la nuit à 4°C dans 1 L de tampon

PBS, suivi d'une dialyse dans le TNE à 4°C pour 2heures. L'hAd-ORF2 a été aliquoté et mis au congélateur à -80°C.

2.4.3.2 Séquençage de l'ORF2 de l'hAd-ORF2

L'intégrité de l'ORF2 du virus recombinant a été confirmée par séquençage. Pour ce faire, une amplification par PCR sur l'hAd-ORF2 a été réalisée en utilisant la polymérase Vent (Invitrogen). Les conditions de PCR ont été les mêmes que celles décrites dans la section 2.3.1 sauf que le tampon $MgCl_2$ a été remplacé par un tampon contenant du $MgSO_4$. Le fragment d'ADN a été purifié à partir d'un gel d'agarose en utilisant le kit QIAEX II. Les amorces 6HF2 n1 et F2C-R ont été utilisées pour isoler la séquence. L'analyse de celle-ci a été réalisée avec le programme 'BLAST' sur le site web NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.4.3.3 Titrage

Le titrage a été fait sur des cellules 293 par la technique de TCID₅₀ dans un plateau de 96 puits. Pour ce faire, les cellules ont été infectées avec une dilution de 10^{-3} à 10^{-10} , puis incubées à 37°C pour une période maximal de 28 jours. Un examen périodique des cultures pour la présence de fluorescence et d'effets cytopathiques a été réalisé. Le titre viral a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$TCID_{50} = (-\Delta) - \delta (\partial * 0.5)$$

où

Δ représente le log en base 10 de la dernière dilution montrant 100% d'effets cytopathiques.

δ représente le log en base 10 du facteur de dilution.

∂ représente la somme des puits dégénérés (0.1 par puits), incluant les puits où il y a 100% d'effets cytopathiques.

2.5 CVP2

2.5.1 Amplification du CVP2

Puisque le virus ne se réplique pas à haut titre, les cellules PKA ont été infectées avec un surnageant d'une infection préalable au CVP2 à une confluence d'environ 40%. Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% CO₂ jusqu'à confluence du feuillet cellulaire. Le milieu a été conservé et le feuillet cellulaire a été trypsiné avec 1.5 mL de la solution pour ensuite être réensemencé dans cinq pétris de 150 cm². Lorsque le feuillet cellulaire a atteint confluence, un flacon 150 cm² a été trypsiné avec 1.5 mL de la solution pour ensuite êtreensemencé dans cinq autres flacons de 150 cm²; les quatre autres étant conservés au congélateur à -80°C. Lors de cette dernière incubation, tous les flacons ont subi 3 cycles de gel/dégel et les surnageants ont été centrifugés à 2 000 g afin de les clarifier. Une ultracentrifugation à 100 000 g pour une durée de 6 heures sur coussin de sucrose a été faite afin d'obtenir une préparation virale semi-purifiée.

2.5.2 Titrage

Le titrage du CVP2 a été fait par infection de cellules PKA. Pour ce faire, un plateau de 96 puits contenant des cellules PKA à confluence de 30 % a été infecté avec le virus CVP2. Suite à une incubation d'une semaine à 37°C, le surnageant a été retiré et les cellules ont été fixées avec une solution de 80 % (v/v) d'acétone pour 30 minutes. Par la suite, le plateau a été sous une hotte chimique afin d'évaporer toute trace d'acétone et un test d'immunofluorescence indirect a été réalisé afin de déterminer le titre par moyen de foyers fluorescents. Brièvement, le feuillet cellulaire a été réhydraté avec une solution de 0.05% (v/v) Tween 20 dans du PBS (PBS-T) pour 10 minutes et une dilution de 1: 500 du sérum de porc anti-CVP2 (157 j74) a été incubée pour 90 minutes à 37°C. Après trois lavages avec le PBS-T, une seconde incubation de 60 minutes a été réalisée avec une dilution de 1: 1500 avec un anticorps anti-IgG de porc conjugué à la FITC, suivi par trois lavages avec le PBS-T. L'analyse a été faite avec un microscope à fluorescence (Leitz).

2.6 Immunisation et test de détection des anticorps

2.6.1 Immunisation chez la souris

L'expression et l'efficacité de l'hAd-ORF2 à induire une réponse humorale spécifique contre l'ORF2 ont été vérifiées suite à une immunisation chez la souris CD1. Pour ce faire, 21 souris ont été divisées en 4 groupes, soit 5 souris : (A) immunisées avec l'hAd-ORF2 ; (B) immunisées avec l'hAd-témoin ; (C) infectées avec le CVP2 IAF-2897 et ; (D) 6 témoins injectées avec la solution TNE. Toutes les préparations virales ont été supplémentées avec l'adjuvant SP1017, un composé non ionique fait à base de deux polymères amphiphilique (L61 et F127) (Lemieux *et al.*, 2000). Les souris des groupes A et B ont été immunisées avec une dose 10^8 TCID₅₀ et les souris du groupe C ont été infectées avec une dose de 10^4 TCID₅₀ par voie sous-cutanée. Environ 200 µL de sang ont été prélevés à partir de la veine faciale toutes les semaines pendant 4 semaines. Une dose de rappel de 10^8 TCID₅₀ par voie intra-péritonéale a été administrée au jour 40 post-infection (PI) pour les groupes A et B seulement. Suite au rappel, un prélèvement sanguin d'environ 200 µL a été fait à 7, 14 et 21 jours après le rappel, soit j47, 54 et 61 PI. Les souris ont été sacrifiées et exsanguinées au jour 68 PI.

2.6.2 Immunofluorescence indirect

Afin de détecter la présence d'Ac anti-ORF2 dans le sérum des souris, des plateaux de 96 puits ont été transfectés avec le plasmide pCEP5-6H-ORF2, suivant la même procédure décrite à la section 2.3.3 et les conditions optimales pour une technique d'immunofluorescence indirecte utilisant un sérum de porc infecté expérimentalement avec le CVP2 ont été mises au point. Cette technique est plus sensible que le test traditionnel, soit sur des cellules infectées avec le CVP2 (Racine *et al.*, 2004). Plusieurs plateaux de cellules 293 ont été transfectés et fixés avec une solution de 80% d'acétone. Avec ces plateaux, nous avons utilisé l'immunofluorescence indirecte afin de détecter la présence d'Ac anti-ORF2 dans le sérum des souris. Pour ce faire, les feuillets cellulaires ont été réhydratés avec une solution de 0.05 % (v/v) PBS-T-20 pendant 10

minutes et le feuillet cellulaire a été incubé pendant 90 minutes avec les sérums de souris prélevés à différent temps (J0, 7, 14, 21, 28, 47, 54, 61 PI) dilué 1 : 50. Le feuillet cellulaire était ensuite incubé pour une heure avec une dilution de 1 : 1500 d'Ac anti-IgG de souris préalablement lavé trois fois avec du 0.05 % PBS-T-20. Enfin, trois lavages ont été réalisés avec une solution de 0.05 % PBS-T-20 et de PBS. Les résultats ont été analysés avec un microscope à fluorescence (Leitz). Le titrage des sérums aux jours 28, 47 et 61 des groupes A, B et C a été réalisé en utilisant la même technique.

Chapitre 3

Résultats

3.1 Amplification de l'ORF2 du CVP2

L'ORF2 du circovirus porcin de type 2 de la souche IAF-2897 a été amplifié par PCR avec l'aide des oligonucléotides spécifiques 6H-F2 no.1 et F2 (Racine *et al.*, 2004) puis inséré dans le vecteur d'expression pCEP5 (Figure 5) par les méthodes standards. Une séquence étiquette composée de six histidines (His-tag) a été insérée dans la partie N-terminal de l'ORF2. L'intégrité fonctionnelle de l'ORF2 a ensuite été vérifiée en mesurant l'expression de la protéine

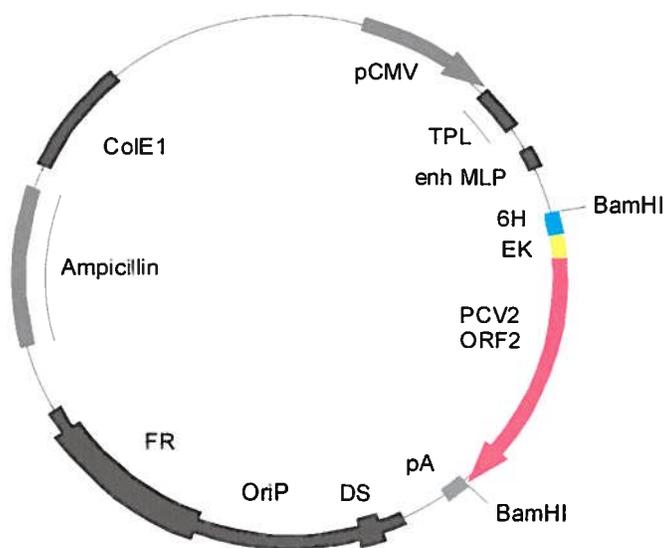


Figure 5 : Cartographie du vecteur d'expression pCEP5-6H-ORF2.

Ce plasmide contient le promoteur fort CMV ainsi que les régions enh MLP (région « enhancer » et le « major late promoter »), où notre amorce 5' se fixe. Un gène de résistance à l'ampicilline est retrouvé comme gène de sélection. L'ORF2 a été inséré au site de clonage BamH I.

immunofluorescence indirect sur des cellules 293. L'intégrité du vecteur a également été vérifiée par séquençage nucléotidique.

Le plasmide a ensuite été amplifié dans *Escherichia coli* DH5 α . Après purification du plasmide par la méthode standard de lyse alcaline, l'ADN plasmidique a été digéré avec l'enzyme de restriction BamHI afin de vérifier l'intégrité l'ORF2. Le fragment d'une taille de 760 pb observé sur gel d'agarose correspond à la taille attendue de l'ORF2 (Figure 6).

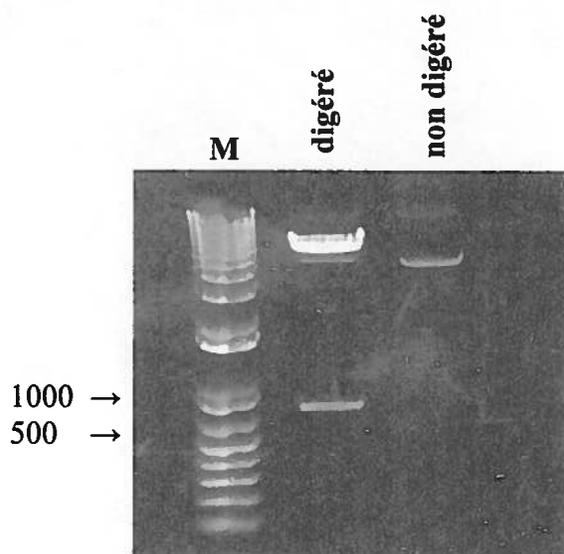


Figure 6 : Clonage de l'ORF2 du circovirus porcin dans le vecteur pCEP-5-6H. Profil électrophorétique sur gel d'agarose mettant en évidence l'insertion de l'ORF2 suite à la digestion du vecteur de la digestion du plasmide pCEP-5-6H-ORF2 par l'enzyme de restriction BamHI. M : marqueur de poids moléculaire.

3.2 Production du plasmide recombinant pAdCMV5-P2DC GFPq/K7PSmlp/ORF2

Dans l'instance de produire un plasmide recombinant adénoviral, nous avons linéarisé le plasmide pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp (Figure 7) avec l'enzyme de restriction Bgl II,

(dont les extrémités de digestion produites sont compatibles avec celles produites par l'enzyme BamHI) et insérés l'ORF2 porcine extrait par digestion avec BAMHI de pCEP5-6H-ORF2. Le plasmide recombinant contient une origine de réplication (ORI) et un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection positive lors de l'amplification chez les bactéries. Il contient aussi une séquence de l'adénovirus humain de type 5 permettant la recombinaison avec l'ADN viral. De plus, il contient un gène reporteur, soit la GFP. Cependant notre insert et la GFP sont transcrits sur un même ARNm et qu'un site d'entrée interne au ribosome (IRES) y est présent

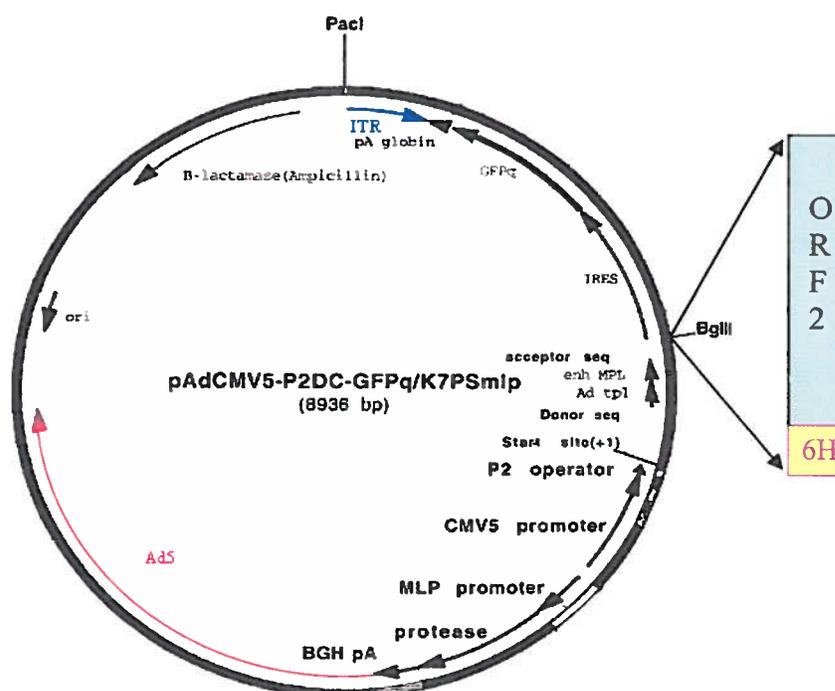


Figure 7 : Cartographie du plasmide pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp.

L'ORF2 est inséré au site de digestion Bgl II. Le plasmide contient un promoteur fort, le CVM5 ainsi que la région « Enhancer » et le « Major late promoter ». En rouge, la région homologue de l'hAd et en bleu, la séquence terminale inversée répétée. L'ARNm sera bicistronique et la GFPq sera traduite via le site d'entrée interne du ribosome (IRES). Il contient la protéase de l'hAd.

pour la traduction de la GFP. L'expression de cette cassette est sous le contrôle d'un promoteur fort, soit le CVM5 ainsi que de l'opérateur *cumate*, une région dont le CymR se fixe pour inhiber la transcription. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries compétentes *E. coli* DH5 α et les différents clones ont été criblés par PCR. La présence d'un fragment de 910 bp suite à une analyse par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour les régions « enhancer » (*Enh*) situé dans l'extrémité 5' du vecteur adénovirus et dans la région C-terminal du gène de l'ORF2 a permis de confirmer que notre insert était correctement inséré (Figure 8). Nos résultats ont démontré que parmi les 14 clones bactériens analysés, un de ceux-ci contenait correctement inséré l'ORF2 dans l'orientation désirée (clone No. 10). À partir de ces résultats, nous avons utilisé le clone 10 pour la poursuite de nos expériences visant à construire l'adénovirus recombinant contenant l'ORF2 porcin.

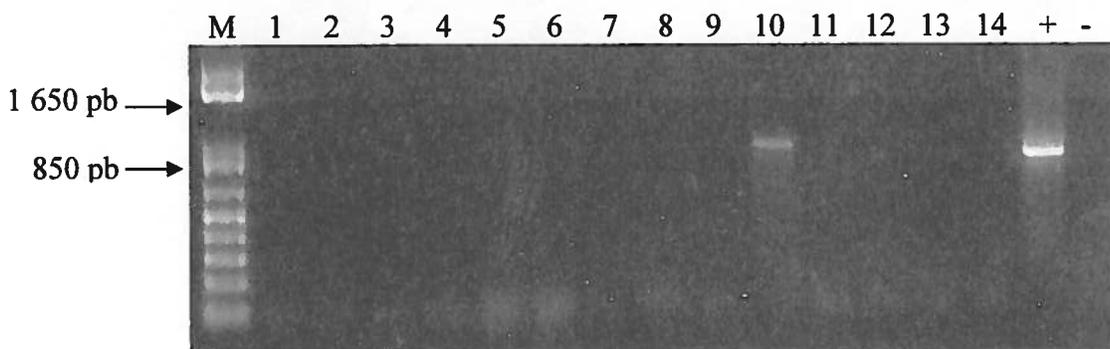


Figure 8 : Criblage par PCR sur différentes colonies démontrant la présence ainsi que l'orientation de l'ORF2 dans le pADCMV5P2DCGFPq/K7PSmlp -ORF2. Quatorze clones bactériens ont été analysés par PCR (colonne 1 à 14). Le témoin positif est le plasmide témoin contenant la région « Enhancer » et l'ORF2 (+). Le témoin négatif est constitué de la réaction de PCR sans ADN (-). M; Marqueur moléculaire.

Afin de valider l'intégrité fonctionnelle de ce nouveau plasmide, une transfection transitoire a été réalisée dans des cellules HEK 293 en utilisant 1.5 μg d'ADN et de 2 μg de PEI. L'analyse de l'expression de la protéine virale a été analysée trois jours post-transfection par immunobuvardage avec un sérum de porc infecté expérimentalement avec la souche CVP2 IAF-2897 (sérum 157-J74). Nos résultats ont démontré que la transfection de ce plasmide dans les

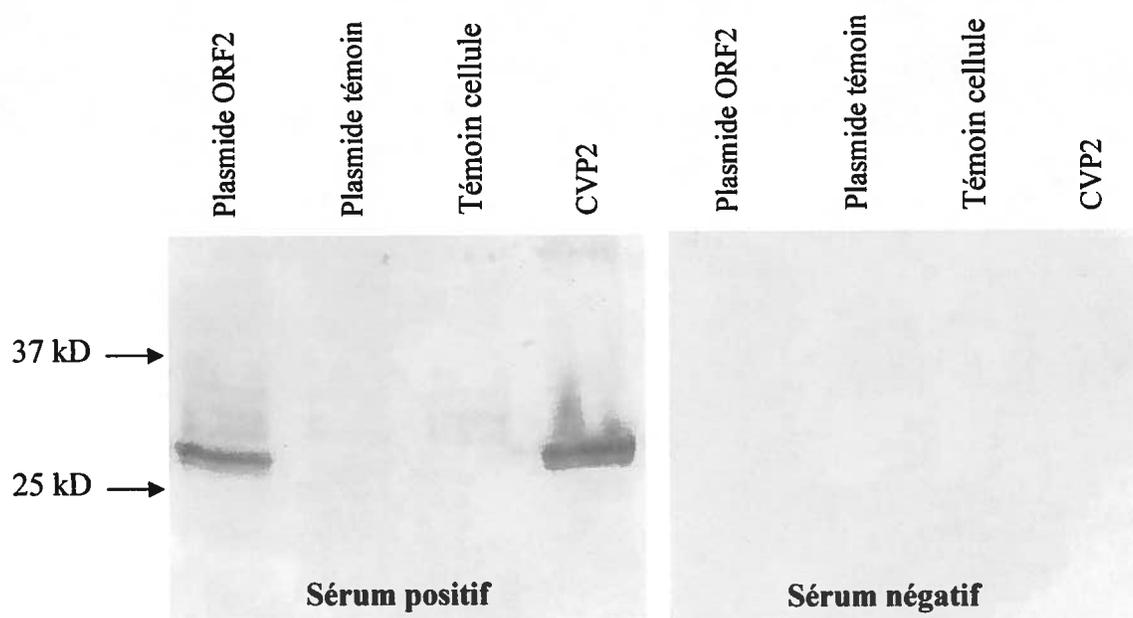


Figure 9 : Expression transitoire de l'ORF2 dans les cellules 293A transfectées avec le plasmide recombinant pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp/ORF2 par immuno-buvardage. Des cellules 293 non transfectées soit avec le pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp/ORF2 ou le pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp ou non ont été lysées. Le sérum positif utilisé est le sérum de porc no 157 j74 (porc infecté expérimentalement avec la souche CVP2 IAF-2897) et le sérum négatif est le sérum de porc 2682 (porc témoin d'une expérience de 1997).

cellules HEK293 induit l'expression d'une protéine de 32 kDa qui se lie de façon spécifique avec ce sérum (Figure 9). Aucune liaison non-spécifique n'apparaît avec le sérum témoin ou encore avec les cellules HEK293 transfectées avec le plasmide témoin ou les cellules non-transfectées. D'autre part, une bande d'environ 30 kDa réagit avec le témoin positif constitué d'une préparation virale de CVP2; cette différence de masse moléculaire s'explique par l'ajout de 6 molécules d'histidine dans la portion N-terminal de l'ORF2 lors de l'étape initiale du clonage, tel que décrit précédemment. Suite à ce résultat, nous avons poursuivi notre expérience en utilisant ce nouveau plasmide pour la construction du vecteur adénoviral recombinant contenant l'ORF2 porcin.

3.3 Expression de l'ORF2 à partir d'un vecteur adénoviral recombinant

À cause entre autre de ses propriétés biologiques et de sa faible pathogénicité, l'adénovirus humain de type 5 représente un excellent vecteur viral pour l'expression de protéines exogènes dans un contexte vaccinale ou de thérapie génique. Afin d'obtenir un vaccin contre le CVP2 porcin, nous avons utilisé cet adénovirus portant une délétion pour les gènes E1, E3 et PS et dans lequel nous avons inséré l'ORF2 codant pour la nucléocapside du CVP2. La propriété de ce vecteur est qu'il est non répliatif suite à la délétion du gène E1. Ce virus se réplique donc seulement dans la ligné cellulaire 293 car celle-ci exprime de façon constitutif le gène E1. L'insertion du gène de l'ORF2 s'est effectuée par la méthode standard de recombinaison d'une forme linéarisée du plasmide recombinant pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp/ORF2 transfectée dans les cellules 293 CymR infectées avec l'adénovirus humain de type 5. La production du virus recombinant a été analysée trois jours post-transfection. Pour ce faire, trois cycles gel/dégel ont été effectués pour promouvoir la libération de particules virales; le surnageant contient donc théoriquement deux types de virus, soit le virus parental et le virus recombinant contenant l'ORF2. Afin de purifier l'adénovirus recombinant, les cellules 293 ont donc été infectées avec dilutions de surnageant afin d'obtenir des plages de lyses isolées exprimant la GFP. Pour les trois premières rondes de purification, nous avons obtenu certaines plages non positives, c'est-à-dire n'exprimant pas la GFP. Après cinq rondes

de purification, toutefois, toutes les plages de lyses étaient positives (Figure 10). Six plages de lyses retenues lors des différentes étapes de purification ont ensuite été analysées par PCR afin de confirmer la présence de l'ORF2. La présence d'un fragment de 910 pb suite à une analyse par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour les régions « enhancer » (Enh) situé dans l'extrémité 5' du vecteur adénovirus et dans la région C-terminal du gène de l'ORF2 a permis de confirmer l'expression du gène au niveau transcriptionnel (Figure 11). Un autre adénovirus produit à partir du plasmide pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp, sans insert, sera utilisé comme témoin tout au long de mes expériences.

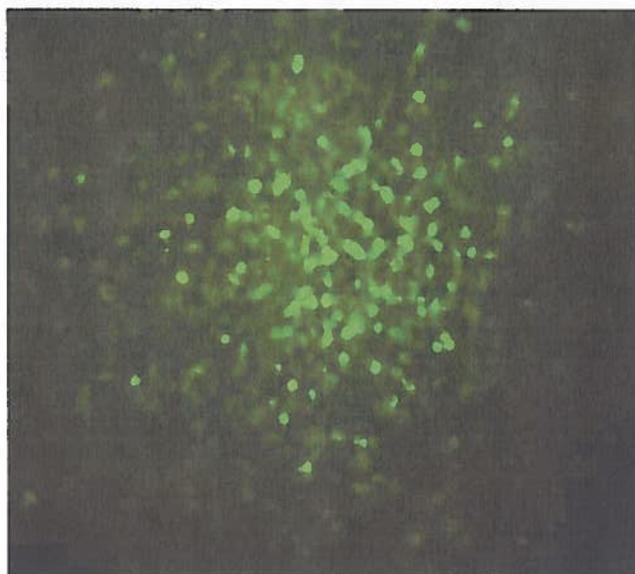


Figure 10 : Détection d'une plaque virale de l'adénovirus recombinant pour l'ORF2 quatre jours après l'infection avec l'adénovirus recombinant pour l'ORF2. La plaque a été détectée grâce à la fluorescence émise par la présence du gène GFP, exprimé exclusivement chez les virus recombinant. Grossissement : 100 X

Afin de vérifier l'expression de l'ORF2 par le vecteur adénoviral recombinant hAd-ORF2 au niveau protéique, des cellules 293 ont été infectées et l'expression de la protéine recombinante a été analysée par immunobuvardage de type Western 24 h post-infection. Nos résultats confirment la présence d'une protéine de 32 kDa correspondant à l'ORF2 dans le lysat des cellules 293 infectées avec le virus hAd-ORF2 recombinant, mais non avec les cellules infectées l'adénovirus témoin (Figure 12). Aucune bande de cette taille n'est visible en utilisant le sérum témoin ou dans les lysats de cellules infectées avec l'adénovirus témoin ou provenant de cellules non-infectées.

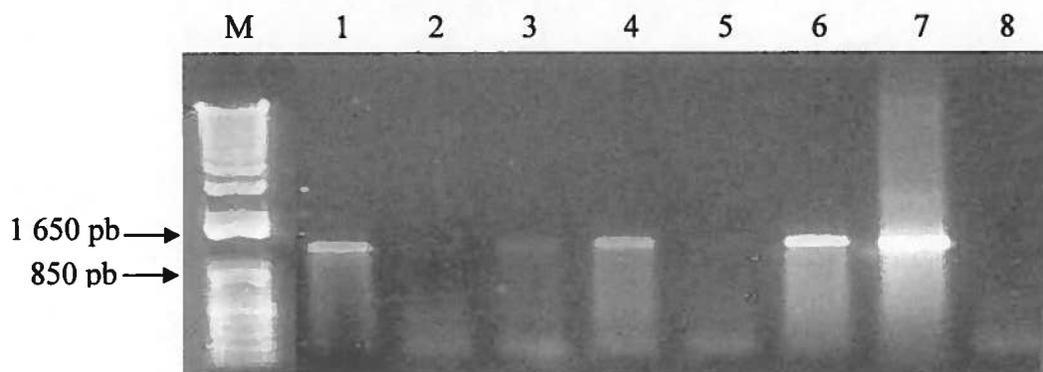


Figure 11 : Profil électrophorétique directionnel sur gel d'agarose de l'ORF2 de six différents clones adénoviraux.

Six éluats (*Colonnes 1 à 6*), provenant de plages de lyse isolées, ont été analysées par PCR directionnel en utilisant des amorces spécifiques pour les régions « enhancer » (*Enh*) dans l'extrémité 5' du vecteur adénovirus et C-terminal du gène de l'ORF2. Le plasmide pAdCMV5-P2DC-GFPq/K7PSmlp/ORF2 a été utilisé comme témoin positif (*Colonne 7*). Le témoin négatif est constitué de la réaction de PCR sans ADN (*Colone 8*). M; Marqueur moléculaire.

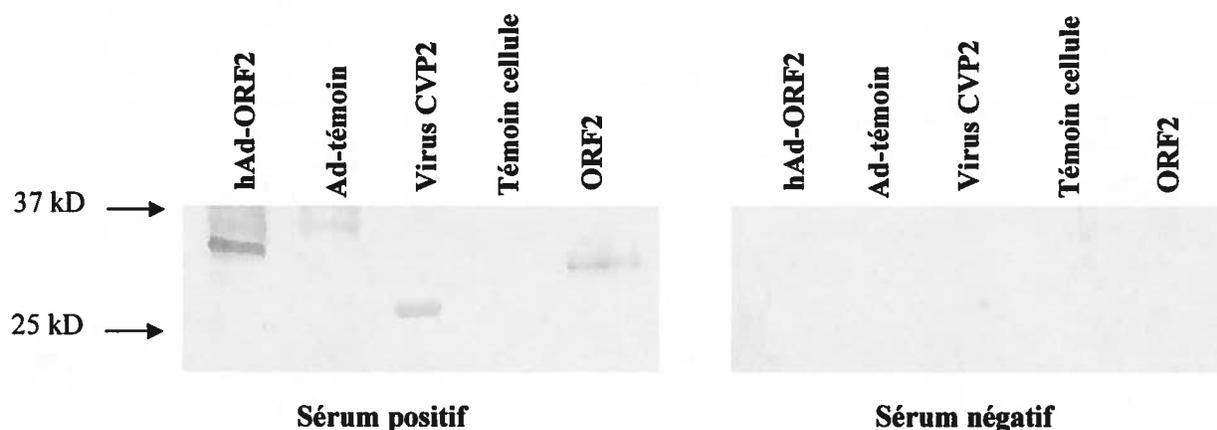


Figure 12 : Expression de la nucléocapside du CVP2 porcine *in vitro* par l'adénovirus recombinant hAd-ORF2 dans les cellules 293.

L'expression de l'ORF2 dans les cellules 293 a été analysée par immunobuvardage 48 h post-infection. Le virus CVP2 porcine ainsi qu'une forme recombinante de l'ORF2 purifié par chromatographie d'affinité (Système HisTrap; Amersham-BioScience) à partir de lysats de cellules transfectées avec le vecteur d'expression pCEP5-6H-ORF2 ont été utilisés comme témoins positifs. Le lysat de cellules 293 non-infectées a été utilisé comme témoin négatif.

3.4 Analyse de séquence.

Les anticorps produits lors d'une réponse immunitaire sont spécifiques à des déterminants antigéniques. Afin de vérifier si l'ORF2 inséré dans notre virus recombinant n'a pas subi de modifications significatives au niveau génomique lors des étapes d'amplification et purification, l'ORF2 a été séquencé et sa séquence nucléotidique comparée à celle provenant de la souche parentale IAF-2897 (AF408635). L'analyse n'a cependant démontré aucun changement au niveau nucléotidique (Figure 13). Suite à ce résultat, nous avons donc poursuivi nos expériences afin de vérifier la capacité de ce virus recombinant à induire une production d'anticorps anti-ORF2 chez la souris.

```

ORF2CVP2 : 1   atgacgtatccaaggaggcggtaccgcagaagaagacaccgccccgcagccatcttggc 60
                |||
Ad-ORF2   : 1   atgacgtatccaaggaggcggtaccgcagaagaagacaccgccccgcagccatcttggc 60

ORF2 CVP2 : 61   cagatcctccgcccgcgccctggctcgtccacccccgccaccgctaccggttgagaagg 120
                |||
Ad-ORF2   : 61   cagatcctccgcccgcgccctggctcgtccacccccgccaccgctaccggttgagaagg 120

ORF2 CVP2 : 121  aaaaatggcatcttcaacaccgcctctcccgcaccttcggatatactgtcaaggctacc 180
                |||
Ad-ORF2   : 121  aaaaatggcatcttcaacaccgcctctcccgcaccttcggatatactgtcaaggctacc 180

ORF2 CVP2 : 181  acagtcagaacgcctcctgggcagtgacatgatgagatttacacttgacgactttggt 240
                |||
Ad-ORF2   : 181  acagtcagaacgcctcctgggcagtgacatgatgagatttacacttgacgactttggt 240

ORF2 CVP2 : 241  cccccgggaggggggaccaacaaaatctctctacccttgaatactacagaataagaaag 300
                |||
Ad-ORF2   : 241  cccccgggaggggggaccaacaaaatctctctacccttgaatactacagaataagaaag 300

ORF2 CVP2 : 301  gttaagggttgaattctggccctgctccccatcaccaggcgataggggagtgaggctcc 360
                |||
Ad-ORF2   : 301  gttaagggttgaattctggccctgctccccatcaccaggcgataggggagtgaggctcc 360

ORF2 CVP2 : 361  actgctgttattctagatgataactttgtaacaaaggccacagccctaacctatgacca 420
                |||
Ad-ORF2   : 361  actgctgttattctagatgataactttgtaacaaaggccacagccctaacctatgacca 420

ORF2 CVP2 : 421  tatgtaaactactcctcccgcatacaatcccccaacccttctcctaccactcccgttac 480
                |||
Ad-ORF2   : 421  tatgtaaactactcctcccgcatacaatcccccaacccttctcctaccactcccgttac 480

ORF2 CVP2 : 481  ttcacacccaaacctggtccttgactccactattgattacttccaaccaaataacaaaagg 540
                |||
Ad-ORF2   : 481  ttcacacccaaacctggtccttgactccactattgattacttccaaccaaataacaaaagg 540

ORF2 CVP2 : 541  aatcagctttggctgaggctacaaacctctagaaatgtggaccacgtaggcctcggcact 600
                |||
Ad-ORF2   : 541  aatcagctttggctgaggctacaaacctctagaaatgtggaccacgtaggcctcggcact 600

ORF2 CVP2 : 601  gcgttcgaaaacagtaaatcagaccaggactacaatatccgtgtaaccatgtatgtacaa 660
                |||
Ad-ORF2   : 601  gcgttcgaaaacagtaaatcagaccaggactacaatatccgtgtaaccatgtatgtacaa 660

ORF2 CVP2 : 661  ttcagagaatttaactcttaagacccccacttaaacctaa 702
                |||
Ad-ORF2   : 661  ttcagagaatttaactcttaagacccccacttaaacctaa 702

```

Figure 13 : Comparaison de séquence entre l'ORF2 du CVP2 (IAF-2897, GenBank AF408635) et l'ORF2 de l'adénovirus recombinant.

L'analyse de comparaison de séquence a été réalisée avec le programme BLAST (bl2seq), offert par le National Center for Biotechnology Information (NCBI). (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi).

3.5 Immunisation expérimentale.

Lors de cette expérience visant à déterminer l'efficacité de l'adénovirus recombinant pour l'ORF2 à induire une réponse immunitaire humorale spécifique à l'ORF2, des souris CD1 ont été infectées, par voie sous-cutané, avec une dose de 10^8 TCID₅₀ par animal avec les adénovirus recombinants hAd-ORF2 et hAd-témoin (témoin négatif). Un troisième groupe (témoin positif) de souris a reçu une dose de 10^4 TCID₅₀ par animal du virus CVP2. Un rappel au jour 40 a été effectué, par voie intra-péritonéale (i.p.) dans les groupes infectés par les adénovirus recombinant pour l'ORF2 et témoin avec une dose de 10^8 TCID₅₀ par animal. Des analyses sérologiques ont ensuite été effectuées sur les sérums prélevés à des intervalles réguliers afin de déterminer la capacité du virus recombinant à induire une réponse humorale contre l'ORF2 du CVP2 porcin.

Les résultats des analyses sérologiques des sérums prélevés aux jours 28, 47 et 61 ont démontré une réponse spécifique en IgG contre l'ORF2 (Tableau I). Avant le rappel (jour 40), le titre des sérums dans le groupe de souris infectées avec le CVP2 (Groupe C) est plus élevé que celui dans le groupe infecté avec l'adénovirus recombinant (Groupe A). Le sérum des groupes témoins ne démontre aucune réponse en anticorps contre l'ORF2. Cependant, après le rappel, le sérum de deux souris du groupe A démontre un titre aussi élevé que le groupe C mais qu'au jour 61, il ne semble pas y avoir de différence dans les titres puisqu'ils sont tout au-delà de 6400. Ces résultats démontrent une bonne efficacité de l'adénovirus recombinant pour l'ORF2 pour induire des anticorps contre l'ORF2 chez la souris.

Un test d'immunofluorescence indirect utilisant les cellules infectées avec le vecteur pCEP5-6H-ORF2 nous a permis de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-ORF2 (Figure 14). Ceux-ci ont été détectés à partir du jour 7 post-injection dans le sérum de souris injectées avec le CVP2 et à partir du jour 14 dans le cas des souris injectées avec l'hAd-ORF2. Au jour 21, la présence d'anticorps spécifiques contre l'ORF2 fut retrouvée dans le sérum de tous les animaux infectés avec l'adénovirus recombinant pour l'ORF2. L'ensemble de ces

résultats démontre que l'hAd-ORF2 est capable d'induire une excellente réponse en Ac spécifique contre l'ORF2 compte tenu des titres élevés qui ont été obtenus.

Groupe	Ac détecté / souris total (%)							
	Jour PI							
	0	7	14	21	28	47	54	61
A	0/5 (0)	0/5 (0)	1/5 (20)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
B	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
C	0/5 (0)	5/5 (100)						
D	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)

Tableau I : Détection de la réponse humorale contre l'ORF2 du CVP2 porcin suite à l'immunisation avec l'Ad-ORF2.

Résultat d'analyses sérologiques des sérums prélevés aux jours 0, 7, 14, 21, 28, 47, 54 et 61 post-immunisation. La détection des Ac a été réalisée par immunofluorescence indirect sur feuillet de cellules transfectées avec le plasmide pCEP5-6H-ORF2 avec une dilution de 1 :50. Le groupe A représente les souris ayant reçu le virus hAd-ORF2; le groupe B représente les souris ayant reçu le hAd-témoin, le groupe C représente les souris ayant reçu le virus CVP2 et le groupe D représente les animaux témoins

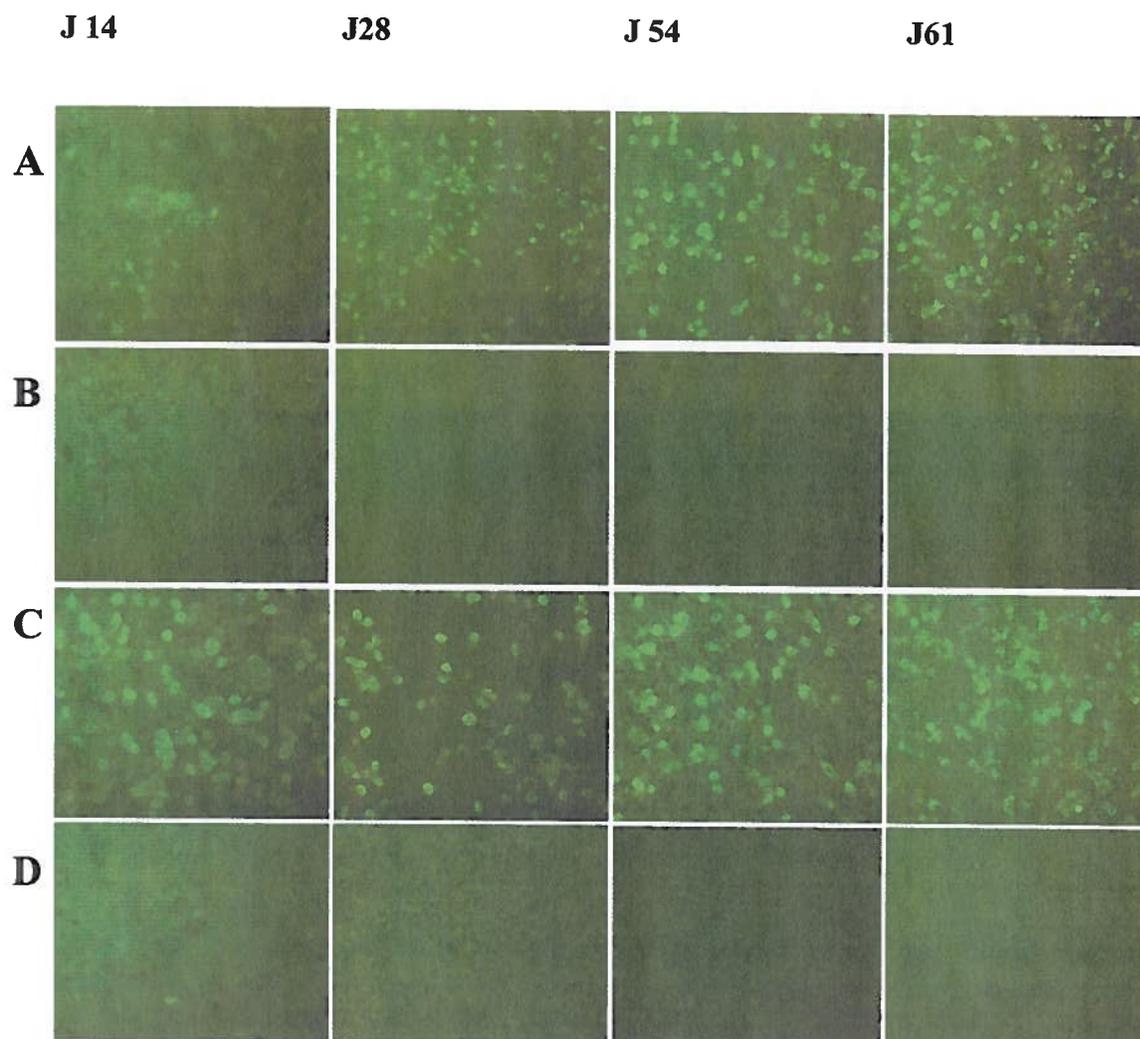


Figure 14 : Test d'immunofluorescence indirecte pour la détection d'anticorps contre l'ORF2 de CVP2 porcin chez des souris immunisées avec l'hAd-ORF2.

Afin de détecter la présence d'anticorps spécifiques contre l'ORF2, des dilutions de 1 :50 des différents sérums prélevés aux jours 14, 28, 54, et 61 de souris immunisées avec l'hAd-ORF2 (*Groupe A*) ou le virus natif (*Groupe C*) ou provenant de souris témoins ayant reçu le virus témoin (*Groupe B*) ou la solution TNE (*Groupe D*). Les sérums ont ensuite été incubés avec des cellules 293A transfectée avec le vecteur pCEP5-6H-ORF2. La mise en évidence d'une réaction spécifique a été réalisé avec l'aide d'un anti-IgG de souris conjugué à la fluorescéine (dilution finale; 1:2000). Résultats observés au microscope à fluorescence; grossissement de 200x.

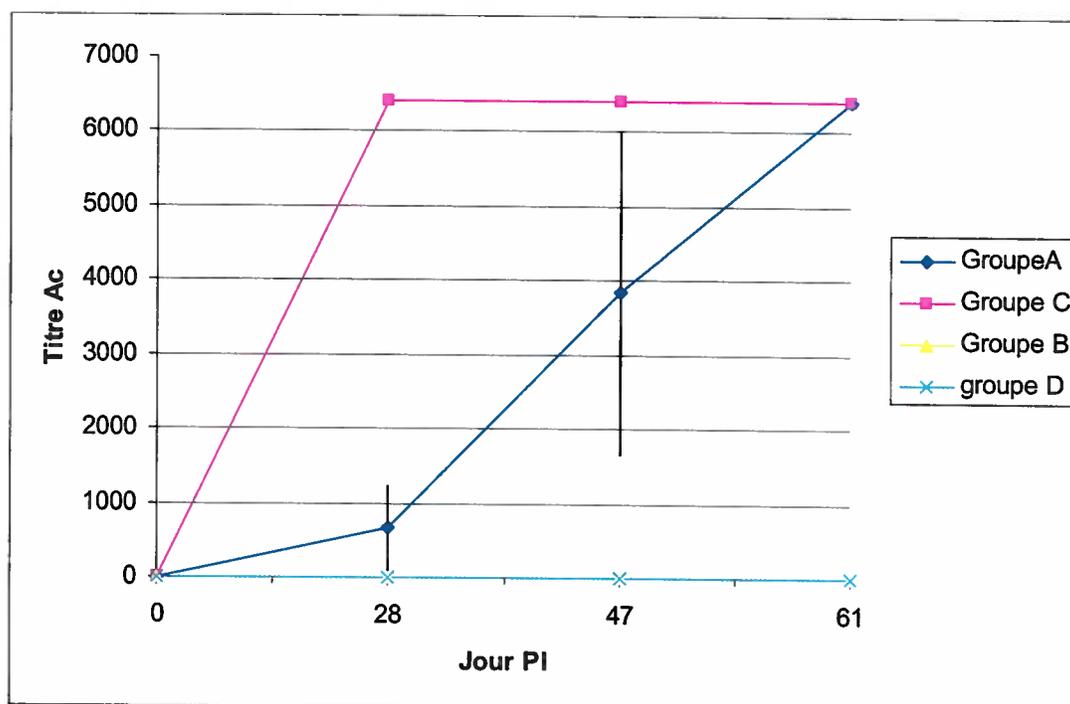


Figure 15 : Induction d'une réponse humorale contre l'ORF2 du CVP2 porcine suite à l'immunisation avec l'AdV-ORF2.

Résultat des analyses sérologiques des sérums prélevés aux jours 28, 47 et 61 post-immunisation. Les titres en anticorps ont été exprimés selon la réciproque de la dilution la plus élevée du sérum dont la fluorescence spécifique a été observée chez les cellules HEK 293 transfectées avec le vecteur pCEP5-6H-ORF2. Le groupe A représente les animaux ayant reçu le virus hAd-ORF2; le groupe B représente les animaux ayant reçu le hAd-témoin, le groupe C représente les animaux ayant reçu le virus CVP2 et le groupe D représente les animaux ayant reçu une solution de TNE.

Chapitre 4

Discussion

4.1 Contexte

Dans ce travail, nous avons, à partir de la souche de circovirus porcin de type 2, produit un vecteur adénoviral contenant l'ORF2 codant pour la nucléocapside du virus. Des expériences *in vivo* dans un modèle expérimental murin ont confirmé la capacité de ce vecteur à induire une réponse humorale spécifique contre cet ORF2 du CVP2. L'ensemble de ces résultats représente une étape importante dans une stratégie globale de développement d'un vaccin contre les maladies causées lors des infections par ce virus chez les troupeaux porcins, notamment le syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage (SDMPS). Les prochaines étapes de valorisation de ce vecteur dans le cadre de tests expérimentaux chez le porc permettront de déterminer avec précision le potentiel de ce vecteur au niveau clinique.

La découverte par Jenner, il y a plus de deux cent ans, que l'on pouvait protéger l'humain contre la variole en induisant chez l'hôte une réponse humorale à partir d'une immunisation avec l'aide d'un virus d'une autre espèce, de même que la découverte par Louis Pasteur, il y a environ 125 ans, que le virus de la rage atténué peut induire une réponse immunitaire humorale, représentent deux événements majeurs qui ont révolutionnés la médecine, et jetés les bases de l'immuno-virologie. Depuis ce temps, la discipline de la vaccinologie a pris un essor important. De nos jours, les vaccins sont fabriqués à partir de virus atténués ou désactivés, par passages successifs sur culture cellulaire, ou par divers moyens chimiques, et ce afin de les rendre non infectieux mais capable d'induire une réponse immunitaire humorale (Arnon et Ben-Yedidia, 2003). Ces méthodes, dites traditionnelles, ne peuvent cependant être employées pour tous les virus. C'est le cas de plusieurs virus, dont celui responsable du SIDA, dont le risque d'un révertant possible demeure élevé. De plus, un virus ne se répliquant pas ou très difficilement en culture cellulaire représente un défi plus grand en terme de développement de vaccin. Afin d'y

remédier, différentes alternatives ont donc été développées durant les dernières années, dont certaines semblent intéressantes. Les plus couramment utilisées font appel, par exemple à l'utilisation de vecteurs viraux, d'ADN recombinant nu (vecteurs plasmidiques), et les protéines ou peptides recombinants. C'est donc dans ce contexte que nous avons utilisé cette approche pour le CVP2.

L'incidence du SDMPS n'a cessé d'augmenter depuis sa découverte en 1991. Depuis l'identification du CVP2 comme l'agent responsable de la maladie (Ellis *et al.*, 1998), aucun agent prophylactique n'a été commercialisé. Ceci est en partie dû au fait que ce virus se réplique seulement dans des cellules en division, restreignant ainsi la quantité de virus pouvant être produit étant donné que la production de particules virales dépend d'enzymes cellulaires actives en phase S1 (Tischer *et al.*, 1987). Pour augmenter la quantité de nouveaux virions, les cellules infectées avec le CVP2 peuvent être traitées avec de la glucosamine (Tischer *et al.*, 1987). Hors, malgré ce traitement, le titre viral demeure faible, ce qui a joué fortement contre le développement d'un vaccin traditionnel jusqu'à maintenant. Des approches alternatives ont donc été envisagées, et l'utilisation de vecteurs adénoviraux, une approche de plus en plus privilégiées dans le domaine de la vaccinologie et de la thérapie génique a été explorée dans ce travail.

4.2 Le vecteur adénoviral : contexte et justification

Initialement, le vecteur adénoviral a été surtout conçu et utilisé comme véhicule pour la thérapie génique (Tatsis et Ertl, 2004). Les premiers vecteurs, générés vers 1985, ont été dérivés à partir de l'adénovirus humain de type 2 ou de type 5, puisqu'ils ne causent aucune maladie chez l'homme ou chez l'animal (Romano *et al.*, 2000). Cependant, son utilisation comme vecteur vaccinal a été envisagée suite à des études démontrant la production d'Ac neutralisant contre des protéines recombinantes intégrée dans le génome viral (Xiang *et al.*, 1996). De nombreuses études ont ainsi été réalisées sur la capacité d'un hAd recombinant à induire une

réponse immunitaire humorale et cellulaire (Bruce *et al.*, 1999; Shanley et Wu, 2003). De plus, une immunité passive de la mère à l'enfant a été démontrée avec l'immunisation du vecteur exprimant une protéine du rotavirus (Both *et al.*, 1993). Ces différents résultats sur l'utilisation du vecteur adénoviral démontrent clairement son efficacité et son potentiel comme vecteur vaccinal (Both *et al.*, 1993; Xiang *et al.*, 1996; Sharpe *et al.*, 2002; Shanley et Wu, 2003).

Depuis la découverte de l'adénovirus humain (hAd), il y a plus de 50 ans (Russell, 2000), les fonctions des différents gènes qu'on y retrouve, notamment les gènes E1, E3 et celui codant pour la protéase (PS) ont permis non seulement de bien comprendre le cycle viral de ce virus, mais également d'identifier les gènes et les régions d'intérêts dans un contexte de génie génétique. Ainsi, le gène E1 est essentiel à la réplication du génome viral tandis que le gène E3 est important dans l'évasion virale, en minimisant le cheminement du CMH de classe I à la surface de la cellule (Russell, 2000). Enfin, la protéase est importante pour la maturation des protéines (Russell, 2000), donnant ainsi une particule virale infectieuse. Ces connaissances ont donc été exploitées dans divers contextes pour élaborer différentes stratégies pour le développement de vecteurs adénoviraux. Une autre des qualités des vecteurs adénoviraux est leur capacité de se répliquer à de hauts titres en culture cellulaire. De plus, chez l'hôte, il peut infecter un grand nombre de types cellulaires différents, dont les hépatocytes, les cellules endothéliales, les myoblastes et les cellules musculaires du cœur (Tatsis et Ertl, 2004). Dans le contexte de nos travaux, il est à noter que l'hAd peut infecter des cellules porcines (Torres *et al.*, 1995) au niveau des muqueuses, un avantage certain dans le cas d'infections par des virus respiratoires porcins.

L'utilisation de l'hAd-rec à des fins de vaccination a pris son essor dans le domaine de la thérapie génique. Son efficacité à induire une réponse humorale face à la protéine recombinante a été rapportée, tant chez la souris (Elahi *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002), que le primate (Shiver *et al.*, 2002) et le porc (Kheyar *et al.*, 2005). L'ensemble de ces études semblent démontrer que l'hAd représente un système d'expression très efficace, permettant l'expression d'une grande

quantité de protéines recombinantes pouvant représenter jusqu'à 20% du contenu protéique total de la cellule (Massie *et al.*, 1995). De même, la construction du vecteur viral et la disponibilité de vecteurs de transfert variés, contenant plusieurs marqueurs de sélection, comme celui de la GFP que nous avons utilisé, facilite grandement la construction de tel type de vecteur. Toutes ces raisons ont justifié le choix du vecteur adénoviral pour nos expériences.

4.3 L'ORF2 comme gène cible

L'efficacité du vaccin produit dépend de plusieurs facteurs, dont l'immunogénicité de la protéine choisie. L'utilisation de la protéine de la nucléocapside est un choix logique puisqu'elle est impliquée dans la pathogénicité du SDMP2 (Chae, 2004). Elle comprend aussi les épitopes majeurs de types spécifiques et elle est la seule protéine formant la capsid du virion. De plus, des études précédentes effectuées par notre groupe de recherche dans le cadre d'une infection expérimentale avec le CVP2 chez les porcs, les Ac détectés lors de cette infection étaient dirigés contre cette protéine (Sébastien Racine, 2004). Des résultats semblables ont été obtenus chez la souris (Kiupel *et al.*, 2001), ce qui confirme l'immunogénicité de cette protéine précédemment rapportée par d'autres groupes de recherches (Nawagitgul *et al.*, 2000a). Pour ces raisons, nous avons opté pour cette protéine pour la construction du vecteur adénoviral exprimant l'ORF2 du CVP2 et conduit l'étude de son immunogénicité comme vaccin. Afin de construire un hAd recombinant pour l'ORF2 (hAd-ORF2), nous avons dû produire un vecteur de transfert exprimant la NC et s'assurer de la fonctionnalité du gène de l'ORF2. La recombinaison, faite avec un MOI de 1, et la purification de l'hAd-ORF2 ont été faites dans des cellules 293. Nous avons observés des plages non fluorescentes lors des premières étapes de purification, probablement à cause du fait que nous avons utilisé un MOI trop élevé lors de l'étape de recombinaison. Afin d'obtenir seulement des hAd-ORF2 exprimant notre gène reporteur (GFP), nous avons donc dû procéder à plusieurs rondes de purification supplémentaires. Suite aux étapes de purification, un stock d'hAd-ORF2 a finalement pu être produit et l'expression de l'ORF2 a été vérifiée *in vitro* dans des cellules 293 infectées. Un bon taux d'expression de la NC a été

démontré par la technique d'immunobuvardage de type Western par la technique de révélation traditionnelle ainsi qu'avec une révélation par la chemiluminescence. En utilisant un système bicistronique, une visualisation du gène reporteur, la protéine fluorescence verte (GFP,) indiquerait aussi une traduction de notre transgène.

L'immunisation chez les souris CD1 a confirmé à la fois l'efficacité du vecteur adénoviral et l'immunogénéicité de l'ORF2. Une séroconversion a été détecté chez 20% des souris immunisées avec l'hAd-ORF2 dès le jour 14 PI et chez 100% des souris à 21 jours PI. Il est tout à fait normal que la séroconversion induite avec la préparation témoin constitué du virus CVP2 soit plus rapide que dans le cas du groupe immunisé avec le vecteur adénoviral puisque dans le premier cas le système immunitaire réagit contre la NC directement tandis que dans le deuxième cas l'hAd-ORF2 doit infecter les cellules et transcrire l'ORF2. Sans surprise, aucune séroconversion n'a été observée dans le groupe immunisé avec l'hAd-témoin ainsi que le groupe témoin, démontrant bien la spécificité de la réponse induite. De même, le titre en Ac anti-ORF2 au jour 28 PI est plus élevé dans le groupe infecté avec le virus CVP2 que celui immunisé avec l'hAd-ORF2. Après un rappel avec les hAd-ORF2 et hAd-témoin, il ne semble pas y avoir de différence dans le titre en Ac au jour 61 PI entre les groupes immunisé avec l'hAd-ORF2 et le CVP2. Hors, il n'est cependant pas possible d'affirmer avec certitude si le rappel a réellement eu un rôle à jouer dans l'augmentation du titre en Ac anti-ORF2 puisque aucun prélèvement sanguin n'a été réalisé avant le rappel, soit au jour 40 PI. Aucun effet bénéfique a été démontré dans le cas du rappel avec un hAd-rec pour la HA chez la souris (Tang *et al.*, 2002). Cependant, cette possibilité n'est pas à exclure puisque dans une étude de l'équipe du Dr Wu, le rappel a fait augmenté le titre en Ac de façon significative (Shanley et Wu, 2003). L'hAd induit une forte réponse immunitaire humorale (Russell, 2000) et cellulaire (Sharpe *et al.*, 2002). Hors, lors de l'immunisation innitial, il y a production d'Ac neutralisant contre l'adénovirus (Santra *et al.*, 2005) et de ce fait même, réduire l'efficacité d'un rappel. L'activation, et donc la maturation des macrophages et cellules présentatrices d'antigène serait du à l'expression de « pathogen-associated recognition patterns » (PAMP) (Tatsis et Ertl, 2004).

Afin de déterminer si la souris peut être un modèle pour le SDMPS, des études chez des souris ICR-CD1 et des BALB/c ont été effectuées avec le CVP2. Les résultats diffèrent entre ces études, l'un démontrant une absence de production d'Ac anti-CVP2 (Quintana *et al.*, 2002), l'autre démontrant une présence d'Ac détecté au jour 14 PI (Kiupel *et al.*, 2001). Nos résultats démontrent une production Ac anti-CVP2 induit par le CVP2 chez la souris CD1, ce qui est contradictoire avec l'un des résultats mentionnés précédents. Il est difficile de croire que le CVP2 n'induit aucune réponse immunitaire. Une explication possible pour cette apparente contradiction dans l'étude de Quintana *et al.* (2002) serait que le site d'injection soit inapproprié et/ou que la méthode de détection des Ac n'était pas assez sensible puisque la dose utilisée est la même, soit 10^4 TCID₅₀. La détection d'Ac anti-CVP2 utilisée de façon courante consiste à infecter des cellules PKA avec le CVP2. Notre technique de détection des Ac anti-ORF2 se fait sur un feuillet cellulaire de 293 transfecté avec le plasmide d'expression pCEP5-6H-ORF2. Hors, la comparaison de ces techniques démontre une sensibilité plus grande dans le cas de la technique que nous avons utilisée, i.e. celle faisant appel au feuillet cellulaire transfecté (Racine *et al.*, 2004). Dans le cas de l'étude avec les souris BALB/C, les Ac ont été détectés au jour 14 PI, comparativement au jour 7 avec les souris CD1 dans nos études. Bien que cette différence puisse être due à la souche de souris utilisée, là encore on peut croire que la sensibilité de la technique utilisée pour la détection d'anticorps peut influencer, bien que moins significativement dans ce cas-ci, les résultats obtenus.

Avant de pouvoir induire une réponse spécifique contre le transgène, l'adénovirus doit être internalisé avant de pouvoir transcrire les gènes. Après traduction et présentation par le CMH de classe I, une réponse cellulaire se produit en plus d'une réponse humorale. Plusieurs études sur l'utilisation du vecteur adénovirus exprimant un transgène ont été rapportées (Bruce *et al.*, 1999; Sharpe *et al.*, 2002; Shanley et Wu, 2003). La cinétique de détection d'Ac contre la protéine recombinante lors de l'immunisation varie selon les études, et pourrait être reliée à différents facteurs. Ainsi, deux semaines après l'immunisation intramusculaire de souris avec

une hAd exprimant le gène HA de l'influenza porcine, des Ac spécifiques ont été détectés (Tang *et al.*, 2002). Cette cinétique coïncide avec celle que nous avons observée avec notre hAd-ORF2. Cependant, certaines études démontrent une présence d'Ac après seulement 7 jours PI (Xiang *et al.*, 1996). Cette différence pourrait être attribuée à l'immunogénicité, par exemple, des protéines recombinantes. Plus la protéine est immunogénique, plus la réponse immunitaire sera rapide. L'expression du transgène par l'adénovirus n'est pas identique pour toutes les constructions. En effet, le taux de transcription du transgène varie selon la taille du transgène et les promoteurs utilisés. Dans le cas de certains virus, il est important d'induire une réponse humorale et cellulaire rapidement. Un bon exemple est le virus de la rage. Il est transmis à l'homme par une morsure d'animaux infectés. La caractéristique première de ce virus est que le temps d'incubation est variable, mais le temps minimal est de 10 jours (Tatsis et Ertl, 2004), impliquant que le vaccin doit induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire rapidement. Le vaccin existant est composé du virus de la rage atténué par passage consécutif *in vitro*. Cependant, afin d'être efficace, plusieurs rappels doivent être faits pour induire une réponse immunitaire. Un hAd-rec a été produit et des essais sur des rats ont démontré la présence d'Ac neutralisant dans le sérum 7 jours après l'immunisation sous-cutanée, intramusculaire, ou intranasale (Xiang *et al.*, 1996). Cette expérience démontre clairement une plus grande efficacité de l'hAd-rec que le vaccin actuel. Puisque les signes cliniques du SDMP se déclarent sans avis, l'immunisation du troupeau de porcs avec un vecteur adénoviral serait avantageuse afin de restreindre la propagation de la maladie en induisant rapidement une réponse humorale chez l'hôte.

4.4 Perspectives des vaccins viraux vis-à-vis des approches traditionnelles et des nouvelles approches dans le développement de vaccins

Les différentes études utilisant un hAd exprimant une protéine recombinante démontrent une bonne expression du gène, induisant ainsi une réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique à la protéine recombinante. Hors, l'expression du gène peut être modifiée. Des

changements au niveau du promoteur serait un moyen d'augmenter la production de la protéine recombinante (Russell, 2000). Une comparaison de différents promoteurs a démontré une variation significative dans l'expression du gène (Sallenave *et al.*, 1998). La modification du promoteur au niveau génomique afin d'optimiser la séquence affecte aussi l'expression du transgène (Massie *et al.*, 1998).

L'hAd-rec non répliquatif démontre un potentiel vaccinal énorme. Hors, l'utilisation d'un vaccin adénovirus répliquatif permettrait d'optimiser son potentiel en produisant davantage de protéines recombinantes. De plus, avec un adénovirus répliquatif, il serait envisageable de diminuer la dose à administrer et assurerait une meilleure réponse immunitaire par rapport à l'adénovirus non répliquatif. Cependant, pour des raisons de biosécurité, cette approche ne permettrait pas une production à des fins commerciales à cause des risques de transmission trop élevés chez les animaux et l'humain. De plus, il a été rapporté que ce type de vecteur peut induire une réponse inflammatoire aigüe et peut engendrer la mort de son hôte (Chuah *et al.*, 2003). Un vecteur répliquatif non disséminatif (semi-répliquatif) a donc été mis au point par l'équipe du Dr Bernard Massie afin de surmonter les problèmes majeurs de biosécurité. Cette nouvelle génération se réplique dans les cellules mais ne peut former de virions infectieux (Oualikene *et al.*, 2000). Avec cette approche, il est possible d'envisager de diminuer la dose à administrer tout en augmentant la réponse immunitaire face à la protéine recombinante en favorisant l'expression du transgène dans les cellules infectées.

Tel que nous l'avons mentionné précédemment, l'hAd est l'un des vecteurs viraux les plus utilisés. Plusieurs autres vecteurs viraux moins connus sont présentement étudiés par différents groupes de chercheurs, dont ceux basés sur l'utilisation des flavivirus (Seligman et Gould, 2004), du virus de la vaccine d'Ankara (Drexler I, 2004; Chen Z, 2005), des lentivirus (He *et al.*, 2005), et du poliovirus (Crotty et Andino, 2004). L'étude de la vaccination par des vecteurs viraux a pris un essor considérable au cours de la dernière décennie. L'utilisation de chacun de ces vecteurs comprend bien entendu des avantages et des inconvénients (Romano *et*

al., 2000). Hors, les vecteurs viraux ne sont pas les seuls à être utilisés dans la recherche pour des vaccins. Il y a les vaccins à ADN nu, équivalent au plasmide, et les protéines recombinantes.

L'utilisation de vaccin à base d'ADN comprend certains avantages. Cette technique est insensible aux Ac préexistants, induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire, et peut être modifiée pour induire une réponse mucoale (Nagata *et al.*, 2005). Une vaccination chez la souris avec un plasmide exprimant la NC du CVP2 a d'ailleurs démontré une production d'Ac spécifique anti-ORF2 (Kamstrup *et al.*, 2004). Après deux vaccinations par l'utilisation du 'Gene Gun', toutes les souris avaient des Ac contre ORF2 avec un titre variant de 50 à 800, et ce au jour 52 PI. Hors, nos résultats ont démontré des titres variant entre 1600 et supérieurs à 6400 au jour 47 PI. A la fin de l'expérience, toutes nos souris avaient un titre supérieur à 6400, une efficacité qui n'a pu être atteinte avec l'immunisation avec le vecteur plasmidique. Cependant, tel que nous l'avons mentionné précédemment, étant donné que les approches expérimentales utilisées pour les mesures d'anticorps peuvent influencer la mesure des taux d'anticorps, des études comparatives directes à l'intérieur d'une même expérience devront être menées afin de confirmer si l'utilisation de vecteurs adénoviraux est supérieure aux vecteurs plasmidiques nus. Néanmoins, des études à base d'ADN réalisées chez la souris et le porc afin d'induire une réponse immunitaire face à la GP5 du VSRRP (Pirzadeh et Dea, 1998) laissent supposer que le vecteur adénoviral pourrait être avantageux. En effet, les titres obtenus avec les plasmides lors de ces expériences sont inférieurs aux titres obtenus par la vaccination avec les vecteurs viraux. De plus, un essai clinique en phase I a été établi chez l'homme pour déterminer l'efficacité de l'immunisation contre certaines protéines du virus du SIDA. L'étude révèle une tolérance envers le vecteur plasmidique exprimant l'Ag HIV-1. Cependant, aucun effet bénéfique à long terme n'a été observé sur les lymphocytes doubles positifs CD4⁺CD8⁺. Une bonne immunisation est l'induction d'une réponse humorale et cellulaire, ce qui n'est pas le cas puisque aucun Ac contre les protéines du VIH n'a été induit (MacGregor *et al.*, 2005). De plus, un autre désavantage de cette technique est le nombre de rappels requis pour obtenir une réponse, soit de quatre dans ce cas-ci. Cependant, l'utilisation de la vaccination par ADN a soulevé des craintes sur sa

biosécurité. L'une des craintes majeures est l'intégration du plasmide dans le génome de la cellule (Gerloni *et al.*, 1997). Une comparaison entre 3 différents vecteurs, soit à ADN, vecteur hAd et MVA « modified vaccinia Ankara virus », reprend les mêmes conclusions mentionnées ci-haut, soit que le vecteur adénoviral induit une meilleure protection (Shiver *et al.*, 2002).

La dose, le site d'injection, l'expression du transgène (Kheyar *et al.*, 2005), la présence d'adjuvant ainsi que la préparation du vaccin sont tous des facteurs importants à considérer lors de la mesure de l'efficacité d'un vaccin. L'importance de la dose est directement liée à la réponse immunitaire. Il a été démontré qu'une dose de 10^8 PFU induit une réponse immunitaire humorale chez 100% des souris comparativement à un plus faible pourcentage lorsque la dose donnée est de 10^7 PFU (Bruce *et al.*, 1999). Une dose trop élevée peut en effet induire des effets cytopathiques, réduisant ainsi son utilisation potentielle comme vecteur vaccinal. Ces effets ont été observés lors d'étude chez le porc en utilisant un adénovirus non répliquatif (Morrissey *et al.*, 2002), en utilisant une dose de plus de 10^{11} PFU par voie intraveineuse à plusieurs reprises. Hors, plusieurs études avec des doses élevées n'ont pas rapporté d'effets toxiques (Fooks *et al.*, 1998; Shiver *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2002). Cela s'explique sans doute par le fait que la toxicité est affectée non seulement par la dose, mais aussi par la fréquence d'injection. Plus le temps de rappel est court, plus il y a de chances d'induire une réaction locale, engendrant un effet cytopathique local. Lors de nos immunisations chez les souris, aucun effet toxique local n'a été observé lors de nos examens macroscopiques de la souris, ce qui est en accord avec d'autres études. L'adjuvant SP1017, composé non ionique fait à base de deux polymères amphiphilique (L61 et F127) (Lemieux *et al.*, 2000) a été utilisé lors de la préparation des vaccins. Celui-ci augmente, au niveau local, la quantité de cellules dendritiques favorisant ainsi une meilleure réponse immunitaire (Sang *et al.*, 2003).

En plus de la dose, la voie d'immunisation joue un rôle majeur dans la réponse immunitaire. En général, les hAd sont capables d'induire une réponse mucoale (Bruce *et al.*, 1999; Shanley et Wu, 2003). Ainsi, l'administration par voie i.p., i.v. ou i.n., avec un hAd

réplicatif exprimant la protéine VP7 du rotavirus induit une bonne réponse humorale comparativement à l'immunisation par voie orale, associée avec un faible taux d'Ac (Both *et al.*, 1993). Dans une autre étude, il y a eu détection d'IgG dans certaines souris lors d'administration d'hAd-rec par voie orale. La vaccination par voie orale dans le cas du CVP2 est intéressante puisque le virus entre par les voies respiratoires et que l'hAd-rec peut infecter le système GALT « gut-associated lymphoid tissue », induisant une réponse locale humorale ainsi que systémique (Fooks *et al.*, 1998).

De plus, une alternative pour augmenter la réactivité de l'Ag, viral ou peptidique, serait l'ajout d'adjuvant. Les différentes molécules d'adjuvant augmentent l'activation des lymphocytes T en favorisant l'accumulation de leucocytes au site d'injection. Une étude a démontré que la présence d'Ac contre la gp50 du virus de la pseudorange, exprimé par un adénovirus recombinant non répliquatif, dans la dose la plus élevée, soit de 10^8 TCID₅₀ (Ganne *et al.*, 1994). Par contre, il y avait présence d'Ac contre la gp50 à la plus faible dose lorsque l'adjuvant, à base d'huile, avait été ajouté. Lors de cette même étude, la formulation de l'adjuvant a influencé le type d'Ig. L'adjuvant augmente aussi l'expression de molécule co-stimulatrice chez les leucocytes et la production de cytokines. L'adjuvant pourrait aussi prolonger l'expression du complexe CMH-peptide à la surface du CPA. De plus, le type d'Ac favorisé varie selon le type d'adjuvant utilisé. Une étude a démontré qu'un adjuvant à base aqueuse favorise l'IgG1 tandis qu'un adjuvant à base d'huile induit toutes les sous-classes d'IgG (Vajdy *et al.*, 2004).

Afin de diminuer la possibilité de toxicité due à la dose, un hAd semi-répliquatif peut être utilisé. Il est possible de réduire la dose infectieuse en utilisant un vecteur hAd répliquatif. Malgré que ce virus soit répliquatif, il ne peut former de particules virales infectieuses suite à la délétion de la protéase. Une immunisation avec ce nouveau vecteur pourrait induire soit une réponse en Ac plus rapide, une production élevée d'Ac ou une très forte réponse cellulaire. Dans

une étude utilisant un hAd répliatif, la réponse humorale n'est pas significativement différentes comparer avec la réponse humorale d'hAd non-répliatif.

4.5 Alternatives et problèmes associés aux vaccins viraux

Il est maintenant possible de produire une protéine d'intérêt, de la purifier et d'en faire un vaccin. En utilisant la protéine complète, tout les épitopes seront présents, ce qui favorise une variété d'Ac spécifiques. Une immunisation chez le porc avec un vaccin à ADN suivi d'un rappel avec la NC démontre une protection partielle suite à une infection défi avec le CVP2 (Blanchard *et al.*, 2003a). Cette étude démontre bien le pouvoir protecteur de la NC. La prochaine étape serait de comparer l'efficacité de protection suite à une infection défi avec l'hAd-ORF2.

La réponse immunitaire est dirigée contre une partie de la protéine, soit l'épitope. Avec les moyens modernes, cette région peut être synthétisée efficacement afin d'en faire un vaccin sous-unitaire. Cette technique contourne la production *in vitro* et réduit la possibilité de contaminant cellulaire ou viral. De plus, cette technique a l'avantage de cibler une ou des régions importantes afin d'optimiser la réponse contre l'agent infectieux. Un désavantage important est la faible immunogénicité de certains peptides, impliquant l'utilisation d'un adjuvant afin d'y remédier. Les peptides devront avoir le motif de liaison au CMH ainsi que la séquence de reconnaissance des cellules B ou cellules T (Yano *et al.*, 2005). Cependant, la population n'a pas tous les mêmes CMH, ce qui implique que certains peptides ne peuvent pas induire une réponse immunitaire.

L'utilisation de vaccin viral vivant peut apporter certaines craintes chez la population au niveau de la biosécurité. Un essai clinique à Paris sur l'utilisation du rétrovirus dans le traitement du déficit immunitaire combiné sévère (DICS) chez des enfants a été marqué par l'apparition de leucémie (Check, 2002; Kaiser, 2005). Cependant, ce virus est utilisé dans la thérapie génique.

Malgré le fait que l'hAd ne s'intègre pas au niveau du génome, il peut demeurer dormant. Différents essais cliniques sont en cours avec l'utilisation de l'hAd dans la thérapie génique et peu pour la vaccination. Le risque associé à l'utilisation de virus viable comme vaccin demeure néanmoins présent. Plusieurs aspects entourant le mécanisme moléculaire dans la cellule infecté demeurent peu connus. De plus, un inconvénient majeur dans l'utilisation de vecteurs viraux est la présence d'Ac chez l'individu. Chez l'homme, la prévalence est élevée pour l'hAd de type 5, ce qui en diminue son efficacité à induire une réponse immunitaire contre la protéine recombinante (Tatsis et Ertl, 2004). Cependant, chez l'animal, aucun Ac neutralisant ne devrait être présent contre cette hAd.

Tous les résultats jusqu'à maintenant démontrent une efficacité supérieure du vecteur adénoviral. Notre vecteur adénoviral induit un taux d'Ac élevé chez la souris. Suite à ces résultats, une analyse plus approfondie sur la nature des Ac nous indiquerait si notre vecteur viral peut induire des Ac neutralisant contre la NC, puisqu'il a été rapporté que ces Ac sont produit lors de l'infection avec le CVP2 (Pogranichnyy *et al.*, 2000) chez le porc et la souris (McNeilly *et al.*, 2001). De plus, il serait intéressant d'étudier plus attentivement la réponse mucosale, puisque le CVP2 utilise cette voie comme portail d'entrée. Également, une expérience avec un hAd recombinant semi-répliatif serait à concevoir afin de comparer les différents paramètres important dans la réponse immunitaire. Puisque l'adjuvant augmente l'immunogénicité, une suite logique serait de refaire cette expérience mais sans adjuvant. Enfin, une immunisation chez le porc suivi d'une infection défi afin de déterminer l'ampleur du pouvoir protecteur du vaccin adénoviral.

Chapitre 5

5.1 Conclusion et perspective

Nous avons démontré que l'adénovirus recombinant pour l'ORF2 exprime la nucléocapside dans un système *in vitro*. Au niveau *in vivo*, soit chez la souris, l'hAd-ORF2 induit une réponse immunitaire en Ac spécifique contre la nucléocapside. Celui-ci semble être plus efficace puisque le taux d'Ac est beaucoup plus élevé avec ce système comparativement avec l'immunisation avec la protéine purifiée ou par ADN nu.

Afin de mieux différencier la réponse en Ac contre l'ORF2 des souris immunisées avec l'hAd-ORF2 versus le CVP2, une cinétique en Ac serait appropriée. Aussi, une caractérisation plus détaillée du type de réponse engendré par le vaccin adénoviral pourrait être envisagée. De plus, pour valider l'efficacité vaccinale, une vaccination suivie d'une infection défi chez le porc serait la prochaine étape. Au niveau de la souris, une dose a été nécessaire afin d'induire la production d'Ac spécifique contre l'ORF2. Chez le porc, il serait avantageux qu'une dose de vaccin soit nécessaire. Ce système pourrait répondre à cette attente, facilitant la tâche des producteurs ainsi que les vétérinaires.

En résumé, cette étude ouvre la porte à un potentiel vaccin dans la lutte contre le SDMPS ainsi qu'aux différents symptômes causés par le CVP2. Cet outil de travail pourra aussi nous confirmer que le CVP2 est l'agent étiologique du SDMPS.

Référence

Albina E., C. Truong, E. Hutet, P. Blanchard, R. Cariolet, R. L'Hospitalier, D. Mahe, C. Allee, H. Morvan, N. Amenna, M. Le Dimna, F. Madec et A. Jestin (2001). An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J Comp Pathol* 125: 292-303.

Allan G., B. Meehan, D. Todd, S. Kennedy, F. McNeilly, J. Ellis, E. G. Clark, J. Harding, E. Espuna, A. Botner et C. Charreyre (1998a). Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* 142: 467-468.

Allan G. M., D. P. Mackie, J. McNair, B. M. Adair et M. S. McNulty (1994a). Production, preliminary characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 357-371.

Allan G. M., F. McNeilly, J. C. Foster et B. M. Adair (1994b). Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. *Vet Microbiol* 41: 267-279.

Allan G. M., K. V. Phenix, D. Todd et M. S. McNulty (1994c). Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinarmed B* 41: 17-26.

Allan G. M., F. McNeilly, J. P. Cassidy, G. A. Reilly, B. Adair, W. A. Ellis et M. S. McNulty (1995). Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol* 44: 49-64.

Allan G. M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Daft, E. G. Clarke, J. A. Ellis, D. M. Haines, B. M. Meehan et B. M. Adair (1998b). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10: 3-10.

Allan G. M., F. Mc Neilly, B. M. Meehan, S. Kennedy, D. P. Mackie, J. A. Ellis, E. G. Clark, E. Espuna, N. Saubi, P. Riera, A. Botner et C. E. Charreyre (1999a). Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol* 66: 115-123.

Allan G. M., S. Kennedy, F. McNeilly, J. C. Foster, J. A. Ellis, S. J. Krakowka, B. M. Meehan et B. M. Adair (1999b). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121: 1-11.

Allan G. M. et J. A. Ellis (2000). Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12: 3-14.

Allan G. M., E. McNeilly, S. Kennedy, B. Meehan, D. Moffett, F. Malone, J. Ellis et S. Krakowka (2000). PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146: 711-712.

Arnon R. et T. Ben-Yedidia (2003). Old and new vaccine approaches. *Int Immunopharmacol* 3: 1195-1204.

Balasz M., J. Segales, C. Rosell, M. Domingo, A. Mankertz, A. Urniza et J. Plana-Duran (1999). Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121: 139-148.

Blanchard P., D. Mahe, R. Cariolet, A. Keranflec'h, M. A. Baudouard, P. Cordioli, E. Albina et A. Jestin (2003a). Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21: 4565-4575.

Blanchard P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. Le Dimna, C. Arnauld, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec et A. Jestin (2003b). An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol* 94: 183-194.

Bogdan J., K. West, E. Clark, C. Konoby, D. Haines, G. Allan, F. McNeilly, B. Meehan, S. Krakowka et J. A. Ellis (2001). Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Can Vet J* 42: 548-550.

Bolin S. R., W. C. Stoffregen, G. P. Nayar et A. L. Hamel (2001). Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 13: 185-194.

Both G. W., L. J. Lockett, V. Janardhana, S. J. Edwards, A. R. Bellamy, F. L. Graham, L. Prevec et M. E. Andrew (1993). Protective immunity to rotavirus-induced diarrhoea is passively transferred to newborn mice from naive dams vaccinated with a single dose of a recombinant adenovirus expressing rotavirus VP7sc. *Virology* 193: 940-950.

Bruce C. B., A. Akrigg, S. A. Sharpe, T. Hanke, G. W. Wilkinson et M. P. Cranage (1999). Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune responses in mice. *J Gen Virol* 80 (Pt 10): 2621-2628.

Calsamiglia M., J. Segales, J. Quintana, C. Rosell et M. Domingo (2002). Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 40: 1848-1850.

Chae C. (2004). Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J* 168: 41-49.

Check E. (2002). Regulators split on gene therapy as patient shows signs of cancer. *Nature* 419: 545-546.

Chen Z., L. Zhang, C. Qin, L. Ba, C. E. Yi, F. Zhang, Q. Wei, T. He, W. Yu, J. Yu, H. Gao, X. Tu, A. Gettie, M. Farzan, K. Y. Yuen et D. D. Ho (2005). Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region. *J Virol* 79: 2678-2688.

Cheung A. K. et S. R. Bolin (2002). Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Arch Virol* 147: 43-58.

Cheung A. K. (2004a). Identification of an octanucleotide motif sequence essential for viral protein, DNA, and progeny virus biosynthesis at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology* 324: 28-36.

Cheung A. K. (2004b). Palindrome regeneration by template strand-switching mechanism at the origin of DNA replication of porcine circovirus via the rolling-circle melting-pot replication model. *J Virol* 78: 9016-9029.

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

Choi C. et C. Chae (1999). In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121: 265-270.

Choi C. et C. Chae (2000). Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J Comp Pathol* 123: 302-305.

Choi C., C. Chae et E. G. Clark (2000). Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 12: 151-153.

Choi J., G. W. Stevenson, M. Kiupel, B. Harrach, L. Anothayanontha, C. L. Kanitz et S. K. Mittal (2002). Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 66: 217-224.

Chuah M. K., D. Collen et T. VandenDriessche (2003). Biosafety of adenoviral vectors. *Curr Gene Ther* 3: 527-543.

Crotty S. et R. Andino (2004). Poliovirus vaccine strains as mucosal vaccine vectors and their potential use to develop an AIDS vaccine. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 835-852.

Darwich L., J. Segales, M. Domingo et E. Mateu (2002). Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 236-242.

Darwich L., M. Balasch, J. Plana-Duran, J. Segales, M. Domingo et E. Mateu (2003a). Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic

wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol* 84: 3453-3457.

Darwich L., S. Pie, A. Rovira, J. Segales, M. Domingo, I. P. Oswald et E. Mateu (2003b). Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* 84: 2117-2125.

Darwich L., J. Segales et E. Mateu (2004). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 149: 857-874.

Drexler I., C. Staib et G. Sutter (2004). Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr Opin Biotechnol* 15: 506-512.

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

Dulac G. C. et A. Afshar (1989). Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res* 53: 431-433.

Eaton R. W. (1997). p-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of p-cymene to p-cumate. *J Bacteriol* 179: 3171-3180.

Edwards S. et J. J. Sands (1994). Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec* 134: 680-681.

Elahi S. M., S. H. Shen, B. G. Talbot, B. Massie, S. Harpin et Y. Elazhary (1999). Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter. *Virology* 261: 1-7.

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

Ellis J., S. Krakowka, M. Lairmore, D. Haines, A. Bratanich, E. Clark, G. Allan, C. Konoby, L. Hassard, B. Meehan, K. Martin, J. Harding, S. Kennedy et F. McNeilly (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest* 11: 3-14.

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

Fenaux M., P. G. Halbur, M. Gill, T. E. Toth et X. J. Meng (2000). Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 38: 2494-2503.

Fenaux M., P. G. Halbur, G. Haqshenas, R. Royer, P. Thomas, P. Nawagitgul, M. Gill, T. E. Toth et X. J. Meng (2002). Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol* 76: 541-551.

Fooks A. R., D. Jeevarajah, J. Lee, A. Warnes, S. Niewiesk, V. ter Meulen, J. R. Stephenson et J. C. Clegg (1998). Oral or parenteral administration of replication-deficient adenoviruses expressing the measles virus haemagglutinin and fusion proteins: protective immune responses in rodents. *J Gen Virol* 79 (Pt 5): 1027-1031.

Ganne V., M. Eloit, A. Laval, M. Adam et G. Trouve (1994). Enhancement of the efficacy of a replication-defective adenovirus-vectored vaccine by the addition of oil adjuvants. *Vaccine* 12: 1190-1196.

Gerloni M., R. Billetta, S. Xiong et M. Zanetti (1997). Somatic transgene immunization with DNA encoding an immunoglobulin heavy chain. *DNA Cell Biol* 16: 611-625.

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

Graham F. L., J. Smiley, W. C. Russell et R. Nairn (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.

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

Harding J.C.S. et E.G. Clark (1997). Recognition and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swine Health Prod* 5(5):201-203.

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

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

Hattermann K., C. Roedner, C. Schmitt, T. Finsterbusch, T. Steinfeldt et A. Mankertz (2004). Infection studies on human cell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2. *Xenotransplantation* 11: 284-294.

He Y., J. Zhang, Z. Mi, P. Robbins et L. D. Falo, Jr. (2005). Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity. *J Immunol* 174: 3808-3817.

Kaiser J. (2005). Gene therapy. Panel urges limits on X-SCID trials. *Science* 307: 1544-1545.

Kamstrup S., A. M. Barfoed, T. H. Frimann, A. S. Ladekjaer-Mikkelsen et A. Botner (2004). Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine* 22: 1358-1361.

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

Kim J. et C. Chae (2001). Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridisation. *Res Vet Sci* 70: 265-269.

Kim J., C. Choi, D. U. Han et C. Chae (2001a). Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. *Vet Rec* 149: 304-305.

Kim J., D. U. Han, C. Choi et C. Chae (2001b). Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 98: 25-31.

Kim J. et C. Chae (2003). A comparison of the lymphocyte subpopulations of pigs experimentally infected with porcine circovirus 2 and/or parvovirus. *Vet J* 165: 325-329.

Kim J., C. Choi et C. Chae (2003a). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 128: 52-59.

Kim J., D. U. Han, C. Choi et C. Chae (2003b). Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* 65: 741-744.

Kiupel M., G. W. Stevenson, S. K. Mittal, E. G. Clark et D. M. Haines (1998). Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet Pathol* 35: 303-307.

Kiupel M., G. W. Stevenson, J. Choi, K. S. Latimer, C. L. Kanitz et S. K. Mittal (2001). Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. *Vet Pathol* 38: 74-82.

Krakovka S., J. A. Ellis, F. McNeilly, S. Ringler, D. M. Rings et G. Allan (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 38: 31-42.

Kyriakis S. C., K. Saoulidis, S. Lekkas, C. Miliotis Ch, P. A. Papoutsis et S. Kennedy (2002). The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 126: 38-46.

Labarque G. G., H. J. Nauwynck, A. P. Mesu et M. B. Pensaert (2000). Seroprevalence of porcine circovirus types 1 and 2 in the Belgian pig population. *Vet Q* 22: 234-236.

Ladekjaer-Mikkelsen A. S., J. Nielsen, T. Stadejek, T. Storgaard, S. Krakowka, J. Ellis, F. McNeilly, G. Allan et A. Botner (2002). Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol* 89: 97-114.

Larochelle R., M. Antaya, M. Morin et R. Magar (1999). Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods* 80: 69-75.

Larochelle R., A. Bielanski, P. Muller et R. Magar (2000). PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol* 38: 4629-4632.

Larochelle R., R. Magar et S. D'Allaire (2002). Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res* 90: 101-112.

LeCann P., E. Albina, F. Madec, R. Cariolet et A. Jestin (1997). Piglet wasting disease. *Vet Rec* 141: 660.

Lekcharoensuk P., I. Morozov, P. S. Paul, N. Thangthumnyom, W. Wajjawalku et X. J. Meng (2004). Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol* 78: 8135-8145.

Lemieux P., N. Guerin, G. Paradis, R. Proulx, L. Chistyakova, A. Kabanov et V. Alakhov (2000). A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 7: 986-991.

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

Liu Q., L. Wang, P. Willson et L. A. Babiuk (2000). Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 38: 3474-3477.

Liu Q., S. K. Tikoo et L. A. Babiuk (2001). Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285: 91-99.

Liu Q., L. Wang, P. Willson, B. O'Connor, J. Keenlside, M. Chirino-Trejo, R. Melendez et L. Babiuk (2002). Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica. *Can J Vet Res* 66: 225-231.

Lopez-Soria S., J. Segales, M. Nofrarias, M. Calsamiglia, H. Ramirez, A. Minguez, I. M. Serrano, O. Marin et A. Callen (2004). Genetic influence on the expression of PCV disease. *Vet Rec* 155: 504.

Lukert, P. D., G. F. de Boer, J. L. Dale, P. Keese, M. S. McNulty, J. W. Randles, et I. Tisher. (1995). The Circoviridae, p. 166-168. *In* F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers (ed.), *Virus taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag, Vienna, Austria.

MacGregor R. R., J. D. Boyer, K. E. Ugen, P. Tebas, T. J. Higgins, Y. Baine, R. B. Ciccarelli, R. S. Ginsberg et D. B. Weiner (2005). Plasmid vaccination of stable HIV-positive subjects on antiviral treatment results in enhanced CD8 T-cell immunity and increased control of viral "blips". *Vaccine* 23: 2066-2073.

Mackinnon J. D. (2000). PMWS and PDNS in Great Britain. *Vet Rec* 147: 144.

Mahe D., P. Blanchard, C. Truong, C. Arnauld, P. Le Cann, R. Cariolet, F. Madec, E. Albina et A. Jestin (2000). Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 81: 1815-1824.

Mandrioli L., G. Sarli, S. Panarese, S. Baldoni et P. S. Marcato (2004). Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 97: 25-37.

Mankertz A., F. Persson, J. Mankertz, G. Blaess et H. J. Buhk (1997). Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 71: 2562-2566.

Mankertz A., J. Mankertz, K. Wolf et H. J. Buhk (1998). Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol* 79 (Pt 2): 381-384.

Mankertz A., K. Hattermann, B. Ehlers et D. Soike (2000). Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol* 145: 2469-2479.

Mankertz A. et B. Hillenbrand (2001). Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology* 279: 429-438.

Mankertz A. et B. Hillenbrand (2002). Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1. *J Gen Virol* 83: 2743-2751.

Massie B., J. Dionne, N. Lamarche, J. Fleurent et Y. Langelier (1995). Improved adenovirus vector provides herpes simplex virus ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. *Biotechnology (N Y)* 13: 602-608.

Massie B., F. Couture, L. Lamoureux, D. D. Mosser, C. Guilbault, P. Jolicoeur, F. Belanger et Y. Langelier (1998). Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol* 72: 2289-2296.

Mayo M. A. (2004). Changes to virus taxonomy 2004. *Arch Virol*.

McNeilly F., G. M. Allan, J. C. Foster, B. M. Adair, M. S. McNulty et J. Pollock (1996). Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function. *Vet Immunol Immunopathol* 49: 295-306.

McNeilly F., I. McNair, D. P. Mackie, B. M. Meehan, S. Kennedy, D. Moffett, J. Ellis, S. Krakowka et G. M. Allan (2001). Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch Virol* 146: 909-922.

McNeilly F., I. McNair, M. O'Connor, S. Brockbank, D. Gilpin, C. Lasagna, G. Boriosi, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka et G. M. Allan (2002). Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 14: 106-112.

Meehan B. M., J. L. Creelan, M. S. McNulty et D. Todd (1997). Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* 78 (Pt 1): 221-227.

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

Meehan B. M., F. McNeilly, I. McNair, I. Walker, J. A. Ellis, S. Krakowka et G. M. Allan (2001). Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch Virol* 146: 835-842.

Morozov I., T. Sirinarumitr, S. D. Sorden, P. G. Halbur, M. K. Morgan, K. J. Yoon et P. S. Paul (1998). Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36: 2535-2541.

Morrissey R. E., C. Horvath, E. A. Snyder, J. Patrick, N. Collins, E. Evans et J. S. MacDonald (2002). Porcine toxicology studies of SCH 58500, an adenoviral vector for the p53 gene. *Toxicol Sci* 65: 256-265.

Nagata L. P., W. G. Hu, S. A. Masri, G. A. Rayner, F. L. Schmaltz, D. Das, J. Wu, M. C. Long, C. Chan, D. Proll, S. Jager, L. Jebailey, M. R. Suresh et J. P. Wong (2005). Efficacy of DNA vaccination against western equine encephalitis virus infection. *Vaccine* 23: 2280-2283.

Nawagitgul P., I. Morozov, S. R. Bolin, P. A. Harms, S. D. Sorden et P. S. Paul (2000a). Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81: 2281-2287.

Nawagitgul P., I. Morozov, T. Sirinarumitr, S. D. Sorden et P. S. Paul (2000b). Development of probes to differentiate porcine circovirus types 1 and 2 in vitro by in situ hybridization. *Vet Microbiol* 75: 83-89.

Nawagitgul P., P. A. Harms, I. Morozov, B. J. Thacker, S. D. Sorden, C. Lekcharoensuk et P. S. Paul (2002). Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 33-40.

Niagro F. D., A. N. Forsthoefel, R. P. Lawther, L. Kamalanathan, B. W. Ritchie, K. S. Latimer et P. D. Lukert (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol* 143: 1723-1744.

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

Okuda Y., M. Ono, S. Yazawa et I. Shibata (2003). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *J Vet Diagn Invest* 15: 107-114.

Opriessnig T., S. Yu, J. M. Gallup, R. B. Evans, M. Fenaux, F. Pallares, E. L. Thacker, C. W. Brockus, M. R. Ackermann, P. Thomas, X. J. Meng et P. G. Halbur (2003). Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* 40: 521-529.

Opriessnig T., E. L. Thacker, S. Yu, M. Fenaux, X. J. Meng et P. G. Halbur (2004). Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs by Dual Infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus Type 2. *Vet Pathol* 41: 624-640.

Oualikene W., L. Lamoureux, J. M. Weber et B. Massie (2000). Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy. *Hum Gene Ther* 11: 1341-1353.

Ouardani M. (2001). Étude biologique du circovirus porcin associé au syndrome de dépérissement en post-sevrage des porcs. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique: Mémoire de maîtrise.

Ouardani M., L. Wilson, R. Jette, C. Montpetit et S. Dea (1999). Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J Clin Microbiol* 37: 3917-3924.

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

Plana-Duran J., M. Balasch, J. Segales, C. Rosell, G. M. Rodriguez-Arrioja, M. Domingo, J. M. Folch, A. Sanchez et A. Mankertz (1999). Post-weaning multisystemic wasting syndrome in Spain. *Vet Rec* 145: 87-88.

Pogranichniy R. M., K. J. Yoon, P. A. Harms, S. D. Sorden et M. Daniels (2002). Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 14: 449-456.

Pogranichnyy R. M., K. J. Yoon, P. A. Harms, S. L. Swenson, J. J. Zimmerman et S. D. Sorden (2000). Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol* 13: 143-153.

Pringle C. R. (1999). Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch Virol* 144: 2065-2070.

Quintana J., M. Balasch, J. Segales, M. Calsamiglia, G. M. Rodriguez-Arrioja, J. Plana-Duran et M. Domingo (2002). Experimental inoculation of porcine circoviruses type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in rabbits and mice. *Vet Res* 33: 229-237.

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

Resendes A. R., N. Majo, J. Segales, E. Mateu, M. Calsamiglia et M. Domingo (2004). Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2. *J Gen Virol* 85: 2837-2844.

Rodriguez-Arrioja G. M., J. Segales, M. Balasch, C. Rosell, J. Quintant, J. M. Folch, J. Plana-Duran, A. Mankertz et M. Domingo (2000). Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Vet Rec* 146: 762-764.

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

Rodriguez-Arrioja G. M., J. Segales, C. Rosell, A. Rovira, J. Pujols, J. Plana-Duran et M. Domingo (2003). Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50: 99-101.

Romano G., P. Michell, C. Pacilio et A. Giordano (2000). Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 18: 19-39.

Rosell C., J. Segales, J. Plana-Duran, M. Balasch, G. M. Rodriguez-Arrioja, S. Kennedy, G. M. Allan, F. McNeilly, K. S. Latimer et M. Domingo (1999). Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120: 59-78.

Rosell C., J. Segales, J. A. Ramos-Vara, J. M. Folch, G. M. Rodriguez-Arrioja, C. O. Duran, M. Balasch, J. Plana-Duran et M. Domingo (2000). Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146: 40-43.

Russell W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81: 2573-2604.

Sallenave J. M., Z. Xing, A. J. Simpson, F. L. Graham et J. Gauldie (1998). Adenovirus-mediated expression of an elastase-specific inhibitor (elafin): a comparison of different promoters. *Gene Ther* 5: 352-360.

Sanchez R. E., Jr., P. Meerts, H. J. Nauwynck et M. B. Pensaert (2003). Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet Microbiol* 95: 15-25.

Sang H., V. M. Pisarev, C. Munger, S. Robinson, J. Chavez, L. Hatcher, P. Parajuli, Y. Guo et J. E. Talmadge (2003). Regional, but not systemic recruitment/expansion of dendritic cells by a pluronic-formulated Flt3-ligand plasmid with vaccine adjuvant activity. *Vaccine* 21: 3019-3029.

Sarli G., L. Mandrioli, M. Laurenti, L. Sidoli, C. Cerati, G. Rolla et P. S. Marcato (2001). Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 83: 53-67.

Sato K., T. Shibahara, Y. Ishikawa, H. Kondo, M. Kubo et K. Kadota (2000). Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 62: 627-633.

Segales J., M. Sitjar, M. Domingo, S. Dee, M. Del Pozo, R. Noval, C. Sacristan, A. De las Heras, A. Ferro et K. S. Latimer (1997). First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec* 141: 600-601

Segales J., F. Alonso, C. Rosell, J. Pastor, F. Chianini, E. Campos, L. Lopez-Fuertes, J. Quintana, G. Rodriguez-Arriola, M. Calsamiglia, J. Pujols, J. Dominguez et M. Domingo (2001). Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 81: 37-44.

Segales J., M. Calsamiglia, C. Rosell, M. Soler, J. Maldonado, M. Martin et M. Domingo (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Vet Microbiol* 85: 23-30.

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

Segales J., M. Domingo, F. Chianini, N. Majo, J. Dominguez, L. Darwich et E. Mateu (2004). Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol* 98: 151-158.

Seligman S. J. et E. A. Gould (2004). Live flavivirus vaccines: reasons for caution. *Lancet* 363: 2073-2075.

Shanley J. D. et C. A. Wu (2003). Mucosal immunization with a replication-deficient adenovirus vector expressing murine cytomegalovirus glycoprotein B induces mucosal and systemic immunity. *Vaccine* 21: 2632-2642.

Sharpe S., A. Fooks, J. Lee, K. Hayes, C. Clegg et M. Cranage (2002). Single oral immunization with replication deficient recombinant adenovirus elicits long-lived transgene-specific cellular and humoral immune responses. *Virology* 293: 210-216.

Shibahara T., K. Sato, Y. Ishikawa et K. Kadota (2000). Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci* 62: 1125-1131.

Shibata I., Y. Okuda, S. Yazawa, M. Ono, T. Sasaki, M. Itagaki, N. Nakajima, Y. Okabe et I. Hidejima (2003). PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci* 65: 405-408.

Shiver J. W., T. M. Fu, L. Chen, D. R. Casimiro, M. E. Davies, R. K. Evans, Z. Q. Zhang, A. J. Simon, W. L. Trigona, S. A. Dubey, L. Huang, V. A. Harris, R. S. Long, X. Liang, L. Handt, W. A. Schleif, L. Zhu, D. C. Freed, N. V. Persaud, L. Guan, K. S. Punt, A. Tang, M. Chen, K. A. Wilson, K. B. Collins, G. J. Heidecker, V. R. Fernandez, H. C. Perry, J. G. Joyce, K. M. Grimm, J. C. Cook, P. M. Keller, D. S. Kresock, H. Mach, R. D. Troutman, L. A. Isopi, D. M. Williams, Z. Xu, K. E. Bohannon, D. B. Volkin, D. C. Montefiori, A. Miura, G. R. Krivulka, M. A. Lifton, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, N. L. Letvin, M. J. Caulfield, A. J. Bett, R. Youil, D. C. Kaslow et E. A. Emini (2002). Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415: 331-335.

Sirinaramitr T., S. D. Sorden, I. Morozov et P. S. Paul (2001). Double in situ hybridization for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus (PCV). *J Vet Diagn Invest* 13: 68-71.

Spillane P., S. Kennedy, B. Meehan et G. Allan (1998). Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet Rec* 143: 511-512.

Steinfeldt T., T. Finsterbusch et A. Mankertz (2001). Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* 291: 152-160.

Stevenson G. W., M. Kiupel, S. K. Mittal et C. L. Kanitz (1999). Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet Pathol* 36: 368-378.

Stevenson G. W., M. Kiupel, S. K. Mittal, J. Choi, K. S. Latimer et C. L. Kanitz (2001). Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 13: 57-62.

Tang M., J. A. Harp et R. D. Wesley (2002). Recombinant adenovirus encoding the HA gene from swine H3N2 influenza virus partially protects mice from challenge with heterologous virus: A/HK/1/68 (H3N2). *Arch Virol* 147: 2125-2141.

Tatsis N. et H. C. Ertl (2004). Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* 10: 616-629.

Tischer I., R. Rasch et G. Tochtermann (1974). Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* 226: 153-167.

Tischer I., H. Gelderblom, W. Vettermann et M. A. Koch (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295: 64-66.

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

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

Tischer I. et H. J. Buhk (1988). Viral DNA from cells infected with porcine circovirus. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 270: 280-287.

Tischer I., L. Bode, J. Apodaca, H. Timm, D. Peters, R. Rasch, S. Pociuli et E. Gerike (1995). Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol* 140: 1427-1439.

Todd D., J. H. Weston, D. Soike et J. A. Smyth (2001). Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286: 354-362.

Torres J. M., C. Sanchez, C. Sune, C. Smerdou, L. Prevec, F. Graham et L. Enjuanes (1995). Induction of antibodies protecting against transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) by recombinant adenovirus expressing TGEV spike protein. *Virology* 213: 503-516.

Trujano M., G. Iglesias, J. Segales et J. M. Palacios (2001). PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet Rec* 148: 792.

Truong C., D. Mahe, P. Blanchard, M. Le Dimna, F. Madec, A. Jestin et E. Albina (2001). Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch Virol* 146: 1197-1211.

Vajdy M., I. Srivastava, J. Polo, J. Donnelly, D. O'Hagan et M. Singh (2004). Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunol Cell Biol* 82: 617-627.

Vincent I. E., C. P. Carrasco, B. Herrmann, B. M. Meehan, G. M. Allan, A. Summerfield et K. C. McCullough (2003). Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol* 77: 13288-13300.

Walker I. W., C. A. Konoby, V. A. Jewhurst, I. McNair, F. McNeilly, B. M. Meehan, T. S. Cottrell, J. A. Ellis et G. M. Allan (2000). Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 12: 400-405.

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

West K. H., J. M. Bystrom, C. Wojnarowicz, N. Shantz, M. Jacobson, G. M. Allan, D. M. Haines, E. G. Clark, S. Krakowka, F. McNeilly, C. Konoby, K. Martin et J. A. Ellis (1999). Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11: 530-532.

Xiang Z. Q., Y. Yang, J. M. Wilson et H. C. Ertl (1996). A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 219: 220-227.

Yang J. S., D. S. Song, S. Y. Kim, K. S. Lyoo et B. K. Park (2003). Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 15: 369-373.

Yano A., A. Onozuka, Y. Asahi-Ozaki, S. Imai, N. Hanada, Y. Miwa et T. Nisizawa (2005). An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine* 23: 2322-2326.

Annexe I

Afin de détecter les Ac contre le CVP2, la technique traditionnelle utilise des cellules PKA infecté avec le CVP2. Hors, cette approche comprend une faiblesse, soit que le CVP2 ne se réplique très facilement, entraînant une perte de sensibilité. Le présent article, intitulé 'Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use of the protein in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs' présente une nouvelle approche dans la detection d'Ac contre le CVP2. En transfectant un plasmide, dans ce cas ci, le pCEP5-6H-ORF2, sur les cellules 293, les résultats de cet article démontrent une augmentation de la sensibilité suite à un IFI avec différents sérums comparativement à la méthode précédente. Ma participation dans ce travail consistait à préparation de cellules transfectées pour les tests d'immunofluorescences. Il est également à noter que ce vecteur est le même que nous avons utilisé lors de mon mémoire pour la détection d'Ac contre l'ORF2 du CVP2.

Eucaryotic Expression of the Nucleocapsid Protein Gene of Porcine Circovirus Type 2 and Use of the Protein in an Indirect Immunofluorescence Assay for Serological Diagnosis of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs

Sébastien Racine,* Ali Kheyar, Carl A. Gagnon, Benoît Charbonneau, and Serge Dea†

INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Received 12 December 2003/Returned for modification 16 January 2004/Accepted 18 March 2004

The purpose of this study was to develop a sensitive, rapid, and inexpensive immunofluorescence assay (IFA) using a recombinant porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid protein for the serological detection of PCV2-specific antibodies in pig sera. The viral nucleocapsid protein encoded by the PCV2 ORF2 gene has recently been identified as the most immunoreactive viral protein that carries type-specific antigenic determinants. The ORF2 sequence of the IAF-2897 strain of PCV2 has been cloned into a pCEP5 eucaryotic expression vector under the control of the cytomegalovirus promoter, downstream of a polyhistidine sequence tag. The recombinant plasmid was used in transfection experiments with human epithelial kidney 293 cells that were further tested, and positive expression of the viral nucleocapsid protein was confirmed by IFA and Western blotting. Strong, specific fluorescence was observed in the nuclei of transfected cells. Test specificity to PCV2 was verified with several related infectious agents. Sensitivity was compared to that of standard IFA using PCV2-infected cells by evaluating the reactivities of 44 field serum samples from pigs on farms with a porcine population suffering from postweaning multisystemic wasting syndrome. The recombinant nucleocapsid-based test was able to detect 15 more positive-testing pigs than the PCV2-based IFA. Therefore, the relative sensitivity of the latter test was estimated at only 57.1% compared to that of the recombinant nucleocapsid-based test. The recombinant fusion protein has been purified by affinity chromatography and is being used to develop further sensitive serological tests.

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is an emerging swine disease first described in Canada in 1991 (7, 13); subsequent outbreaks have frequently struck pig farms in North and South America and in Europe and Asia (2, 3, 6, 15, 22, 28). The disease affects 5- to 12-week-old piglets and is characterized in part by weight loss, dyspnea, jaundice, and enlarged lymph nodes as well as by degeneration and necrosis of hepatocytes, multifocal lymphohistiocytic pneumonia, lymphocytic depletion, and multinucleated giant cell formation (13). Typically, morbidity rates can reach 5 to 50% in affected herds, and mortality is close to 100% in pigs that develop the full spectrum of symptoms associated with the disease (19). The rapid and simultaneous emergence of the disease in many different parts of the world as well as the uncertain mode of transmission and high rates of mortality in pigs suffering from PMWS has caused great concern throughout the swine industry. The agent thought to be mainly responsible for PMWS has been identified; a circovirus-like particle isolated from diseased pigs was associated with the syndrome and named recombinant (rec) porcine circovirus type 2 (PCV2) (2, 11, 12).

The first porcine circovirus, now known as PCV1, was discovered in 1974 as a nonpathogenic contaminant of the porcine kidney PK-15 cell line (27). It has since been characterized

as a small nonenveloped single-stranded DNA virus with a 1.76-kb ambisense genome (25). Antibodies against the virus have been found in pigs worldwide, but no discernible pathogenic properties have been associated with PCV1 infection in swine (8, 10, 24). PCV2, isolated from pigs suffering from PMWS displays a 76 to 83% amino acid identity with nonpathogenic PCV1 and shares the same genomic organization, consisting of two major open reading frames (ORFs) coding for the replicase protein (Rep) and the nucleocapsid (NC) protein, respectively (12, 18, 19). The 702-nucleotide ORF2 sequence coding for the PCV2 NC protein is located on the complementary strand of the double-stranded replicative form of the PCV2 genome and shares only 66% amino acid identity with the sequence of the PCV1 ORF2, compared with an 85% identity between the ORF1s of both viruses (12). These data have led scientists to speculate that the PCV2 NC protein may be at least in part responsible for the pathogenicity associated with PCV2. Recently, several studies have suggested that the 28-kDa PCV2 NC protein is the major immunogenic protein of the virus and the principal bearer of type-specific epitopes (14, 20).

PMWS is most commonly diagnosed on the basis of the presence of histopathological lesions, its characteristic clinical symptoms, and on the detection of PCV2 in the lesions (23). Current methods most commonly used for the detection of PCV2 in pigs include indirect immunofluorescence assays (IFA) for PCV2-infected cells and PCR (21). Because the use of PCR requires several time-consuming steps, IFA is generally preferred for rapid and inexpensive diagnosis of PMWS.

* Corresponding author. Mailing address: c/o Peter Tijssen, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. Des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7. Phone: (450) 687-5010. Fax: (450) 686-5501. E-mail: peter.tijssen@inrs-iaf.quebec.ca.

† In memoriam. Deceased January 2003.

TABLE 1. Oligonucleotide primers used for the construction and sequencing of the pCEP5-6H-ORF2 plasmid

Primer	Sense ^a	Sequence ^b	Length (bp)
6H-F2 no. 1	F	5'- <u>ACCATCA</u> <u>GGTGACGATGACGATAAGGATATGACGTATCC</u> <u>AGGAGCGG-3'</u>	49
6H-F2 no. 2	F	5'- <u>CGCGGATCCGCGATGCATCACCATCACCATCA</u> <u>CGGTGACGATGACGA-3'</u>	47
F2	R	5'- <u>CGCGGATCCGCGACCGGATCC</u> <u>CGCGTTAGGGTTAAGTGGGGGGT-3'</u>	44
SeqpCEP-F	F	5'-GAGTGACAATGACATCCAC-3'	19
SeqpCEP-R	R	5'-GTCCTCCGAGTGAGAGAC-3'	19

^a F, forward; R, reverse.

^b Nucleotide sequences corresponding to BamHI digestion sites are underlined, the polyhistidine sequences are boxed, the enterokinase digestion sites are in bold, and nucleotides corresponding to the ORF2 sequence are italicized.

However, IFA requires the prior infection of porcine cells with live PCV2 virus, a procedure which can be very arduous because of its very slow replication cycle. The aim of this work was to develop a rapid, easy-to-use, and inexpensive ORF2-based serological diagnostic assay for PCV2 detection on the basis of a rec-PCV2 NC protein produced in a eucaryotic expression system.

(This report was taken in part from a dissertation to be submitted by S. Racine to the INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, in partial fulfillment of the requirements for the M.Sc. degree.)

MATERIALS AND METHODS

Virus, cells, and antisera. In a previous work, the IAF-2897 strain of PCV2 virus was isolated from lung tissue of young pigs with typical clinical signs of PMWS in Quebec farms and its genome was entirely sequenced (GenBank accession no. AF408635) (21). The virus was propagated in PCV1-free, PK-15 porcine kidney (PKA) cells, which were graciously provided by A. Afshar (Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada, Nepean, Ontario, Canada). Cells were infected at a very low level of confluence with purified virus and grown in monolayers for 3 to 4 days in GIBCO minimal essential medium (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 5% fetal bovine serum, 1 mM glutamine, 1% sodium pyruvate, and 100 μ M penicillin-streptomycin. When cells reached confluence, supernatant was removed and cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). The virus was harvested by freezing and thawing the infected cells three times in a small volume of PBS. The resulting cell lysate was then clarified by centrifugation. Viral genomic DNA was extracted from stocks of virus with TriPure DNA isolation reagent (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada) according to the manufacturer's recommendations. Transfection experiments were carried out with the human embryonic kidney 293 cell line (ATCC CRL-1573). Cells were grown in GIBCO Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen) supplemented with 5% fetal bovine serum, 1 mM glutamine, 1% sodium pyruvate, and 100 μ M penicillin-streptomycin.

To produce a swine reference serum for use in serological tests of the IAF-2897 strain of PCV2, four 5-week-old specific-pathogen-free pigs were injected intranasally with 10⁶ fluorescence units of semipurified PCV2 virus stock. Antisera from inoculated pigs were tested weekly for the presence of PCV2-specific antibodies until bleeding at 63 days postinfection (dpi). Negative-testing serum samples were collected from two noninfected specific-pathogen-free piglets that were maintained under the same conditions. A total of 44 field serum samples collected from different groups of pigs from southern Quebec farms with porcine populations suspected to be infected with PCV2 were provided by Biovet Inc. (St-Hyacinthe, Quebec, Canada).

Cloning of PCV2 ORF2 in a eucaryotic expression vector. The PCV2 ORF2 sequence coding for the virus NC was amplified from the purified PCV2 DNA in two successive PCRs using the primers described in Table 1. These primers were designed to add a polyhistidine sequence to permit purification of the rec protein by use of an affinity column and an enterokinase site for the subsequent removal of the polyhistidine site. All primers overlap with each other or with the ORF2 sequence by 20 to 22 nucleotides. Both PCRs used *Taq* polymerase and consisted of an initial enzyme activation step at 95°C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 48°C for 1 min, and extension at 72°C for 3 min and a final extension at 72°C for 10 min. The first PCR amplified the ORF2 by use of the 6H-F2 no. 1 forward primer and the F2 reverse primer.

The resulting PCR product was then purified using a QIAGEN PCR purification kit (QIAGEN Inc., Mississauga, Ontario, Canada). In the second PCR the 6H-F2 no. 2 forward primer was used with the same F2 reverse primer used previously. A 780-nucleotide DNA sequence of the expected size was confirmed by gel electrophoresis, and the final PCR product was then purified as previously described.

The eucaryotic expression vector pCEP5 derived from the pCEP4 vector (9) was obtained from the laboratory of A. Kamen (BRI, NRC, Montreal, Canada). Both the vector and the final purified PCR product were digested with the BamHI enzyme for 2 h at 37°C. The enzyme was subsequently inactivated by incubation at 65°C for 20 min. The digested PCR product and plasmid were then ligated using T4 DNA ligase at 14°C for 14 h. *Escherichia coli* DH5 α competent cells were transformed using the resulting pCEP-6H-ORF2 plasmid. Positive clones were screened by PCR, restriction enzyme digestion, and DNA sequencing using the SeqpCEP primers detailed in Table 1.

Expression of the rec nucleocapsid protein. Transfection experiments were carried out in either 96-well plaques or 60-cm² petri dishes, and 293 or PKA cells as well as polyethyleneimine (PEI) gene transfer reagent (5) in its 25-kDa linear form (Polysciences, Warrington, Pa.) were used for all transfection experiments. Typically, 1 μ g of linear 25-kDa PEI was mixed with 1 μ g of pCEP5-6H-ORF2 DNA plasmid in a total volume of 100 μ l of GIBCO serum-free Dulbecco's modified Eagle medium. This mix was incubated at 37°C for 10 min, and then 20 μ l per well was added to the subconfluent 293 or PKA cell monolayers and incubated in standard culture conditions for 48 h.

Expression of the PCV2 ORF2 in transfected cells was verified by IFA using polyclonal PCV2 porcine sera from pigs experimentally infected with purified PCV2, as well as sera from PCV-free pigs. Briefly, transfected cells were washed with PBS and fixed with an acetone-methanol solution (1:1). Fixed cells were then rehydrated with PBS for 10 min. PCV2-positive and -negative pig sera were diluted at 1/100 in PBS with 0.15% Tween 20 and incubated with cells for 1 h at 37°C. Cells were washed three times with PBS and then incubated with rabbit anti-pig immunoglobulin G-fluorescein isothiocyanate conjugate (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) diluted 1/100 in PBS during 45 min at 37°C. Cells were finally observed and photographed with an epifluorescence microscope (Leica; Leitz, Wetzlar, Germany). PCV2-infected PKA cells were also used as controls as described above.

Purification and characterization of rec protein. 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2 expression vector in 100-mm-diameter petri dishes were lysed with a cell lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris [pH 7.8], 1% Triton X, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS]) containing protease inhibitors. The cell lysate was then solubilized by repeated passage through a syringe and added to a HiTrap chelating affinity column (Amersham Pharmacia Biotech, Bale d'Urté, Québec, Canada) per the manufacturer's instructions. Collected fractions were screened for the presence of the rec ORF2 protein by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting.

Collected fractions of purified 6H-ORF2 protein as well as nontransfected 293 cell lysate and purified virus preparation were analyzed by Western blotting. Proteins were separated in SDS-12% polyacrylamide electrophoresis gels by use of the standard method and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada), which was then incubated in blocking solution (4% skim milk, 0.05% Tween 20 in PBS). Polyclonal anti-PCV2 serum, as well as serum from PCV-free pigs, was diluted 1/500 in blocking solution and incubated with the membranes for 1 h at room temperature. Membranes were washed three times in PBS-Tween 20 and incubated for 1 h with a 1/1,000-diluted solution of goat anti-porcine immunoglobulin G-peroxidase conjugate (Sigma) in blocking solution. After three final washes, the blots were developed with 4-chloro-1-naphthol reagent (Bio-Rad).

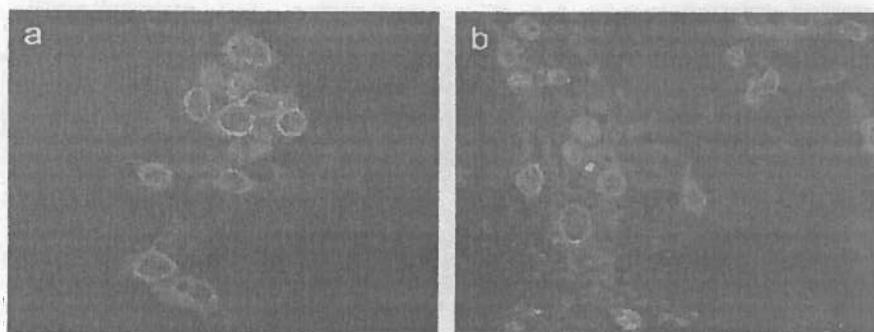


FIG. 1. Localization of the ORF2 protein in transfected cells. Fluorescence was localized in the peri- and intranuclear regions of 293 cells transfected with the pCEP5-6H-ORF2 plasmid (a). This specific fluorescence is similar to that observed in PCV2-infected PKA cells (b). To facilitate observation, the 293 cells were transfected with a suboptimal quantity of pCEP5-6H-ORF2 DNA.

Sensitivity and specificity of the IFA. All field serum samples were tested by IFA on 96-well plaques of either 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2 or PKA cells infected with purified PCV2 as described previously. Serum dilutions from 1/50 to 1/5,000 were used. Sera were considered positive for PCV2 at 1/50. Specificity of both diagnostic tests for PCV2 was assayed by testing serum samples from pigs infected with PCV1, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. The sensitivity values for both assays were determined using the following formulas, with the IFA performed on transfected 293 cells as a reference assay: (i) sensitivity = true positives/(true positives + false negatives) \times 100 and (ii) specificity = true negatives/(true negatives + false positives) \times 100.

RESULTS

Expression of the PCV2 NC protein in transfected cells. A mix of purified plasmid DNA and linear 25-kDa PEI was used to transfect subconfluent monolayers of 293 cells. Transfected cells showed no sign of cellular damage that could be attributed to the presence of the PCV2 NC protein or the PEI transfection reagent. The presence of the NC protein was determined by IFA with various types of antibodies. Intense and specific fluorescence was observed in the nuclei as well as in the perinuclear regions of transfected cells. The pattern of fluorescence was similar to that of PKA cells infected with wild-type PCV2 (Fig. 1).

Transfected cells containing the recNC antigen reacted very strongly to polyclonal anti-PCV2 antibodies but did not cross-react with normal pig serum. The expression levels of the NC protein in in vitro infections of PKA cells and in 293 cells transfected with the pCEP-6H-ORF2 plasmid were compared by IFA (Fig. 2). The proportion of cells expressing the PCV2 NC antigen was much higher in cells transfected with the plasmid than in infected cells. Repeated experiments confirmed that, on average, the PCV2 recNC protein is expressed at levels roughly 9 times higher in cells transfected with the pCEP5-6H-ORF2 plasmid than in cells infected with the virus.

Characterization of the PCV2 recNC protein. Transfection of subconfluent 293 cells in 60-mm-diameter petri dishes with the pCEP-6H-ORF2 plasmid resulted in the production of a significant quantity of PCV2 recNC which could then be recovered by cell lysis as described above. The resulting lysate containing both cellular proteins and the PCV2 recNC antigen

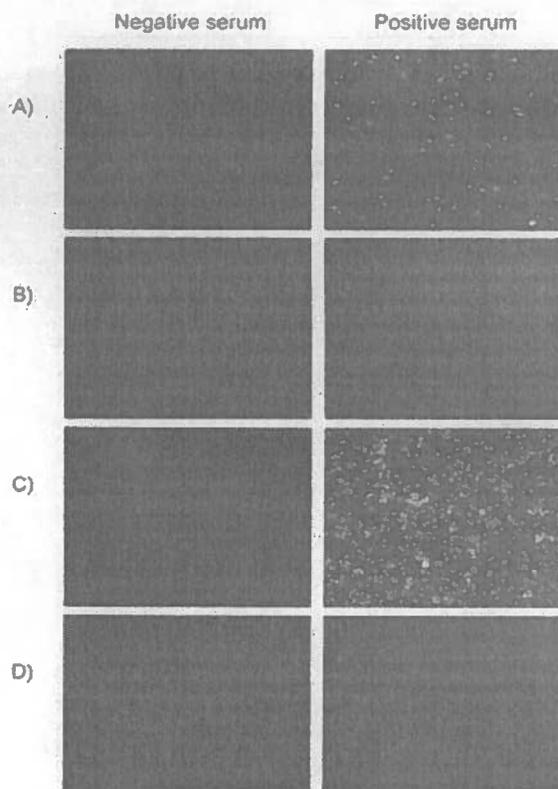


FIG. 2. IFA comparison of PCV2 NC expression levels in PCV2-infected PKA cells and 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2. (A) PKA cells infected with PCV2. (B) Mock-infected PKA cells. (C) 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2. (D) Nontransfected 293 control cells. Cells were incubated with either polyclonal anti-PCV2 pig serum (positive serum) or PCV2-negative pig serum (negative serum).

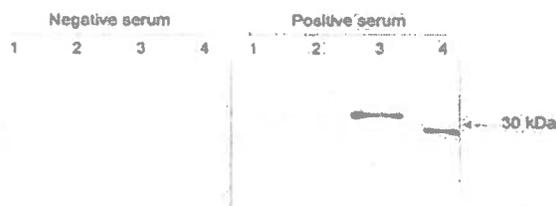


FIG. 3. Expression and purification of rec 6H-ORF2 protein and reactivity with polyclonal anti-PCV2 pig serum and PCV-negative serum in Western blotting. Lane 1, nontransfected 293 cell lysate; lane 2, total protein in cell lysate from 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2; lane 3, 6H-ORF2 protein partially purified in a HiTrap chelating affinity column; lane 4, total protein in cell lysate from concentrated purified PCV2.

was purified by passage through an Ni affinity column. Both the total protein from the cell lysate and the purified recNC reacted specifically in immunoblotting with polyclonal anti-PCV2 serum at a 1/500 dilution (Fig. 3, lanes 2 and 3). The recNC protein had an observed molecular mass of 32 kDa. Concentrated and purified PCV2 virus was used as a control antigen (Fig. 3, lane 4) and produced a specific reaction at a molecular mass of 29 kDa. Neither the recNC nor the purified PCV2 virus reacted with PCV2-negative swine serum.

Accuracy of the rec ORF2-based diagnostic IFA. The accuracy of the test was verified by comparing both the classic IFA diagnostic test using PCV2-infected PKA cells (classic IFA) and the recNC-based test (recNC IFA). All 44 porcine serum samples collected from PMWS-affected swine farms were tested using both IFA tests, and the observed results are summarized in Table 2. A total of 23 serum samples were positive for PCV2-specific antibodies by the PCV2-based test, while 35 serum samples were positive by the recNC-based test. The sensitivity of the classic IFA versus that of the recNC-based test is 57.1% when the latter is used as the reference assay. A total of 15 serum samples that were negative in the classic IFA were considered positive in the recNC IFA.

Among the 35 serum samples that tested positive for PCV2 antibodies in the recNC-based test, 10 showed antibody titers greater than 5,000 whereas only 3 showed antibody levels greater than 2,500 in the classic IFA. Serum samples from six pigs that tested negative in the classic IFA produced antibody titers over 2,500 with the new IFA test. Overall, 25 serum samples produced a significantly higher antibody titer with the recNC IFA than with the classic IFA. In addition, seven positive-testing serum samples gave roughly equal titers and nine were negative with both assays. Only three samples had anti-

body titers that were lower with the recNC IFA than with the classic IFA.

Positive-control sera from pigs infected with PCV1, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus, or *M. hyopneumoniae* were also tested with both IFA (data not shown). Some nonspecific background fluorescence was observed among PCV2-infected PKA cells, but no reactivity whatsoever was observed in cells transfected with the pCEP5-6H-ORF2 plasmid. As a result, both IFA diagnostic tests had a specificity of 100%.

DISCUSSION

The dramatic increase in reported outbreaks of PMWS in pig farms in recent years has been an additional burden for pig producers already under pressure from the threat of other pig pathogens, increased public scrutiny, and intense competition in the marketplace. Early detection of PCV2 in pigs is essential to help contain the spread of the virus and of PMWS. The goal of the present study was to conceive a very specific and extremely sensitive but low-cost and easy-to-use test to help in the diagnosis of cases of early PCV2 infection in pigs. The IFA is probably the most commonly used method for the detection of PCV2 antibodies in pig serum, as it is faster and less expensive than PCR tests and does not require specialized equipment. However, the use of live PCV2 to infect cells used in IFA has always been problematic at best. Because the virus does not produce a visible cytopathic effect in infected cells and replicates only in cells currently undergoing mitosis, PCV2 infections yield very small amounts of virus (1). The use of D-glucosamine to stimulate the entry of cells in the S-phase of mitosis to accelerate the replication of PCV2 has been suggested previously (26). However, it was also reported to be problematic because of its high level of cellular toxicity and therefore should generally be avoided when possible (1). There is also evidence of antigenic cross-reactivity between the Rep proteins of PCV1 and PCV2, which could generate false diagnostic results. Recent studies have demonstrated that the ORF1-encoded proteins in the two viruses were antigenically related whereas the ORF2 proteins were recognized differentially by polyclonal anti-PCV2 antibodies (4, 16, 17). No cross-reactivity was demonstrated between the NC proteins of the two viruses (29).

To circumvent the previous problems, the ORF2 gene from the PCV2 virus was cloned into a pCEP5 eucaryotic expression vector bearing a CMV2 promoter. The resulting pCEP5-6H-ORF2 plasmid was used to transfect cells that could then express the viral NC protein. Initial attempts to transfect PKA cells with the plasmid and either PEI or fuGENE6 transfection reagents (Roche Diagnostics) were a failure. No plasmid DNA was detected in the cytoplasm or the nuclei of transfected cells. Alternatively, 293 cells had previously been used successfully in conjunction with the pCEP5 vector and PEI (9). Subsequent transfection experiments with pCEP5-6H-ORF2 consistently produced clear and distinct fluorescence in the nucleus and the perinuclear area of the 293 cells (Fig. 1). This fluorescence pattern was identical to that observed in naturally infected PKA cells, but background fluorescence was markedly lower in transfected cells.

The proportion of transfected cells expressing the PCV2

TABLE 2. Comparison between IFA for the serologic detection of specific PCV2 antibodies in pigs

Classic IFA result	No. (%) of serum samples with indicated result by recNC IFA		
	Positive	Negative	Total
Positive	20 (45.5)	3 (6.8)	23 (52.3)
Negative	15 (34.1)	6 (13.6)	21 (47.7)
Total	35 (79.6)	9 (20.4)	44 (100.0)

recNC was roughly proportional to the quantity of plasmid DNA used in the transfection mix. Fluorescent cells may be observed with as little as 40 ng of plasmid DNA per well in a 96-well plate, the optimal amount of plasmid being about 200 to 300 ng per well. By use of these conditions, transfection of 293 cells with the plasmid generated on average 9 times more fluorescent cells expressing the PCV2 NC than transfection of PKA cells infected with the virus (Fig. 2). In addition, transfections of 293 cells in 60-mm-diameter petri dishes under the same transfection conditions yielded significantly larger quantities of NC product than transfection of PKA cells infected with PCV2 under the same culture conditions. The addition of a polyhistidine tag to the recNC protein allowed quick and easy purification and concentration of the protein by affinity chromatography with a metal chelate affinity column. Purified and nonpurified recNC from cell lysate analyzed by Western blotting reacted strongly with PCV2-specific antibodies (Fig. 3). As expected, the addition of the polyhistidine tag and the enterokinase restriction site to the NC amino acid sequence increased the molecular mass of the protein to roughly 32 kDa compared to about 29 kDa for the native protein. These results suggest that the recNC protein expressed in transfected cells is immunogenically identical to the native protein.

To determine whether recNC IFA using cells transfected with the pCEP-6H-ORF2 plasmid can be used as an accurate diagnostic tool for the detection of PCV2-specific antibodies in pigs, 44 swine serum samples from several porcine farms in southern Quebec that have had recurrent problems with PMWS outbreaks in the past years have been analyzed. Each serum sample was tested by classic IFA using a diagnostic protocol from local laboratories and by recNC IFA as described in the present study (Table 2). The results strongly indicate that the recNC IFA was able to detect much smaller amounts of antibodies in serum, as evidenced by comparing several serial serum dilutions in each test, and it is therefore a much more sensitive assay. The sensitivity of the classic IFA was only 57.1% compared to that of the recNC IFA. Of the 44 serum samples tested, only three samples that were considered to be positive using the classic IFA were shown to be negative with the recNC IFA. This could be explained by the high amount of background fluorescence often observed in classic IFA, particularly at low serum dilutions. However, fluorescence in transfected cells is strongly localized in the cell nucleus even under conditions of incubation with low serum dilutions. It is noteworthy that both IFA tests were also used with sera collected at different times postinfection from piglets experimentally infected with PCV2. The recNC IFA was able to detect the presence of PCV2-specific antibodies in serum as early as 7 dpi compared to 14 dpi for the classic IFA.

The results presented in this report indicate that an IFA diagnostic test using PCV2 recNC antigen expressed from transfected cells can quickly and accurately detect even small amounts of PCV2 antibodies in pig sera. The sensitivity of the assay is much improved compared to that of the classic IFA method using virus-infected cells. This system is particularly advantageous, because very large amounts of protein can be rapidly and inexpensively produced compared to the results seen with PCV2 infections, which can be relatively difficult to perform and produce only small quantities of virus. In addition, the recNC protein can be immediately purified and con-

centrated by affinity chromatography and can subsequently be used as an antigen for enzyme-linked immunosorbent assays and Western blot analyses and for further characterization studies. Additional work is necessary to determine whether the protein might be used as a subunit vaccine in pigs to prevent infection by PCV2.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Kamen (BRI, NRC, Montreal, Canada) and Biovet Inc. (St-Hyacinthe, Québec, Canada) for providing, respectively, the pCEP5 eucaryotic expression vector and the swine sera from farms with pigs suffering from PMWS. We are grateful to Mourad Ouardani for his technical help as well as to Peter Tijssen for helpful discussions.

This work was partly supported by the Québec Ministry of Agriculture (MAPAQ), the Conseil de Recherche en Pêche et Agro-Alimentaire du Québec (CORPAQ) (grant 102055), and Biovet Inc. (St-Hyacinthe, Québec, Canada).

REFERENCES

- Allan, G. M., and J. A. Ellis. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Investig.* 12:3-14.
- Allan, G. M., F. McNelly, S. Kennedy, B. Duft, E. G. Clark, J. A. Ellis, D. M. Haines, B. M. Meehan, and B. M. Adair. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Investig.* 10:3-10.
- Allan, G. M., F. McNelly, B. M. Meehan, S. Kennedy, D. P. Mackie, J. A. Ellis, E. G. Clark, E. Espuna, N. Souhl, F. Riera, A. Botner, and C. E. Charreyre. 1999. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 66:115-123.
- Blanchard, P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. Le Cana, C. Arnaud, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec, and A. Jestin. 2003. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Microbiol.* 94:183-194.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergoy, D. Scherman, B. Demenech, and J. P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7297-7301.
- Choi, C., C. Chae, and E. G. Clark. 2000. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Investig.* 12:151-153.
- Clark, E. 1997. Post-weaning multisystemic syndrome. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 28:499-501.
- Dulac, G. C., and A. Afshar. 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can. J. Vet. Res.* 53:431-433.
- Durocher, Y., S. Perret, and A. Kamen. 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* 30:E9.
- Edwards, S., and J. J. Sands. 1994. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet. Rec.* 134:680-681.
- Ellis, J., L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Willson, J. Strokappe, K. Martin, F. McNelly, B. Meehan, D. Todd, and D. Haines. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39:44-51.
- Hamel, A. L., L. L. Lin, and G. P. Nayar. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72:5262-5267.
- Harding, J. 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 28:503.
- Liu, Q., S. K. Tikoo, and L. A. Babiak. 2001. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285:91-99.
- Liu, Q., L. Wang, P. Willson, B. O'Connor, J. Keenleyside, M. Chirino-Trejo, R. Melendez, and L. Babiak. 2002. Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica. *Can. J. Vet. Res.* 66:225-231.
- Magar, R., P. Muller, and R. Larochelle. 2000. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can. J. Vet. Res.* 64:184-186.
- Mahe, D., P. Blanchard, C. Truong, C. Arnaud, P. Le Cana, R. Cariolet, F. Madec, E. Albina, and A. Jestin. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 81:1815-1824.
- Meehan, B. M., F. McNelly, D. Todd, S. Kennedy, V. A. Jewhurst, J. A. Ellis, L. E. Hassard, E. G. Clark, D. M. Haines, and G. M. Allan. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79:2171-2179.

- Morozov, I., T. Sirinarumtir, S. D. Sorden, P. G. Halbur, M. K. Morgan, K. J. Yoon, and P. S. Paul. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36:2535-2541.
- Nawagitgul, P., I. Morozov, S. R. Bolln, P. A. Harms, S. D. Sorden, and P. S. Paul. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81(Pt. 9):2281-2287.
- Ouardani, M., L. Wilson, R. Jettie, C. Montpetit, and S. Dea. 1999. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 37:3917-3924.
- Plaana-Duran, J., M. Balasch, J. Segalés, C. Rosell, G. M. Rodríguez-Arrijo, M. Domingo, J. M. Foteh, A. Sanchez, and A. Mankertz. 1999. Post-weaning multisystemic wasting syndrome in Spain. *Vet. Rec.* 145:87-88.
- Rosell, C., J. Segalés, J. Plaana-Duran, M. Balasch, G. M. Rodríguez-Arrijo, S. Kennedy, G. M. Allua, F. McNeilly, K. S. Latimer, and M. Domingo. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs.
24. Tischer, I., L. Bode, D. Peters, S. Pociuli, and B. Germann. 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 140:737-743.
25. Tischer, I., H. Geiderblein, W. Vettermann, and M. A. Koch. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295:64-66.
26. Tischer, I., D. Peters, R. Rasch, and S. Pociuli. 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 96:39-57.
27. Tischer, I., R. Rasch, and G. Tochtermann. 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentbl. Bakteriol. [Orig. A]* 226:153-167.
28. Trujano, M., G. Iglesias, J. Segalés, and J. M. Palacios. 2001. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet. Rec.* 148:792.
29. Truong, C., D. Mahe, P. Blanchard, M. Le Dimna, F. Madec, A. Jestin, and E. Albina. 2001. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and nat-