

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**THÈSE
PRÉSENTÉE À L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU DOCTORAT
EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE**

**PAR
HELMİ MARDASSI**

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION
MOLÉCULAIRE DES PROTÉINES STRUCTURALES
MAJEURES DU VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR
ET RESPIRATOIRE DU PORC (SRRP)**

NOVEMBRE 1996

PRÉAMBULE

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de cinq publications qui sont présentées dans la présente thèse. Pour un meilleur lien entre les différentes parties de ce projet, ces articles ont été regroupés en différents chapitres traitant chacun d'un aspect particulier des objectifs qui ont été fixés. De même, afin de mieux suivre le cours de ces travaux, une brève introduction à chacun de ces articles a été présentée. D'autre part, afin que cette thèse puisse constituer un ensemble cohérent, la version originale de chaque article fut reproduite dans sa totalité en respectant le format de la présente thèse. En conséquence, la numérotation des pages, des figures et des tableaux, ainsi que le style de citation des références, furent ajustés; la page titre du tiré à part de chacun des articles fut annexée à la fin du présent document. Toutefois, les références bibliographiques citées dans chacun des articles ont été rapportées dans la dernière section de la thèse. Globalement, cette thèse est divisée en trois grandes parties. La première constitue une revue bibliographique générale sur le syndrome, son agent causal et d'autres considérations qui lui sont associées. La partie expérimentale de ce travail, qui classiquement comporte la méthodologie, les résultats et leur discussion, est décrite dans chacun des articles qui font l'objet de la deuxième partie. On y retrouve certaines figures qui n'ont pas été incluses dans les publications finales. Par ailleurs, comme pour chaque thèse présentée par articles, tous les résultats ont été assujettis à une discussion générale globale qui constitue la troisième et dernière partie.

À mes parents

Pour leur amour et leur soutien

À ma femme Boutheina et à mon fils Nabil

Pour leur amour et les joies qu'ils me procurent

À mes soeurs

Pour leur amour et leur tendresse

À ma seconde famille: mes beaux-parents, mes belles-soeurs et
mes beaux-frères

Pour leur amour et leur affection

À mon oncle Hammadi
qui me manque ...

À tous ceux que j'aime

Que ce travail puisse traduire l'expression de ma
profonde gratitude

TABLE DES MATIÈRES

	Page
PAGE TITRE	
PRÉAMBULE	ii
DÉDICACES	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
SOMMAIRE	xvii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PARTIE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	8
1. GÉNÉRALITÉS	9
2. LE SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE DU PORC (SRRP)	11
2.1 Apparition et autres dénominations	11
2.2 Manifestations cliniques et lésionnelles	13
2.3 Évolution	17
2.3.1 Les différentes formes cliniques du SRRP	17
2.3.2 Distribution géographique	18
2.4 Importance	20
3. LE VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE DU PORC	22
3.1 Isolement	23
3.2 Hôtes cellulaires	24
3.3 Caractéristiques morphologiques	25
3.4 Caractéristiques physico-chimiques	26
3.5 Multiplication virale	26
3.6 Morphogenèse	28
3.7 Caractéristiques moléculaires	28

3.7.1 Le génome viral	28
3.7.2 Stratégie de réplication et mode de transcription	30
3.7.3 Les protéines virales	35
3.8 Pathogénie de l'infection par le virus du SRRP	38
3.8.1 Réponse immune	39
3.8.1.1 Données sur la réponse humorale	39
3.8.1.2 Données sur la réponse cellulaire	42
3.8.2 Variations antigéniques	43
3.8.3 Virulence	44
3.8.4 Persistance de l'infection virale	44
3.8.5 Transmission	46
4. LES ARTÉRIVIRUS	47
4.1 Propriétés morphologiques	48
4.2 Caractéristiques structurales	48
4.3 Caractéristiques de culture	49
4.4 Caractéristiques pathogéniques	51
5. SUPERFAMILLE DES CORONAVIRUS (CLASSIFICATION)	53
6. CONCLUSION	63
PARTIE II: MÉTHODOLOGIE, RÉSULTATS, ET DISCUSSION	65
CHAPITRE 1: Caractéristiques générales de souches québécoises de référence du SRRP	66
Introduction	67
ARTICLE 1: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: morphological, biochemical, and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome	68

CHAPITRE 2:	Analyses moléculaires du génome du virus du SRRP	105
	Introduction	106
ARTICLE 2:	Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Québec and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome	108
ARTICLE 3:	Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Québec reference strain	129
ARTICLE 4:	Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification	161
CHAPITRE 3:	Synthèse et modifications post-traductionnelles des protéines structurales majeures du virus du SRRP	193
	Introduction	194
ARTICLE 5:	Intracellular synthesis, processing and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus	195
PARTIE III:	DISCUSSION GÉNÉRALE	237
A-	Analyse sérologique et ultrastructurale d'isolats québécois associés au SRRP	238
B-	Identification d'un nouveau génotype du virus du SRRP	242
C-	Identification des protéines structurales du virus du SRRP et de leur(s) région(s) génomique(s) codante(s)	248
D-	Maturation des protéines structurales du virus du SRRP	252
E-	Assemblage du virus du SRRP (schéma hypothétique)	257
F-	Implications dans l'étude immunobiologique des protéines structurales du virus du SRRP et dans la conception d'une stratégie de vaccination	260

CONCLUSION GÉNÉRALE	263
RÉFÉRENCES	267
REMERCIEMENTS	291
ANNEXE A: LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS	294
ANNEXE B: PAGE TITRE DES TIRÉS À PART DES ARTICLES AYANT FAIT L'OBJET DE LA PARTIE II	300

LISTE DES TABLEAUX

		Page
TABLEAU 1	Synonymies du SRRP.	12
TABLEAU 2	Caractéristiques cliniques, pathologiques et virologiques des isolats du virus du SRRP provenant de fermes du Québec. (Clinical history, pathological and virological findings associated with isolation of PRRS virus in Quebec pig farms).	92
TABLEAU 3	Caractéristiques des amorces nucléotidiques déduites de la séquence de l'ARN génomique de la souche IAF-exp91, ayant été utilisées dans la réaction RT-PCR. (RT-PCR oligonucleotide primers deduced from the sequence of the IAF-exp91 genome).	116
TABLEAU 4	Caractéristiques des produits des ORFs 3 à 7 (souche IAF-exp91), telles que déduites à partir de leur séquence en acides aminés (IAF-exp91 ORFs 3 to 7 characteristics).	146
TABLEAU 5	Pourcentages d'homologie entre les séquences en acides aminés des ORFs 3 à 7 des souches IAF-exp91 et LV du virus du SRRP ainsi que des virus EAV et LDV. (Percentage aminoacid identity between predicted IAF-exp91 ORFs 3 to 7 products and those of LV, LDV, and EAV).	147

LISTE DES FIGURES

		Page
FIGURE 1:	Organisation génomique et stratégie de réplication des membres du genre Artérovirus.	32
FIGURE 2:	Lien phylogénétique entre les membres de la superfamille des coronavirus.	55
FIGURE 3:	Organisation génomique des coronavirus, torovirus et artérovirus.	57
FIGURE 4:	Organisation du gène de la réplicase (ORF 1a/ 1b) des coronavirus, torovirus et artérovirus.	60
FIGURE 5:	Représentation schématique de la morphologie des virus appartenant aux genres Torovirus, Artérovirus et Coronavirus.	62
FIGURE 6:	Immunomarquage à la protéine A couplée à l'or colloïdal de particules virales extracellulaires du virus du SRRP. (Protein A-immunogold labeling of extracellular viral particles).	94
FIGURE 7:	Coupe ultramince d'un macrophage alvéolaire de porcs infectés par la souche de référence du Québec du virus du SRRP, IAF-exp91. (Ultrathin section of a porcine alveolar macrophage infected with the reference Quebec isolate, IAF-exp91, of PRRS virus.	96
FIGURE 8:	Purification du virus du SRRP (Souche IAF-exp91) produit sur cellules MAP et marqué à la méthionine ³⁵ S, sur un gradient de densité de chlorure de césium et micrographie électronique des particules virales après coloration négative. (Isopyknic purification on a CsCl gradient of the reference Quebec isolate, IAF-exp91, of PRRS virus propagated in PAM cells in the presence of [³⁵ S]methionine and negative stain electronmicrograph of observed viral particles).	98
FIGURE 9:	Ultrastructure de la souche de référence du Québec, IAF-exp91, du virus du SRRP. (Ultrastructure of Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus).	100

- FIGURE 10:** Analyse par radioimmunoprécipitation (RIPA) et immunobuvardage des protéines de la souche IAF-exp91 du virus du SRRP. (Radioimmunoprecipitation and Western immunoblotting patterns of reference Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus). 102
- FIGURE 11:** Réactivité des protéines structurales de la souche de référence IAF-Klop vis-à-vis d'anticorps monoclonaux dirigés contre la nucléocapside de la souche américaine de référence ATCC VR2332. (Reactivity of structural polypeptides of Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus with MoAbs directed against the nucleocapsid protein of the American ATCC-VR2332 reference strain). 104
- FIGURE 12:** Analyse sur gel d'agarose, après digestion par les endonucléases *Not I* et *Sal I*, des clones recombinants portant des ADNc spécifiques de l'extrémité 3' de l'ARN génomique de la souche IAF-exp91. (Figure non publiée) 118
- FIGURE 13:** Séquence des 530 nucléotides de l'extrémité 3' terminale de la molécule d'ARN génomique et leur traduction en acides aminés. (Nucleotide sequence of the 3'-terminal 530 nucleotides of the IAF-exp91 strain of PRRSV, including the N protein gene). 120
- FIGURE 14:** Comparaison des séquences en acides aminés de la protéine N des souches IAF-exp91, LV et la souche de référence allemande du virus du SRRP, avec celles des virus EAV et LDV. (Comparison of the amino acid sequences of the N protein of the IAF-exp91, LV and German reference strains of PRRSV with those of LDV and EAV). 122
- FIGURE 15:** Alignement des séquences nucléotidiques de l'extrémité 3' non codante du génome des souches IAF-exp91, LV et la souche allemande de référence du virus du SRRP. (Sequence alignment of the 3'-end noncoding region of IAF-exp91, LV and the German reference strain of PRRSV genome). 124
- FIGURE 16:** Analyse sur un gel d'agarose des produits d'amplification des paires d'amorces 119R10-55U320 et 119R10-39U356. (Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products obtained using the primer pairs 119R10-55U320 and 119R10-39U356). 126

- FIGURE 17:** Analyse sur un gel d'agarose des produits d'amplification des paires d'amorces 1008PS-1009PR et 1010PLS-1011PLR désignées à partir de la séquence nucléotidique de la souche de référence IAF-exp91. (Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products obtained using primer pairs 1008PS-1009PR and 1010PLS-1011PLR designed from the IAF-exp91 sequence). 127
- FIGURE 18:** Séquence en nucléotides et en acides aminés de l'extrémité 3' (2834 bases) de l'ARN génomique de la souche de référence du Québec, IAF-exp91, du virus du SRRP. (Figure non publiée) 149
- FIGURE 19:** Comparaison des séquences en acides aminés des cadres de lecture 3 à 7 de la souche IAF-exp91 avec leur équivalent chez les souches LV, ATCC VR 2385 et MN-1b. (Comparison of the predicted amino acid sequences of the 3'-terminal genes (ORFs 3 to 7) of Québec PRRSV strain IAF-exp91 with LV and correspondent available sequences from two american isolates (ATCC VR2385 and MN-1b). 152
- FIGURE 20:** Comparaison des profils hydrophatiques des produits des ORFs 3, 4, 5, et 6 des souches IAF-exp91 et LV du virus du SRRP. (Figure non publiée) 154
- FIGURE 21:** Analyse par SDS-PAGE des protéines du virus du SRRP. (SDS-PAGE analysis of PRRSV-induced polypeptides). 156
- FIGURE 22:** Analyse par SDS-PAGE des produits de traduction *in vitro* des cadres de lecture 7, 6 et 5. (SDS-PAGE analysis of the *in vitro* translation products of ORFs 7, 6, and 5). 158
- FIGURE 23:** Glycosylation du produit de traduction *in vitro* du cadre de lecture 5. (Glycosylation of the *in vitro* translated PRRSV ORF 5 product). 160

- FIGURE 24:** Diagramme de la région génomique 3' non codante du virus du SRRP montrant la localisation des différentes amorces, la taille des produits d'amplification ainsi que la sonde spécifique du gène de la nucléocapside. (Diagram of the 3' end of PRRSV genome showing the localization of the oligonucleotide primers, the size of the predicted amplified products and N probe described in the text). 184
- FIGURE 25:** Amplification par PCR du gène de la nucléocapside d'isolats québécois et européens du virus du SRRP, utilisant des amorces spécifiques des souches canadiennes et des amorces communes. (PCR amplification of the nucleocapsid protein gene of Quebec and European isolates of PRRSV using specific and common oligonucleotide primers). 186
- FIGURE 26:** Sensibilité de la réaction RT-PCR pour la détection de l'ARN viral. (Sensitivity of the RT-PCR procedure in detecting viral specific RNA). 188
- FIGURE 27:** Analyse sur gel d'agarose des produits de la réaction RT-PCR à partir de tissus de poumons infectés. [RT-PCR products resulting from enzymatic amplification of PRRSV (IAF-Klop strain) genomic RNA extracted from infected porcine lung tissue]. 190
- FIGURE 28:** Détection du virus du SRRP à partir de tissus de poumons d'animaux expérimentalement infectés en utilisant les techniques de RT-PCR, d'hybridation de type Southern et d'isolement viral sur les cellules MAP. (Detection of PRRSV in lung tissues of experimentally-infected pigs by RT-PCR, Southern blotting, and virus isolation in PAM cultures). 192
- FIGURE 29:** Analyse par SDS-PAGE (10%) des produits d'expression dans *E. Coli* des ORFs 5, 6 et 7 de la souche IAF-Klop du virus du SRRP. (Figure non publiée) 222

FIGURE 30:	Identification des protéines codées par les ORFs 5, 6 et 7 sur des préparations virales purifiées. (Identification of proteins encoded by PRRSV ORFs 5, 6, and 7 in purified viral preparations).	224
FIGURE 31:	Identification des protéines glycosylées du virus du SRRP et analyse de leur type de glycosylation. (Identification of PRRSV glycosylated proteins).	226
FIGURE 32:	Modifications post-traductionnelles des protéines N, M et E du virus du SRRP. (Processing of PRRSV N, M, and E proteins).	228
FIGURE 33:	Interaction entre les protéines de l'enveloppe du virus du SRRP par le biais de ponts disulfures. (Interactions between PRRSV envelope proteins via disulfide bonds).	230
FIGURE 34:	Analyse de la cinétique d'interaction entre les deux protéines de l'enveloppe du virus du SRRP. (Kinetics of PRRSV envelope proteins interactions).	232
FIGURE 35:	Transport intracellulaire des complexes M-E du virus du SRRP. (Intracellular transport of PRRSV M-E complexes).	234
FIGURE 36:	Localisation intracellulaire des protéines structurales majeures E, M et N du virus du SRRP, propagé dans les cellules MARC-145. (Intracellular localization of the E, M, and N proteins in PRRSV-infected MARC-145 cells).	236

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a a	acide(s) aminé(s)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BEV	Virus de Berne (Torovirus)
BRV	Virus de Breda (Torovirus)
BSA	Albumine sérique bovine
BUDR	5-bromo-2-désoxyuridine
BVDV	Virus de la diarrhée bovine
CPE	Effet cytopathique
CPM	Comptes par minute
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique
DICT50	Dose infectieuse induisant un effet cytopathique dans plus de 50% des cultures infectées
DMEM	Milieu minimal essentiel de Dulbecco
EAV	Virus de l'artérite équine
ELISA	Épreuve immunoenzymatique
EMCV	Virus de l'encéphalomyocardite
Endo β	Endoglycosidase spécifique des structures riches en résidus de type lactosamine
Endo H	Endoglycosidase spécifique des structures riches en mannose ou de type hybride
FBS	Sérum foetal de veau
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Glyco F	Endoglycosidase spécifique des chaînes hydrocarbonées indépendamment de leur stade de maturation
GST	Glutathion sulfotransférase
HCV	Coronavirus humain
IAA	Iodoacétamide
IBV	Coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire
IFA (IIF)	Immunofluorescence indirecte
Ig	Immunoglobuline
IP	Test d'immunoperoxidase
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside
IUDR	5-iodo-2-désoxyuridine

k b	Kilobases
k p b	Kilopaires de bases
kDa	kiloDalton
LDV	Virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique de la souris
MARC	Meat Animal Research Center
MAP	Culture primaire de macrophages alvéolaires de porc
MBP	Protéine qui fixe le maltose
MEM	Milieu essentiel minimal
MHV	Virus de l'hépatite murine
MoAb	Anticorps monoclonal
MOI	Multiplicité d'infection
M_r	Masse moléculaire relative
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimide
n t	Nucléotide(s)
ORF	Cadre de lecture ouvert
p b	Paires de bases
PBS	Tampon salin phosphaté
PCR	Amplification d'ADN par réaction en chaîne de l'ADN polymérase
p.i	post-infection
PM	Poids moléculaire
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride (fluorure de p-toluène sulfonyle)
PRRSV	Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin
RE	Réticulum endoplasmique
RIPA	Test de radioimmunoprécipitation
RT	Transcriptase inverse
S	Coefficient de sédimentation
SDS-PAGE	Électrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de SDS
SHFV	Virus de la fièvre hémorragique simienne
SIV	Virus de l'influenza porcin
SDRP	Syndrome dysgénésique et respiratoire porcin
SIRS	Syndrome d'infertilité et respiratoire porcin
SRRP	Syndrome reproducteur et respiratoire du porc
SN	Test de séroneutralisation
TAE	Tampon Tris-acétate
TBE	Tampon Tris-borate
TBS	Tampon Tris-HCl + NaCl
TBS-T	Tampon TBS supplémenté de Tween-20

TGEV	Virus de la gastroentérite transmissible des porcs
TNE	Tampon Tris-NaCl-EDTA
U	Unité

SOMMAIRE

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire du porc (SRRP), a été récemment reconnu comme étant l'agent étiologique primaire d'une entité pathologique qui se manifeste par des troubles respiratoires chez les animaux de tous les âges et par des troubles de la reproduction chez les truies. Ces affections confèrent à cette maladie une importance économique hautement considérable, et ce à cause de la forte mortalité des porcelets, la baisse de croissance des animaux atteints et la chute des paramètres d'élevage. Le virus qui en est responsable présente une morphologie togaviriforme, alors que l'organisation et le mode de répllication de son génome (molécule d'ARN de polarité positive d'environ 15 kb) rappellent ceux des coronavirus. Sur la base de ses caractéristiques morphologiques et moléculaires, le virus du SRRP a été provisoirement classé dans le genre Artérvirus de la famille *Togaviridae*, avec notamment le virus de l'artérite équine (EAV), le virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique de la souris (LDV) et le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV). Le genre Artérvirus est actuellement beaucoup plus affilié aux membres de la famille *Coronaviridae*, et sera probablement considéré sous peu, comme représentant une famille virale à part entière.

Les travaux entrepris dans le cadre de la réalisation de ce programme de recherche ont porté sur certains aspects moléculaires qui faisaient défaut dans les connaissances sur le virus du SRRP. Ils visaient tout d'abord à identifier les protéines structurales du virus et à assigner leur région(s) génomique(s) codante(s). L'analyse moléculaire de ces protéines virales en ce qui a trait à leur synthèse, leurs

modifications post-traductionnelles, ainsi que leur incorporation finale dans les particules virales, a constitué le but ultime du présent travail de recherche.

Par marquage radioactif et radioimmunoprécipitation, il a été possible d'identifier trois protéines structurales majeures désignées N, M, et E, ayant respectivement une masse moléculaire de 15, 19, et 24.5 kDa. Parmi les trois protéines, seule la E est glycosylée. Les expériences préliminaires de traduction *in vitro* ont démontré que ces protéines pourraient être codées respectivement par les cadres de lecture ouverts (ORFs) 7, 6, et 5 situés à l'extrémité 3' de l'ARN génomique. L'assignement des protéines N, M, et E aux ORFs 7, 6, et 5, a été confirmé en utilisant des antisérums monospécifiques dirigés contre le produit d'expression dans *E. coli* de chacun de ces gènes.

Les résultats d'analyses de séquençage d'un isolat de référence du Québec ont révélé des variations génomiques importantes au niveau de l'extrémité génomique 3' terminale, comparativement à la souche prototype européenne. Les variations génomiques observées suggèrent l'existence d'au moins deux génotypes du virus du SRRP. Ces variations génomiques affectent principalement les gènes codant la protéine glycosylée de l'enveloppe (ORF5) et la nucléocapside (ORF7), ce qui suggère que ces deux gènes sont à la base de l'émergence des variants antigéniques.

Des variations génomiques importantes ont aussi été notées au niveau de la région 3' non codante du génome viral. Hormis les mutations nucléotidiques, une insertion de 22 nucléotides fait que la région 3' non codante de la souche IAF-exp91 est la plus longue de tous les membres du genre Artévirus séquencés jusqu'à

maintenant. Par RT-PCR, on a pu constater que cette insertion de nucléotides pourrait constituer un marqueur génétique des souches nord-américaines du virus du SRRP. Cette caractéristique a été mise à profit afin de distinguer les souches nord-américaines des souches européennes par la technique RT-PCR.

En réalisant un marquage bref des cellules infectées suivi de différentes périodes de chasse, il a été possible d'analyser l'acheminement des protéines structurales majeures du virus à partir du lieu de leur synthèse jusqu'à l'étape finale du bourgeonnement viral. Ainsi, il a été démontré que la glycoprotéine de l'enveloppe (E) du virus est retenue pour une durée anormalement longue au niveau du réticulum endoplasmique. Cette protéine acquiert sa conformation finale au bout de 60 min suivant sa synthèse, moment où le virus semble être libéré de la cellule. L'analyse des protéines virales en conditions non réductrices a montré que les deux protéines de l'enveloppe (E et M) se lient très rapidement après leur synthèse par le biais de ponts disulfures donnant naissance à des hétérodimères (complexes M-E). C'est d'ailleurs sous cette forme que ces deux protéines sont incorporées dans le virion. L'association de ces deux protéines sous forme d'hétérodimères semble précéder le processus de glycosylation qui porte sur la protéine E.

Au cours de cette étude, une interaction spécifique entre la protéine de la nucléocapside (N) et les deux protéines de l'enveloppe a aussi été mise en évidence. Les résultats obtenus suggèrent que l'association entre ces protéines a lieu très rapidement après leur synthèse, débutant vraisemblablement par une interaction entre la protéine N et M, avant que cette dernière soit recrutée dans les complexes M-E.

Considérés de façon globale, les résultats de la présente thèse aboutissent à des implications dont il faut tenir compte, non seulement dans l'aspect immunobiologique de l'infection virale, mais aussi dans le cadre des études qui seront amorcées afin de mieux disséquer le cycle viral.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le syndrome reproducteur et respiratoire du porc (SRRP) est une nouvelle entité pathologique qui fut initialement identifiée en 1987 aux États-Unis et au Canada (Keffaber, 1989; Martineau *et al.*, 1991). Il constitue l'exemple typique d'une maladie émergente causée par un nouvel agent, vis-à-vis duquel l'espèce animale cible était entièrement naïve. Il s'agit aussi d'une maladie dont le sort fut grandement influencé par la tendance actuelle à élever les animaux de façon intensive. Cette maladie constitue entre autre un témoignage additionnel sur les dangers inhérents à l'intensification des élevages et le non respect des règles élémentaires de leur gestion sanitaire (Meredith, 1995).

Les troubles liés à cette maladie se manifestent essentiellement sous forme d'avortements massifs, de mise bas de foetus momifiés ou de porcelets mort-nés ou nés faibles, et d'affections respiratoires chez tous les animaux, essentiellement pendant la phase du pré-sevrage (Goyal, 1993). Les pertes engendrées par ces troubles ont conféré à cette maladie une importance économique hautement considérable pour l'industrie porcine (Loula, 1991).

La maladie apparaît sous plusieurs formes cliniques d'une région géographique à une autre, entre différents élevages d'une même région, et entre individus d'un même élevage (Martineau *et al.*, 1991). Selon le degré de sévérité des signes cliniques, la maladie peut se présenter sous une forme aiguë, chronique, ou voire même de façon inapparente. Elle peut prendre une allure épizootique affectant très rapidement la majorité des élevages, alors que dans certains cas, l'infection est présente sous une forme endémique pouvant s'étaler sur une période de trois ans (Meredith, 1995).

Le statut sanitaire de l'industrie de l'élevage porcin au Canada et aux États-Unis au moment de l'apparition du SRRP, comptait déjà plusieurs états pathologiques présents essentiellement sous forme endémique. Ainsi, hormis les affections associées à des agents bactériens (*Streptococcus suis*, *Escherichia coli*, *Serpulina hyodysenteriae*, *Leptospira*, *Chlamydia*,...), la composante respiratoire due notamment aux virus Influenza (SIV), de même que les troubles de la reproduction engendrés par le parvovirus porcin (PPV), ont grandement compliqué la tâche des cliniciens et des chercheurs quant à reconnaître le SRRP en tant qu'une entité pathologique à part, et identifier l'agent causal (Martineau *et al.*, 1991). Effectivement, au début de la maladie, on se demandait si les deux composantes majeures de l'infection, à savoir les troubles de la reproduction et les affections respiratoires, représentaient des manifestations cliniques d'une même entité pathologique ou s'ils résulteraient de deux maladies distinctes ayant apparu de façon simultanée. De même, on ne savait pas non plus si la maladie décrite aux États-Unis était la même que celle observée au Québec. Au niveau lésionnel, de par la pneumonie interstitielle, une pneumonie de type nécrosante et proliférative fut mise en évidence de façon très fréquente (Martineau *et al.*, 1992). En conséquence, pendant les quatre années qui suivirent l'avènement de ce syndrome, et compte tenu de l'hétérogénéité de ses signes cliniques et lésionnels, plusieurs dénominations lui ont été attribuées, dont on retiendra essentiellement le caractère mystérieux et nouveau (Albina *et al.*, 1992b). Plusieurs travaux scientifiques furent donc entrepris, dont des essais cliniques de reproduction expérimentale de la maladie et ce, afin de mettre en évidence l'agent étiologique primaire.

Le virus de l'encéphalomyocardite porcine (EMCV) fut l'un des agents isolés suite aux premiers épisodes de SRRP, à partir de tissus d'avortons aussi bien aux États-Unis qu'au Canada (Kim *et al.*, 1989; Dea *et al.*, 1991). Ce virus

fut considéré comme étant un agent potentiel du SRRP, sur la base de la séropositivité des animaux de plus de 40% des fermes affectées et de son isolement à partir d'avortons. Néanmoins, bien que les expériences d'inoculations expérimentales aient permis de reproduire les lésions de pneumonie interstitielle, la pathologie qui lui est associée demeure suffisamment différente de celle qu'on rencontre lors d'un épisode classique de SRRP. Au cours de cette période, et presque de façon concomitante au Canada et aux États-Unis, des souches de virus influenza de type A furent isolées à plusieurs reprises. Dans certains cas, on a observé des séroconversions vis-à-vis des sous-types H1N1 et H3N2. D'autres souches du virus influenza furent isolées et présentaient un profil sérologique atypique selon les tests d'inhibition de l'hémagglutination et leur réactivité vis-à-vis d'antisérums spécifiques aux souches conventionnelles du virus influenza porcine (A/Wisconsin/H1N1; A/New Jersey/H1N1/76). En utilisant ce même test, ces nouvelles souches n'ont présenté aucune réactivité avec des antisérums dirigés contre les virus influenza humains de types A, B, et C. Le nouveau variant du virus influenza porcine, qualifié "d'atypique", fut hypothétiquement associé à la pneumonie proliférative et nécrosante (Dea *et al.*, 1992c), et tout comme le virus EMCV, son inoculation expérimentale chez des porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiques (SPF) n'a pas permis de reproduire de façon intégrale les signes cliniques du SRRP. Enfin, plusieurs autres agents viraux (cytomégalovirus porcine, parvovirus porcine, virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite, virus de la rhinotrachéite bovine, virus de la diarrhée bovine et virus de la maladie d'Aujeszky) ont retenu l'attention des chercheurs quant à leur implication potentielle dans ce syndrome. Toutefois, les résultats des enquêtes sérologiques et épidémiologiques étaient loin de prouver un lien quelconque avec le syndrome (Goyal, 1993). Par conséquent, la possibilité de l'association entre agents viraux et bactériens fut aussi considérée comme une cause potentielle du syndrome. De même, la

déficience combinée en vitamine E et sélénium, ainsi que l'affection des porcs par des mycotoxines, furent aussi tenues en ligne de compte.

En 1990, un syndrome similaire au SRRP est soudainement apparu en Europe. On a d'abord rapporté la maladie en Allemagne puis partout dans la majorité des pays d'Europe Occidentale. La maladie évolua de façon épizootique, si bien qu'en moins d'une année elle fut signalée dans la presque totalité des pays européens (Meredith, 1992). Des chercheurs néerlandais ont très rapidement rapporté l'isolement d'un nouveau virus sur des cultures primaires de macrophages alvéolaires de porc, qu'ils ont initialement désigné "virus de Lelystad", en référence à la ville de l'institut de recherche où le virus fut isolé (Wensvoort *et al.*, 1991a). Les expériences d'inoculations expérimentales, combinées aux données sérologiques et épidémiologiques, ont définitivement établi ce nouveau virus comme étant l'agent étiologique primaire du SRRP aux Pays-Bas; les quatre postulats de Koch ayant été entièrement reproduits (Terpstra *et al.*, 1991). Dès lors, des sérums provenant de la plupart des pays européens, des États-Unis, et du Canada furent testés par immunopéroxydase et une séroconversion significative vis-à-vis du virus de Lelystad fut mise en évidence dans la plupart des cas. Plusieurs souches virales antigéniquement apparentées au virus de Lelystad furent par la suite isolées en Europe et en Amérique du Nord. La plupart de ces souches ont permis de reproduire le cortège des signes cliniques du SRRP accompagnés d'une séroconversion vis-à-vis de la souche d'inoculation (Meredith, 1995).

Les travaux préliminaires de caractérisation du virus du SRRP indiquent plusieurs points de similarité tant sur le plan morphologique, biologique et moléculaire, avec un groupe de virus jadis inclus dans le genre Artérovirus de la famille des Togaviridae. Ce groupe de virus comprend le virus de l'artérite

équine (EAV), le virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique de la souris (LDV) et le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV). En effet, tout comme ces artérovirus, le virus du SRRP est enveloppé, contient une nucléocapside isométrique, et son génome est constitué d'une molécule d'ARN de polarité positive. Chez leur hôte naturel, ces virus infectent essentiellement les cellules de type macrophage, et tendent à produire une infection persistante (Plagemann et Moennig, 1992).

En automne 1992, date à laquelle le travail de la présente thèse fut entamé, et après que le virus du SRRP fut isolé, on a commencé à s'interroger quant aux conséquences éventuelles de la circulation du virus pendant au moins cinq années précédant son isolement en Amérique du Nord. Selon des études sérologiques, les souches du virus du SRRP se sont avérées antigéniquement très variables, et on peut les subdiviser en deux groupes antigéniques distincts (Wensvoort *et al.*, 1992a). Ainsi, le virus de Lelystad constitue le prototype du groupe antigénique européen, alors que la souche ATCC VR2332, isolée au Minnesota, définit le second groupe antigénique qui comprend la plupart des souches nord-américaines et qui semble être plus hétérogène. Tous ces virus possèdent en commun des épitopes au niveau de la protéine de la nucléocapside reconnus par des anticorps monoclonaux produits contre la souche américaine ATCC VR2332. Les bases moléculaires de cette hétérogénéité antigénique sont complètement inconnues. D'autre part, bien qu'on lui prévoyait une organisation structurale similaire à celle des artérovirus, le nombre exact et la nature des protéines structurales du virus du SRRP demeuraient inconnus. L'une des difficultés initiales majeures qui entravait l'étude de ce virus, était liée à l'absence de lignées cellulaires continues permettant sa multiplication. Certes, bien qu'on ait rapporté la possibilité de propager le virus sur une lignée continue, celle-ci fut initialement strictement

réservée à certains laboratoires. Sur le plan prophylactique, aussitôt que le virus fut isolé, et face à l'ampleur des dégâts économiques qu'il engendrait, on s'empressa à produire et à administrer des vaccins faits de virus atténués, dont on s'est rendu compte, peu après, qu'ils étaient peu efficaces. L'échec de la vaccination a soulevé plusieurs questions dont notamment le rôle de la variation antigénique, la nature même de l'infection et surtout l'immunobiologie des protéines structurales du virus.

Dans le but d'essayer de répondre à certaines des questions soulevées ci-dessus, le travail contenu dans cette thèse fut entrepris. Les objectifs de ce travail, compte tenu du caractère émergent du virus du SRRP, se sont fixés au fur et à mesure que nos recherches progressaient. Comme dans la plupart des laboratoires ayant isolé plusieurs souches du virus du SRRP, nos travaux ont d'abord porté sur la caractérisation générale de plusieurs isolats québécois du virus du SRRP. Les résultats obtenus suite à cette étude, nous ont conduit à explorer l'aspect moléculaire du virus. Ainsi, la deuxième partie du projet consistait à analyser la région génomique du virus qui, sur la base des caractéristiques moléculaires des artérovirus, contiendrait les gènes structuraux. De par les travaux de clonage et de séquençage, nous nous sommes aussi proposés d'identifier de façon plus concrète les protéines structurales du virus ainsi que leur(s) région(s) génomique(s) codante(s). Finalement, afin de fournir les bases moléculaires nécessaires aux études ultérieures en regard de l'immunobiologie des protéines structurales du virus, la maturation complète de celles-ci fut étudiée en détail dans la troisième et dernière partie de ce projet de doctorat.

PARTIE I:
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. GÉNÉRALITÉS

Le caractère émergeant et le contexte même dans lequel le SRRP est apparu, lui ont conféré une importance de type didactique, et ce de par l'importance économique qu'on lui connaît (Meredith, 1995). En effet, bien que l'agent causal soit un nouveau virus chez l'espèce porcine, ses caractéristiques communes aux membres du genre *Artérvirus* (virus de l'artérite équine, virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique de la souris, virus de la fièvre hémorragique simienne) initialement classés dans la famille *Togaviridae*, ont engendré non seulement un regain de considération vis-à-vis de ce groupe de virus, mais aussi l'éventualité de la création d'une nouvelle famille virale qui incluerait les trois artérvirus et le virus du SRRP (Plagemann et Moennig, 1992).

En dépit de leur identification il y a de cela au moins une trentaine d'années, l'état des connaissances sur les artérvirus était loin d'être complet, et cela tient en majeure partie à leur faible importance sur le plan économique. Curieusement, sitôt après l'apparition du virus du SRRP, les travaux sur les artérvirus se sont intensifiés de façon notable, et l'on assista durant les cinq dernières années à une accumulation d'un nombre impressionnant de données concernant notamment leurs aspects moléculaires. Ces derniers ont aussi très rapidement rendu compte de l'étroite relation qui existe entre les artérvirus et les membres de la famille *Coronaviridae*, en ce qui a trait à leur organisation génomique et leur mode de répllication. Ainsi, l'identification préalable des torovirus, dont l'organisation génomique et la stratégie de répllication est aussi similaire à celle des coronavirus, a conduit à la notion de "superfamille des coronavirus". Par conséquent, l'étude du virus du SRRP ne peut

être dissociée, d'une part du cadre des artérovirus qui lui sont très fortement associés, et d'autre part de l'aspect moléculaire des coronavirus.

Par ailleurs, il est important de noter que les connaissances concernant le virus du SRRP ont aussi évolué de manière très rapide, presque de façon simultanée à l'accumulation des données sur les artérovirus. Étant donné que le SRRP était reconnu à l'échelle mondiale, plusieurs travaux émanant de plusieurs équipes ont été parallèlement entrepris. La difficulté de propager ce nouveau virus sur des lignées continues a sérieusement influencé, dans un premier temps, le cours des travaux sur la caractérisation du virus. Ainsi, jusqu'à la fin de l'année 1992, les travaux effectués étaient essentiellement de caractère clinique et épidémiologique; seules des données morphologiques et physico-chimiques étaient disponibles, lesquelles d'ailleurs ont permis d'établir le lien entre le virus du SRRP et les artérovirus.

En tenant compte de toutes les considérations mentionnées ci-dessus, et afin de se placer dans le contexte et la problématique ayant conduit à définir les objectifs du présent travail, la première partie de cette thèse qui est liée à la revue de la littérature concernant le SRRP, sera subdivisée en quatre sections. Au cours des deux premières, une revue sur l'apparition du SRRP, ses aspects cliniques et les caractéristiques de l'agent étiologique, à savoir le virus du SRRP, seront traités. Étant donné que les travaux effectués dans le cadre de la présente thèse ont été publiés au fur et à mesure qu'ils ont été réalisés et ont contribué à enrichir les connaissances sur le virus du SRRP, la littérature concernant ce virus se limitera aux données préexistantes. Les résultats d'autres équipes étroitement liées à ce travail qui ont précédé de peu, ont accompagné, ou sont parus plus tard que les travaux

conduits dans notre laboratoire, seront mentionnés et discutés dans les différents chapitres de la deuxième partie, et finalement repris lors de la discussion générale, soit la troisième partie de la présente thèse. Toutefois, vu que les travaux réalisés sur la séquence et la stratégie de réplication du virus de Lelystad, le prototype européen du virus du SRRP, furent publiés six mois après le début des travaux rapportés dans cette thèse, il en sera tenu compte dans la section portant sur les caractéristiques du virus du SRRP. D'autre part, étant donné le lien étroit établi entre le virus du SRRP et les artérovirus en général, la troisième section sera réservée à ce groupe de virus. Enfin, pour justifier les difficultés relatives au statut taxonomique du virus du SRRP et des artérovirus, la dernière section de cette revue bibliographique tiendra compte des différentes caractéristiques ayant conduit à la notion de la superfamille des coronavirus.

2. LE SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE DU PORC (SRRP)

2.1 Apparition et autres dénominations

La recrudescence chez l'espèce porcine d'importants troubles affectant les systèmes respiratoire et reproducteur fut d'abord remarquée aux États-Unis (Caroline du Nord, Minnesota, et Iowa) à partir de l'année 1987, et on rapporta ainsi l'émergence d'une nouvelle maladie (Keffaber, 1989). Au cours de la même période, un syndrome similaire fut aussi noté au Canada, surtout dans le sud de la province de Québec (Bilodeau *et al.*, 1991; Morin et Robinson, 1991). Étant donné

TABLEAU 1: Synonymie du SRRP (Selon Albina *et al.*, 1992b)

EN FRANCAIS	EN ANGLAIS	AUTRES
Nouvelle Maladie du Porc	New Pig Disease	
Maladie Mystérieuse	Mystery Pig Disease (MPD) Mystery Swine Disease (MSD) Mystery Reproductive Syndrome (MRS)	
Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc (SDRP) Troubles de la Reproduction et de l'appareil Respiratoire du Porc (TRRP)	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS)	
Avortement Épidémique et Syndrome Respiratoire du Porc	Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS)	
Avortement Tardif Épidémique du porc	Epidemic Late Abortion of Swine (ELAS)	Seuchenhafter Spätabort beim Schweine (SSS)
Avortement bleu		Abortus Blauw
Maladie des Oreilles Bleues	"Blue Ear" Disease (BED)	
Syndrome Hyperthermie Anorexie Avortement de la Truie (HAAT) Pneumonie Interstitielle (syndrome HAAT-Pneumonie Interstitielle)	Hyperthermia, Anorexia and Abortion Syndrome of the Sow (HAASS) Interstitial Pneumonia	

l'impossibilité d'associer cette maladie à un agent étiologique connu, elle fut initialement désignée aux États-Unis sous le nom de "maladie mystérieuse du porc" (Dial *et al.*, 1990), tandis qu'au Canada on référerait au Syndrome "Hyperthermie-Anorexie-Avortement de la Truie" ou syndrome "HAAT" (Martineau *et al.*, 1991). Trois ans plus tard, on rapporta en Allemagne (Lindhaus et Lindhaus, 1991) et aux Pays-Bas (Wensvoort *et al.*, 1991b) l'apparition d'une maladie porcine dont les troubles ressemblaient à la maladie mystérieuse du porc, à laquelle on attribua les noms "avortement infectieux tardif des porcs" (Allemagne) et "syndrome respiratoire et avortement épidémique du porc" (Pays-Bas). La maladie s'est répandu très rapidement en Europe et a atteint les pays avoisinants dont la France (Albina *et al.*, 1992b), l'Espagne (Plana *et al.*, 1992), la Belgique, le Royaume-Uni (White, 1991), et le Danemark (Goyal, 1993). Au cours de son évolution, on attribua au syndrome plusieurs dénominations (Tableau 1) et finalement, suite à un symposium international qui s'est tenu au Minnesota en 1992, on adopta la dénomination commune de "Syndrome reproducteur et respiratoire du porc" (SRRP), dénomination qui fut aussi adoptée par l'office international des épizooties (O.I.E).

2.2 Manifestations cliniques et lésionnelles

Les signes cliniques associés au SRRP sont très variables (Blaha, 1992) et ont été, au début de l'apparition du syndrome, à l'origine d'un état de confusion quant au diagnostic précis de cette maladie (Martineau *et al.*, 1991; Albina *et al.*, 1992b; White, 1992; Goyal, 1993). La variabilité des signes cliniques s'observe aussi bien à l'échelle individuelle, entre différents troupeaux, ainsi que d'un pays à l'autre

(Martineau *et al.*, 1992). Toutefois, les troubles liés aux systèmes reproducteur et respiratoire semblent être relativement plus fréquents.

Lors d'un épisode classique de SRRP où la forme aiguë prédomine, les signes cliniques précoces observés à l'échelle d'un élevage rappellent ceux d'un syndrome grippal (Martineau *et al.*, 1991; 1992; White, 1992; Goyal, 1993). En effet, on assiste à l'apparition de conjonctivites, d'inappétence et d'un état léthargique. Certains animaux présentent une légère hyperthermie et on observe un retard de croissance chez les animaux en phase d'engraissement (Albina *et al.*, 1992b). Ces premiers troubles généraux qui s'étalent sur une période maximale de deux semaines (Goyal, 1993) ont été rapportés dans la plupart des pays et semblent concerner 1 à 10% des animaux de l'élevage (Meredith, 1995). Les signes liés à l'affection du système respiratoire apparaissent de façon notable vers la troisième semaine après le début des troubles généraux et peuvent se manifester chez toutes les catégories d'animaux. Néanmoins, les jeunes porcelets en pouponnière et en début d'engraissement développent les troubles respiratoires les plus graves se caractérisant par de la dyspnée, de la toux, de l'éternuement et des coups de flanc (Martineau *et al.*, 1991; Albina *et al.*, 1992b). Ces animaux sont particulièrement sensibles aux infections bactériennes secondaires (*Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella cholerae suis*, *Pasteurella multocida*, et *Actinobacillus pleuropneumoniae*) (Loula, 1991; Blaha, 1992) et accusent un retard de croissance considérable qui est dans la plupart des cas irréversible. Lors d'une affection aiguë typique du SRRP, les troubles liés à la fonction reproductrice demeurent les plus spectaculaires. On assiste à des avortements tardifs pouvant atteindre dans les cas les plus sévères 80% des femelles gestantes (Goyal, 1993), à des mise bas prématurées (5 à 30%) (Loula, 1991; Hopper *et al.*, 1992), et à la

naissance d'animaux momifiés (Martineau *et al.*, 1991). Les femelles ayant mis-bas souffrent souvent d'agalactie entraînant un fort taux de mortalité chez les nouveau-nés (Martineau *et al.*, 1991; Dee, 1992; Hopper *et al.*, 1992). Dans les cas les plus sévères, la mortalité des porcelets entre la naissance et le sevrage atteint un taux de 90% (Martineau *et al.*, 1992). L'avenir reproducteur des femelles est souvent sérieusement compromis, puisqu'on observe un fort taux d'infertilité, des irrégularités du cycle sexuel et une augmentation de l'intervalle sevrage-saillie (Martineau *et al.*, 1991; Albina *et al.*, 1992b). Chez les verrats, on note aussi des troubles au niveau de leur appareil reproducteur, dont notamment une mauvaise qualité de la semence caractérisée par une diminution du nombre et de la motilité des spermatozoïdes (Goyal, 1993).

Le tableau clinique décrit ci-dessus peut s'accompagner d'autres signes moins constants, dont la cyanose des extrémités de la peau (oreilles, queue, vulve, lèvres, et mamelons), des oedèmes (autour des yeux, des mamelons, et des régions périanale et vulvaire), une diarrhée chez les nouveau-nés, des hémorragies au niveau de la peau, voire même des manifestations de prurit (Christianson et Joo, 1994; Meredith, 1995).

Bien que les troubles engendrés par le SRRP peuvent être très sévères lors d'une phase aiguë, les lésions observées ne corrélaient pas souvent avec l'ampleur des signes cliniques. En général, les poumons d'animaux atteints semblent avoir seulement augmentés de taille, présentent souvent une décoloration diffuse en surface (Martineau *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992) et une consolidation du parenchyme (Ramos *et al.*, 1992). Les ganglions bronchiques et/ou médiastinaux sont hypertrophiés et hémorragiques (Pol *et al.*, 1991; Rossow *et al.*, 1994).

Microscopiquement, on peut mettre en évidence une pneumonie de type interstitielle résultant d'une infiltration par des cellules lymphomonocytaires des septa alvéolaires, sans atteinte des bronches et des bronchioles (Martineau *et al.*, 1991; Pol *et al.*, 1991; Albina *et al.*, 1992b). Il y a généralement une absence de cellules et de sérosité dans la lumière alvéolaire, mais on peut rencontrer dans les septa alvéolaires, une hyperplasie des pneumocytes de type II (Halbur *et al.*, 1996). Au niveau du placenta des femelles atteintes, on a noté l'existence de foyers de nécrose (Albina *et al.*, 1992b) et des études plus approfondies ont rapporté une vasculite lymphohistiocytaire multifocale (Stochhufe-Zurwieden *et al.*, 1992). Toutefois, l'inflammation du placenta n'est pas toujours constante chez les femelles ayant avorté et n'a pas pu être reproduite suite à des inoculations expérimentales, si bien que son rôle direct dans l'avortement demeure incompris (Christianson et Joo, 1994). Quant aux foetus momifiés, ils paraissent oedémateux et leurs cavités thoracique et abdominale renferment de grandes quantités de liquides hémorragiques. Chez les porcelets nés vivants, on rapporte des cas d'encéphalite et de myocardite lymphomonocytaires, de pneumonie interstitielle, voire même des cas d'hépatite (Collins *et al.*, 1992). De plus, la muqueuse nasale est affectée par une perte de la ciliature, et par l'arrondissement et la desquamation des cellules épithéliales. Enfin, la population lymphocytaire du thymus, des amygdales et des noeuds lymphatiques mésentériques serait diminuée (Albina *et al.*, 1992b).

Tout comme les signes cliniques, les lésions observées chez les animaux atteints de SRRP sont très variables. Il convient toutefois de signaler la grande fréquence des lésions pulmonaires surtout la pneumonie interstitielle qui serait ainsi la cause majeure des signes respiratoires.

2.3 Évolution

On peut envisager l'évolution du SRRP au sein d'un même élevage, ce qui nous amène à considérer les différentes formes cliniques par lesquelles le syndrome peut se manifester. D'autre part, la dissémination du SRRP au sein d'un même pays ou à travers diverses frontières est sans aucun doute favorisée par la présence de fortes densités porcines et par les échanges commerciaux permettant d'entretenir l'infection. Donc, le contexte géographique peut conditionner de façon considérable l'évolution du syndrome.

2.3.1 Les différentes formes cliniques du SRRP

Hormis l'infection de type aiguë décrite précédemment, des formes inapparentes et chroniques de la maladie ont été rapportées. Dans les élevages qui jouissent d'un bon statut sanitaire, où les animaux sont peu condensés avec une séparation efficace des différentes catégories, le SRRP peut survenir de façon inapparente. Dans ce cas, on peut détecter la séropositivité chez un certain nombre d'animaux en l'absence de signes cliniques (Done et Paton, 1995). Si dans ce type d'élevage on sépare les porcelets sevrés de leur mère, l'infection peut s'éliminer complètement.

Suite à la forme aiguë dramatique du SRRP, qui en moyenne dure 30 à 90 jours, on assiste à un retour graduel des normes d'élevage, les signes de l'infection étant beaucoup plus rapidement éliminés dans les élevages de type extensif (Keffaber *et al.*, 1992; Christianson et Joo, 1994; Meredith, 1995). Toutefois, dans

les élevages ayant contracté cette forme sévère, une réduction à long terme du nombre de porcelets nés vivants ainsi qu'une baisse de 10 à 15% du taux de mises-bas furent notées (Loula, 1991, Benfield *et al.*, 1992a). Les paramètres normaux de la reproduction au sein d'un élevage sont souvent atteints au bout de six mois après le début de l'infection (Goyal, 1993).

La forme chronique du SRRP fut d'abord identifiée au Canada (Martineau *et al.*, 1991), puis un peu plus tard aux États-Unis (Loula, 1991). C'est au niveau des unités du post-sevrage et de l'engraissement que cette forme est la mieux caractérisée (Loula, 1991; Benfield *et al.*, 1992a; Keffaber *et al.*, 1992). Les animaux sont plus sensibles aux infections secondaires virales et bactériennes, d'où un retard de leur croissance et une augmentation du taux de mortalité en post-sevrage (Keffaber *et al.*, 1992). Cette forme chronique semble résulter de la persistance du virus du SRRP dans un élevage initialement affecté par la forme aiguë (voir section pathogénie). Dans les locaux de reproduction, une infection chronique s'installe plus souvent suite à l'introduction dans l'élevage positif, de cochettes séronégatives qui s'infectent et développent éventuellement des troubles de la reproduction. Quant aux truies ayant déjà été atteintes par une phase aiguë du SRRP, elles semblent généralement reprendre leur potentiel reproducteur, tel que mentionné ci-dessus.

2.3.2 Distribution géographique du SRRP

Avec le développement de tests sérologiques pour la détection d'anticorps contre le virus du SRRP, on s'inclina face à l'évidence que la distribution du SRRP

est beaucoup plus étendue qu'on ne le préconisait auparavant en se basant sur l'unique apparition des signes cliniques (Edwards *et al.*, 1992; Morrison *et al.*, 1992b; Cho *et al.*, 1993). Ces mêmes tests ont aussi permis d'estimer l'importance de la forme inapparente du syndrome.

Dès 1987, des chercheurs américains ont rapporté les premiers signes cliniques associés au SRRP (Keffaber, 1989; Loula, 1991). Presque simultanément, on rapporta aussi le SRRP au Canada (Martineau *et al.*, 1991). Des études sérologiques rétrospectives indiquent que le SRRP serait présent aux États-Unis depuis 1985 (Yoon *et al.*, 1992a) et au Canada depuis 1983 (Carmen, 1995). Aux États-Unis, le nombre d'élevages affectés par la maladie a atteint son pic au cours des saisons estivales des années 1988 et 1989 (Stevenson *et al.*, 1993). Les États les plus touchés sont essentiellement confinés au nord-est du pays et sont par ordre décroissant de séroprévalence: le Michigan, l'Indiana, l'Iowa, l'Ohio, le Minnesota, l'Illinois, et la Caroline du Nord (Christianson et Joo., 1994; Meredith, 1995). On estime que 40 à 60% des élevages dans les régions à forte production porcine ont été atteints par le virus du SRRP. Toutefois, les résultats de ces études sérologiques ne reflètent certainement pas les vrais taux de séroprévalence, compte tenu de la variabilité antigénique entre les souches virales et du choix, souvent inadéquat, des échantillons (Christianson et Joo, 1994). Au début de l'apparition du syndrome, les troubles liés à l'appareil reproducteur étaient les plus dominants, aussi bien aux États-Unis qu'au Canada (Martineau *et al.*, 1991). Après le pic de 1988-1989, la forme respiratoire devint de plus en plus fréquente.

Les pays européens étaient touchés par le syndrome dès l'hiver 1990, surtout en Allemagne et aux Pays-Bas où respectivement plus de 3000 et 1300 foyers

épidémiques furent rapportés. La maladie s'est répandue très rapidement dans presque tous les pays avoisinants (Belgique, France, Italie, Malte, Suisse, Espagne, Royaume-Uni, Danemark) (Albina *et al.*, 1992b; Martineau *et al.*, 1992; Meredith, 1992 et 1995), et comme dans le cas des pays nord-américains, elle est apparue sous sa forme épidémique sévère au cours des six à huit premiers mois. L'épidémie qui a secoué l'Europe au début de l'année 1991, a vu par la suite son importance diminuer, au profit de l'établissement d'un état endémique moins sévère attribué par certains à l'émergence de souches virales moins virulentes (Meredith, 1995).

Bien que certains pays revendiquent un statut indemne vis-à-vis du SRRP, on admet de plus en plus que le SRRP se serait répandu à travers la plupart des régions du monde. En effet, après son apparition dans les pays nord-américains et européens, on a rapporté officiellement la présence du SRRP en Europe de l'est (Russie, Pologne) et en Asie (Japon, Philippines, Corée), et de façon officieuse, en Amérique latine (Chili). Les données épidémiologiques, cliniques et commerciales attribuent essentiellement cette évolution pandémique du syndrome aux échanges internationaux de porcs (Dea et Martineau, 1994). L'Australie est présentement considérée comme étant exempte de l'infection.

2.4 IMPORTANCE

Les pertes économiques engendrées par le SRRP sont d'une telle ampleur, qu'elles constituent de loin l'aspect le plus important du syndrome. Les pertes économiques à court terme sont liées essentiellement aux troubles de la reproduction chez les truies (avortement) et à la mortalité des porcelets autour de la

période du sevrage. À plus longue échéance, les retards de croissance chez les animaux en post-sevrage et la diminution des paramètres de la reproduction se font ressentir. De même, la fréquence des complications secondaires qui s'observent dans les élevages après le passage d'un épisode aiguë de SRRP, accroît les coûts inhérents aux divers traitements qui s'imposent. Hormis ces considérations cliniques, les restrictions imposées par certains pays (Australie, Russie, Mexique) pour l'importation de porcs provenant de régions contaminées, ont sérieusement diminué les profits des pays producteurs. D'un autre côté, les coûts associés aux analyses sérologiques, pratiquées désormais par les pays atteints du syndrome, ont aussi contribué à l'importance économique du syndrome.

Dans la majorité des cas, l'impact économique du SRRP fut analysé de façon plus précise suite à l'avènement de la forme aiguë. On estime que la production annuelle serait ainsi diminuée de 5 à 20% (Christianson et Joo, 1994). Aux États-Unis, les pertes annuelles enregistrées au sein d'un troupeau de 250 truies représentent 92% du profit net par truie (Goyal, 1993). Durant une épidémie sévère ayant secoué 250 unités de production autour d'une région de 161 km en Iowa, Loula (1991) a rapporté des pertes de 85,330 porcelets, soit 10,6 millions de dollars américains. En Allemagne et aux Pays-Bas, les pertes totalisées par chaque pays sont d'environ de deux millions de porcelets (Meredith, 1992).

Les conséquences économiques des formes chronique et subclinique du SRRP sont difficiles à estimer. Leurs effets directs et indirects sont pour la plupart du temps méconnaissables et s'étalent sur une plus longue période. Néanmoins, quel que soit le pays atteint, quelle que soit la forme clinique prédominante, on s'accorde

à penser que le SRRP est très néfaste pour l'industrie du porc, surtout là où cette activité est majeure, comme notamment le cas du Québec au Canada.

3. LE VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE DU PORC

L'identification finale de l'agent responsable du SRRP en tant que nouveau virus complètement inconnu des virologistes, est en soi une découverte extrêmement importante. Il a donc fallu cinq années de spéculations sur la nature exacte de l'étiologie du SRRP pour qu'on découvre enfin la vraie cause de cette maladie. Durant toute cette période, le virus aurait probablement eu suffisamment de temps pour évoluer avec son espèce-hôte. Contrairement à ce qui aurait dû être l'aboutissement normal et légitime des nombreux travaux qui furent entrepris aux États-Unis et au Canada pour déterminer l'agent causal du SRRP, ce dernier fut plutôt isolé et identifié pour la première fois en Europe. Cette déviation dans le cours normal des travaux sur le SRRP tient essentiellement à la nature du statut sanitaire des élevages porcins aux États-Unis et au Canada (discuté lors de l'introduction générale), à l'extrême variabilité des manifestations cliniques et lésionnelles qu'a connu le SRRP dans ces pays et enfin, à des différences géographiques entre les pays européens et nord-américains. En effet, dès son apparition en Europe, le SRRP fut considéré comme une nouvelle entité pathologique dont l'étiologie serait probablement méconnue. Ces conclusions étaient basées sur l'évolution très rapide de la maladie, sur le fait que les troubles respiratoires et reproducteurs étaient moins importants dans ce continent, du moins durant la période précédant l'avènement du SRRP, et qu'enfin sur le fait que

l'incidence des maladies dues au parvovirus porcin, aux virus de type influenza et au virus de l'encéphalomyocardite était de loin beaucoup moins importante que dans les élevages nord-américains. Ainsi, conscients des résultats des travaux précédemment effectués aux États-Unis et au Canada, les chercheurs européens se sont penchés sur l'éventualité d'une nouvelle étiologie virale et, pour la première fois, des cultures primaires de macrophages alvéolaires porcins furent utilisées comme support cellulaire, permettant ainsi de découvrir un nouveau virus qu'on appela le virus de Lelystad (Pol *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991a).

3.1 Isolement

Le virus de Lelystad (virus LV) fut initialement isolé sur des cultures primaires de macrophages alvéolaires de porc (MAP), à partir d'homogénats de tissus de porcelets atteints de SRRP et d'échantillons sériques de truies infectées de façon naturelle (Wensvoort *et al.*, 1991a). Ce virus n'a pu être propagé que sur les cellules MAP, les oeufs embryonnés et les cultures secondaires de reins de porc (PK-15 et SK-6) ayant été vainement utilisées. Tous les animaux ayant servi à ces essais d'isolement manifestaient des signes évidents de SRRP. En utilisant des sérums pairés, une séroconversion vis-à-vis du virus LV fut mise en évidence chez 75% des truies et 88% des élevages infectés et ce, en l'absence de séroconversion évidente vis-à-vis d'autres agents viraux telle que révélée par le test d'immunoperoxidase (Wensvoort *et al.*, 1991a). Un lien direct entre le virus LV et le SRRP venait ainsi d'être démontré. Les travaux de Terpstra *et al.* (1991), en reproduisant les quatre postulats de Koch, ont établi de façon définitive que le virus LV était l'agent étiologique primaire du SRRP. De façon similaire, plusieurs souches

virales furent isolées en Allemagne (Ohlinger *et al.*, 1991), en France (Baron *et al.*, 1992), Espagne (Plana Duran *et al.*, 1992), Angleterre (Paton *et al.*, 1992), aux États-Unis (Collins *et al.*, 1992), et au Canada (Dea *et al.*, 1992a). Toutes ces souches ont reproduit le SRRP et ont été isolées sur les cellules MAP, à l'exception de la souche américaine de référence "ATCC VR 2332", qui peut être propagée sur une lignée continue désignée "ATCC CL2621", laquelle est dérivée de la lignée de rein de singe cercopithèque, MA-104 (Kim *et al.*, 1993).

3.2 Hôtes cellulaires

Les cellules MAP constituent le support cellulaire de choix pour l'isolement du virus du SRRP; elles permettent la réplication de la majorité des souches du virus. Toutefois, pour que ces cultures soient permissives au virus, il faut qu'elles soient fraîchement récoltées à partir d'un porcelet dont l'âge varie de cinq à huit semaines (Wensvoort *et al.*, 1991b). Les deux autres supports cellulaires utilisés pour la propagation du virus du SRRP dérivent de la lignée MA-104 par sélection d'un clone permissif; il s'agit des lignées CL2621 (Benfield *et al.*, 1992b; Collins *et al.*, 1992) et MARC-145 (Kim *et al.*, 1993). Bien que les titres d'infectivité obtenus sur cellules PAM, CL 2621 et MARC-145 soient comparables (10^5 à 10^7 DICT50/ml) (Wensvoort *et al.*, 1991b; Benfield *et al.*, 1992b; Collins *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993), les cellules primaires de macrophages alvéolaires de porc demeurent les plus sensibles (Benfield *et al.*, 1992b; Bautista *et al.*, 1993). Le virus du SRRP s'est avéré très restrictif dans son spectre d'hôte cellulaire. En effet, plusieurs lignées primaires provenant de la plupart des organes de porc (poumon, coeur, trachée, rein, moelle osseuse, thyroïde et testicule), de bovin (divers

épithélium) et de poulet (cellules fibroblastiques, hépatocytes et oeufs embryonnés) n'ont permis de multiplier le virus. De même, plusieurs lignées cellulaires continues de rein de porc (PK-15, PK-2, SK-6), de macrophages porcins, de trompe de fallope (PFT), ainsi que des lignées conventionnelles provenant de reins de singe (Vero), d'hamster (BHK-21), de chien (MDCK) et de chat (CRFK) se sont avérées non permissives à la réplication du virus du SRRP (Wensvoort *et al.*, 1991b; Benfield *et al.*, 1992b; Dea *et al.*, 1992a; Yoon *et al.*, 1992b). On a toutefois rapporté la permissivité des monocytes porcins prélevés à partir du sang périphérique (Voicu *et al.*, 1994), ce qui a permis à ces auteurs de les considérer comme étant le moyen par lequel le virus est véhiculé vers divers organes, dont le placenta des femelles infectées.

3.3 Caractéristiques morphologiques

Les particules du virus du SRRP telles qu'observées en microscopie électronique, sont enveloppées, de forme sphérique et d'un diamètre variant de 45 à 80 nm (taille moyenne calculée sur 25 particules est de 62 nm). Les virions contiennent une nucléocapside isométrique dont la taille varie de 25 à 45 nm (Benfield *et al.*, 1992b; Dea *et al.*, 1992a; Wensvoort *et al.*, 1992b). La surface des virions paraît généralement lisse, bien que certains auteurs ont observé des petites projections (Dea *et al.*, 1992). Ces caractéristiques morphologiques ont été à l'origine de la description initiale du virus du SRRP en tant que membre de la famille *Togaviridae* (Benfield *et al.*, 1992b; Wensvoort *et al.*, 1992b).

3.4. Caractéristiques physico-chimiques

La densité de flottaison du virus est estimée à 1,19 g/cm³ sur gradient de chlorure de césium et à 1,14 g/cm³ sur gradient de saccharose (Benfield *et al.*, 1992b; Wensvoort *et al.*, 1992b). D'autre part, les traitements du virus par le chloroforme et l'éther entraînent son inactivation, confirmant la présence d'une enveloppe lipidique (Plana *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1992b). La stabilité du virus est grandement affectée par les variations du pH aussi bien à 4°C qu'à 37°C. Le pouvoir infectieux du virus est diminué de plus de 90% à des pH plus hauts que 7 et plus bas que 5. Bien que le virus ne se réplique pas à un pH de 6, il semble être néanmoins le plus stable dans ces conditions. Dans les milieux de culture où le pH est le plus souvent de 7,5, le titre infectieux viral est diminué de moitié à partir de 6 min, 3, 20 et 139 heures, à des températures de 56, 37, 21 et 4°C, respectivement (Bloemraad *et al.*, 1994). À une température de -70°C, la stabilité du virus n'est pas affectée pour au moins une période de quatre mois (Benfield *et al.*, 1992b; Bloemraad *et al.*, 1994).

3.5 Multiplication virale

Sur les cellules MAP, la croissance du virus s'accompagne d'un effet cytopathique intense qui apparaît dès les premières 24 heures. Les cellules commencent par s'arrondir et se grouper en amas, puis se fragmentent progressivement. Dépendamment de la multiplicité d'infection (m.o.i) utilisée et de la souche virale, la lyse totale des cellules peut avoir lieu en trois à quatre jours plus tard (Wensvoort *et al.*, 1991b; Dea *et al.*, 1992a, Yoon *et al.*, 1992b). En

microscopie électronique, on peut mettre en évidence la présence de nucléocapsides virales dès six heures post-infection (p.i), alors que les particules virales enveloppées sont souvent observées à partir de neuf heures p.i., temps où débute d'ailleurs la libération du virus dans le surnageant des cellules infectées (Pol et Wagenaar, 1992). Le cycle viral au complet du virus du SRRP serait ainsi de 9 à 12 heures. Les titres infectieux obtenus aussi bien dans les cellules MAP, CL2621 ou MARC-145 (10^6 DICT₅₀/ml en moyenne) (Benfield *et al.*, 1992b; Bloemraad *et al.*, 1994; Dea *et al.*, 1992a; Plana *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1991b et 1992b; Yoon *et al.*, 1992b) ne permettent pas de réaliser des infections virales à de hautes multiplicités d'infection. Toutefois, les courbes de croissance réalisées à des multiplicités d'infection de 0,01 DICT₅₀/cellule indiquent que dans les cellules MAP, le titre viral maximal dans la fraction intracellulaire aussi bien que dans la fraction extracellulaire, est atteint au bout de 40 heures p.i, précédant ainsi de peu l'apparition de l'effet cytopathique (Bloemraad *et al.*, 1994). L'examen par microscopie de balayage indique une perte des microvillosités et des pseudopodes normalement présents à la surface des macrophages normaux. À un stade plus avancé, l'effet cytopathique se traduit par un aplatissement des cellules entraînant leur affaissement total qui donne à la cellule un aspect de noyau dense, vraisemblablement suite à la perte des fluides cytoplasmiques (Paton *et al.*, 1992). Les études de Pol et Wagenaar (1992) ont aussi montré des modifications importantes au sein des macrophages infectés. Ainsi, dès l'apparition des nucléocapsides virales dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) lisse, on observe une augmentation de la taille des mitochondries qui perdent leurs granules et leurs cristaux, donnant naissance à des vésicules à double membrane dont le diamètre varie de 100 à 300 nm; ces vésicules ne contiennent pas de particules virales enveloppées.

3.6 Morphogenèse

Des études préliminaires en microscopie électronique sur des cellules MAP (Pol et Wagenaar, 1992) et des cellules MARC-145 (Dea *et al.*, 1995) démontrent que le virus du SRRP bourgeonne au niveau des membranes intracellulaires et non au niveau de la membrane cytoplasmique. D'abord, les nucléocapsides s'entourent d'une enveloppe au niveau des membranes du RE lisse vers 6 heures p.i. Plus tard (9 heures p.i), on observe des particules virales enveloppées dans la lumière du RE lisse et de l'appareil de Golgi. Enfin, des vésicules contenant plusieurs particules virales semblent véhiculer le virus vers le site de bourgeonnement qui se situerait dans le compartiment intermédiaire, soit entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. La libération du virus dans le milieu extracellulaire a lieu par exocytose. Ces observations rappellent le type de maturation des particules virales appartenant à la famille des coronaviridae.

3.7 Caractéristiques moléculaires

3.7.1 Le génome viral

Le fait que la réplication du virus du SRRP ne soit pas affectée par les inhibiteurs de la synthèse de l'ADN tels que le 5-bromo-2-désoxyuridine (BUDR), le 5-iodo-2-désooxyuridine (IUDR) et la mitomycine C a permis de conclure que son génome est constitué d'ARN (Benfield *et al.*, 1992b; Yoon *et al.*, 1992b). En effet, on a pu mettre en évidence au niveau des ARN cytoplasmiques totaux de cellules MAP infectées par le virus, l'existence d'une molécule d'ARN dont la taille a été

approximativement estimée à 15 kb (Wensvoort *et al.*, 1992b). Le génome au complet du virus de Lelystad, le prototype européen du virus du SRRP, fut analysé en cumulant les données de séquençage de plusieurs fragments d'ADN complémentaire (ADNc) se chevauchant et obtenus suite à la réalisation d'au moins deux banques génomiques (Meulenber *et al.*, 1993b). Les résultats ont démontré qu'il s'agit en effet d'une molécule d'ARN polyadénylé de 15 088 nucléotides contenant huit cadres de lecture ouverts (ORF). Ces derniers ont été désignés par ORF1a, ORF1b et ORFs 2 à 7, en se déplaçant dans le sens 5' → 3' de la molécule d'ARN. Compte tenu de l'existence de motifs spécifiques de certaines protéases au niveau de l'ORF1a, et de motifs que l'on retrouve au niveau des séquences de plusieurs polymérases dépendantes de l'ARN de plusieurs virus à ARN, les ORFs 1a et 1b furent associés à la machinerie répliquative du virus (Meulenber *et al.*, 1993b). Ils constituent à eux seuls plus des trois quarts du génome viral. Les ORFs 2 à 6 présentent les caractéristiques de protéines membranaires, alors que le cadre de lecture 7 coderait pour une protéine hautement basique. Enfin, à l'extrémité 3' du génome viral, immédiatement en aval du codon de terminaison, une séquence d'à peu près 114 nucléotides fut considérée comme étant la région 3' non codante. Cette organisation génomique est similaire à celle des membres du genre Artérovirus de la famille *Togaviridae* composée par le virus de l'artérite équine (EAV), le virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique de la souris (LDV) et le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV). Ainsi, de par la ressemblance morphologique du virus du SRRP avec les togavirus, ces caractéristiques moléculaires l'associent davantage au genre Artérovirus anciennement compris au sein de cette famille. Toutefois, contrairement aux données morphologiques, l'organisation génomique des artérovirus est semblable aux virus de la famille *Coronaviridae* incluant les genres Coronavirus et Torovirus (Spaan *et al.*, 1988; Godeny *et al.*, 1990; Snijder *et*

al., 1990 a et b; Den Boon *et al.*, 1991a; Kuo *et al.*, 1992; Plagemann et Moennig, 1992).

3.7.2. Stratégie de réplication et mode de transcription

L'étroite relation que l'on vient de démontrer sur le plan de l'organisation génomique entre le virus du SRRP et les membres des artérovirus laisse présager un mode de réplication et d'expression similaire pour tous ces virus. Ainsi, tout comme l'EAV (Van Berlo *et al.*, 1982 et 1986; DeVries *et al.*, 1990) et le LDV (Kuo *et al.*, 1991 et 1992), le virus du SRRP génère dans le cytoplasme des cellules infectées, une série d'ARNs sous-génomiques polyadénylés ayant en commun leur extrémité 3' terminale et une séquence de tête à leur extrémité 5' (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a et b). Les six ARNs sous-génomiques qu'on peut mettre en évidence dans les macrophages infectés par le virus du SRRP, en même temps que la molécule d'ARN génomique de 15 kb, ont une taille qui varie de 0,9 à 3,7 kb. En adoptant la nomenclature appliquée dans le cas du virus EAV, ces ARNs sous-génomiques ont été désignés, du plus petit au plus grand, par ARNs 7, 6, 5, 4, 3, et 2 (Fig. 1) (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a et b). Des expériences d'hybridation ont démontré que, comme pour les virus EAV (Van Berlo *et al.*, 1986) et LDV (Kuo *et al.*, 1992), chaque ARN sous-génomique contient à son extrémité 3' la séquence complète de l'ARN sous-génomique qui lui est immédiatement plus petit de taille (Meulenberg *et al.*, 1993a et b). Comme il a été déjà mentionné plus haut, une séquence de tête commune est aboutée à l'extrémité 5' de chacun des ARNs sous-génomiques, puisqu'un oligonucléotide spécifique à l'extrémité 5' génomique s'hybride avec les ARNs 2 à 7. La région de jonction entre cette

FIGURE 1: Organisation génomique et stratégie de réplication des membres du genre Artérovirus.

ST: Séquence de tête

(Selon Den Boon *et al.*, 1991a)

séquence de tête et les ARNs sous-génomiques a été séquencée (Meulenberg *et al.*, 1993a). On démontra l'existence d'un motif de jonction hautement conservé chez tous les ARNs sous-génomiques et dont l'équivalent, ou presque, est retrouvé au niveau du génome viral. La distance séparant ce motif de jonction du codon d'initiation de chaque cadre de lecture varie de 9 (ORF7) à 83 (ORF4) nucléotides. En alignant les séquences nucléotidiques des motifs de jonction des six ARNs sous-génomiques, il en ressort la séquence consensus 5'-(U/A)(C/U/A)(A/G)ACC-3', où seules les trois dernières bases sont hautement conservées chez tous les ARNs sous-génomiques (Meulenberg *et al.*, 1993a). Cette séquence consensus peut être réduite aux six nucléotides les plus fréquents et on parle alors, dans le cas du virus LV, du motif UCAACC. En fait, la séquence nucléotidique autour de ces motifs de jonction peut varier chez un même ARN sous-génomique. Ainsi, à part l'ARN4, une certaine hétérogénéité au niveau de la séquence de jonction de tous les autres ARNs sous-génomiques a été mise en évidence, ce qui amena à conclure que le processus de fusion entre la séquence de tête et le corps des ARNs sous-génomiques est peu précis (Meulenberg *et al.*, 1993a).

Sur la base de ces résultats (organisation génomique similaire aux coronavirus, présence d'une série d'ARNs sous-génomiques ayant une extrémité 3' commune, présence d'une séquence de tête en 5' identique chez tous les ARNs sous-génomiques et identification d'un motif consensus au niveau des sites de jonction des différents ARNs sous-génomiques), les auteurs ont émis l'hypothèse que le mécanisme de transcription adopté par le virus du SRRP serait similaire à celui des autres membres du genre Artérovirus (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a et b). Évidemment, sur la base de leur stratégie commune de répllication, tous les artérovirus sont similaires au coronavirus.(Spaan *et al.*, 1988).

Selon le modèle proposé pour les coronavirus ainsi que pour les membres des torovirus, la séquence de tête qui dériverait de l'extrémité 3' de la molécule d'ARN complémentaire au génome viral (brin matrice de polarité négative), jouerait un rôle important dans la synthèse des ARNs messagers sous-génomiques ainsi que les molécules d'ARNs génomiques qui seront incorporées dans les futurs virions. Une fois détachée de sa matrice, la séquence de tête servirait d'amorce à la synthèse des ARNs sous génomiques, en s'appariant par son extrémité 3' au niveau d'une séquence intergénique (séquence presque identique à l'extrémité 3' de la séquence de tête qu'on trouve essentiellement en amont de chaque cadre de lecture ainsi qu'au niveau des sites de jonction des ARNs sous-génomiques) sur le brin matrice qui lui aurait donné naissance (Baric *et al.*, 1983 et 1985; Makino *et al.*, 1986; Baker et Lai, 1990). Ce modèle qui fut appelé "leader RNA-primed transcription mechanism", est certes fort plausible, mais non dénué d'éléments contradictoires. En effet, il ne peut s'appliquer dans le cas des ARNs 6 et 7 du coronavirus de l'hépatite murine (MHV), compte tenu de l'hétérogénéité de séquence observée au niveau de leur site de jonction. Ainsi, pour adapter ce modèle à tous les ARNs messagers sous-génomiques du MHV, on émit l'hypothèse que la séquence de tête se fixerait de manière peu précise au niveau des sites intergéniques de certains cadres de lecture. Cette même explication ne peut prévaloir dans le cas du virus LV et ce, à cause d'une plus grande hétérogénéité au niveau des séquences de jonction identifiées au sein des six ARNs sous-génomiques et où une homologie partielle avec seulement six nucléotides de la séquence de tête est observée. Il reste donc à déterminer si le motif UCAACC, ou un autre qui lui est fortement similaire serait suffisant pour assurer un appariement efficace de la séquence de tête au niveau des séquences intergéniques afin d'amorcer la synthèse des différents ARNs sous-génomiques à partir de l'ARN complémentaire au génome viral. D'autre part, les travaux effectués

en regard du mécanisme de transcription du virus EAV indiquent que les ARNs sous-génomiques seraient synthétisés par épissage d'une molécule précurseur d'ARN génomique. À cet égard, les auteurs ont tenu compte de l'homologie de séquence qui existe entre l'extrémité 3' de la séquence de tête et la région 5' du site d'épissage de l'ARN pré-ribosomal de *Tetrahymena* (Van Berlo *et al.*, 1986; De Vries *et al.*, 1990). Toutefois cette homologie entre les séquences de tête et le site d'épissage de *Tetrahymena* est loin d'être notable dans le cas des virus LV et LDV (Meulenberg *et al.*, 1993a). En fait, le modèle de la transcription amorcée par la séquence de tête fut fortement critiqué dans le cas des coronavirus, suite à la mise en évidence dans les cellules infectées par le virus MHV, d'ARNs sous-génomiques de polarité négative ainsi que des intermédiaires de réplication sous-génomiques (Sethna *et al.*, 1989; Sawiki et Sawiki, 1990). Bien que de tels intermédiaires ont pu être mis en évidence dans le cas du virus EAV, aucune structure semblable n'a été encore observée pour les virus LV et LDV.

3.7.3 Les protéines virales

Les études portant sur les protéines synthétisées par le virus du SRRP furent grandement amputées par l'absence d'une lignée convenable permettant de multiplier le virus à de très hauts titres, et par surcroît, par la fragilité structurale du virus. D'autre part, les premiers essais effectués pour produire des anticorps monoclonaux pourvus d'un large spectre de spécificité antigénique, se sont limités à une et une seule protéine virale de 15 kDa, présentement associée à la nucléocapside virale (Nelson *et al.*, 1993). L'utilisation de sérums provenant d'animaux hyperimmunisés, a permis l'identification par immunobuvardage dans les

cellules infectées de trois protéines virales de masse moléculaire 15, 19 et 26 kDa (Nelson *et al.*, 1993). Ce profil protéique est similaire à ce qui avait été rapporté pour les virus EAV (De Vries *et al.*, 1992) et LDV (Cafruny *et al.*, 1986). La séquence de l'ARN du virus du SRRP prévoit quant à elle, huit cadres de lecture pouvant donner chacun naissance à au moins une protéine. En tenant compte de la similitude d'organisation génomique avec les coronavirus, chaque ARN sous-génomique (ARNs 2 à 7 pour le virus du SRRP) devrait principalement coder une seule protéine qui dériverait du gène localisé à l'extrémité 5' terminale. En se basant aussi sur les résultats obtenus pour le virus EAV (De Vries *et al.*, 1992), il est fort probable que chacune de ces trois protéines virales du SRRP serait codée par l'un de ces ARNs sous-génomiques. Par ailleurs, on assume que les deux cadres de lecture ORF1a et ORF1b, qui occupent les trois quarts de l'extrémité 5' terminale du génome, sont traduits à partir de la molécule d'ARN génomique, donnant naissance à des protéines impliquées dans les processus de réplication et de transcription (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993b). Effectivement, plusieurs séquences présentes au niveau de ces deux cadres de lecture de l'extrémité génomique 5' virale présentent des homologies avec des sites d'enzymes protéasiques (ORF1a), ainsi qu'avec des motifs de polymérases des virus à ARN (ORF1b) (Meulenberg *et al.*, 1993b). Le produit du cadre de lecture ORF1a serait traduit de façon classique, fort probablement par un processus de balayage par les ribosomes, tandis que le produit du cadre de lecture ORF1b serait synthétisé grâce à un mécanisme de changement de cadre de lecture (Meulenberg *et al.*, 1993b) tel que démontré pour les coronavirus (Bournsell *et al.*, 1987; Brierley *et al.*, 1987; Bredenbeek *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991), les torovirus (Snijder *et al.*, 1990a) et le virus EAV (Den Boon *et al.*, 1991a). Au niveau de la jonction ORF1a-ORF1b, on a identifié chez tous ces virus une structure secondaire de l'ARN dite "pseudo-

noeud" qui permet aux ribosomes d'effectuer leur changement de cadre de lecture afin d'entamer la traduction de l'ORF1b. Cette structure en "pseudo-noeud" est similaire à celle observée au niveau de la région gag-pol du virus du sarcome de Rous (Jacks *et al.*, 1988).

L'analyse des séquences en acides aminés déduites à partir des cadres de lecture ORFs 2 à 6 prévoit une topographie transmembranaire des protéines résultantes, à cause de la présence de régions fortement hydrophobes et de sites potentiels de N-glycosylation. Le produit de chacun des cadres de lecture ORFs 2, 3 et 5, serait une protéine intégrale de type I et ce, à cause de la présence potentielle d'une séquence "signal" à l'extrémité aminée et d'une séquence d'ancrage dans la région carboxylique. Le profil hydropathique du produit du cadre de lecture ORF6 est similaire à celui de la protéine membranaire (M) des coronavirus (Rottier *et al.*, 1986), des torovirus (Den Boon *et al.*, 1991b) et du virus EAV (De Vries *et al.*, 1992), vue la présence de trois régions transmembranaires successives. Les travaux de protection vis-à-vis des protéases indiquent que la protéine M des coronavirus est membranaire de type III (Cavanagh *et al.*, 1986; Rottier *et al.*, 1984). L'analyse du cadre de lecture ORF7 indique qu'il coderait pour une protéine dont l'extrémité aminée serait fortement basique; le produit attendu présenterait une homologie en acides aminés de plus de 40% avec ses homologues chez les virus EAV et LDV (Meulenberg *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993). Comme ce cadre de lecture a été associé à la nucléocapside virale chez ces derniers, (Godeny *et al.*, 1990; De Vries *et al.*, 1992), on assume que le produit de l'ORF7 du virus du SRRP représenterait lui aussi la composante majeure de la nucléocapside virale (Conzelmann *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993b).

3.8 Pathogénie de l'infection par le virus du SRRP

L'interaction du virus du SRRP avec son hôte fut largement déduite à partir des données accumulées lors des travaux d'inoculation expérimentale du virus qui avaient établi son rôle étiologique primaire. Par ailleurs, la distribution mondiale qu'avait connu ce virus et l'isolement simultané de plusieurs souches virales appartenant à différents contextes géographiques, ont contribué à une meilleure compréhension quant à sa pathogénie. Il ne faut pas non plus ignorer les données préalablement démontrées pour les autres artérovirus, qui ont permis dans plusieurs cas de faire le rapprochement avec ce qui fut observé dans le cas du virus du SRRP. Toutefois, ayant sûrement évolué dans un contexte différent que celui des autres artérovirus, le virus du SRRP aurait certainement développé au cours de son évolution certaines stratégies qui lui sont tout à fait spécifiques.

À présent, il est prématuré de dresser un schéma pathogénique complet expliquant les différentes facettes de l'infection par le virus. Comme on l'a déjà indiqué, les lésions observées chez les animaux infectés ne corrélaient pas nécessairement avec la gravité des signes cliniques de l'infection, surtout en ce qui concerne les troubles de la reproduction. Quant aux troubles respiratoires, on assume actuellement que le SRRP, tel qu'observé dans le champ, serait la résultante d'une cause multifactorielle. Cependant, on peut avoir une idée plus claire sur l'interaction du virus du SRRP avec son hôte à travers les données qui suivent.

3.8.1 Réponse immune

La réponse du système immunitaire vis-à-vis de l'infection par le virus du SRRP demeure jusqu'à date énigmatique et ce, à cause du paradoxe qui fait que d'un côté l'infection semble augmenter la vulnérabilité des animaux atteints face à d'autres infections, et que d'un autre côté, on ne note pas chez les animaux infectés par le virus une immunosuppression fonctionnelle systémique et durable pouvant expliquer cette fragilité accrue. Par ailleurs, bien que les animaux ayant encouru une infection par le virus semblent immuns vis-à-vis d'une réinfection, la nature de cette immunité reste à démontrer.

3.8.1.1 Données sur la réponse humorale

Suite à l'infection d'animaux sensibles au virus du SRRP, on peut détecter des anticorps sériques spécifiques au bout de 5 à 9 jours par les tests d'immunofluorescence indirecte (IFI), d'immunopéroxydase (IP), et d'ELISA (Albina *et al.*, 1992a; Bilodeau *et al.*, 1992; Loemba *et al.*, 1996; Rossow *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1992a; Yoon *et al.*, 1995; Vézina *et al.*, 1996; Wensvoort *et al.*, 1991a). Les anticorps de type IgM, témoins d'une infection récente, peuvent être mis en évidence par IFI, au plus tard cinq jours après le contact avec le virus (Park *et al.*, 1995; Loemba *et al.*, 1996). Dans la plupart des cas, les titres en anticorps atteignent leur maximum au bout de quatre à six semaines (Yoon *et al.*, 1995). Une des caractéristiques de la réponse immunitaire humorale vis-à-vis du virus du SRRP, est l'apparition très lente des anticorps neutralisant l'infection. Ces derniers n'apparaissent en général qu'au bout de six à huit semaines après l'infection

(Bilodeau *et al.*, 1992; Christianson et Joo, 1994; Goyal, 1993; Nelson *et al.*, 1994) et atteignent leur pic vers la dixième semaine. En optimisant les paramètres du test de séroneutralisation, Yoon et ses collègues (1994) ont pu mettre en évidence la présence d'anticorps neutralisants au bout de 9 à 11 jours suivant l'inoculation par le virus. Ces auteurs ont démontré que l'addition de sérum de porc non inactivé était importante pour la détection des anticorps neutralisants. Toutefois, tous les travaux portant sur l'analyse de la réponse immunitaire humorale, s'accordent sur le fait que les anticorps sériques, y compris ceux qui exhibent une activité neutralisante, ne conduisent pas à l'élimination du virus. En effet, aussi bien chez les animaux infectés par la voie naturelle que chez les animaux expérimentalement inoculés, la virémie peut durer pour plus de trois mois même en présence de hauts titres en anticorps sériques (Christianson et Joo, 1994; Goyal *et al.*, 1993; Loemba *et al.*, 1996; Vézina *et al.*, 1996). À ce sujet, il est important de noter qu'*in vitro* et en utilisant les cellules MAP, on a pu mettre en évidence une augmentation de l'infectivité du virus en présence d'anticorps qui lui sont spécifiques (Choi *et al.*, 1992). Ce phénomène qui est connu sous la dénomination ADE (Antibody-dependent enhancement of infectivity) s'explique par le fait que puisque le virus infecte les macrophages, les anticorps qui lui sont spécifiques vont se fixer par leur fragment Fc au niveau de leur récepteur présent à la surface de ces cellules. Ceci constituerait un moyen alternatif d'attache non spécifique du virus à sa cellule-hôte, qui aurait pour conséquence de potentialiser l'adsorption. Pour cette même raison d'ailleurs, le test de séroneutralisation ne peut-être pratiqué sur les cellules MAP. La nature de ces anticorps facilitateurs de l'infection demeure inconnue, de même que le rôle qu'ils peuvent jouer dans l'évolution d'une infection naturelle.

La spécificité de la réponse humorale fut étudiée essentiellement par la technique d'immunobuvardage, et semble être généralement limitée aux trois protéines virales majeures de 15, 19, et 26 kDa (Nelson *et al.*, 1994; Yoon *et al.*, 1995; Loemba *et al.*, 1996). Ces travaux indiquent que les anticorps dirigés contre la protéine de 15 kDa apparaissent le plus tôt, soit au bout de 7 jours après l'infection, suivis une semaine plus tard par l'apparition des anticorps réagissant avec les protéines de 19 et 26 kDa (Nelson *et al.*, 1994; Yoon *et al.*, 1995). Curieusement, en utilisant comme source d'antigènes des protéines exprimées dans *E.coli*, la réponse en anticorps vis-à-vis de la protéine de 26 kDa, semble précéder d'une semaine l'apparition d'une réponse spécifique des protéines de 15 et 19 kDa (Loemba *et al.*, 1996). Cette différence dans la cinétique d'apparition des anticorps spécifiques de tel ou tel antigène, en utilisant des protéines provenant du virus même ou d'un système d'expression, semble être liée à un facteur quantitatif. En effet, dans les particules virales la protéine de 26 kDa semble être moins abondante que les deux autres constituants du virus. Une certaine équimolarité dans le test d'immunobuvardage réalisé avec des protéines exprimées pourrait donc influencer la sensibilité de la technique.

À l'exception de Yoon et ses collaborateurs (1995) qui ont associé l'activité neutralisante à la protéine de 26 kDa, les autres travaux n'ont pas pu faire un tel lien (Loemba *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1994). Tous les anticorps dirigés contre la protéine de 15 kDa se sont avérés incapables de neutraliser l'infectivité virale (Nelson *et al.*, 1993). Enfin, un anticorps monoclonal qui semble être dirigé contre une protéine virale de 43 kDa, présumée être le produit du cadre de lecture ORF3, est lui aussi non neutralisant (Drew *et al.*, 1995).

3.8.1.2 *Données sur la réponse cellulaire*

L'unique évidence impliquant une composante cellulaire dans la réponse immunitaire vis-à-vis du virus du SRRP consiste dans le fait que les animaux ayant préalablement été atteints par le virus deviennent immuns face à la réinfection et ce, en l'absence d'anticorps neutralisants (Christianson *et al.*, 1992; Goyal, 1993). Cette constatation ne devrait pas cependant non plus ignorer un rôle potentiel d'une éventuelle immunité locale, dont l'existence n'a pas encore été rapportée.

En fait, il existe beaucoup plus de données sur les effets du virus sur la réponse cellulaire elle-même, étant donné qu'il infecte les cellules accessoires de choix, à savoir les macrophages. À ce propos, et contrairement à ce que l'on attendait, le virus du SRRP s'est avéré un modulateur de la réponse immunitaire (Molitor *et al.*, 1992; Vézina *et al.*, 1996). Certes, une immunosuppression précoce et transitoire fut mise en évidence dans la plupart des cas (Molitor *et al.*, 1992; Ohlinger *et al.*, 1992; Vézina *et al.*, 1996). Toutefois, suite à cet état, les animaux infectés démontrent une plus grande capacité que les animaux non infectés à développer contre des agents pathogènes exogènes une réponse immunitaire humorale et cellulaire. En fait, il semble plutôt y avoir chez les animaux infectés par le virus du SRRP, une activation polyclonale des lymphocytes du sang périphérique (Molitor *et al.*, 1992; Ohlinger *et al.*, 1992; Vézina *et al.*, 1996). Cette modulation de l'activité du système immunitaire est à l'encontre de l'exacerbation des infections opportunistes que l'on rapporte fréquemment après le passage d'une phase aiguë du syndrome. Il se pourrait que ces infections résultent de la première phase d'immunosuppression transitoire à laquelle s'ajoute la destruction des cellules MAP par le virus (Goyal, 1993). Toutefois, des études expérimentales récentes

indiquent que l'infection par le virus du SRRP n'implique pas une potentialisation de l'effet pathogène de certaines bactéries dont *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella cholerasuis* et *Pasteurella multocida* (Cooper *et al.*, 1995). Il reste à démontrer si tel est le cas lors d'une infection naturelle.

3.8.2. Variations antigéniques

Les souches du virus du SRRP peuvent être divisées en deux groupes antigéniques; le premier incluant toutes les souches européennes et le second comprenant les souches nord-américaines. Cette distinction a pu être réalisée en utilisant soit des sérums polyclonaux (Wensvoort *et al.*, 1992a), ou des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de 15 kDa (nucléocapside) (Nelson *et al.*, 1993; Dea *et al.*, 1996) ou contre la protéine matricielle de 19 kDa (Dea *et al.*, 1996). Contrairement aux souches européennes, une variabilité importante fut observée dans le groupe nord-américain (Wensvoort *et al.*, 1992a; Nelson *et al.*, 1993; Dea *et al.*, 1996) et ce, en accord avec le fait que le virus étant apparu beaucoup plus tôt dans le continent américain, aurait subi plus de variations. Ces variations antigéniques semblent influencer le diagnostic sérologique de l'infection, puisqu'on rapporta un certain nombre de cas faussement négatifs (Yoon *et al.*, 1995).

3.8.3. Virulence

L'hypothèse de l'existence de plusieurs souches du virus du SRRP manifestant des degrés variables de virulence émergea suite à la constatation que le syndrome peut apparaître sous des formes plus ou moins sévères (Goyal, 1993; Christianson et Joo, 1994; Meredith, 1995). Les données accumulées à ce sujet résultent plutôt de constatations fragmentaires, concernant souvent des exploitations dont les statuts sanitaires sont hautement variables, et par conséquent, il est impossible d'en tirer des conclusions formelles et définitives. Récemment, Halbur et ses collègues (1996) ont pu uniformiser leurs travaux afin de conclure quant à l'existence de souches à virulence faible et d'autres douées de haute virulence. Ces auteurs ont en effet reproduit sur un nombre impressionnant de porcelets, les lésions plus ou moins sévères observées dans le champ et ce, en l'absence de facteurs exogènes pouvant biaiser les résultats; les porcelets inoculés ont tous été obtenus par césarienne et ont été privés de colostrum. Les travaux de séquençage conduits sur ces souches à virulence variable n'ont pas permis de noter des différences majeures au niveau des cadres de lecture ORFs 2 à 7 (Meng *et al.*, 1995b). De même, il ne semble pas y avoir de corrélation entre les sérogroupes identifiés et la différence dans la virulence des souches.

3.8.4 Persistance de l'infection virale

La pathogénie du virus du SRRP est dominée par sa capacité à se maintenir dans la circulation sanguine pendant des périodes pouvant excéder les trois mois après l'infection et ce, même en présence d'anticorps sériques neutralisants (Albina

et al., 1993; Bautista *et al.*, 1993; Bilodeau *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 1993). Des travaux indiquent que le virus persistant maintient son pouvoir infectieux en dépit de l'absence de signes cliniques graves chez les animaux infectés. Chez les verrats, les expériences démontrent la présence de virus infectieux jusqu'à 101 jours après l'infection dans les glandes bulbo-urétrales, et jusqu'à 67 jours dans le sperme (Christopher-Hennings *et al.*, 1995). Dans un autre rapport, la persistance du virus du SRRP semble être encore plus importante, puisqu'on peut réisoler le virus 157 jours après la première exposition. Le virus semble persister essentiellement au niveau des macrophages alvéolaires et des tissus lymphoïdes de la sphère oropharyngéale (Blaha *et al.*, 1995). D'autre part, les porcelets nés de mères infectées peuvent héberger le virus pendant de longues périodes, en dépit de la présence de hauts taux d'anticorps maternels (Bilodeau *et al.*, 1994). Dans certains élevages, le virus peut être réisolé dans le compartiment pouponnière au bout de deux années et demie après l'apparition des troubles de la reproduction (Keffaber *et al.*, 1992).

Ces résultats indiquent clairement que le virus du SRRP, bien que de structure fragile, semble avoir développé sa propre stratégie afin de persister chez l'animal et au sein des élevages infectés (Albina *et al.*, 1993). Le virus semble pouvoir coexister avec la réponse immunitaire de l'animal, dont le rôle exact dans la pathogénie de l'infection reste à déterminer. Toutefois, certains auteurs ont spéculé sur les mécanismes permettant au virus de persister au sein des élevages infectés. Parmi les causes conduisant à cet état, on évoque la présence continue au sein des élevages d'animaux sensibles ayant été épargnés par l'infection aiguë initiale, l'introduction de nouveaux animaux susceptibles, la persistance du virus chez les individus infectés, la naissance de porcelets porteurs du virus et la réinfection de

certaines animaux ayant déjà développé une phase aiguë, suite à une perte progressive de leur immunité présumée protectrice.

3.8.5. Transmission

La transmission du virus du SRRP peut avoir lieu par contact direct entre animaux infectés et animaux sensibles, ainsi que par l'émission d'aérosol. La voie de pénétration du virus semble être essentiellement oro-nasale. Ces voies de transmission et de pénétration du virus ont été déduites d'une part, suite à l'introduction d'animaux sains dans des élevages infectés, et d'autre part grâce aux expériences d'inoculation expérimentale (Albina *et al.*, 1992b; Bilodeau *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992; Goyal, 1993; Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991a). Ce mode de transmission semble être tout à fait compatible avec le fait que les élevages qui développent les cas du syndrome les plus sévères sont ceux pourvus d'une forte densité animale, où la séparation entre les différentes catégories d'animaux est mal assurée (Meredith, 1995). Le virus traverse aussi la barrière placentaire, ce qui constitue ainsi la voie principale par laquelle les nouveau-nés sont infectés (Terpstra *et al.*, 1991). Le stade de gestation semble grandement influencer le passage transplacentaire du virus (Christianson *et al.*, 1992; Mengeling *et al.*, 1994). Dans la plupart des cas, le passage a lieu de façon significative vers le dernier tiers de gestation, le virus pouvant être isolé à partir des foetus et des nouveau-nés. Ce résultat est en accord avec les troubles importants qu'on observe dans les locaux de truies reproductrices infectées en fin de leur période de gestation. De même, on peut déjà suggérer un rôle éventuel direct du virus dans le déclenchement des avortements et de la momification

foetale. Toutefois, le mécanisme exact régissant cette action demeure inconnu. Enfin la présence du virus dans le sperme a été très bien démontrée (Meredith, 1995; Christopher-Hennings *et al.*, 1995). Toutefois, la possibilité que le virus soit transmis par la semence des verrats demeure très controversée.

4. LES ARTÉRIVIRUS

Sur la base de caractéristiques morphologiques et biologiques communes, le virus de l'artérite équine (EAV), le virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique de la souris (LDV), et le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV) furent provisoirement groupés dans le genre Artérvirus au sein de la famille *Togaviridae*, en y joignant tout récemment le virus du SRRP (Plagemann et Moennig, 1992). Les travaux de séquençage des génomes des virus EAV (Den Boon *et al.*, 1991a), LDV (Kuo *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993; Godeny *et al.*, 1993) et du SRRP (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a et b) démontrent leur similarité manifeste vis-à-vis des coronavirus, sur le plan de l'organisation génomique et de la stratégie de réplication. Nous avons déjà mis l'accent lors de cette revue de littérature sur cette similarité avec les coronavirus et ce à travers l'analyse génomique du virus du SRRP (voir section 3.7.2). Cet aspect sera d'ailleurs encore développé en évoquant la superfamille des coronavirus. Toutefois, la similarité des artérvirus est en fait étendue à plusieurs autres aspects faisant l'objet de la présente section.

4.1 Propriétés morphologiques

Les artérovirus sont semblables sur le plan morphologique. Ils se présentent tous comme étant des particules enveloppées à contour presque lisse, de forme généralement sphérique et d'une taille variant de 45 à 70 nm. Leur nucléocapside est isométrique et de taille variant entre 25 et 35 nm. Leur densité de flottaison, ainsi que leur coefficient de sédimentation, sont presque similaires avec des valeurs moyennes respectives de 1,15 g/cm³ et de 215 X S. À cause de ces caractéristiques morphologiques, les artérovirus ont été considérés comme étant des membres de la famille *Togaviridae* (Plagemann et Moennig, 1992).

4.2 Caractéristiques structurales

Les travaux portant sur les virus EAV et LDV indiquent la présence de trois protéines structurales majeures. La masse moléculaire de chacune de ces protéines est très proche pour les deux virus, avec des valeurs de 12-14, 16-18, et 25-42 kDa (Plagemann et Moennig, 1992; De Vries *et al.*, 1992). Pour ces deux virus, seules les protéines majeures de 25-42 kDa sont glycosylées. Elles présentent un aspect diffus sur les gels de polyacrylamide-SDS attribuable, dans le cas du virus EAV, à l'addition de plusieurs résidus de lactosamine au niveau de la protéine précurseur lors de sa translocation dans le compartiment trans de l'appareil de Golgi. L'hétérogénéité de la masse moléculaire de la protéine homologue chez le virus LDV semble aussi découler du même processus de modification post-traductionnelle. Chez le virus EAV, une protéine glycosylée additionnelle mineure de masse moléculaire approximative de 25 kDa fut identifiée (De Vries *et al.*, 1992)

dont l'homologue chez le virus LDV n'a pas encore été mis en évidence (Faaberg et Plagemann, 1995). Les quatre protéines du virus EAV, de masse moléculaire 14, 16, 30-42, et 25 kDa, furent respectivement désignées par N, M, G_L et G_S et assignées aux cadres de lecture ORFs 7, 6, 5, et 2 (De Vries *et al.*, 1992). La protéine de 14 kDa est associée à la nucléocapside, alors que les autres sont membranaires. Pour le virus SHFV qui a été moins étudié, quatre protéines de masse moléculaire 14, 18, 42 et 54 furent identifiées. Les deux premières semblent correspondre respectivement aux protéines N et M du virus EAV, alors que la nature des deux dernières reste à déterminer (Godeny *et al.*, 1995).

En somme, sur le plan structural, les virus EAV, LDV et SHFV sont similaires. Les études préliminaires sur la structure du virus du SRRP semblent indiquer une composition protéique très proche de celle des autres artérovirus (Nelson *et al.*, 1993). Toutefois, à ce sujet, des études convaincantes pour ce nouveau virus ne sont pas encore disponibles.

4.3 Caractéristiques de culture

Les artérovirus sont surtout connus pour leur propension à infecter surtout les cellules de type macrophage (Plagemann et Moennig, 1992). À ce sujet, le virus LDV fut le plus étudié. La permissivité des macrophages de souris sensibles à l'infection est restreinte aux cultures primaires de macrophages qui résident dans le péritoine, la rate, la moelle osseuse, et à un moindre degré aux cultures de macrophages alvéolaires du foie, ainsi que les monocytes du sang périphérique (Rowson et Mahy, 1985). Ces cultures primaires de macrophages sont permissives à

80% si elles sont récoltées à partir de souris d'une à deux semaines d'âge. Passé ce délai, la permissivité des cellules chute à moins de 10% (Inada et Mims, 1985; Onyekaba *et al.*, 1989). Il semble aussi que la proportion de macrophages qui supportent un cycle viral productif soit beaucoup plus importante *in vivo* que sur des cellules cultivées *in vitro* (Plagemann et Moennig, 1992). Les multiples essais en vue de faire propager le virus LDV sur d'autres supports cellulaires provenant de l'espèce murine et d'autres espèces ont été vains. Le virus SHFV, qui cause une fièvre hémorragique chez le macaque, a lui aussi pour cible primaire les macrophages péritonéaux. De façon similaire au virus LDV (Stueckemann *et al.*, 1982a et b; Onyekaba *et al.*, 1989; Plagemann et Moennig, 1992), seule une sous-population de macrophages produite de manière continue chez l'animal infecté, semble supporter tous les stades de l'infection (Gravell *et al.*, 1986). Toutefois, contrairement au virus LDV, ce virus simien a pu être propagé dans la lignée continue de cellules rénales de la même espèce, à savoir la lignée MA-104 (Gravell *et al.*, 1986). Le virus EAV infecte de façon primaire les macrophages alvéolaires, mais contrairement aux virus LDV et SHFV, son spectre d'hôte cellulaire est beaucoup plus large. En effet, ce virus peut être très facilement propagé sur des cultures primaires de cellules de reins de chevaux, de lapins et d'hamsters. Sur des lignées continues, telles que les cellules RK-13, BHK21 et Vero, le virus se réplique à de très hauts titres avoisinant 10^8 DICT₅₀/ml (Plagemann et Moennig, 1992). Ainsi, si l'on tient compte du virus du SRRP, les artérovirus ont tous pour cible primaire les macrophages, qui hormis le cas du virus EAV, constituent le support de choix pour leur propagation. Le cycle de réplication de ces virus est très court (8 à 12 heures) et cytolitique (Gravell *et al.*, 1986; Onyekaba *et al.*, 1989; Plagemann et Moennig, 1992; Van Berlo *et al.*, 1982; Wensvoort *et al.*, 1991a).

4.4 Caractéristiques pathogéniques

En général, l'infection par les artérovirus résulte en un état de persistance plus ou moins long, pendant lequel l'animal infecté joue le rôle de réservoir permettant la dissémination du virus. Cet état de persistance est manifeste dans le cas des virus LDV et SHFV, puisqu'il peut durer toute la vie de l'animal. Pour le SHFV, le développement de l'état de persistance dépend de la souche virale ainsi que de la lignée de l'animal infecté (Gravell *et al.*, 1986). Chez le singe macaque, le SHFV produit une infection aiguë très rapide dont l'issue est souvent fatale. En revanche, chez les singes africains du genre patas ou babouin, l'infection évolue dans la plupart des cas vers un état de persistance, à moins que la souche soit très virulente, ce qui conduirait plutôt à une infection de type aiguë, toutefois, moins fatale que chez le macaque (Gravell *et al.*, 1986). Le virus LDV se comporte de façon relativement constante indépendamment de la souche virale et de la lignée de souris infectées. L'infection est asymptomatique et évolue inévitablement vers un état de persistance qui dure pendant toute la vie de l'animal. Dans certains cas, une atteinte neurologique grave dépendante de l'âge peut se développer sous forme d'une poliomyélite (Plagemann et Moennig, 1992). Pour ce qui est du virus EAV, l'état de persistance qui peut découler d'une infection primaire est relativement beaucoup plus court, pouvant atteindre au maximum deux ans (Timoney *et al.*, 1986), ressemblant de ce fait beaucoup plus au virus du SRRP qu'aux virus LDV et SHFV.

Cette évolution de l'infection vers la persistance qui domine la pathogénie des artérovirus, serait probablement associée à l'incapacité de la réponse immunitaire de se débarrasser complètement du virus. Comme on l'a déjà mentionné dans le cas du virus du SRRP, l'état de virémie après l'infection de l'hôte sensible par l'un de ces

virus ne semble pas être affecté par la présence d'anticorps. Ceci est surtout évident dans le cas du virus LDV qui parvient à se répliquer dans les macrophages de souris auxquels on a préalablement conféré une immunité passive (Plagemann et Moennig, 1992). Toutefois, le niveau de virémie qui est maintenu durant toute la vie de l'animal est plus faible par rapport à celui qui précède l'apparition des anticorps. Cela indiquerait probablement que la réponse immune parvient à minimiser l'infection sans pour autant l'éliminer complètement. Par ailleurs, et cela rejoint tout à fait le cas du virus du SRRP, l'apparition des anticorps doués d'une activité neutralisante du virus LDV se fait très tardivement après la primo-infection (un à deux mois). En outre, afin de parvenir à neutraliser le virus LDV, plusieurs molécules d'anticorps de différentes spécificités doivent se fixer sur un même virion (Plagemann *et al.*, 1992). Ces anticorps capables de neutraliser le virus *in vitro*, ne protègent pas les souris de l'infection et ne changent pas non plus le cours de l'infection persistante (Plagemann et Moennig, 1992; Rowland *et al.*, 1994). Il est actuellement bien établi que la persistance du virus LDV résulte de la production continue, chez l'animal infecté, d'une sous-population de macrophages permissifs à l'infection virale issus de cellules initialement insensibles (Hu *et al.*, 1992; Stueckemann *et al.*, 1982b). Deux autres particularités importantes dans l'immunobiologie du virus LDV se retrouvent chez le virus du SRRP; il s'agit d'une part, de l'activation polyclonale des lymphocytes B et d'autre part, du phénomène facilitateur de l'infection par les anticorps spécifiques du virus. On ne sait pas encore pour ces deux virus à quelles protéines ces deux phénomènes peuvent être associés. L'effet du virus LDV sur la réponse immunitaire de type cellulaire est aussi similaire à ce qui fut rapporté pour le virus du SRRP. En effet, la dépression de la réponse cellulaire est subtile et transitoire (Rowson et Mahy, 1985).

La réponse immunitaire humorale vis-à-vis du virus EAV, est différente de celle dirigée contre les virus LDV et du SRRP, et ce notamment sur le plan de la cinétique des anticorps neutralisants. Ces derniers apparaissent beaucoup plus tôt (une semaine après l'infection) dans le cas du virus EAV et durent plus longtemps, puisqu'on peut continuer à les détecter 7 ans après la primo-infection. Les titres atteints par ces anticorps neutralisants sont de loin plus importants que ceux enregistrés suite à l'infection par les virus LDV et SRRP. De même, l'apparition des anticorps neutralisants dans le cas de l'infection par le virus EAV, résulte en l'élimination du virus dans le sérum; toutefois le virus peut être réisolé à partir de la fraction leucocytaire. En fait, cette réponse humorale vis-à-vis du virus EAV, bien qu'elle semble plus efficace, n'arrive pas à empêcher les réinfections ni même à éliminer complètement le virus (McCollum, 1986). Seule la maladie clinique peut être prévenue.

Abstraction faite de quelques différences mineures, la pathogénie des artérovirus semble être similaire. Toutefois, plusieurs travaux sont à envisager afin de déterminer le rôle exact de la réponse immunitaire contre ces virus. Ces derniers semblent user de stratégies, pour le moment peu connues, afin de contrecarrer leur élimination complète.

5. SUPERFAMILLE DES CORONAVIRUS (CLASSIFICATION)

Les critères morphologiques, qui furent initialement à la base de la classification des virus EAV, LDV, SHFV et celui du SRRP dans le genre Artérovirus de la famille *Togaviridae* (Plagemann et Moennig, 1992), ne peuvent désormais

FIGURE 2: Lien phylogénétique entre les membres de la superfamille des coronavirus.

La distance entre les différents groupes de virus est arbitraire.

(Selon Snijder et Horzinek, 1993)

MHV: mouse hepatitis virus

IBV: infectious bronchitis virus

HCV: human coronavirus

BEV: Berne virus

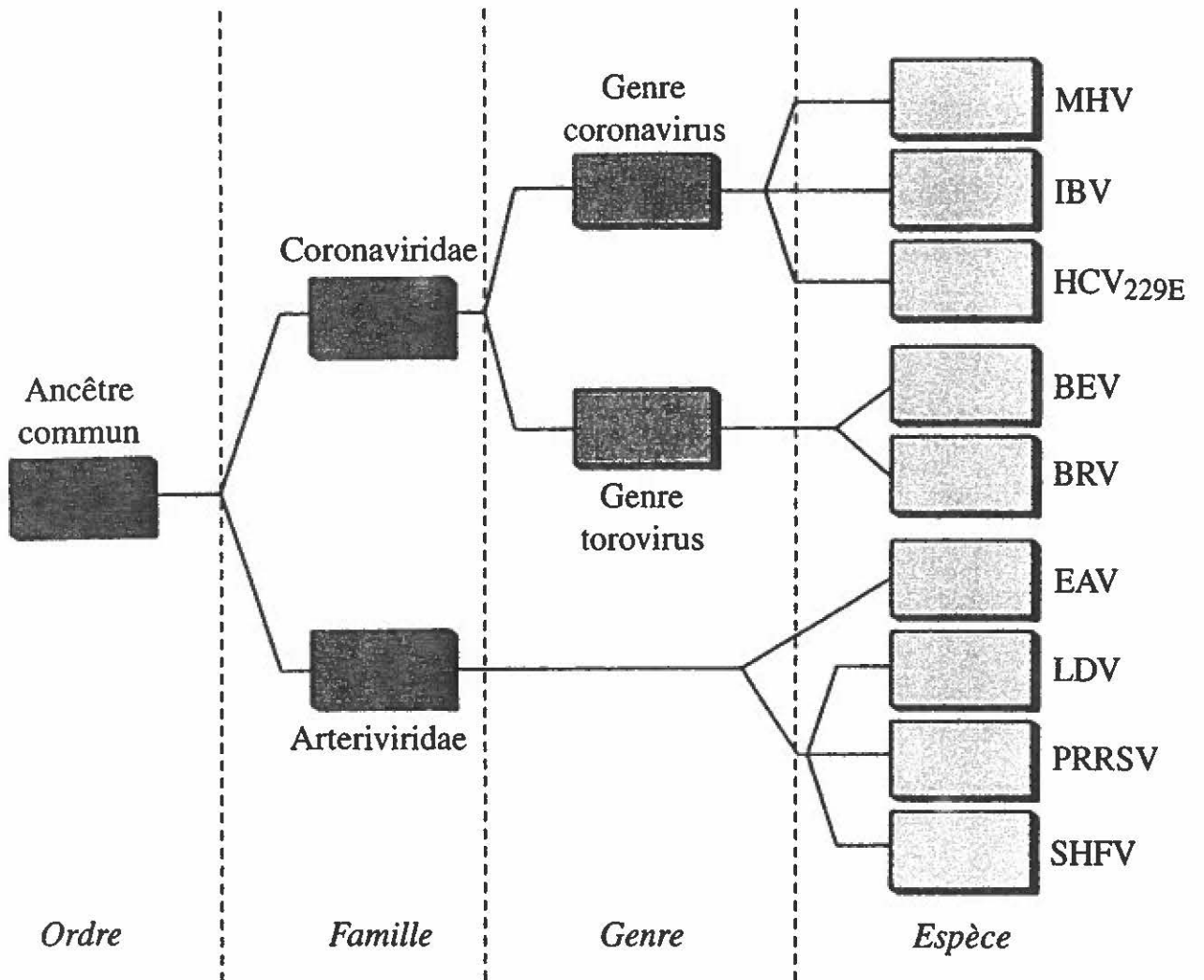
BRV: Breda virus

EAV: Equine arteritis virus

LDV: Lactate dehydrogenase-elevating virus

PRRSV: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

SHFV: Simian hemorrhagic fever virus



prévaloir si l'on tient compte des progrès récents effectués dans l'analyse moléculaire de ces virus (Den Boon *et al.*, 1991a; Chen *et al.*, 1993; Conzelmann *et al.*, 1993; Godeny *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a et b). En effet, la similarité au niveau de l'organisation génomique et la stratégie de réplication avec les membres de la famille *Coronaviridae* est évidente. Cette famille s'est avérée encore plus large après l'identification de la famille *Toroviridae* (Horzinek *et al.*, 1987), dont l'organisation génomique et la stratégie de réplication de ses membres sont similaires à ceux des coronavirus. Cette famille, qui fut initialement considérée à part, représente actuellement un genre dans la famille *Coronaviridae* (Pringle, 1992). L'analyse détaillée des séquences génomiques de tous ces virus a permis de démontrer un lien phylogénétique (Fig. 2), créant ainsi la notion "superfamille des coronavirus" (Pringle, 1992; Snijder et Horzinek, 1993).

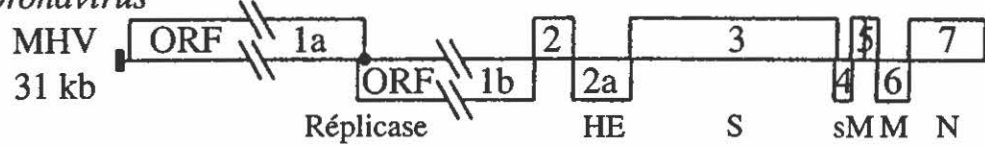
Les trois propriétés principales qui sont à la base de la notion de la superfamille des coronavirus concernent leur organisation génomique (5'-réplicase/protéines de l'enveloppe/protéine de la nucléocapside-3') (Fig. 3), leur stratégie de réplication (synthèse d'une série d'ARNs sous-génomiques ayant en commun leur extrémité 3') et la conservation de plusieurs domaines au niveau de la séquence de leur réplicase (Fig. 4). Toutefois, plusieurs autres critères semblent différencier les artérovirus des genres Coronavirus et Torovirus. Ces derniers, à la différence des artérovirus, sont en effet d'une taille plus importante, présentent à la surface de leurs particules des spicules proéminentes, et leur nucléocapside qui est de symétrie hélicoïdale, contient une molécule d'ARN génomique de plus grande taille (Fig. 5) (Spaan *et al.*, 1988; Plagemann et Moennig, 1992; Snijder et Horzinek, 1993). Ces différences majeures ont incité les virologistes à réviser le

FIGURE 3: Illustration comparative de l'organisation génomique des coronavirus, torovirus et artérovirus.

La désignation couramment employée des produits de certains gènes est indiquée en bas de chaque cadre de lecture de la molécule d'ARN génomique. Noter que l'organisation génomique de tous ces virus répond au modèle 5'-réplicase-protéines membranaires-protéine de la nucléocapside-3'.

(Selon Snijder et Spaan, 1995)

Coronavirus



Torovirus



Artérovirus

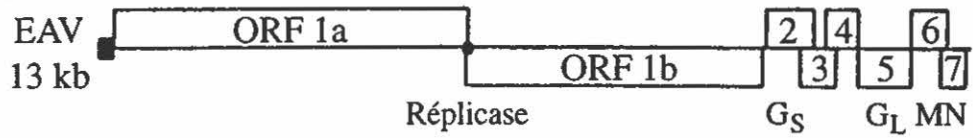


FIGURE 4: Organisation du gène de la réplicase (ORF 1a/ 1b) des coronavirus, torovirus et des artérovirus.

Le site de changement du cadre de lecture "ribosomal frameshift" est indiqué par un cercle plein.

Bien que leur génome soit de taille variable, les coronavirus, torovirus et artérovirus ont conservé certains motifs de protéases en des positions relativement similaires au niveau du cadre de lecture 1a. De même, les domaines spécifiques des fonctions polymérase (POL) et hélicase (HEL), présents au niveau du cadre de lecture 1b, sont aussi conservés. Enfin, un domaine à l'extrémité carboxylique de l'ORF1b (CTD) est présent chez tous ces virus. Il est important de noter, qu'inversement à la plupart des virus à ARN, le domaine lié à la fonction hélicase est situé en aval du motif spécifique de la polymérase. Ainsi, l'organisation des domaines fonctionnels conservés au niveau des cadres de lecture 1a et 1b des coronavirus, torovirus et artérovirus répond à la formule suivante: protéase-polymérase-hélicase-domaine C-terminal. Hormis la similarité que l'on observe au niveau de l'organisation générale des génomes de ces virus, la conservation de plusieurs domaines liés à la fonction de la réplicase renforce leur lien phylogénétique et appuie la notion de "superfamille des coronavirus".

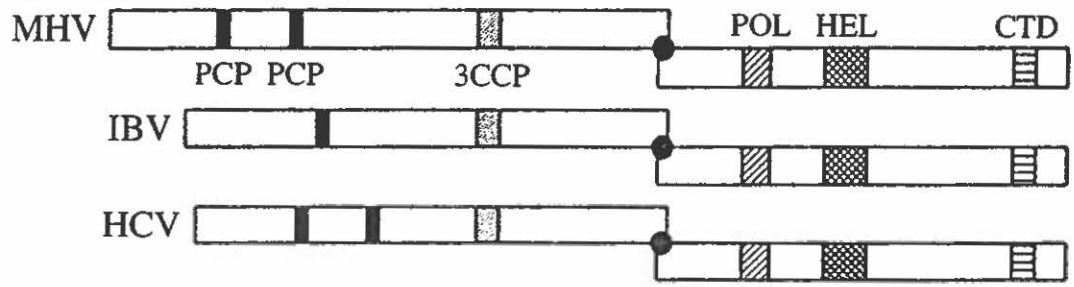
PCP: protéase à cystéine de type papaine.

3CCP: protéase à cystéine similaire à la protéase 3C des picornavirus.

CSP: protéase à sérine de type chymotrypsine.

(Selon Snijder et Spaan, 1995)

Coronavirus



Torovirus



Artérovirus

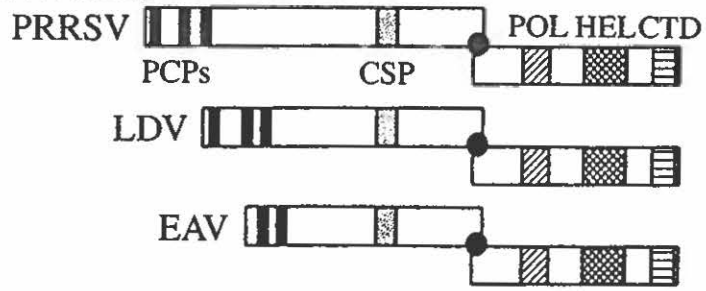
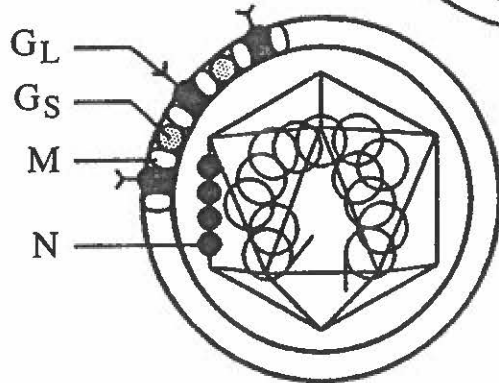
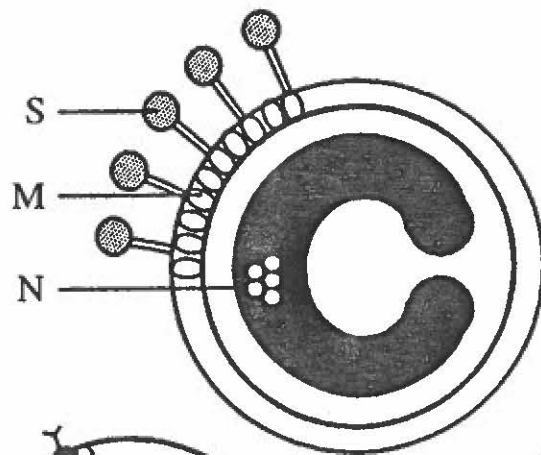


FIGURE 5: Représentation schématique de la morphologie des virus appartenant aux genres Torovirus, Artérovirus et Coronavirus.

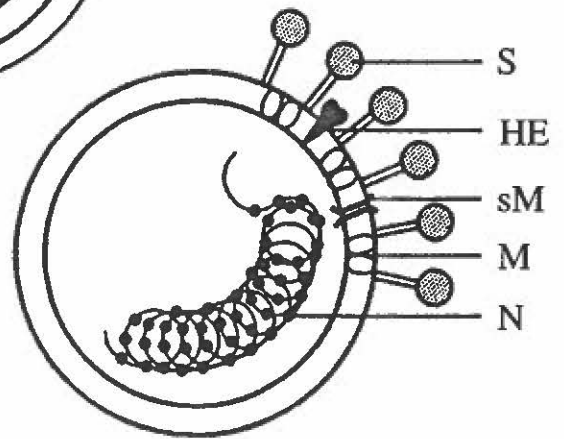
La topographie des protéines structurales majeures est indiquée.

(Selon Snijder et Spaan, 1995)

Torovirus
BEV



Artérvirus
EAV



Coronavirus
MHV

statut taxonomique des artérovirus, et l'on s'accorde à ce qu'une sous-famille ou une famille à part leur soit réservée (VDN News, 1994).

6. CONCLUSION

Durant les quatre dernières années, les études moléculaires sur les artérovirus ont été très intenses, et le sont devenues davantage après l'émergence du virus du SRRP. De par l'importance économique qui caractérise ce dernier, les autres artérovirus constituent d'excellents modèles pour étudier l'interaction virus-hôte en ce qui concerne surtout la persistance virale. À ce sujet, le virus murin LDV est le meilleur candidat, puisqu'il infecte naturellement une espèce très maniable.

Les données de littérature qui viennent d'être évoquées rendent compte que bien que les artérovirus soient presque similaires sur la plupart des aspects, la ressemblance entre le virus LDV et celui du SRRP est la plus accentuée. On se demande alors si ce dernier n'aurait pas dérivé du premier suite à son adaptation naturelle chez le porc. En fait, ceci est tout à fait envisageable puisqu'il n'existe pas de barrière physique entre l'espèce porcine et murine. Toutefois, jusqu'à date, il n'existe pas de données expérimentales qui corroborent une telle éventualité. En effet, les infections expérimentales n'ont pas permis de démontrer une répllication éventuelle du virus du SRRP chez l'espèce murine (Hooper *et al.*, 1994).

En ayant la plus haute importance économique, les études sur le virus du SRRP devraient s'orienter sur l'aspect immunobiologique afin d'aboutir à un moyen de lutte efficace contre l'infection. À ce propos, les données de littérature souffrent

d'un manque important concernant la nature des protéines structurales de ce virus.
C'est dans ce contexte que les travaux de la présente thèse furent amorcés.

PARTIE II:
MÉTHODOLOGIE, RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1:
CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DE SOUCHES
QUÉBÉCOISES DE RÉFÉRENCE DU SRRP

Suite à la découverte du virus de Lelystad en tant qu'agent étiologique primaire du SRRP, plusieurs laboratoires de divers pays ayant subi des épisodes de ce syndrome, ont fini par isoler plusieurs souches du virus. Étant donné que la distribution de ce syndrome s'étalait sur la plupart des continents, il était donc nécessaire de procéder au départ à l'identification de tous ces isolats afin de pouvoir les classer. C'est dans ce contexte que le travail présenté dans ce premier chapitre fut entrepris. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que tous les isolats de la province du Québec sont antigéniquement plus proches des souches américaines. Sur le plan morphologique et structural, aucune différence majeure n'a pu être décelée. En effet, l'aspect togaviriforme des particules virales ainsi que l'existence d'au moins trois protéines structurales ont pu être démontrés dans le cas de la souche de référence du Québec, IAF-exp91. Ces travaux préliminaires ont été rapportés dans l'article I qui constitue le premier chapitre de la présente thèse.

ARTICLE 1

**Porcine reproductive and respiratory syndrome virus:
morphological, biochemical and serological characteristics of
Quebec isolates associated with acute and chronic
outbreaks of PRRS**

H. Mardassi, R. Athanassious, S. Mounir, and S. Dea

Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier,
531 boulevard des Prairies, Laval, Qc
Canada, H7N 4Z3

Canadian Journal of Veterinary Research (1994), **58**: 55-64

ABSTRACT

Cytolytic and non-cytolytic strains of the porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) were isolated in primary cultures of porcine alveolar macrophages (PAM) from lung homogenates of stillborn fetuses or blood samples of dyspneic piglets collected from Quebec pig farms having experienced acute or chronic outbreaks of PRRS. Serological identification of the virus was confirmed by indirect immunofluorescence and indirect protein A-gold immunoelectron microscopy using reference antiserum prepared from experimentally-infected specific pathogen free (SPF) piglets and monoclonal antibodies (MoAbs) directed against the p15 nucleocapsid (N) protein of the reference ATCC-VR2332 isolate. Intracytoplasmic enveloped viral particles that tended to accumulate into cytoplasmic vesicles were observed in the infected PAM; no budding was demonstrated at the level of the cytoplasmic membrane. The extracellular virions appeared as pleomorphic but mostly spherical enveloped particles, 50-72 nm in diameter (averaged diameter of 50 particles was 58.3 nm), with an isometric core about 25-30 nm. Buoyant density of the virus in CsCl density gradients was estimated to 1.18-1.20 g/ml. No hemagglutinating activity was demonstrated. Analysis of semi-purified virions of isolate IAF-exp91 by radioimmunoprecipitation (RIPA) and Western immunoblotting experiments, using reference rabbit and porcine hyperimmune sera, revealed 4 major viral proteins, a predominant 15 kD N protein and three other proteins with predicted Mr of 19, 26 and 42 kD. Progeny viral particles produced in PRRSV-infected PAM in the presence of tunicamycin lacked the 42 kD protein, thus confirming its *N*-glycosylated nature. Immunoprecipitation experiments using the anti-ATCC-VR2332 MoAbs confirmed

the close antigenic relationships between Quebec and American reference isolates of PRRSV.

INTRODUCTION

A porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) was first reported in the United States and Canada in 1986-87 (Bilodeau *et al.*, 1991; Polson *et al.*, 1990) and swept rapidly through Western European countries in 1991 (Baron *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1991a). The disease was initially characterized by severe reproductive failure in sows of any parities (late-term abortions; dead, weak and mummified piglets), respiratory disease and increased preweaning mortality, and an influenza-like syndrome in grower-finisher pigs (Bilodeau *et al.*, 1991; Keffaber *et al.*, 1989; Paton *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991a).

The causative agent of PRRS was first described in the Netherlands and designated the Lelystad virus (LV) (Wensvoort *et al.*, 1991b). The LV is a fastidious agent that can be isolated and serially passaged in primary cultures of porcine alveolar macrophages (PAM) from tissues of sick nursing piglets and from blood samples of infected sows (Yoon *et al.*, 1992a). In pigs experimentally infected with the LV, both the reproductive form as well as the respiratory form of the disease could be reproduced (Christianson *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1992b). Electron microscopic studies showed that LV is a spherical, enveloped virus, 50 to 65 nm in diameter with a central core measuring 25-30 nm (Wensvoort *et al.*, 1992b; Benfield *et al.*, 1992b). Viruses with similar morphological characteristics and serologically related to LV were isolated in other European countries (Baron *et al.*, 1992; Plana *et al.*, 1992) and in North America (Yoon *et al.*, 1992a; Collins *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992a). Recently, the genome of LV was shown to be a 15 Kb polyadenylated RNA molecule, containing eight open reading frames that probably encode virus-specific proteins (Meulenber *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993).

According to its morphological, biochemical and molecular characteristics, PRRSV was provisionally classified as a member of the genus *Arterivirus* of the family *Togaviridae* (Benfield *et al.*, 1992a et b; Meulenberg *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993; Francki *et al.*, 1992). No serologic cross-reactivities were found between PRRS virus and other members of the *Arterivirus* genus, such as lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) of mice and equine arteritis virus (EAV) (Wensvoort *et al.*, 1992b; Plagemann et Moennig, 1992), but similar intracellular viral particles and virus-induced structures were observed by electron microscopy in PAM cells infected with PRRSV (Wensvoort *et al.*, 1992b; Plagemann et Moennig, 1992; Dea *et al.*, 1992b). The density gradient-purified virions of the ATCC-VR2332 isolate possesses morphological and physico-chemical properties similar to EAV and LDV (Wensvoort *et al.*, 1992b; Benfield *et al.*, 1992b; Plagemann et Moennig, 1992). Polypeptides with apparent molecular mass (M_r) of 15, 19, and 24 to 26 kD, can be predicted from sequence analysis of the LV genome (Meulenberg *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993). These polypeptides may correspond to the nucleocapsid protein N, the matrix protein M, and the major surface glycoproteins G, as described for EAV and LDV (Francki *et al.*, 1992; Plagemann et Moennig, 1992; De Vries *et al.*, 1992). The European isolates of PRRSV appear to belong to the same serotype, whereas antigenic variability has been demonstrated among North American isolates, and between North American and European isolates; the involvement of non-pathogenic or low-pathogenic PRRS virus strains in regions with no clinical outbreaks has been also suggested (Morrisson *et al.*, 1992b; Wensvoort *et al.*, 1992a).

In the present study, we describe the isolation of PRRSV from acute and chronic outbreaks of reproductive and respiratory problems in Quebec pig farms.

We also describe the morphological and physico-chemical properties, the polypeptide and antigenic structures of the reference IAF-exp 91 Quebec isolate of PRRSV. Comparison of the various Quebec isolates by radioimmunoprecipitation (RIPA) and indirect immunofluorescence revealed a close antigenic relationship with the reference North American isolate of PRRSV.

MATERIALS AND METHODS

Clinical specimens

Clinical samples were collected from pig farms that were experiencing acute or chronic (repeated) outbreaks of severe reproductive problems in sows of different parities concomitant to respiratory problems in suckling and postweaning piglets (Bilodeau *et al.*, 1991). Mummified and stillborn swine fetuses, sera from convalescent sows and nursing piglets from affected litters, were submitted by attending veterinarians or were collected by the authors during herd visits. Portions of lung, spleen, kidney, heart and brain from aborted fetuses or sick suckling pigs were processed for virological and serological investigations. Ten percent homogenates were prepared in phosphate-buffered saline (10 mM PBS), pH 7.4, using a Sorvall Omnimixer (Yvan Sorvall Inc., La Jolla, Ca) and clarified by centrifugation at 5,000 X g for 20 min at 4°C. Specimens were used immediately for virus isolation or were stored at -70°C.

Reference virus and antisera

A cytopathic virus, designated IAF-exp91 virus, was isolated from the lung of a specific pathogen-free (SPF) pig, which has been intranasally inoculated with a pooled homogenate of tissues from suckling piglets in a Quebec herd (PLO) experiencing a typical acute outbreak of PRRS (Dea *et al.*, 1992a). The virus propagated in primary cultures of porcine alveolar macrophages (PAM) was shown to reproduce clinical disease and respiratory lesions in SPF pigs, and reproductive disorders in sows (Dea *et al.*, 1992b).

The reference hyperimmune sera used in the present study were obtained from experimentally-infected specific-pathogen-free (SPF) piglets, and reacted positively by indirect immunofluorescence (IIF titers of 1:128 to 1:256) to the tissue culture-adapted American isolate ATCC-VR2332 of PRRS virus (Dea *et al.*, 1992b). Monoclonal antibodies (MoAbs) SDOW17, EP147 and VO17, directed against the nucleocapsid protein of the reference ATCC-VR2332 isolate of PRRSV (Benfield *et al.*, 1992b; Collins *et al.*, 1992), were kindly provided to us by Drs D.A. Benfield and E. Nelson (South Dakota State University).

A rabbit hyperimmune serum directed against the IAF-exp91 isolate of PRRS was obtained following immunization with the CsCl gradient purified virus. The protocol used for rabbit immunization has been previously described (Dea *et al.*, 1988).

Cell cultures and virus isolation

Continuous monkey kidney (Vero, CV-1, MA-104), dog kidney (MDCK), rabbit kidney (RK-13), baby hamster kidney (BHK-21), porcine kidney (PK-15), porcine fallopian tube (PFT) and swine testicular (ST) cell lines, as well as primary cultures of porcine kidney, testicle, and lung cells were used to attempt virus isolation. Cell monolayers were prepared in Linbro 24-well microtiter plates using culture media described in previous reports (Dea *et al.*, 1991; Dea *et al.*, 1992c). Primary cultures of PAM cells obtained from 5-8-week-old SPF pigs were prepared according to the procedure described by Wensvoort *et al.* (1991a). PAM cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)

supplemented with 10% gamma-irradiated fetal bovine serum (FBS) and 50 µg/ml gentamicin.

Aliquots (100 µl) of clarified clinical samples were inoculated in duplicate wells. After an adsorption period of 1 h at room temperature, infected cell monolayers were rinsed twice with PBS and reincubated at 37°C in culture medium containing 2 to 5 % FBS. Infected cell cultures were monitored daily for the appearance of cytopathic effect (CPE). Subpassages were done at 5- to 6-day intervals, depending on the extent of CPE. For virus identification, the cells were fixed at 24-36 h p.i. with 80% methanol in PBS and stained by indirect immunofluorescence (IIF) using anti-IAF-exp91 rabbit hyperimmune antiserum, or anti-ATCC VR2332 MoAbs, and fluorescein-conjugated anti-porcine or anti-mouse IgG (ICN, Biochemical Canada Ltd, Mississauga, Ontario) (Dea *et al.*, 1991). Infectivity titers were determined by titration of clarified tissue culture medium using an endpoint dilution procedure and calculation of 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) per ml (Dea *et al.*, 1991).

Viral purification

Stock viruses were produced by at least five successive passages in PAM. The viruses were harvested by freezing and thawing infected cells twice and removing cellular debris by centrifugation at 5000 X g for 20 min. Alternatively, the cell pellet was disrupted by hypotonic shock in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. The extracellular virus in 100 to 200 ml of clarified supernatant fluids was first pelleted by differential ultracentrifugation at 100,000 X g for 2 h through a 30% (W/V) sucrose cushion. Concentrated virus was then purified by CsCl isopycnic gradient

ultracentrifugation, as previously described (Benfield *et al.*, 1992b; Dea *et al.*, 1991). After an overnight centrifugation at 100,000 X g, fractions were collected and their optical density at 280 nm (or number of cpm in case of [³⁵S]-methionine labeled virus) and buoyant density were determined. Infectivity of each fraction was determined following inoculation of PAM cells seeded in 96 well-microtiter plates (Yoon *et al.*, 1992b).

Electron microscopy (EM)

Aliquots (10 µl) of clarified infected-cell culture fluid and fractions from density gradients were spotted on formvar-carbon-coated grids and negatively stained with 2% solution of sodium phosphotungstate (pH 7.0) or positively stained with 3% uranyl acetate, as previously described (Dea et Tijssen, 1988; Horzinek *et al.*, 1971). The grids were examined on a Philips EM 300 electron microscope at a potential of 80 kV.

Infected PAM cells (12 to 18 h p.i.) were also examined by transmission EM. Cells were rinsed with 100 mM PBS (pH 7.4) supplemented with 4.5% sucrose (W/V) and were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS for 1 h at 4°C. Ultrathin sections (70-90 nm thick) were processed and stained with uranyl acetate and lead citrate, as previously described (Dea *et al.*, 1989a).

Protein A-Gold immunolabelling (PAG-IEM)

The procedure used for PAG-IEM was done as described elsewhere (Dea et Garzon, 1991). Briefly, aliquots (100 µl) of clarified infected cell culture fluids or

purified viral preparations (diluted 1:20) were poured into 240 μ l nitrocellulose microtubes and concentrated by airfuge ultracentrifugation at 120,000 X g (30 psi) for 10 min onto 400-mesh naked-nickel grids. Pooled serum from experimentally-infected SPF piglets and rabbit hyperimmune serum were used as positive antisera. The gold particles in the PAG complex were 7 to 15 nm. The grids were counterstained with 2% sodium phosphotungstate, pH 7.0. Specificity of the labeling was demonstrated by controls including non-immune pig and rabbit sera and incubation with PAG complex alone.

Hemagglutination assay (HA)

The microhemagglutination assay was performed as previously described (Dea *et al.*, 1992c). The assay was done at 4, 22 and 37°C using chicken, rabbit, mice, guinea pigs and bovine erythrocytes.

Radioisotopic labeling of virion structural proteins

PAM monolayers prepared in 75cm²-tissue culture flasks (Corning) were washed twice with PBS and infected (or mock-infected) at a multiplicity of infection of 1 TCID₅₀/cell. After adsorption of the virus for 1 h at room temperature, the inoculum was discarded and the monolayers were further incubated 3 h at 37°C in DMEM medium supplemented with 2 % FBS. In glycosylation-inhibition experiments, tunicamycin (Boehringer-Mannheim Canada Ltd, Laval, Quebec) at concentrations of 0.5 and 1.0 μ g/ml was also added to the maintenance medium. At 3 h p.i., the medium was discarded and replaced by methionine-free DMEM (ICN Biochemical Canada Ltd, Mississauga, Ontario), with or without tunicamycin. After

a starvation period of 1 h, 50 μ Ci of trans-labeled L-[35 S] methionine (Sp. act. \geq 1,200 Ci/mmol, ICN Biochemical Canada) per mL were added and cultures were reincubated at 37°C. Supernatants containing radiolabeled virus were harvested at 24 to 48 hours p.i. or when maximal CPE was achieved.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Supernatants of PRRSV-infected PAM were harvested when maximal CPE was achieved and clarified by low-speed centrifugation. Thereafter, extracellular virions were pelleted by ultracentrifugation at 100,000 X g for 2 h through a 30% (W/V) sucrose cushion. This semi-purified virus was then disrupted in an equal volume of double-strength Laemmli sample buffer in the presence or absence of 2-mercaptoethanol (BIO-RAD Laboratories, Mississauga, Ontario). The samples were boiled for 3 min, and clarified at 10,000 X g for 15 min before electrophoresis in 12.5 or 15.0 % SDS-polyacrylamide gels, as previously described (Dea et Tijssen, 1988). For fluorography, gels were soaked in Amplify (Amersham Searle Co., Oakville, Ontario) for 45 min, dried, and autoradiographed with Kodak X-OMAT RP film at -70°C for 3 to 7 days (Dea et Tijssen, 1989). The apparent molecular mass (M_r) of the virion polypeptides were determined by comparing their electrophoretic mobilities to those of standards (Rainbow 14 C-methylated protein molecular weight markers, Amersham Searle Co.).

Radioimmunoprecipitation (RIPA) and western immunoblotting

Radiolabeled semi-purified virus obtained as above was resuspended in ice-cold RIPA lysis buffer made of 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 μ g/ml of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 10^3 units/ml of aprotinin (Boehringer-Mannheim, Canada, Ltd).

Immunoprecipitation assays using homologous hyperimmune rabbit and porcine sera, or murine ascitic fluids, were performed as previously described using protein A-sepharose (Pharmacia) for absorption of the immune complexes (Dea et Tijssen, 1989). Alternatively, 10 μ l of diluted (1:50 to 1:200) or undiluted rabbit hyperimmune serum were mixed with 50 μ l of a 10% suspension of formaldehyde-fixed and heat-inactivated *Staphylococcus aureus* cells (Pansorbin, Calbiochem, LaJolla, CA). The mixed suspension was adjusted to 100 μ l with RIPA buffer and incubated for 2 h at 4°C under gentle agitation. The antibody-coated bacteria were then washed twice and resuspended in 100 μ l of RIPA buffer. For the immunoprecipitation assays, 50 μ l of diluted radiolabeled virus were added and the samples were incubated overnight at 4°C. The immune complexes were then collected by centrifugation and washed four times in RIPA buffer. The resulting pellets were resuspended in 50 μ l of Laemmli sample buffer containing 5% of 2-mercaptoethanol and processed as above for SDS-PAGE.

In Western immunoblotting assays, viral proteins separated by SDS-PAGE were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes (45 μ m pore size, Schleicher & Schuell) at a potential of 60 V for 2 h in transfer buffer consisting of 25 mM Tris-190 mM glycine (pH 8.3) and 20 % (V/V) methanol (Dea et Tijssen, 1988). After saturation for 1 h in 50 mM Tris-buffered saline (TBS) containing 3% bovine serum albumin (grade V, Sigma Chemical Co, St-Louis, MO.), membranes were incubated for 2 h at room temperature in the presence of 1:50 to 1:200 dilution of the reference hyperimmune serum. The immune reactions were revealed following incubation with 1:1000 dilution of HRP-labeled rabbit anti-porcine IgG or goat anti-rabbit IgG (ICN Biochemical Canada Ltd, Mississauga, Ontario) and a

subsequent incubation of 30 to 45 min in the enzyme substrate solution consisting of 0.05% 4-chloro-1-naphthol (Sigma) in TBS containing 20% (V/V) methanol.

RESULTS

Virus isolation and serological identification

Ten isolates of PRRSV could be propagated in primary cultures of PAM cells from clinical samples collected from pig farms in southern Quebec that had experienced typical or atypical signs of PRRS. Clinical and pathological findings associated with isolation of PRRSV in Quebec pig farms are summarized in Table 2. Six of the 10 farms exhibited severe reproductive and respiratory syndromes that lasted 2 to 6 months. The clinical findings included: anorexia and pyrexia in pregnant sows lasting up to 7 to 11 days, mid-to-late-term abortions often with partially autolysed fetuses, and a dramatic increase in stillbirth rates, weak-born pigs, and neonatal deaths preceded by clinical signs of rapid abdominal breathing. Most of these farms had extended postweaning nursery problems with respiratory disease. Clinical signs in four of the 10 farms investigated were not typical of PRRS; these farms were experiencing chronic production losses involving increased mortality and reduced growth rate in pigs at postweaning age that persisted for more than 12 months. The various isolates were cultivated in PAM cells from lung homogenates of stillborn fetuses or dyspneic pigs collected during the acute phase of the syndrome, but also from serum collected up to 60 months after the onset of severe clinical signs in the farm. Piglets submitted for necropsy from these outbreaks were in variable body condition. Different degrees of pulmonary congestion and oedema, sometimes with increased firmness of lung tissue, enlarged mediastinal lymph nodes, were the only significant macroscopic lesions observed. Histologically, lesions of multifocal interstitial pneumonia (IP) and/or proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) were found in lungs from sick piglets (Dea *et al.*, 1992c).

Seven of the Quebec PRRSV isolates induced, upon their first or second passage in PAM, a CPE characterized by lysis, rounding off, and clumping of the cells. Infected cells showed a bristling cytoplasmic membrane (sea-urchin appearance) with a granular cytoplasm after the first 18 to 24 h p.i.; complete destruction of the monolayers was usually achieved within 36 to 48 h p.i. upon the third or fourth passage. On the other hand, three other isolates induced cellular aggregation within 24 to 48 h p.i., without causing significant cellular degeneration after 6 to 7 day p.i. (Table 2). No hemagglutinating activity was recovered from clarified infected supernatant fluids using rooster, guinea pig, rabbit and rat erythrocytes.

Identification of the virus isolates was confirmed by IIF tests. Antisera directed to known porcine viruses including transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine parvovirus (PPV), encephalomyocarditis virus (EMCV), swine influenza virus (SIV) and porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV), and to bovine viral diarrhea virus (BVD) did not react by IIF to infected macrophages. However, a diffuse and granular cytoplasmic (mostly perinuclear) fluorescence was observed using convalescent sera from experimentally-infected SPF piglets that had been found previously to be positive for antibodies to the Lelystad and/or American ATCC-VR2332 isolates of PRRSV. Three monoclonal antibodies, SDOW17, EP147 and VO17, directed against the nucleocapsid protein of the reference ATCC-VR2332 isolate, reacted positively with similar titers to different Quebec isolates of the virus. No reactivity was observed following incubation with pooled sera from control SPF pigs. In all cases, infectivity titers determined by IIF tests ranged between $10^{4.50}$ to $10^{6.50}$ TCID₅₀/ml after the third and fifth passages, respectively. Protein A-immunogold labeling of aggregated

extracellular virions, following incubation with sera from experimentally-infected SPF piglets or with rabbit homologous hyperimmune serum, further confirmed the identification of the virus (Fig. 6). The gold granules were usually distributed around the viral particles, whereas the interior of the virions was not labeled. No labeling was observed following incubation with rabbit pre-immune serum or with sera from mock-infected SPF piglets, or following incubation of the viral suspensions with PAG complex alone.

In vitro cell susceptibility of the various Quebec PRRSV isolates was limited to PAM, and no serological evidence of viral replication or cytopathic changes was found when the isolates were blindly passaged 3-5 times in the continuous cell lines tested, including those of porcine origin.

Ultrastructural characteristics

Electron microscopic examination of ultrathin sections of infected PAM after 16 to 18 h p.i. permitted the observation of viral particles that tended to accumulate into smooth-walled cytoplasmic vesicles (Fig. 7). The intracellular virions appeared as enveloped viral particles 45-55 nm in diameter with a central isometric core about 25-30 nm in diameter. Budding of viral particles through intracytoplasmic membranes could be observed, but at no time was budding present at the level of the cytoplasmic membrane. Viral replication was found to be restricted to the cytoplasm. During the course of infection with the IAF-exp 91 isolate (PLO), intense vacuolation of the cytoplasm was observed with only minor damage to the intracellular organelles.

Isopycnic ultracentrifugation on CsCl gradients of concentrated extracellular virus regularly yielded three opalescent bands corresponding to buoyant densities

of 1.18 to 1.31 g/ml. With the IAF-exp 91 isolate, the clearest band corresponded to a buoyant density of 1.18-1.20 g/ml and peak infectivity of $1 \times 10^{7.2}$ TCID₅₀/ml (Fig. 8A). These gradient fractions contained numerous pleomorphic, but mostly spherical, enveloped viral particles 50-72 nm in diameter (averaged diameter of 50 particles was 58.3 nm) with little cellular debris (Fig. 8B). Many particles appeared empty. The middle opalescent band corresponding to buoyant density of 1.24-1.26 g/ml also contained viral particles, but mostly cellular debris. The faint opalescent band observed near the bottom of the tube corresponded to a buoyant density of 1.28-1.31 g/ml and contained mostly core-like structures approximately 25-35 nm in diameter. Staining of semi-purified viral particles with uranyl acetate allowed a better visualization of the central isometric core-like structure (Fig. 9 A and B).

Viral polypeptides identified by RIPA and Western immunoblotting

Semi-purified preparations of the reference Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus were analysed by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions, and viral polypeptides were deduced from RIPA and Western immunoblotting experiments using sera from convalescent pigs or homologous rabbit hyperimmune serum, as the source of specific virus antibodies.

Under reducing conditions, at least six new polypeptide species, not present in supernatant fluids of mock-infected control cultures, were resolved by SDS-PAGE of the semi-purified preparations of [³⁵S]-methionine-labeled PRRS virus (Fig. 10A, lane 3). The relative migration distances of these bands correspond to approximate M_r of 12, 15, 19, 26, 42 and 90 kD. Occasionally, a 70 kD polypeptide could also be observed. Only the 15, 19, 26 and 42 kD polypeptide species were immunoprecipitated using both source of antisera (Fig. 10A, lanes 4 and 6; Fig. 11,

lanes 3 and 4). The 15 kD polypeptide was characteristically observed as a predominant band or as a group of two closely migrating bands. The later polypeptide was immunoprecipitated by the three monoclonal antibodies, SDOW17, EP147 and VO17, directed against the nucleocapsid protein of the reference ATCC-VR2332 isolate of PRRSV (Fig. 11, lanes 5 to 7).

Representative immunoblot patterns of viral polypeptides separated by electrophoresis under reducing conditions and revealed following incubation in the presence of sera from experimentally-infected SPF piglets are illustrated in Fig. 10B. From the polypeptide species described above, only those with apparent M_r of 15, 19 and 26 kD were immunochemically stained by homologous antisera. The 42 kD protein could not be detected in Western immunoblotting experiments using different sources of antisera. Similar immunoblot patterns were revealed using pooled sera from convalescent pigs of the 10 Quebec pig farms investigated, the 15 kD polypeptide being constantly revealed as the predominant structural protein (data not shown). However, none of the three anti-N MoAbs tested reacted positively against the 15 kD polypeptide by Western immunoblotting. Under nonreducing conditions, homologous hyperimmune sera failed to recognize the 19 kD protein (Fig. 10B, lane 2).

In order to determine which of these polypeptides were glycosylated, IAF-exp 91 isolate was cultivated in the presence of tunicamycin. The semi-purified viral preparations were analysed together with virus from untreated cell cultures by RIPA. Results indicated that the 42 kD viral protein could no longer be detected by homologous antisera following tunicamycin treatment of PRRS virus-infected macrophages (Fig. 10A, lanes 7 and 8).

DISCUSSION

The results obtained in the present study further confirmed the importance of the new porcine virus which has been recently reported as the causative agent of acute outbreaks of severe reproductive and respiratory problems that affected Canadian pig farms since the fall of 1987 (Dea *et al.*, 1992a et b). Although most of the Quebec PRRS virus isolates were cultivated in PAM cells from lung homogenates of stillborn fetuses or dyspneic pigs collected during the acute phase of the syndrome, the virus was also recovered from blood samples collected up to 60 months after the onset of severe clinical signs in the farm. Thus, it appears (by serologic surveys and virus isolation) that the virus continues to circulate on most farms that had acute PRRS 1-3 years earlier, and that a distinct chronic form of the disease may emerge. Our results are in agreement with previous findings by Keffaber *et al.* (1992) that PRRSV can be isolated from nurseries up to 2.5 years post acute outbreak. Recent evidence using contact exposure, suggests that pigs may shed virus for up to 99 days after experimental infection and perhaps longer (Zimmerman *et al.* 1992, Intern Sympo. on SIRS, May 1992, St-Paul, Minnesota), so prolonged infection with PRRS virus is probably common.

Our efforts to isolate the virus in continuous cell lines were unsuccessful and as previously reported by others, only primary cultures of PAM were found to be permissive to the Quebec PRRS isolates (Dea *et al.*, 1992a et b). The cytopathic changes and infectivity titers recovered after the first fifth passages in cultures of PAM are in agreement with previous findings with reference European and American isolates of the virus (Yoon *et al.*, 1992a; Wensvoort *et al.*, 1992b). As demonstrated in the present study, the existence of non cytolytic isolates has been

also reported in a recent comparative study on the efficacy of PAM and the continuous cell line CL 2621 for the detection of PRRSV and anti-PRRS antibodies (Bautista *et al.*, 1993). The morphological characteristics of the Quebec isolates of PRRSV are also in agreement with previous description of the tissue culture-adapted ATCC-VR2332 American isolate of PRRSV (Benfield *et al.*, 1992b). As demonstrated in case of other members of the *Togaviridae* family, notably members of the genus *Arterivirus*, the presence of an inner icosahedric nucleocapsid was best visualized by staining with uranyl acetate (Horzinek *et al.*, 1971). Late events of the viral morphogenesis in PAM cells appeared similar to those previously described for EAV and LDV (Plagemann et Moennig, 1992). The fact that all of the Quebec isolates reacted positively by indirect immunofluorescence tests to three monoclonal antibodies directed against the nucleocapsid protein of the reference American ATCC-2332 strain of PRRSV suggested their close antigenic relationships. Two of the anti-N MoAbs tested in our study have been previously reported to distinguish among European and American isolates of the PRRSV (Nelson *et al.*, 1992). Further studies using MoAbs directed against the antigenic determinants of the surface structural proteins are needed in order to elucidate with certainty if strains that have been associated with acute or chronic episodes of PRRS can be differentiated serologically.

In order to establish the number and size of structural proteins of the Quebec reference isolate IAF-exp91, SDS-PAGE analysis of [³⁵S]-methionine labeled purified or semi-purified virus was conducted under reducing and non-reducing conditions. Identification of viral proteins was further confirmed by RIPA and Western immunoblotting tests using sera from experimentally-infected SPF pigs, as well as homologous hyperimmune rabbit antiserum. From data obtained by RIPA

and Western immunoblotting experiments, it appeared that from the bands obtained by SDS-PAGE, only those corresponding to estimated M_r of 15, 19, 26 and 42 kD could in fact represent viral proteins. Other bands detected by SDS-PAGE could correspond to cellular proteins that co-purified with the extracellular virions. Thus, with the exception of the 42 kD protein, the polypeptide patterns identified for the Quebec reference isolate appear identical to those previously reported for the American reference isolate ATCC-VR2332 propagated in the continuous CL2621 cell line (Murphy *et al.*, 1992). As previously mentioned by others, these polypeptide patterns are compatible with those determined for EAV and LDV (Francki *et al.*, 1992; Plagemann et Moennig, 1992); the nature of the polypeptides detected in EAV has been recently confirmed using recombinant vaccinia virus (De Vries *et al.*, 1992). By analogy to EAV and LDV, the 15, 19 and 26 kD polypeptides identified for PRRSV probably represent the major nucleocapsid protein N, the matrix protein M, and the surface major glycoprotein G_L , respectively (Francki *et al.*, 1992; Plagemann et Moennig, 1992; De Vries *et al.*, 1992). However, since the latter was still detected in preparations of extracellular viral particles pelleted from the supernatants of tunicamycin treated infected PAM, one cannot conclude on its glycosylated nature. In fact, from the polypeptides identified, only one with apparent M_r of 42 kD could not be detected after incubation in the presence of glycosylation inhibitor. By analogy to EAV, the 42 kD protein of PRRSV is probably a highly glycosylated form of the 26 kD protein, the latter being the backbone of the envelope glycoprotein (De Vries *et al.*, 1992). Further study with monospecific sera should permit to elucidate the relation between both viral proteins. The 42 kD glycoprotein may also possess a majority of conformation-dependent epitopes, since it could not be revealed by Western immunoblotting or may simply represent a cellular contaminant. Recently, the complete nucleotide

sequence of the genome of two European isolates of PRRSV was determined; within the 3' terminal 3.5 kb six open reading frames were identified that might encode virus specific proteins. Polypeptides having M_r similar in size to those identified in the present study have been predicted for ORF's 2 to 7 of the viral genome (Meulenber *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993).

The four major viral proteins identified in case of the reference Quebec isolate IAF-exp 91 were revealed using sera from convalescent pigs obtained from each of the farms investigated. These results suggest that virus isolates from these farms share antigenic determinants located on each of their homologous structural proteins. Close antigenic relationship between the reference American and Quebec isolates was also confirmed by RIPA using three MoAbs directed against the nucleocapsid protein. These MoAbs appeared also to be directed against conformation-dependent epitopes since no reactivity was demonstrated to the 15 kD protein by Western immunoblotting. Further investigations with MoAbs directed against the antigenic determinants of the surface proteins should provide more information on the topography of the various structural proteins and antigenic relationships among various strains.

Our present findings and earlier reports on the morphological and biochemical characteristics of PRRSV (Wensvoort *et al.*, 1992b; Benfield *et al.*, 1992b, Plana *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992b) have revealed a close similarity with the virions of LDV and EAV, both assigned to the novel genus *Arterivirus* (Francki *et al.*, 1992; Plagemann et Moennig, 1992). No antigenic relationship was found between the three viruses (Wensvoort *et al.*, 1992a et b), but PRRSV shares a number of other properties with EAV and LDV: the primary target cell of all three viruses in their

respective hosts is the macrophage; they establish asymptomatic persistent infections in their natural hosts; assembly of virus particles occurs by budding from intracellular membranes; virion morphology, genomic organization and physicochemical properties are similar (Meulenberg *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993; Plagemann et Moennig, 1992). Recent molecular studies on EAV (Den Boon *et al.*, 1991a), LDV (Kuo *et al.*, 1992) and PRRSV (Meulenberg *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993) have shown that these viruses possess a genomic organisation and a strategy of replication similar to members of the *Coronaviridae*. However, on the basis of morphological and structural differences, this virus group, probably along with Simian haemorrhagic fever virus (SHFV), has been proposed to be raised to the taxonomic status of a new family, the *Arteriviridae* (Francki *et al.*, 1992). Further studies, particularly on the replication, gene expression strategy and genomic relationship, are needed to support this new classification.

TABLE 2. Clinical history, pathological and virological findings associated with isolation of PRRS virus in Quebec pig farms

Farm	Clinical history				Histopathological Findings ^c		Virus isolation ^d		
	Reproductive Disorders ^a	Respiratory signs		Duration (Months) ^b	IP	PNP	CPE ^e	IIF ^f	PAG-IEM ^g
		Suckling piglets	Growers						
BAJ	+	+	-	2	+	+	L	+	+
PLO	+	+	+	18	+	-	L+	+	+
CM	+	-	+	3	+	+	L	+	+
SBC	+	+	NA	12	NA	NA	L	+	+
KLOP	+	+	+	24	+	+	NL	+	+
BUT	+	+	+	60	+	+	L	+	+
NUT	+	-	NA	6	-	+	NL	+	+
DESR	-	-	+	6	-	+	L	+	+
IAF-183	+	+	-	2	+	-	L	+	ND
CHA	+	+	-	2	+	-	NL	+	ND

^aIncreased rate of mid-to-late term abortions, stillbirth, weak-born pigs, neonatal deaths

^bNumber of months during which persisted reproductive disorders and respiratory signs

^cMicroscopic lesions of interstitial pneumonia (IP) or proliferative and necrotizing pneumonia (PNP)

^dIsolation of a cytopathogenic virus in primary cultures of PAM cells from lung homogenates of stillborn fetuses or blood sample of dispneic piglets

^eType of cytopathic changes: L= lysis of PAM cells within 24 to 36 hours PI upon the second and third passages; NL= aggregation of PAM cells with no apparent cellular degeneration within 6 to 7 days PI

^fReactivity in indirect immunofluorescence tests of infected-PAM cells following incubation with both monoclonal antibodies to the ATCC 2332 isolate of PRRS virus and serum from experimentally-infected sows (anti-IAF-exp91)

^gProtein A-immunogold labeling of extracellular viral particles following incubation with rabbit or porcine anti-PRRS virus hyperimmune serum

NA= not available; ND= not done

FIGURE 6: Protein A-immunogold labeling of extracellular viral particles.

A specific gold labeling of aggregated extracellular virions present in the supernatant fluids of infected PAM cultures was obtained following incubation with hyperimmune sera collected from experimentally-infected pigs. Most of the gold granules appeared closely associated with the viral particles, with minimal gold background staining.

Bar represents 100 nm.

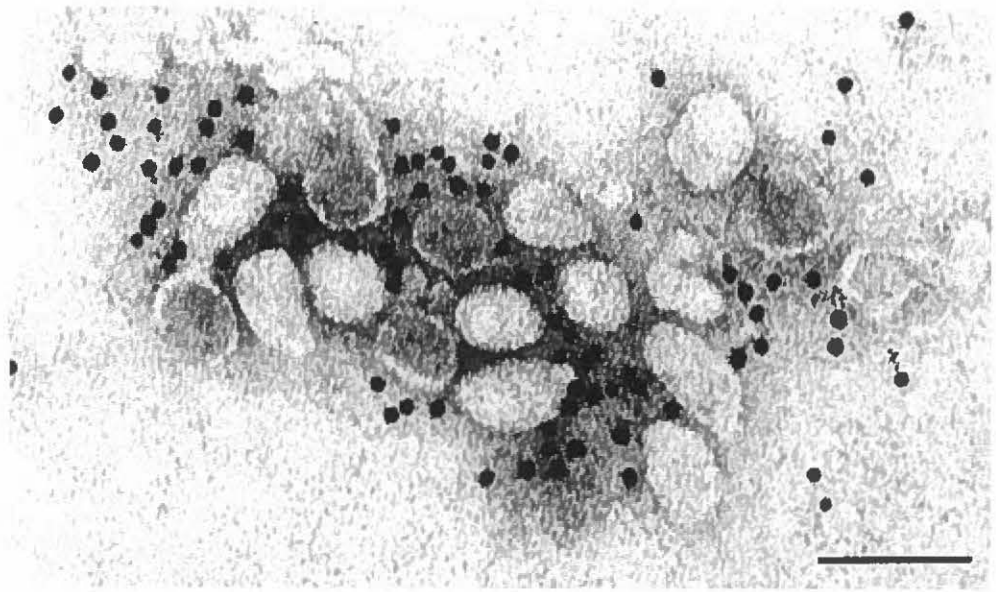


FIGURE 7: Ultrathin section of a porcine alveolar macrophage infected with the reference Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus.

By 14 to 18 h pi, intracellular particles could be observed in the lumen of the cytoplasmic vesicles, but not in the nucleus. The arrowheads indicate viral particles budding from the membranes of smooth-walled vesicles. Virions consisted of empty (electron translucent) or complete (electron dense center) enveloped particles, and possess a central isometric core approximately 25-30 nm in diameter (arrows).

Bar represents 100 nm.

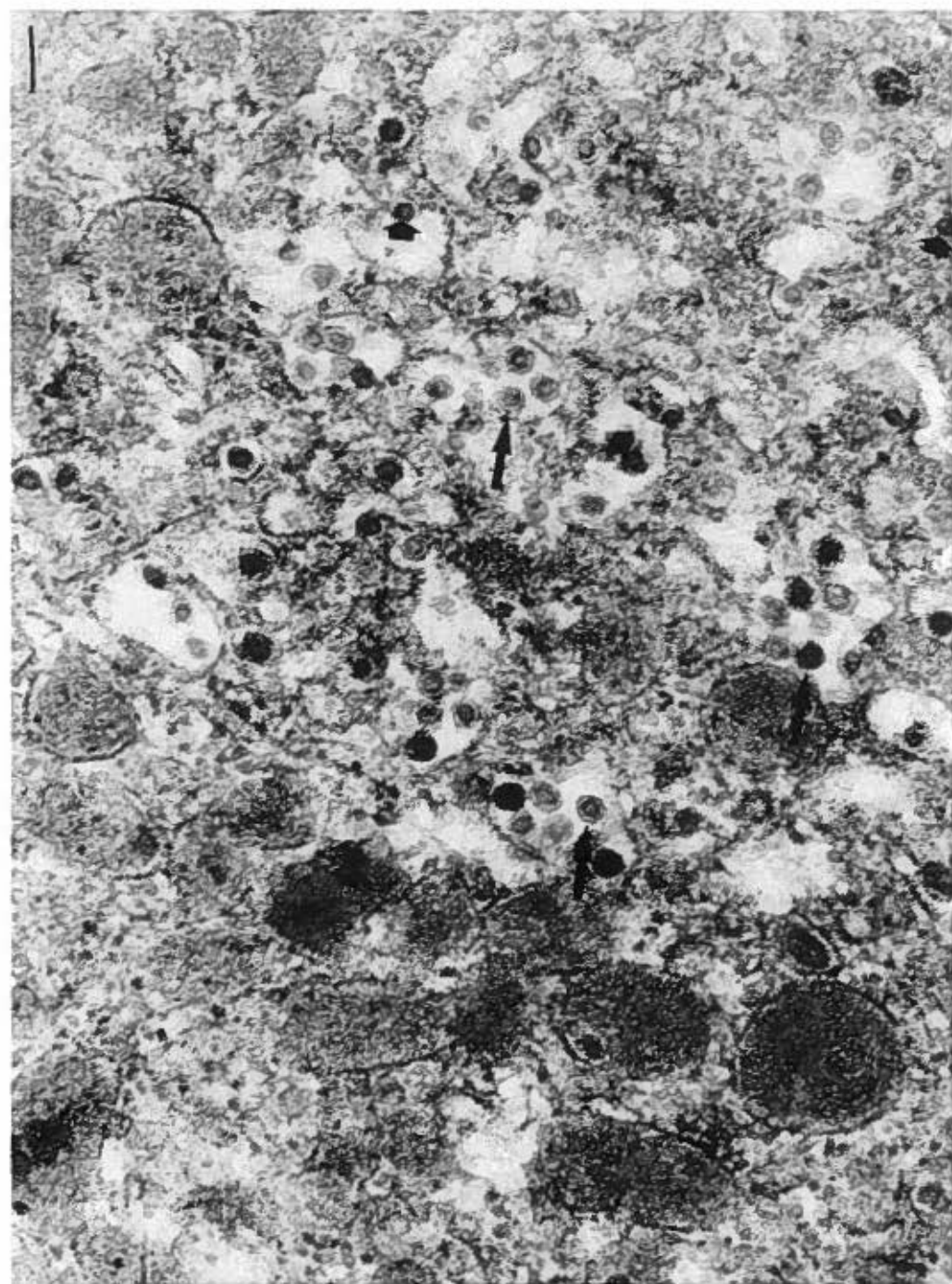
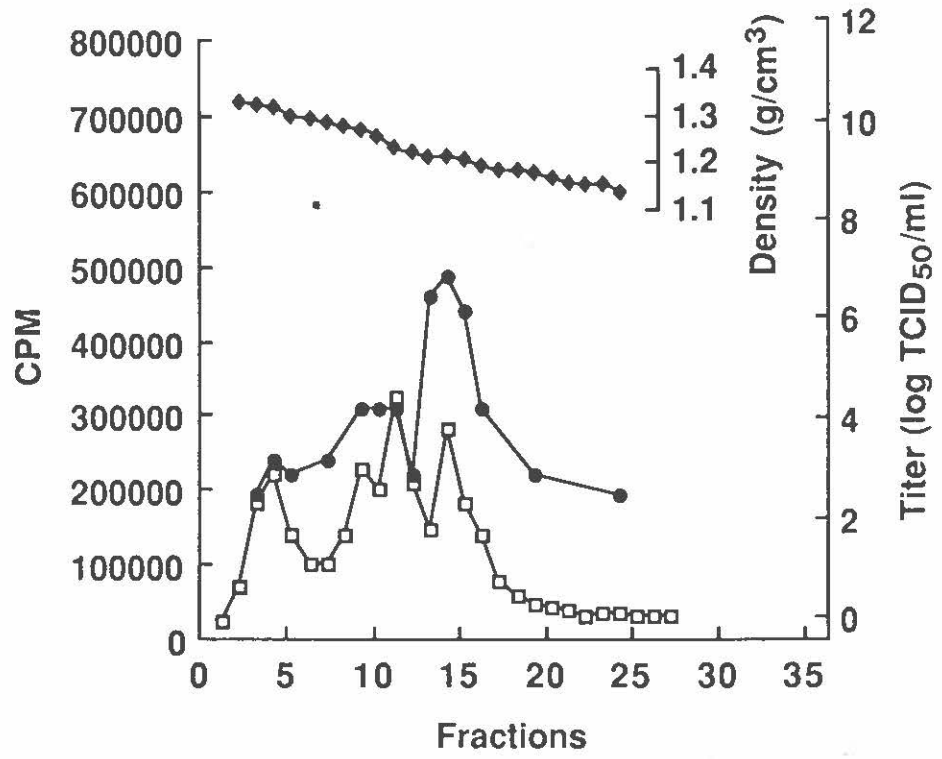


FIGURE 8: A. Isopycnic purification on a CsCl gradient of the reference Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus propagated in PAM cells in the presence of [³⁵S]methionine. Peak infectivity titer (●—●) and CPM (□—□) was found in fractions corresponding to a buoyant density (■—■) of 1.18-1.20 g/ml.

B. Negative stain electron micrograph of viral particles observed in CsCl-gradient fractions of 1.18-1.20 g/ml.

Bar represents 100 nm.



B

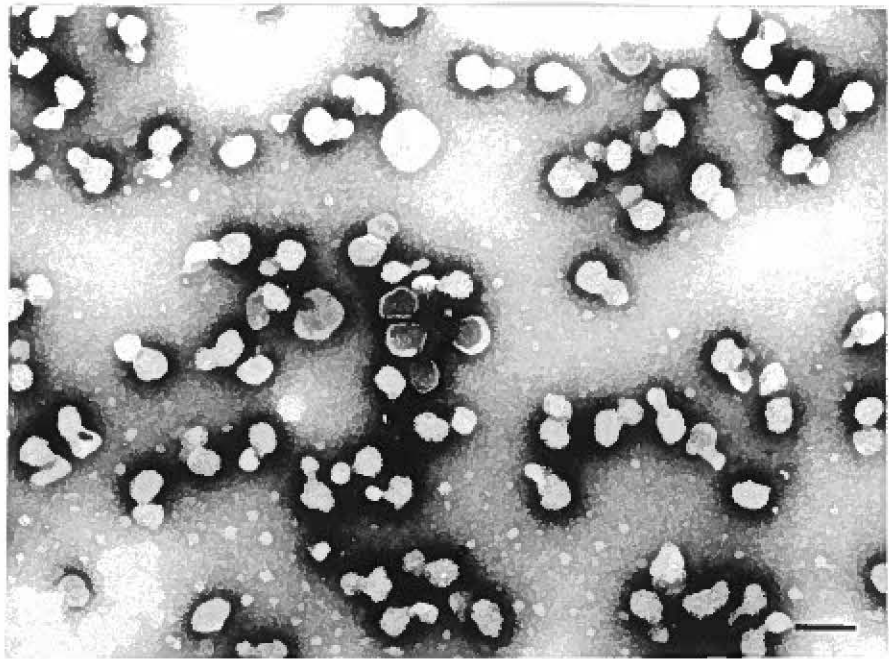


FIGURE 9: Ultrastructure of Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus.

A. Staining of the purified viral particles with uranyl acetate permitted a better visualization of the central core component.

B. An intact enveloped virion with a well-defined central core component.

Bars represent 100 nm.

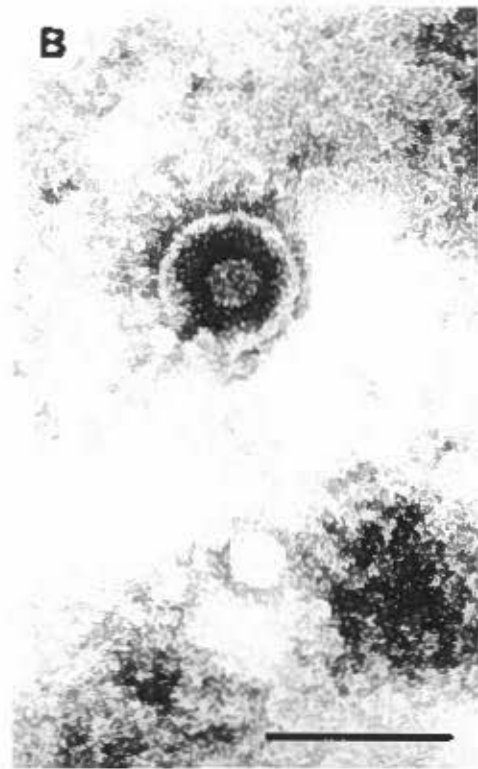
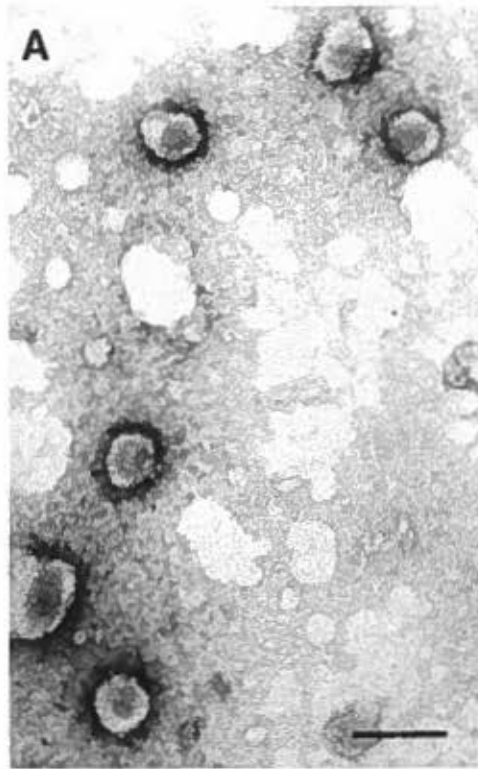


FIGURE 10: Radioimmunoprecipitation and Western immunoblotting patterns of reference Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus.

A. PAM cultures were infected with PRRS virus at a multiplicity of approximately 1-5 TCID₅₀/cell in the absence (Lanes 2 to 7) or presence (Lane 8) of 1 µg/ml tunicamycin, and labeled with [³⁵S]-methionine. Concentrated extracellular virions were resuspended in RIPA buffer and incubated in the presence of antibody-coated *Staphylococcus aureus* cells. The immune complexes were solubilized with electrophoresis buffer containing 2-mercaptoethanol and analysed by SDS-PAGE and fluorography. Lanes 2 and 3: SDS-PAGE analysis of mock-infected or infected cell lysates, respectively; Lanes 4 to 8: Immunoprecipitates obtained following incubation of semi-purified virus in the presence of normal rabbit serum (Lane 5) or homologous rabbit hyperimmune serum (Lanes 4, 6, 7 and 8). Positions of molecular weight standards are indicated to the left (Lane 1). Estimated M_r of PRRS virus structural proteins are also indicated.

B. Western-immunoblot patterns of the Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus as determined following incubation in the presence of 1:50 dilution of the homologous rabbit hyperimmune serum (Lanes 1 and 2) or negative rabbit serum (Lane 3). Semi-purified virus was disrupted in electrophoresis sample buffer in the presence (Lane 1) or absence (Lane 2) of 2-mercaptoethanol.

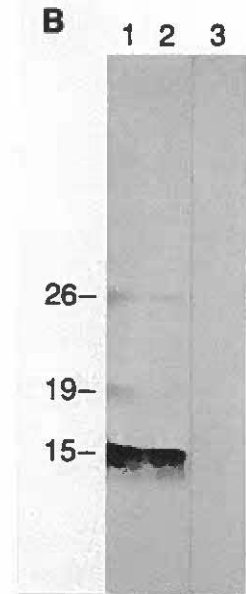
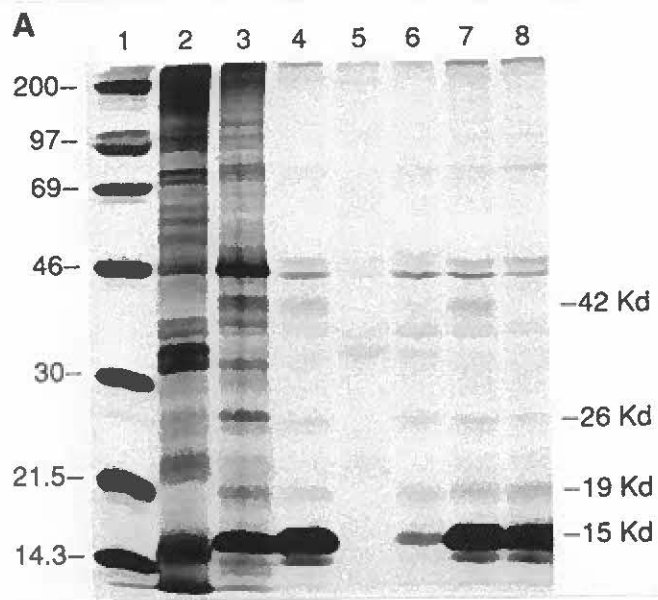
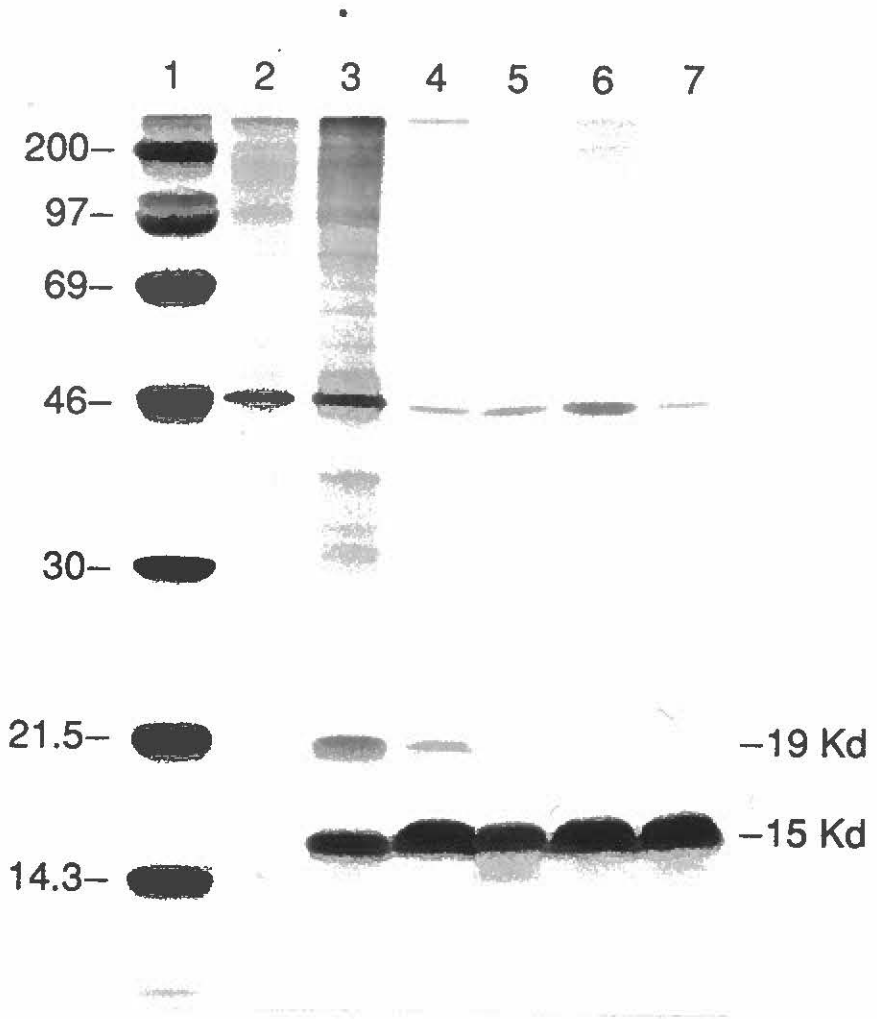


FIGURE 11: Reactivity of structural polypeptides of Quebec isolate IAF-exp91 of PRRS virus with MoAbs directed against the nucleocapsid protein of the American ATCC-VR2332 reference strain.

Semi-purified extracellular virions labeled with [³⁵S]-methionine were solubilized in RIPA buffer and incubated in the presence of antibody-coated *Staphylococcus aureus* cells. The immune complexes were solubilized with electrophoresis buffer containing 2-mercaptoethanol and analysed by SDS-PAGE followed by fluorography. Lanes 2 to 4: Immunoprecipitates obtained following incubation of semi-purified virus in the presence of normal porcine serum (Lane 2) or sera collected from experimentally-infected pigs diluted 1:50 (Lane 3) or 1:200 (Lane 4) in the RIPA buffer. Lanes 5 to 7: Cross-reactivity to the N protein of the IAF-exp 91 isolate of MoAbs SDOW17, EP147 and VO17, respectively. Positions of molecular weight standards are indicated to the left.



CHAPITRE 2:
ANALYSES MOLÉCULAIRES DU GÉNOME DU VIRUS DU
SRRP

Les travaux rapportés au cours du premier chapitre ont permis non seulement d'identifier notre matériel de départ, mais aussi d'apprendre à manipuler ce virus relativement nouveau. Les analyses sérologiques ont confirmé l'appartenance de nos isolats au séro groupe nord-américain dont aucune donnée sur le plan génomique n'était disponible.

Afin d'apporter de nouveaux éléments concernant la biologie de ce virus, les objectifs qui ont été fixés suite aux travaux préliminaires du premier chapitre, ont été essentiellement axés sur l'analyse moléculaire d'une souche du séro groupe nord-américain, IAF-exp91. Compte tenu du fait que le virus du SRRP est un virus à ARN, et par conséquent enclin aux variations génomiques, l'éventualité qu'il ait accumulé au cours de son évolution des changements majeurs au niveau de sa séquence nucléotidique était fortement envisagée. Sur la base des travaux réalisés dans le cas du virus LV, la région 3' terminale du virus contenant potentiellement les gènes structuraux, fut clonée et sa séquence fut déterminée. L'analyse de cette séquence a permis de mettre en évidence l'existence de variations génomiques majeures entre la souche IAF-exp91 et le virus LV, ce qui est en accord avec l'appartenance de chacun à un séro groupe distinct. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de deux publications (Articles 2 et 3) qui sont incluses dans le présent chapitre. En outre, lors des analyses de séquence, il s'est avéré que la région non codante 3' terminale de la souche IAF-exp91 contenait 22 nucléotides de plus par rapport à son homologue chez le virus LV. Cette particularité a été mise à profit afin de distinguer les souches canadiennes des souches européennes par la technique RT-PCR. L'étude de l'efficacité de cette approche pour la détection et la différenciation des souches du virus du SRRP a donné naissance à une quatrième publication (article 4). Cette approche, qui constitue une application directe de

l'analyse de l'extrémité 3' terminale du génome viral, est d'un grand intérêt du point de vue du diagnostic, compte tenu de la grande difficulté à produire et à maintenir les cultures primaires de macrophages alvéolaires de porc.

Enfin lors de ce chapitre, les travaux sur la caractérisation des protéines structurales ont été repris. Ceci était rendu possible, d'une part, à cause de la disponibilité d'une lignée cellulaire continue permissive au virus, et d'autre part, à cause du fait que les cadres de lecture de l'extrémité 3' génomique ont pu être clonés, permettant ainsi de procéder à des expériences de traduction *in vitro*. Ces résultats sont inclus dans l'article 3.

ARTICLE 2

Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Québec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

HELMI MARDASSI, SAMIR MOUNIR and SERGE DEA*

*Centre de recherche en virologie, Institut Armand Frappier,
Université du Québec, Laval, Québec, Canada, H7N 4Z3*

The sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Library under the accession number U02095 (N-PRRS-IA).

Journal of General Virology (1994), 75: 681-685

SUMMARY

The sequence of the 3'-terminal region of the genome of Québec reference strain IAF-exp91 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) was investigated by analysis of four cDNA clones. The 3'-terminal 530 nucleotides (nt) encompassed a large open reading frame (ORF) with a coding capacity of 123 amino acids (M_r 13649). The predicted protein was extremely basic and hence was considered to correspond to the nucleocapsid protein (N) gene. When compared to the homologous sequences of two reference Netherlands strains (Lelystad and isolate 10) of PRRSV, the IAF-exp91 N protein was found to be five amino acids (aa) shorter and displayed a high degree of divergence. Overall, IAF-exp91 strain showed identities of 63% and 59% with both reference European strains at the nt and aa level, respectively. Two aa stretches, STAPM and SQGAS, present respectively at the N- and C-terminal regions of the N protein of European strains, were missing in the IAF-exp91 N protein sequence. The 3'-terminal noncoding region (151 nt) of the IAF-exp91 strain was 37 nt longer than that of the European strains. The aligned nt sequence of this noncoding region exhibited an overall identity of 59% with that of the European strains. The Québec reference strain of PRRSV is more closely related to equine arteritis virus and lactate dehydrogenase-elevating virus than are the two European strains of the virus. Preliminary data obtained by RT-PCR experiments, using specific or common oligonucleotide primers, suggested that this approach could be useful to distinguish among PRRSV strains from different geographic origins.

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) was first described in the United States (Polson *et al.*, 1990) and Canada (Bilodeau *et al.*, 1991) in 1986 to 1987. The disease was initially characterized by severe reproductive failure in sows of any parities (late-term abortions, increased numbers of stillborn, mummified and weakborn pigs, increased pre-weaning mortality), and respiratory problems affecting pigs of all ages, but mainly unweaned piglets. In 1990, a similar disease was observed in Germany (Lindhaus & Lindhaus, 1991) and rapidly swept through Western European countries in 1991 (Baron *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992b).

The aetiological agent of the syndrome (PRRSV) has been definitively identified as a small spherical enveloped virus, 50 to 65 nm in diameter, with a central isometric nucleocapsid of about 25 to 30 nm (Benfield *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992b). The viral genome is a positive stranded-polyadenylated RNA of about 15 kb, which generates in infected cells, a 3'-coterminally nested set of six subgenomic mRNAs (Meulenbergh *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993). The genomic RNA contains at least eight open reading frames (ORFs) organized similarly to those of equine arteritis virus (EAV) and lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) genomic RNAs. The latter two viruses have been proposed as members of the genus *Arterivirus*, family *Togaviridae* (Plageman et Moening, 1992; Conzelmann *et al.*, 1993). European isolates of PRRSV appear to belong to the same serotype, whereas antigenic variability has been demonstrated among American isolates, and between American and European isolates (Wensvoort *et al.*, 1992a). We report here the sequence analysis of the 3'-terminal 530 nucleotides (nt) of the reference Quebec strain IAF-exp91 of PRRSV (Dea *et al.*, 1992 a)

IAF-exp91 was propagated in primary cultures of porcine alveolar macrophages (PAM) prepared as described by Wensvoort *et al.* (1991a). After complete degeneration of the monolayers, supernatant fluids were clarified by centrifugation at 5000g for 20 min, followed by ultracentrifugation through a cushion of 30% sucrose (W/V) for 3 hrs at 100000g. The viral pellets were resuspended in TNE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) and viral genomic RNA was isolated according to the method of Chomczynsky *et Sacchi* (1987). To obtain the 3' end of the viral genome, a cDNA library was constructed according to Gübler *et Hoffman* (1983), using oligo (dT)₁₂₋₁₈ as primers in the first-strand synthesis reaction, and the second-strand mix from GIBCO BRL cDNA synthesis kit with modifications. Phenol-chloroform extractions were omitted and replaced by Sephaglas BandPrep purification of DNA (Pharmacia) which was also used to purify cDNA for ligation into the pSPORT1 vector instead of column size fractionation. The cDNA was selected according to size by preparative agarose gel electrophoresis (Fig. 12). Sequencing of four randomly selected clones was performed on both strands by the dideoxynucleotide chain termination method (Sanger *et al.*, 1977) using the T7 DNA polymerase (Pharmacia) in an Automated Laser Fluorescent DNA sequence analyser (Pharmacia LKB). No mismatched bases, additions or deletions were found between the four cDNA clones. Sequence analyses were performed on an Apple Macintosh computer with the Mac Vector 3.5 (International Biotechnologies) and GeneWorks®.2.2 (IntelliGenetics) sequence analysis programs.

The nucleotide sequence of the 3'-terminal 530 nucleotides of the IAF-exp91 strain of PRRSV [excluding the poly(A) tail] and its predicted amino acid sequence are shown in Fig. 13. This genomic region encompassed a large ORF (nucleotides 8

to 376) encoding a polypeptide of 123 amino acids with a predicted M_r of 13649, consistent with the estimated M_r of the nucleocapsid (N) protein determined previously by SDS-PAGE analyses (Mardassi *et al.*, 1994a). As previously described for Lelystad virus (LV) and isolate 10 of PRRSV (Meulenberg *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993), the N protein of the IAF-exp91 strain was extremely basic; 26% of the N-terminal half of the polypeptide consisted of Arg, Lys and His residues. As shown in Fig. 14, the N protein of the IAF-exp91 isolate when compared with that of the LV strain exhibited only 63% and 59% identities at the nucleotide and amino acid levels, respectively. Such relatively high divergence resulted from a number of nucleotides substitutions, insertions or deletions, making the IAF-exp91 N protein five amino acids shorter than that of the LV strain. The nucleotide substitutions appeared randomly distributed, but were more frequent in the first half of the N gene. Four amino acid stretches, located at amino acid positions 16 to 24, 50 to 58, 78 to 89, and 110 to 118 in the IAF-exp91 sequence, were shared by the Québec and the reference European strains (Fig. 14). Two amino acid stretches, STAPM and SQGAS, situated respectively at the N-terminal and C-terminal regions of the N protein of both European isolates were missing from the IAF-exp91 N protein (Fig. 14). The amino acid identity between the IAF-exp91 and the LV strains increases to 70% when only the sequences located between these two stretches were compared. Interestingly, these two amino acids stretches have not been also identified in the amino acid sequence of the N protein of LDV and EAV for which the percentages of amino acid identities with the IAF-exp91 strain were estimated to 49 and 23%, respectively. Consequently, the N protein of the IAF-exp91 isolate appeared to be more closely related to LDV and EAV than do the LV and German reference strains (Meulenberg *et al.*, 1993b; Conzelmann *et al.*, 1993).

The IAF-exp91 noncoding region downstream of the N gene stop codon was 151 nt in length, thus exceeding the European strains' noncoding sequences by 37 nt. Twenty two of these nucleotides were absent in the first half of the homologous noncoding region of the LV strain (Fig. 15). An overall identity of 59% was found by comparing the noncoding region of the IAF-exp91 strain to that of the LV strain. The consensus sequence C-C-G-G/A-A-A-T-T-poly(A) at the 3' end of LDV and the German strain genome (Conzelmann *et al.*, 1993), is also present in the case of IAF-exp91 and is identical to that of the two European strains. Despite the high genomic variability observed in the noncoding regions of the Canadian and European PRSSV strains, the presence of this conserved sequence suggests that it may have a functional significance.

To establish further the differences between PRSSV strains from different geographic origins, reverse transcription (RT)-PCR experiments were designed such that Canadian and European reference strains could be distinguished by using specific or common oligonucleotide primers. The designs of primers for RT-PCR amplification were based on the nucleotide sequence of the IAF-exp91 strain and the nucleotide sequences of ORFs 6 and 7 of the LV strain of PRSSV (Meulenber *et al.*, 1993b). Oligonucleotides used in the RT-PCR were synthesized on an automated Gene Assembler DNA Synthesizer (Pharmacia, LKB). Nucleotide sequences of the primers derived from the 3' region of the IAF-exp91 genome and their position in the genome of LV reference strain are shown in Table 3. Oligonucleotide primers 1008PS and 1009PR were designed to amplify exclusively the 3' region of the Quebec strain, whereas oligonucleotide primers 1010PLS and 1011PLR (common primers) were designed in order to amplify the N gene of both the Québec and European reference strains of PRSSV. Alternatively, we also used

three oligonucleotide primers 119R10, 55U320 and 39U356, which have been previously designed by Meulenberg *et al.* (1993b) for the sequencing of the LV genome.

RT-PCR reactions were conducted essentially as described by Chirnside et Spaan. (1990). As shown in Fig. 16, the primer pairs 119R10-55U320 and 119R10-33U356 which permitted amplification of two genomic fragments of 1217 and 756 bp, respectively, from the LV strain, were unable to amplify such fragments when IAF-exp91 genomic RNA was used as template despite the use of a lower annealing temperature. Comparison of the 119R10 primer with its corresponding sequence in IAF-exp91 cDNA revealed a three base mismatch at its 3' end which could be an explanation for the inability to amplify such a region in the IAF-exp91 strain. In contrast, when primers 1008PS and 1009PR which represent the IAF-exp91 sequence in a region displaying differences from the LV strain was chosen, amplification of the N gene was possible in case of the Québec strain, but not for the LV strain (Fig. 17, lanes 1 and 2). As expected, the use of oligonucleotide primers 1010PLS and 1011PLR which display total complementarity with sequences of the LV strain (common primer) resulted in the amplification of both the Québec and the LV strains of PRRSV (Fig. 17, lanes 4 and 5). The genomic fragment generated by these common oligonucleotide primers in case of the LV RNA migrated faster than the genomic fragment amplified from IAF-exp91 strain. These results are thus in agreement with the absence of 22 nt in the 3' end of the LV genome previously identified by nucleotide sequence analysis. Taken together, results from RT-PCR experiments further confirmed the existence of relatively high genomic diversity among the N genes of the European and Québec reference strains of PRRSV.

Using sera from convalescent pigs in indirect immunofluorescence or

immunoperoxidase tests, it has been shown that antigenic variations exist between European and North American isolates of PRRSV (Wensvoort *et al.*, 1992a). These findings are in part supported by the important variability observed at the level of the N protein, as demonstrated in the present study, between the prototype Québec strain IAF-exp91, and the two Netherlands strains of PRRSV (Fig. 14). This antigenic variability between North American and European isolates of PRRSV has been also recently confirmed in our laboratory using monoclonal antibodies EP147, VO17 and SDOW17 directed against the N protein of the prototype American strain ATCC-VR2332. Indeed, two of these MAbs (EP147 and VO17) failed to react with homologous protein of the LV strain in RIPA experiments (data not shown), whereas they all strongly immunoprecipitated the N protein of the IAF-exp91 strain (Mardassi *et al.*, 1994a). These results suggested that our reference strain is closely related to the American strain, thus confirming previous serological studies using sera from experimentally-infected pigs, as well as sera collected from different pig farms in Québec that have experienced typical outbreaks of PRRS (Dea *et al.*, 1992a). Despite its internal location in the virion, the N protein of PRRSV undergoes a high degree of antigenic variability compared to the N protein of other enveloped positive-stranded RNA viruses such as Coronaviruses (Lapps *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1992). The extent of genomic variation observed between the Canadian and European strains of PRRSV confirms the need for further investigation of genomic heterogeneity among strains of this virus before techniques that rely upon nucleic acid hybridization can be effectively applied as diagnostic procedures. Interestingly, results obtained in RT-PCR experiments, using either specific or common oligonucleotide primers, suggested that this approach could be useful to distinguish among PRRSV strains from different geographic origins.

Table 3. RT-PCR oligonucleotide primers deduced from the sequence of the IAF-exp91 genome

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	Position	Product (bp)
1008PS	TAAATATGCCAAATAACAAC	3-22	468
1009PR	TAGGTGACTTAGAGGCACA	450-470	
1010PLS	ATGGCCAGCCAGTCAATCA	51-69	433
1011PLR	TCGCCCTAATTGAATAGGTG	464-483	

FIGURE 12: Résultat de la banque génomique

Analyse sur gel d'agarose, après digestion par les endonucléases *Not* I et *Sal* I, des clones recombinants portant des ADNc spécifiques de l'extrémité 3' terminale de la molécule d'ARN génomique de la souche IAF-exp91.

M: 1 kb DNA ladder (kpb)

CLONES

Kb

M 9 27 18 46 50 58 12 11 21 14 16 23 M

4.072 —
3.054 —
2.036 —
1.636 —
1.018 —
0.506 —

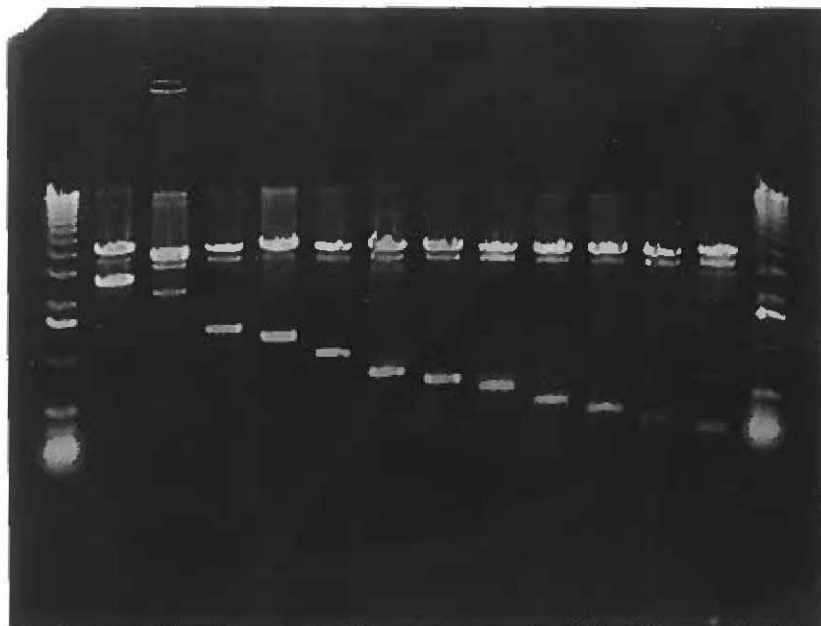


FIGURE 13: Nucleotide sequence of the 3'-terminal 530 nucleotides of the IAF-exp91 strain of PRRSV, including the N protein gene.

The predicted amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. The asterisk indicates termination codon. The poly(A) tail with 34 nt was obtained from one out of four cDNA clones analysed.

FIGURE 14: Comparison of the amino acid sequences of the N protein of the IAF-exp91, LV and German reference strains of PRRSV with those of LDV and EAV.

Dots indicate residues identical to those of IAF-exp91; Dashes represent gaps introduced into the sequence. The analysis was performed with the Geneworks® program (Intelligenetics) using default settings.

IAF-exp91	MPNNNGRQQKKKK-----GDGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPgkkn	45
PRRSV LV	.AGK.-QS.....STAPM.N.....L..AM.KS.R.---QPR.GQA	46
PRRSV 10	.AGK.-QS.....STAPM.N.....L..AM.KS.R.---QPR.GQA	
LDV	.S-----N...G-----QNKGA..QLNQ.ISAL-LR.AGQN..K.Q.-	38
EAV	.ASRRS.P.AASF-----RN.RRRQPTS--YNDLL-----MF.Q-MRV	36
IAF-exp91	KKKNPEKPHFPLATEDDVRRHHTPserQLCLSSIQTAfNQAGTCTLSDS	95
PRRSV LV	...K.....A...I...L.QT..S...Q.....AS..S.	96
PRRSV 10	...K.....A...I...L.QT..S...Q.....PS....	
LDV	...Q.-.L.....GPS.L..VM..N.V.M.R..LV.L....G.Q...V..	87
EAV	R.PPAQPTQAII.EPG.L..DLNQQ..ATLS.NV.RF.MI.H.SL.-A.A	85
IAF-exp91	GRISYAVEFSLPTHHTVRLIRVTASPSA-----	123
PRRSV LV	.KV.FQ...M..VA.....ST-..SQGAS	128
PRRSV 10	.KV.FQ...M..VA.....ST-..SQGAS	128
LDV	.G.NFT.S.M....A.....NAS.NS.-----	115
EAV	.GLT.T.SW-V..KQIQ.--K.APPAGP-----	110

FIGURE 15: Sequence alignment of the 3'-end noncoding region of IAF-exp91, LV and the German reference strain of PRRSV genome.

A complete identity is observed between the two European strains which show the 22 missed nucleotides (dashes). The double underlined nucleotides, show the consensus sequence observed at the polyadenylation site of PRRSV and LDV.

IAF-exp91	TGAGCTGGCATTCTTGAGACATCCCAGTGATTGAATTGGAAGAATGTGTG	50
PRRSV LV	.C...-----.....T...-C...CA.	28
PRRSV 10	.C...-----.....T...-C...CA.	28
IAF-exp91	GTGAATGGCACTGATTGATATTGTGCCTCTAAGTCACCTATTCAATTAGG	100
PRRSV LVCGC.....GCG.GTG.....G.....	78
PRRSV 10CGC.....GCG.GTG.....G.....	78
IAF-exp91	GCGACCGTGTGGGGTAACATTTAATT-GGCGAGAACCATGCGGCCGAAA	149
PRRSV LVT.ACA.....C.T.C.....CA...AG.....T.A.....	128
PRRSV 10T.ACA.....C.T.C.....CA...AG.....T.A.....	128
IAF-exp91	<u>TT</u>	151
PRRSV LV	..	130
PRRSV 10	..	130

FIGURE 16: Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products obtained using the primer pairs 119R10-55U320 (lanes 1 and 3) and 119R10-39U356 (lanes 2 and 4).

As predicted from the LV sequence, two fragments of 1218 and 756 bp (lanes 1 and 2) were respectively amplified by the first and the second primer pair. No amplification was observed when IAF-exp91 genomic RNA was used as template (lane 3 and 4).

Lane M: 1kb-DNA Ladder molecular size markers (Gibco BRL).

Lanes 1 and 2: LV strain genomic RNA.

Lanes 3 and 4: IAF-exp91 genomic RNA.

Les poids moléculaires du standard (marge gauche) ainsi que la taille des produits amplifiés (marge droite) sont indiqués en kpb.

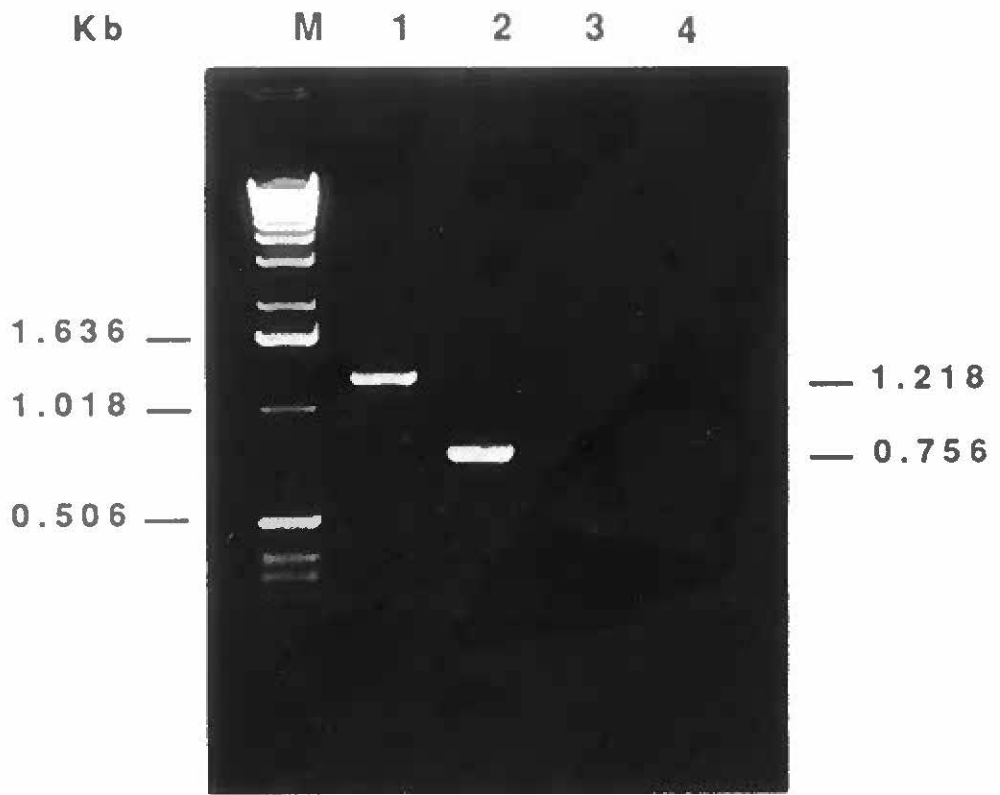
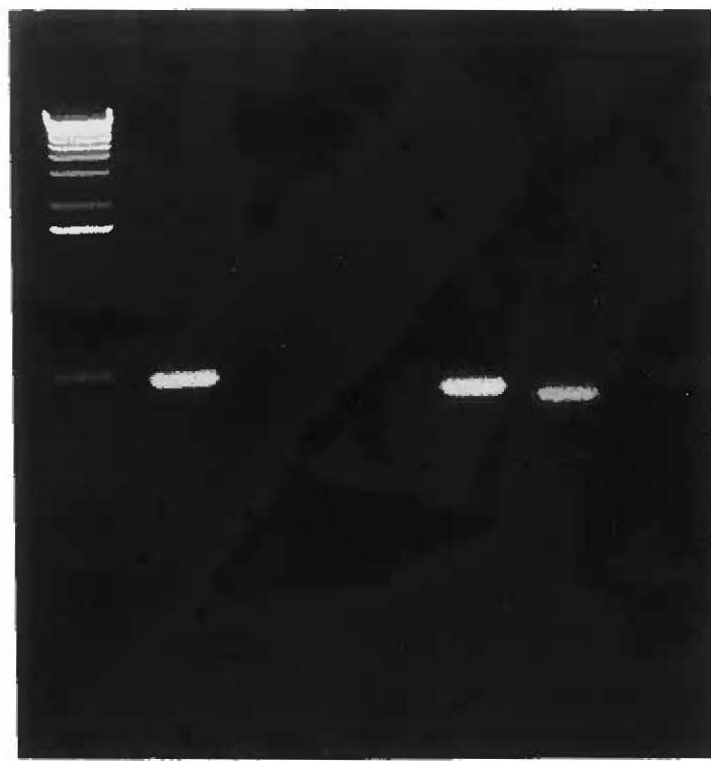


FIGURE 17: Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products obtained using primer pairs 1008PS-1009PR (lanes 1, 2 and 3) and 1010PLS-1011PLR (lanes 4, 5 and 6) designed from the IAF-exp91 sequence.

The 468 bp fragment predicted for the IAF-exp91 specific primer pair was amplified using IAF-exp91 RNA (lane 1) but not with RNA extracted from LV (lane 2) or from mock-infected PAM (lane 3). The single band resulting from the amplification reaction of the second primer pair using IAF-exp91 and LV RNA is observed in lanes 4 and 5, respectively. The amplified products in lanes 4 and 5, corresponded by their size (433 and 398 bp, respectively) to the predictions deduced from the IAF-exp91 and LV sequence. As in lane 3, no amplification has occurred from mock-infected PAM RNA using the primer pair 1010PLS-1011PLR (lane 6). The 1 kb-DNA ladder (Gibco BRL) was used as molecular size markers (lane M).

Kb M 1 2 3 4 5 6

1.636 —
1.018 —
0.506 —



ARTICLE 3

Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Québec reference strain

H. MARDASSI, S. MOUNIR, and S. DEA

Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier,
Université du Québec, Laval, Québec, Canada

The sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Library under the accession number L40898.

SUMMARY

The cDNA sequence of the 3'-terminal genomic region of the Québec IAF-exp91 strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) was determined and compared to those of other reference strains from Europe (Lelystad virus) and US (ATCC VR2385, MN-1b). The sequence (2834 nucleotides) which encompassed ORFs 3 to 7 revealed extensive genomic variations between the Québec strain and Lelystad virus (LV), resulting from high number of base substitutions, additions and deletions. The ORFs 5, 3, and 7 seemed to be relatively the most variable; the predicted encoding products of the Québec and LV strains displayed only 52%, 54%, and 59% amino acid identities, respectively. Nevertheless, *in vitro* translation experiments of the structural genes (ORFs 5, 6, and 7) and radioimmunoprecipitation assays with extracellular virions gave results similar to those previously reported for LV. In contrast, close genomic relationships were demonstrated between Québec and US strains. Taken together, these results indicate that, although structurally similar, North American PRRSV strains belong to a genotype distinct from that of the LV, thus supporting previous findings that allowed to divide PRRSV isolates into two antigenic subgroups (U.S. and European).

INTRODUCTION

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a small enveloped RNA virus which has been found to be the causative agent of a new pig disease that occurs in North America and Europe (Benfield *et al.*, 1992b; Collins *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992a; Wensvoort *et al.*, 1991a). The disease is characterized by severe reproductive failure in sows and respiratory problems affecting pigs of all ages (Goyal, 1993). The European prototype strain of PRRSV, known as the Lelystad virus (LV), shows close similarities with the *arteriviruses* from morphological, biochemical and molecular aspects (Meulenber *et al.*, 1993b; Wensvoort *et al.*, 1992b). This new group of viruses include equine arteritis virus (EAV), lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) and simian hemorrhagic fever virus (SHFV) (Plagemann *et al.*, 1992). The viral genome is a positive single-stranded polyadenylated RNA molecule of about 15 kb in length that contains eight open reading frames (ORFs) similarly organized as EAV (Conzelmann *et al.*, 1993; Den Boon *et al.*, 1991a; Meulenber *et al.*, 1993b). The transcription mechanism of the genomic RNA has similarities with that of *coronaviruses*, since a 3'-coterminal nested set of six major subgenomic mRNAs has been identified in PRRSV-infected cells (Conzelmann *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 1994; Meulenber *et al.*, 1993a et b). The virions contain a nucleocapsid protein of 15 kDa (N), an unglycosylated membrane protein of 18 kDa (M), and a glycosylated membrane protein of 25 kDa (E); it was recently shown that these proteins are encoded by ORFs 7, 6, and 5, respectively (Meulenber *et al.*, 1995).

So far, little is known about the origin and evolution of PRRSV. Although the clinical syndromes associated with PRRSV infection are similar in North

America and Europe (Goyal, 1993), antigenic variations have been reported between US and European isolates and among US isolates (Goyal, 1993; Nelson *et al.*, 1993). Preliminary sequence analysis of North American isolates revealed high genomic variations with European strains (Mardassi *et al.*, 1994b et c). This is strongly supported by serological findings. To further contribute to the understanding of the genetic basis for antigenic diversity between PRRSV isolates, we determined the cDNA sequence of the 3'-terminal genomic region of the Québec reference strain IAF-exp91. Our prime objective was to compare the genomic sequence of the Québec strain to those of other reference strains from Europe and U.S. Since important amino acid changes were identified between North American strains and LV, we also analysed the proteins specified by a cell culture-adapted Québec PRRSV isolate (IAF-Klop) and demonstrated that these viruses remain structurally similar.

MATERIALS AND METHODS

Viruses

The origin and propagation in porcine alveolar macrophages (PAM) of the Québec IAF-exp91 and IAF-Klop strains of PRRSV have been previously described (Dea *et al.*, 1992a; Mardassi *et al.*, 1994a). The latter was also adapted to grow in MARC-145 cells, a highly permissive cell clone to PRRSV derived from the MA104 monkey kidney cell line (Kim *et al.*, 1993). The cell line was kindly provided to us by J. Kwang (U.S Meat Animal Research Center, USDA, ARS, Clay Center, Nebraska). The IAF-Klop strain was plaque-purified twice and yielded titers of 10^5 - 10^6 TCID₅₀/ml after five successive passages in MARC-145 cells.

Polyclonal antisera

Hyperimmune sera were prepared against IAF-exp91 and IAF-Klop PRRSV strains in New Zealand Albino rabbits and specific-pathogen-free (SPF) piglets, respectively (Dea *et al.*, 1992a; Mardassi *et al.*, 1994a). The porcine hyperimmune sera had only weak neutralizing activity (VN titers of 1:32) towards IAF-Klop strain, but reached titers of 1:2560-1:5120 by indirect immunofluorescence staining. The monoclonal antibodies (MAbs) SDOW17, VO17 and EP147, directed against the nucleocapsid protein of the ATCC-VR 2332 isolate of PRRSV (Nelson *et al.*, 1993) were kindly provided by D. A. Benfield and E. Nelson (South Dakota State University).

cDNA synthesis and cloning

Supernatant fluids of infected cells were clarified and extracellular virions were concentrated by ultracentrifugation, as previously described (Mardassi *et al.*, 1994b). Genomic RNA of both Québec PRRSV strains was extracted from 50 µl aliquots by the guanidinium isothiocyanate-acid phenol method described by Chomczynsky et Sacchi (1987). Cloning of IAF-exp91 3' end genomic fragments was obtained by setting up a cDNA library, as previously reported (Mardassi *et al.*, 1994b).

DNA sequencing and analysis

Sequencing of cDNA clones was performed on both strands by the dideoxynucleotide chain termination method (Sanger *et al.*, 1977) using T7 DNA polymerase (Pharmacia). The nucleotide and amino acid sequences were analysed with the aid of the Geneworks 2.2 (IntelliGenetics) sequence analysis program. All comparisons were performed with a k-tuple length of one, and costs to open and to lengthen a gap of 5 and 25, respectively.

In vitro Translation of PRRSV structural genes

Enzymatic amplification of ORFs 5 and 6 of the IAF-Klop strain was achieved by RT-PCR (Mardassi *et al.*, 1994c). Oligonucleotide primers were designed according to the 3' end sequence of the IAF-exp91 strain. Two restriction sites for *EcoR* I (sens primers) and *BamH* I (antisens primers) were added at the 5'end of each primer for directional cloning. Sequence and position of oligonucleotide primers were the following:

1005PS : 5' GAATTCGAATTCATGTTGGGGAAATGCTTGACC 3' (1210-to 1230);

1005PR: 5' GGATCCGGATCCGGCAAAAGTCATCTAGGG 3' (1807-1824);

1006PS: 5' GAATTCGAATTCAGTTTCAGCGGAACAATGG 3' (1782-1800);

and

1006PR: 5' GGATCCGGATCCCAGCTGATTGACTGGCTGGC 3' (2357-2372).

The amplified products of ORFs 5 and 6 were agarose-gel purified, digested with *EcoR* I and *Bam*HI , and finally ligated into a similarly treated pBluescript SK+ plasmid vector (Stratagene) (Sambrook *et al.*, 1989). Enzymatic amplification of ORF7 was achieved using primer pair 1008PS/1009PR (Mardassi *et al.*, 1994b) to which *EcoR* I restriction sites were added at the 5' end of both primers to allow cloning into pBluescript SK+ vector. The resulting recombinant plasmids pBS5, pBS6 and pBS7 contained the coding sequences of ORFs 5, 6 and 7, respectively, under control of the T7 RNA polymerase promoter. After being linearized by digestion with the appropriate endonuclease (*Bam*H I or *Eco* RI), recombinant plasmids were transcribed *in vitro* using T7 RNA polymerase (Ambion Inc). Capping of transcripts was achieved by adding 0.75 mM of m⁷G(5')ppp(5')G (Pharmacia LKB) to the reaction mixture. Two µl of each transcript were *in vitro* translated using wheat germ extract (Promega) in the presence of 50 µCi of trans-labeled [³⁵S]methionine (Sp. act.>1,200Ci/mM, ICN Biochemical). For post-translation modification studies, *in vitro* translation experiments were also done using lysates of rabbit reticulocytes (Promega) in the presence of canine microsomal membranes (Promega).

In vivo labeling of PRRSV proteins and immunoprecipitation

Confluent monolayers of MARC-145 cells were infected with IAF-Klop strain at a MOI of 0.1 TCID₅₀/cell. At 36 h post-infection, cells were washed with PBS, starved for 2 h in methionine-free medium, then reincubated for 6 h

in culture medium containing 50 $\mu\text{Ci/ml}$ of [^{35}S]methionine. Alternatively, the labeling period was extended until maximum cytopathic effect was achieved, and extracellular virus was prepared as previously described (Mardassi *et al.*, 1994a). Proteins were immunoprecipitated from infected cell lysates or extracellular virions, then analyzed by electrophoresis in 12 or 15% SDS-polyacrylamide gels, as previously described (Mardassi *et al.*, 1994a). In one experiment, immune complexes were treated with 200 mU of endoglycosidase F/N-glycosidase F (glyco F) (Boehringer Mannheim) as performed by De Vries *et al.* (1992). In case of the translated products of ORFs 5 to 7, they were either directly analyzed by electrophoresis or after immunoprecipitation.

RESULTS

Comparison of the IAF-exp91 sequence with that of LV

The sequence of the 3'-terminal portion of the genome of Québec reference strain IAF-exp91 of PRRSV was obtained from 8 viral specific clones having in common their 3' ends. Sequence data obtained from these clones were assembled and a sequence consisting of 2834 nucleotides (nt) was derived (Fig. 18). For any given region, at least two distinct clones were sequenced on both strands, except for the 5' most 634 nucleotides which were determined from only the longest clone where no base mismatches between the two strands were observed. The nucleotide and deduced amino acid (aa) sequences determined for the Québec IAF-exp91 strain of PRRSV have been submitted to EMBL Data Library and have been assigned accession no L40898.

This genomic region contains five ORFs corresponding to ORFs 3 to 7 of the LV and extends to the poly(A) tail. All the ORFs overlapped, except ORFs 4 and 5. These ORFs each encoded a polypeptide with predicted sizes of 29K, 19.6K, 22.4K, 19.1K and 13.6K, respectively (Table 4). Sequence analyses revealed a high degree of genomic variation between Québec IAF-exp91 and LV strains. A high rate of base substitutions, additions and deletions, randomly distributed along the nucleotide sequence was noted.

The percentages of aa identity between predicted encoding products of ORFs 3 to 7 of the IAF-exp91 strain and those of the LV are presented in Table 5. The results indicate that ORFs 5, 3, and 7 are the most variable with only 52%, 54%, and 59% aa identities, respectively, when compared to LV. In

contrast, ORFs 4 and 6 of the IAF-exp91 strain were relatively less variable, sharing respectively 68 and 81% aa sequence identities with those of the LV (Table 5). Variations in the length of each ORF was also noted making the products of ORFs 7, 5, 4, and 3 of the Québec IAF-exp91 strain shorter than those of the LV (Table 4), whereas ORF 6 of the Québec strain had an additional aa residue.

Comparison of the aa sequences of the predicted encoding product of each of the ORFs also revealed that most of the variations are located at the amino terminus (Fig. 19). This was particularly evident in case of ORF 5 where 32 aa changes were identified within the 35 most *N*-terminal residues. The same situation was observed at the *N*-terminus of ORF 3 product, where only 29% identity was found within the 35 most *N*-terminal residues. Interestingly, despite these extensive aa changes, the potential *N*-linked glycosylation sites as well as the general hydrophathy profiles of the ORFs products were highly conserved (Fig. 20). Comparative analyses with LV of the IAF-exp91 ORF 7 and the 3'-terminal non coding region have been previously reported (Mardassi et al., 1994b). The ORF 7 product showed 59% aa identity with that of LV (Table 5).

A conserved sequence motif, (U/A)(C/U/A)(A/G)ACC, has been previously identified for LV which might serve as part of the junction sites for the leader sequence during transcription of mRNAs (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a). Except for ORFs 7 and 6 where the sequence motif AACC was present at nearly the same position upstream the ATG start codon, such consensus sequence was not identified upstream the ORFs 5, 4, and 3 of the IAF-exp91 strain.

Sequence comparison of IAF-exp91 with US PRRSV isolates

As shown in Fig. 19, the IAF-exp91 strain appeared to be closely related to the US PRRSV isolate ATCC VR 2385 (Meng *et al.*, 1994). Amino acid identities were of 90% for ORF5 and 96% for both ORFs 6 and 7. No base deletions or additions could be demonstrated between these two North American strains. As is the case for IAF-exp91 and LV, it appears from these comparisons, that ORF5 is relatively highly variable among PRRSV isolates. Interestingly, most aa substitutions identified within ORF 5 products of IAF-exp91 and ATCC VR 2385 strains, corresponded to variable sites between LV and IAF-exp91 strains.

So far, only one ORF4 sequence data is available from the US PRRSV isolates, namely the MN-1b strain (Kwang *et al.*, 1994). Surprisingly, as much as 17% aa variations exists between this US isolate and IAF-exp91. In addition, the length of this ORF seemed to vary from one strain to the other (178, 171, and 183 aa for IAF-exp91, MN-1b, and LV, respectively). This finding was unexpected, since ORF4 was less variable than ORFs 5, 3, and 7, when IAF-exp91 strain was compared to LV (Table 5).

It has been shown that the 3'-terminal non-coding region (151 nt) of the IAF-exp91 strain is 37 nt longer than that of the LV (Mardassi *et al.*, 1994b). On the basis of this dissimilarity, a RT-PCR assay was set-up that permitted not only detection but also differentiation between Québec and European strains of PRRSV (Mardassi *et al.*, 1994c). The homologous non-coding region of the ATCC VR2385 strain has the same length than that of the Québec strain and displays 94% nt identity (data not shown).

In vivo and in vitro analysis of the structural genes

The Québec IAF-Klop strain of PRRSV was used for *in vivo* labeling experiments and *in vitro* analysis of structural genes. Contrary to IAF-exp91 strain, IAF-Klop could be serially propagated in the continuous cell line MARC-145, in which labeling experiments could be readily achieved. Sequence analysis showed that IAF-Klop was closely related to IAF-exp91 with amino acid identities higher than 90% for their structural genes (ORF5: 94%, ORF6: 98%, ORF7: 99%). Furthermore, both strains had identical protein profiles as revealed by western immunoblotting (data not shown).

From IAF-Klop infected cell lysates, five major viral-induced proteins with apparent M_{rS} of 15K, 19K, 24.5K, 29K and 42K could be consistently immunoprecipitated by the homologous porcine hyperimmune serum (Fig. 21A, lane 3). These proteins were not present in mock-infected cultures (Fig. 21A, lane 1). Among these proteins, only the 15K and 19K species were efficiently immunoprecipitated by the rabbit hyperimmune serum directed against the IAF-exp91 strain (Fig. 21A, lane 2). Furthermore, an additional minor protein species with apparent M_r of 14.5K was revealed by the rabbit antiserum, but failed to react with the homologous porcine antiserum. Glyco F treatment of immunoprecipitated proteins resulted in loss of the 24.5K, 29K and 42K polypeptide species, thus suggesting their glycosylated nature (data not shown).

To assess the structural nature of the viral proteins identified above, immunoprecipitation experiments were performed using preparations of [^{35}S]methionine-labeled and concentrated extracellular virions. Following incubation with homologous porcine hyperimmune serum, only the 15K, 19K,

and 24.5K protein species were clearly immunoprecipitated (Fig. 21B, lane 2). Interestingly, glycoF treatment of the immunoprecipitated proteins resulted in loss of the 24.5K protein; instead a new species with estimated M_r of 16.5K was observed (Fig. 21B, lane 3).

As expected from the aa sequences, *in vitro* translation experiments yielded products with estimated M_r of 15K and 19K for ORFs 7 and 6, respectively (Fig. 22A). Both products were efficiently immunoprecipitated by the anti-IAF Klop porcine hyperimmune serum (Fig. 22B, lanes 3 and 6) and comigrated electrophoretically with the 15K and 19K viral proteins. The Mab SDOW17 reacted toward ORF7 product (Fig. 22B, lane 5), as it was also the case for Mabs VO17 and EP147 (data not shown). On the other hand, the *in vitro* translated product of ORF5 had an apparent M_r of 18.5 K (Fig. 22A) which was about 4K less than what was expected from its amino acid sequence (Table 4). This difference could not be due to a defective clone, since all constructions used for *in vitro* translation experiments were sequenced and no abnormality was detected. Moreover, the ORF5 product was highly recognized by the anti-IAF-Klop porcine hyperimmune serum (Fig 22B, lane 8). Furthermore, when *in vitro* translation was carried out in the presence of canine microsomal membranes, a larger protein which migrated approximately to the same distance as the 24.5K viral protein was observed (Fig. 23, lane 3).

DISCUSSION

In the present study, important genomic variations were demonstrated between a Québec reference strain of PRRSV and LV, the European prototype virus. Since these viruses have a distinct geographic origin, and the fact that the Québec strain seemed to have circulated several years before its initial isolation (Dea *et al.*, 1992a), genomic heterogeneity among them was expected. The data obtained from this genomic comparison are in agreement with previous findings by others who demonstrated the existence of antigenic and genomic variations between European and US PRRSV strains, the latter being more heterogeneous (Meng *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1993; Wensvoort *et al.*, 1992a). Genomic analyses of the Québec reference strain further substantiate previous findings suggesting that North American and European PRRSV isolates may have diverged into two distinct genotypes (Mardassi *et al.*, 1994b; Meng *et al.*, 1994). A common feature in the sequences of European PRRSV isolates is the absence of 22 nucleotides in the first half of the 3'-terminal non-coding region, in comparison with North American isolates studied (Mardassi *et al.*, 1994b; Meng *et al.*, 1994; Suarez *et al.*, 1994). It remains to be seen, as more sequence data will be available, whether this property could be considered as a marker trait between European and North American PRRSV isolates.

Biological and molecular similarities between LV, LDV, and EAV, have been well documented (Chen *et al.*, 1993; Conzelmann *et al.*, 1993; Godeny *et al.*, 1993; Meulenber *et al.*, 1993b; Plagemann et Moennig, 1992), with LV and LDV being much more related to each other than to EAV. Despite its high genomic divergence with LV, the Québec PRRSV strain also appeared to be

more closely related to LDV than to EAV. The relatedness between PRRSV and LDV in several aspects is intriguing. Indeed, since the latter has been identified many years ago, one can easily speculate that PRRSV may have derived from LDV. So far, there is no data which suggests an eventual replication of LDV in pigs or PRRSV in mice (Hooper *et al.*, 1994). Phylogenetic analyses of the polymerase genes of coronaviruses, toroviruses, EAV, LDV, and LV, indicated that both LV and LDV may have derived from an EAV-like progenitor, while coronaviruses hypothetically arose from a torovirus progenitor (Godeny *et al.*, 1993). Genetic recombinations between positive-stranded RNA viruses have been well demonstrated (Goldbach et Wellink, 1988; Strauss et Strauss, 1988). A copy-choice mechanism, due to a polymerase "jump" from one negative-sense RNA template to another, has been proposed for the generation of recombinant coronaviruses (Lai, 1992). Whether such a mechanism has accounted in the emergence of PRRSV from LDV or from an arterivirus common ancestor, remains questionable. Recently, genomic variations have been also identified within the N and the M genes of several geographically distinct EAV isolates (Chirnside *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1992). Despite the distinction of three genomic variants among various EAV strains, their M and N proteins appeared to remain relatively unchanged, which is in agreement with the fact that no distinct antigenic variants of EAV has been identified so far. This contrasts with PRRSV, since the genomic differences between European and North American strains are considerable, and thus, tends to be more heterogeneous.

Recently three structural proteins, N (15 kDa), M (18 kDa), and E (25 kDa), have been identified for LV (Meulenberg *et al.*, 1995), in agreement with previous findings with IAF-exp91 and ATCC-2332 strains (Mardassi *et al.*,

1994a; Nelson *et al.*, 1993). The viral structural proteins were shown to be encoded by ORFs 7, 6, and 5, respectively (Meulenberg *et al.*, 1995). A comparable protein profile was obtained for the cell culture–adapted Québec IAF-Klop strain, suggesting that although genomically highly divergent, PRRSV isolates are structurally related. Indeed, despite high degrees of aa variations, *in vitro* translation experiments demonstrated that the primary structure of the ORFs 5 to 7 of the Québec strain remains comparable to that of LV (Meulenberg *et al.*, 1995). However, the difference observed in the electrophoretic mobility of the ORF5 translated product of the Québec strain (18.5K) with that predicted from the aa sequence (22.4 K) is causing some concerns. Moreover, a 16.5K protein species was obtained following glycoF treatment of viral proteins, rather than the 19K protein predicted from the ORF5 aa sequence after removal of the putative signal peptide. Studies using monospecific antisera should permit to elucidate whether the 16.5K protein species could represent the primary unglycosylated form of the 24.5K protein species. Such discrepancy in the size of the ORF5 product predicted from the aa sequence, and the M_r value estimated from the electrophoretic mobility of its *in vitro* translation product, has been also reported in case of LV (Meulenberg *et al.*, 1995). A 16.5K unglycosylated protein was also obtained after glycoF treatment of viral proteins precipitated from lysates of infected cells where the duration of the labeling period was only six hours (data not shown). Therefore, protein degradation could not be considered as an explanation for the discrepancies observed between the *in vivo* and *in vitro* molecular weights of the ORF5 product. An interesting finding that has never been reported before, is the identification of two additional viral specific proteins in lysates of IAF-Klop-infected MARC-145 cells. Two bands corresponding to proteins with apparent

M_{RS} of 29K and 42K were constantly immunoprecipitated by the homologous porcine hyperimmune serum. Since these proteins were not detected with concentrated preparations of extracellular virions, they were considered as nonstructural. In contrast, in case of LV, two proteins with apparently identical M_{RS} have been reported by western immunoblotting analysis using purified virion preparations, but both proteins could not be immunoprecipitated from lysates of LV-infected cells (Meulenber *et al.*, 1995). Based on the reactivity of anti-peptide sera directed against LV ORFs 5 and 7, it was speculated that the 42K protein might represent a homo- or heterodimer of the E protein (25 kDa), whereas the 28K species a dimeric form of the N protein (15 kDa) (Meulenber *et al.*, 1995). It remains to be demonstrated whether these products are distinct in cases of the LV and IAF-Klop strains, or whether the antiserum directed against the Québec strain has a distinct specificity pattern from that used for LV.

In conclusion, the results obtained in the present study are in agreement with previous findings on the existence of antigenic diversity between North American and European strains of PRRSV. High degrees of amino acid variations were identified within the structural genes of the Québec and European prototype strains, which might explain the lack of reactivity of the anti-IAF-Klop hyperimmune serum when tested against LV in virus neutralization tests (Dea *et al.*, personal communication). Nonetheless, it remains to be elucidated whether the products of ORFs 3 and 4, which were also found to be highly variable, also contribute to the antigenic diversity of PRRSV isolates. Although antipeptide sera raised against ORFs 3 and 4 reacted positively with LV-infected PAM cells (Meulenber *et al.*, 1995), the exact nature and localization of their products are still unknown.

TABLE 4. IAF-exp91 ORFs 3 to 7 characteristics.

ORF	Position	Number of amino acids encoded	Calculated size (kDa)	Potential N-Glycosylation sites
7	2311-2679	123 (128)	13.6 (13.8)	1 (1)
6	1797-2318	174 (173)	19.1 (18.9)	1 (2)
5	1210-1809	200 (201)	19.0 22.4 (22.4)	2 (2)
4	663-1196	178 (183)	17.4 19.6 (20.0)	4 (4)
3	118-879	254 (265)	26.3 29.0 (30.6)	7 (7)

The corresponding values for LV are indicated within the parenthesis. In case of ORFs 3, 4, and 5, the lower values correspond to the molecular mass of the proteins after removal of the predicted N-terminal signal sequence.

TABLE 5. Percentage amino acid identity between predicted IAF-exp91 ORFs 3 to 7 products and those of IAF-Klop, LV, LDV, and EAV

ORF	IAF-Klop	LV	LDV	EAV
7	99	59	49	23
6	98	81	51	17
5	94	52	46	18
4	ND	68	35	17
3	ND	54	24	11

ND: not determined

FIGURE 18: Séquence nucléotidique et en acides aminés de l'extrémité 3' terminale de l'ARN génomique de la souche de référence Québécoise, IAF-exp91, du virus du SRRP.

Le début de chaque ORF est indiqué par son numéro, alors l'astérisque montre le codon de terminaison. Les résidus asparagine qui constituent des sites potentiels de glycosylation sont soulignés en gras. La séquence consensus AACCC précédant les cadres de lecture 7 et 6 est encadrée.

CATAACCTGCGCATGTACAGGGTCAAATGTAACCATAGTGTATAATAGCACTTTGAACCAAGTGTGTTGCTGTTTTCCCGACCCCGATTG 90
CCGGCCAAAGCTACATGATTTTTAGCAATGGCTAATAGCCGTACATTCCTCTATATTCCTCTGTTGACAGCTTCTGTACTCTTTTTGT 180
ORF3 M A N S R T F L Y I L L C C S F L Y S F C
AGTACTGTGGTTGCGGATTCCAATGCTACGTACTGTTTTGGTTTCCGCTGGTTAGGGGCAATTTTTCTTCGAGCTCACGGTGAATTAC 270
S T V V A D S N A T Y C F W F P L V R G N F S F E L T V N Y
ACGGTGTGCCACCTTGCTCACCCGGCAGGCTGCCGAGAGATCTATGAACCCGGTAGGGCTCTTTGGTGCAGGATAGGGCATGATCGA 360
T V C P P C L T R Q A A A E I Y E P G R A L W C R I G H D R
TGTGGGAGGACGATCATGACGAGCTAGGATTCTAGTGCCGCTGGCTCTCTAACGAAGCGCGCTGACCAGTGTACGCTTGGTTG 450
C G E D D H D E L G F L V P P G L S N E G R L T S V Y A W L
CGGTTTTGCTCTTCAGCTACACGGCCAGTTTCATCCCGAGATATTCGGAATAGGGAATGTGAGCAAAGTTTATGTTGACATCAAGCAT 540
A F L S F S Y T A Q F H P E I F G I G N V S K V Y V D I K H
CAATTTATCTGTGCTGTTTCATGACGGGCAGAACACCACCTTGCTCGCCATGACAACATTTTCAGCCGTTCCAGACCTATTACCAACAT 630
Q F I C A V H D G Q N T T L P R H D N I S A V F Q T Y Y Q H
CAAGTCGACGGCGCAATGGTTTCACCTTGAATGGCTGCGTCCCTTCTTTCTCTGTTGGTTGGTTTTGAATGCTCTTGGTTTCTCAGG 720
Q V D G G N W F H L E W L R P F F S S W L V L N V S W F L R
ORF4 M A A S L L F L L V G F E C L L V S Q
CGTTCGCTGCAAGCCATGTTTCAGTTCGAGTCTTTTCAGACATCAAGACCAATACCACCGCAGCAGCAGGCTTTGTTGCTCTCCAAGACA 810
R S P A S H V S V R V F Q T S R P I P P Q Q Q A L L S S K T
A F A C K P C F S S S L S D I K T N T T A A A G F V V L Q D
TCAGCTGCTCTTAGGCATAGCCACTCGCCCTCTGAGACGATTGCGAAAATCCCTCAGTGCAGCAGCGGCGATAGGAACACCCGTTATATCA 900
S A V L G I A T R P L R R F A K S L S A A R R *
I S C L R H S H S P S E T I R K I P Q C R T A I G T P V Y I
CTGTTACGGCCAATGTAACGGATGAGAATTAATTTACATTCCTCTGACCTCCTCATGCTTTCTCTTGCCTCTTCTATGCTTCTGAGATGA 990
T V T A N V T D E N Y L H S S D L L M L S S C L F Y A S E M
GTGAAAAGGGATTTAAGTGATATTTGGCAATGTGTCAGCAATGTGGCTGTGTGTGTTAACTTTACCAGCTACGTCCAACATGTTAAGG 1080
S E K G F K V I F G N V S G I V A V C V N F T S Y V Q H V K
AGTTTACCCAAAGCTCCTTGGTAGTCGACCATGTGCGGCTGCTCCATTTTATGACACCTGAGACCATGAGGTGGGCAACTGTTTTAGCCT 1170
E F T Q R S L V V D H V R L L H F M T P E T M R W A T V L A
GTCTTTTGGCATTCTGTTGGCAATTTGAATGTTAAGTATGTTGGGAAATGCTTGACCGCGGGCTATTGCTCGCAATGGCTTTTTTTG 1260
C L F A I L L A I * ORF5 M L G K C L T A G Y C S Q L P F L
TGGTGTATCGTGCCGTTCTGTTTTGTTGCGCTCGTCAACGCCAACAGCTACAGCAGCTCCCATTTACAGTTGATTTATAACCTGACGATA 1350
W C I V P P C F V A L V N A N S Y S S S H L Q L I Y N L T I
TGTGAGCTGAATGGTACAGATTGGCTGAATGGAAAATTTGATTGGGCAGTGGAGACTTTTGTATCTTTCTGTGTTGACTCACATTGTC 1440
C E L N G T D W L N G K F D W A V E T F V I F P V L T H I V
TCCTATGGCGCCCTCACCACCAGTCATTTCTTGACACTGTGCGTCTGATCACTGTGTCCACCGCCGGATATCTCCATGGGCGGTATGTC 1530
S Y G A L T T S H F L D T V G L I T V S T A G Y L H G R Y V
TTGAGTAGCATCTACGCTGCTGTGCCCTAGCTGCGTTGATTTGCTTCGTCATCAGGTTGACGAAGAATGTCATGTCCTGGCGCTACTCA 1620
L S S I Y A V C A L A A L I C F V I R L T K N C M S W R Y S

TGTACCAGATATACCAACTTTCTTCTGGACACCAAGGGCAAACCTCTATCGTTGGCGGTGCGCCCGTCATCATAGAGAAAGGGGCAAAGTT 1710
C T R Y T N F L L D T K G K L Y R W R S P V I I E K G G K V

GAGGTTGAAGGTCACCTGATCGACCTCAAGAGAGTTGTGCTTGGACGGTTCCGCAGCAACCTGTAACCAAAGTTTCAGCGGAACAATGG 1800
E V E G H L I D L K R V V L D G S A A T P V T K V S A E Q W
ORF6 M

TGTCGTCCTAGATGACTTTTGCCATGACAGCACAGCTCCACAAAAGGTGCTCTTGGCGTTTTCTATTACCTACACGCCAGTGATGATAT 1890
C R P *
V S S L D D F C H D S T A P Q K V L L A F S I T Y T P V M I

ATGCCCTAAAGGTAAGTCGCGGCCGACTGCTAGGGCTTCTGCACCTTTTGTATTTTCCTGAATTGTGCTTTTCACCTTCGGATACATGACAT 1980
Y A L K V S R G R L L G L L H L L I F L N C A F T F G Y M T

TCACGCACCTTTACAGACACAAATAGGGTCGCGCTCACTATGGGAGCAGTGGTTGCACCTCCTTTGGGGGGTGTACTCAGCCATAGAAACCT 2070
F T H F Q S T N R V A L T M G A V V A L L W G V Y S A I E T

GGAAATTCATCACCTCCAGATGCCGTTTGTGCTTGTAGGCGCAAGTACATTTCTGGCCCCCTGCCACCACGTTGAGAGTGCCCGCAGGTT 2160
W K F I T S R C R L C L L G R K Y I L A P A H H V E S A A G

TTCATCCGATTGCGGCAAGTATAACCACGCATTTGTGCTCGCGCTCCCGCTCTACTACGGTTAACGGCACATTGGTGCCCGGGTTGA 2250
F H P I A A S D N H A F V V R R P G S T T V N G T L V P G L

AAAGCCTCGTGTGGGTGGCAAAAAGGCTGTCAAGCGGGAGTGGTAAACCTCGTTAAATATGCCAAATAACAACGGCAGACAGCAAAG 2340
K S L V L G G K K A V K R G V V N L V K Y A K *
ORF7 M P N N N G R Q Q K

AAAAAGAAAGGGGATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGTGTGATGCTGGTAAATCATCGCCAGCAAACCAGTCCAGAGGTAAGGGA 2430
K K K G D G Q P V N Q L C Q M L G K I I A Q Q N Q S R G K G

CCGGGGAAGAAAATAAGAAGAAAACCCGAAAAGCCCCATTTTCTCTAGCGACTGAAGATGACGTCAGACACCCTTTACCCCTAGT 2520
P G K K N K K K N P E K P H F P L A T E D D V R H H F T P S

GAGCGCAATTGTGCTGTGTCGTCATCCAGACAGCCTTAATCAAGGCGCTGGAACCTGCACCCCTGTGAGATTTCAGGGAGGATAAGTTAC 2610
E R Q L C L S S I Q T A F N Q G A G T C T L S D S G R I S Y

GCTGTGGAGTTTAGTTTGCCTACGCATCATACTGTGCGCCTGATTTCGCGTCACAGCATCACCCCTCAGCATGATGAGCTGGCATTCTTGAG 2700
A V E F S L P T H H T V R L I R V T A S P S A *

ACATCCCAGTGATTGAATTGGAAGAATGTGTGGTGAATGGCACTGATTGATATTGTGCCTCTAAGTCACCTATTCAATTAGGGCGACCGT 2790

GTGGGGTAACATTTAATTGGCGAGAACCATGCGGCCGAAATTA 2834

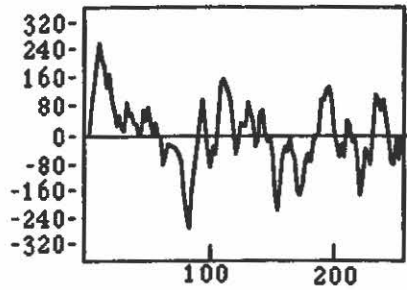
FIGURE 19: Comparison of the predicted amino acid sequences of the 3'-terminal genes (ORFs 3 to 7) of Québec PRRSV strain IAF-exp91 with LV and their equivalent from two american isolates (ATCC VR 2385, and MN-1b).

The analysis was performed with the aid of the GeneWorks 2.2 (IntelliGenetics) program using default settings. Dots indicate residues identical to those of IAF-exp91, dashes represent gaps introduced into the sequences and amino acid changes are noted. The LV sequences used in this alignment are based on the sequence data presented by Meulenberg *et al.* (1993b). Sequence data of the two US strains, ATCC VR 2385 and MN-1b, were taken from previous reports of Meng *et al.* (1994) and Kwang *et al.* (1994), respectively.

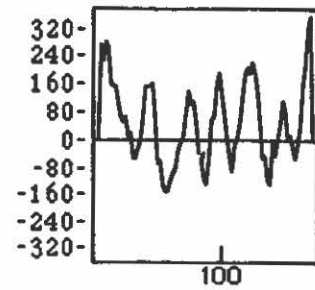
IAF-exp91	ORF3	MANSRTFLYIILLCCSFLYSFCSTVVADSNATYCFWFLVVRGNFSFELTVNYTVCPPCLTRQAAAIEYEPGRALWC	75
LV	ORF3	..HQCARFHFF..GFIC.LVH.ALASN.SS.LC.....AH..T.....I...I.MP.STS...RQRL....NM..	75
IAF-exp91	ORF3	RIGHDRCGEDDHDELGFLVPPGLSNEGRLTSVYAWLAFLSFSYTAQFHPEIFGIGNVSKVYVDIKHQFICAVHDG	150
LV	ORF3	K.....E.R.....LMSI.S.YD.L-K.EG.....A.....L.....R.F..KR.....E... 149	
IAF-exp91	ORF3	QNTTLPRHDNISAVFQTYQHQVDGNGWFHLEWLRPFSSWLVLNVSWFLRRSPASHVSVRVFQTSRPIPPQQA	225
LV	ORF3	H.S.VSTGH...LYAA..H..I.....L.....I.....V.P..R.IY..IL..TR..RLPV 224	
IAF-exp91	ORF3	LLSSKTSAV--LGIATRPLRRFA-K.-----L.---AARR	254
LV	ORF3	SW.FR..I.SD.TGSQQRK.K.PESRPNVVKPSVLPSTS.	265
IAF-exp91	ORF4	MAASLLFLLVGFECCLLVSAQAFACKPCFSSSLSDIKTNTTAAAGFVVLQDISCLR-HSHSPS-ETIR--KIPQCRT	71
MN-Ib		...AT...M...K.....----ANHVA.....S.A.....-RN.A.-.A.--.....A	66
LV	ORF4	...AT..F.A.AQHIM..E.....TH...E.....M.....N.F.P.GV.AAQ.K.SFG.SS...E 75	
IAF-exp91	ORF4	AIGTPVYITVTANVTDENYLHSSDLLMLSSCLFYASEMSEKGFVIFGNVSGIVAVCVNFTSYVQHVKEFTQRSL	146
MN-Ib	ORF4I.....E.V.....R...LL.	141
LV	ORF4	.V...Q...I.....S.YNA.....A.....V.SA....D..A..TQH..QHH 150	
IAF-exp91	ORF4	VV-DHVRLLFHMTPETMRWATVLACLFAILLAI	178
MN-Ib	ORF4	---R.....	171
LV	ORF4	L.I.I....LTPSA....TI..... 183	
IAF-exp91	ORF5	MLGKCLTAGYCSQLPFLWCIVPFC--FVALVNANSYSSSHLQLIYNLTICELNGTDWLNKGFDAVETVFIFFVL	73
VR 2385	ORF5Y...L.....S.--.....S..GN.G.N.....L.....AN.....C.....	73
LV	ORF5	.RCSHKLGRFLTPHSCF.WLFL.L.TGLSWSFADGNGD..TY.Y.....SSH.G.....LY..A 75	
IAF-exp91	ORF5	THIVSYGALTTSHFLDTVGLITVSTAGYLHGRYVLSIIYAVCALAALICFVIRLTKNCMSWRYSCRYTNFLLD	148
VR 2385	ORF5V.....FV.....M.....A.....	148
LV	ORF5	...L.LGF.....F.AL..GA....FVG.....C.V.GA..F..FV....AA....AC..AR..F...IV.D 150	
IAF-exp91	ORF5	KGKLYRWRSFVIEKGGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAEQWCRP	200
VR 2385	ORF5	..R.....R.....I.....R.....S..	200
LV	ORF5	R.RVH..K..IVV..L..A..D.N.VTI.H...E.VK.Q.L.RT....-EA 201	
IAF-exp91	ORF6	MVSSLDDFCHDSTAPQKVLAFSITYTPVMIYALKVSRGRLGLLHLLIFLNCAFTFGYMTFTHFQSTNRVALTM	75
VR 2385	ORF6	.E.....I.....V.....V.....K....	75
LV	ORF6	.-GG....N.PI.A..LV.....I.....I.....S.....YV.....L 74	
IAF-exp91	ORF6	GAUVALLWGVYSAIETWKFITSRCRLCLLGRKYILAPAHHVESAAAGFHPAASDNHAFVVRPGSTTVNGTLVPG	150
VR 2385	ORF6N.....	150
LV	ORF6FT.S.....C..R.....L.S.S..G.R.YA..K..L..... 149	
IAF-exp91	ORF6	LKSLVLGGKKAVKRGVNVNLVKYAK	174
VR 2385	ORF6R...Q.....	174
LV	ORF6	.R.....R.....GR 173	
IAF-exp91	ORF7	MPNNNGRQOKKKK----GDGQPVNQLCQMLGKI I AQONQSRGKPGKKNKKNPEKPHFPLATEDDVRHHFTPS	70
VR 2385	ORF7	...T.K...R.-----H.....	
LV	ORF7	.AGK.-QS....STAPM.N.....L..AM.KS.R.---QPR.GQA...K.....A...I...L.QT 75	
IAF-exp91	ORF7	ERQLCLSSIQTAFNQAGTCTLSDSGRISYAVEFSLPTHHTVRLIRVTASPSA-----	123
VR 2385	ORF7T.....	
LV	ORF7	..S...Q.....AS..S..KV.FQ...M..VA.....ST...SQGAS 128	

FIGURE 20: Analyse comparative des profils hydrophobes des produits des ORFs 3, 4, 5, et 6 des souches IAF-exp91 et LV du virus du SRRP.

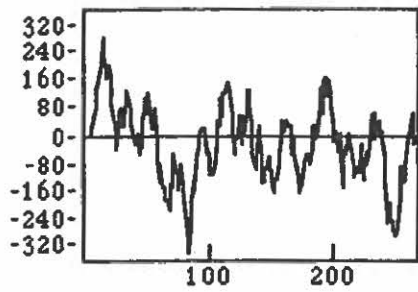
L'analyse fut réalisée selon la méthode de Kyte et Doolittle (1982) en utilisant une fenêtre de onze acides aminés. Les régions hydrophobes se retrouvent vers le haut.



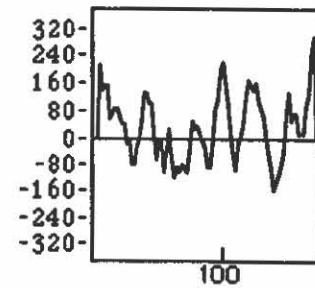
IAF-exp91 ORF3



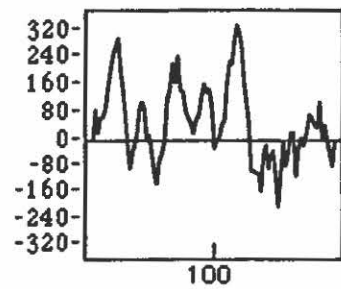
IAF-exp91 ORF4



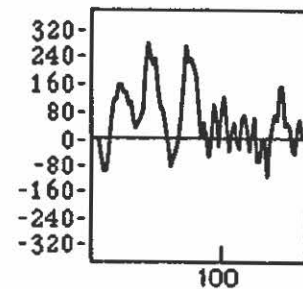
LV ORF3



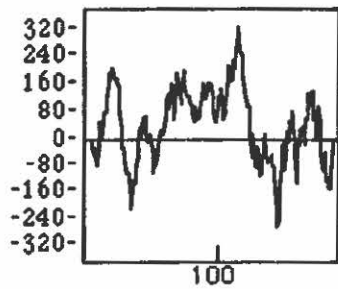
LV ORF4



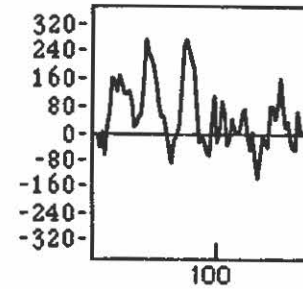
IAF-exp91 ORF5



IAF-exp91 ORF6



LV ORF5



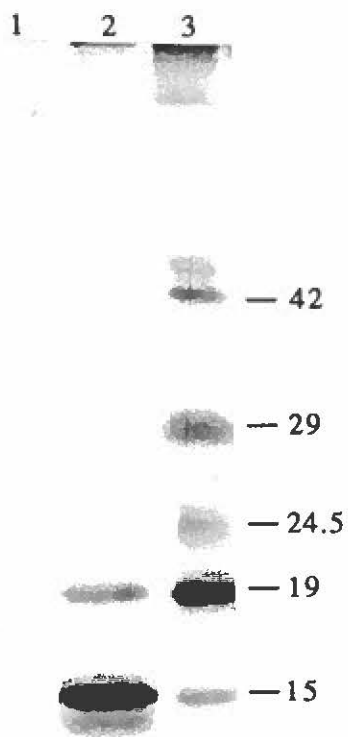
LV ORF6

FIGURE 21: SDS-PAGE analysis of PRRSV-induced polypeptides.

A. MARC-145 cells were infected with the PRRSV strain IAF-Klop and labeled with [^{35}S] methionine for 6 hours. Cell lysates were prepared in RIPA buffer, clarified, and immunoprecipitated with rabbit polyclonal serum raised against the PRRSV strain IAF-exp91 (Lane 2) or the porcine homologous hyperimmune serum (Lane 3). As negative control, the porcine serum was tested with cell lysates from mock-infected cells (Lane 1). The molecular size (in kilodaltons) of the five major viral polypeptides are indicated on the right.

B. RIPA profiles of extracellular virions of the PRRSV strain IAF-Klop collected from supernatants of [^{35}S] methionine-labeled MARC-145 cells after maximum cytopathic effect was achieved. The homologous porcine hyperimmune serum was used for precipitation of viral structural proteins after treatment (Lane 3) or no treatment with glyco F (Lane 2). Positions of molecular size markers (Lane 1) are shown on the left and the viral structural proteins are indicated by their molecular mass (in kilodaltons) on the right. The arrow indicates the possible unglycosylated form of the 24.5 K protein, regularly observed after glyco F treatment. The slight displacement of the treated 15K and 19 K proteins as compared to their untreated counterparts (Lane 3 vs Lane 2) should not be interpreted as resulting from deglycosylation of these proteins but is due to the enzyme incubation buffer as demonstrated in other experiments (data not shown).

A



B

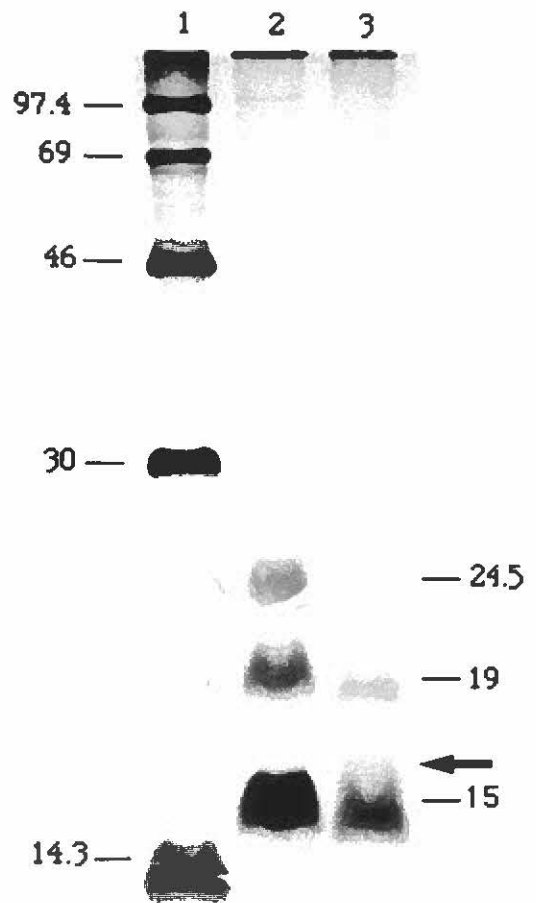
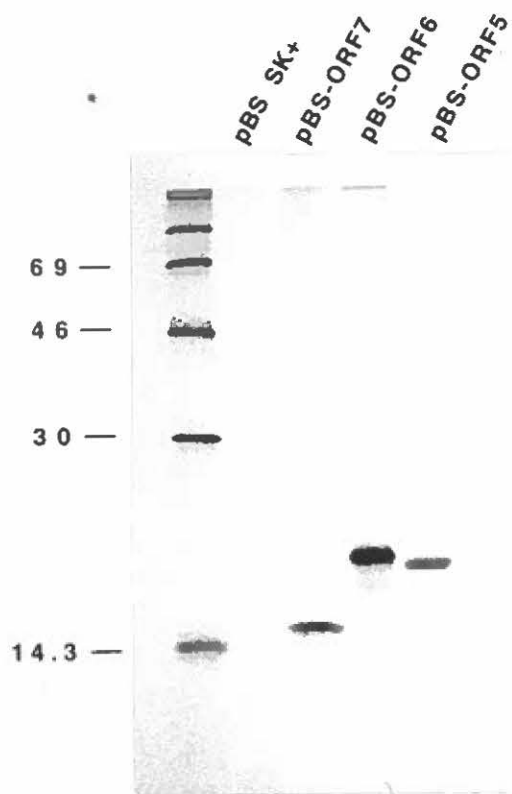


FIGURE 22: SDS-PAGE analysis of the *in vitro* translation products of ORFs 7, 6, and 5.

A. Five μ l of the translation products of ORFs 7 (pBS-ORF7), 6 (pBS-ORF6), and 5 (pBS-ORF5) were solubilized in electrophoresis sample buffer containing 2-mercaptoethanol and analysed on a 15% polyacrylamide gel. The plasmid pBS SK+ was used as negative control (lane 2). Positions of the [14 C] methylated protein markers (Lane 1) are shown on the left (in kilodaltons).

B. Radioimmunoprecipitation analysis of the *in vitro* translation products of ORFs 5, 6, and 7. Infected MARC-145 cell lysates labeled with [35 S]-methionine or translation reaction products of ORF 7, ORF 6, and ORF 5 were incubated with the homologous porcine hyperimmune serum. Antigen-antibody complexes were analysed by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide gel as shown in lanes 2, 3, 6, and 8, respectively. A normal serum collected from a seronegative SPF pig was used as control for precipitation of ORFs 7, 6, and 5 (Lanes 4, 7 and 9, respectively). The ORF 7 translation product was also immunoprecipitated by monoclonal antibody SDOW17 (lane 5) directed against the 15 K protein of the American reference strain ATCC VR 2332 of PRRSV. Positions of molecular size markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

A



B

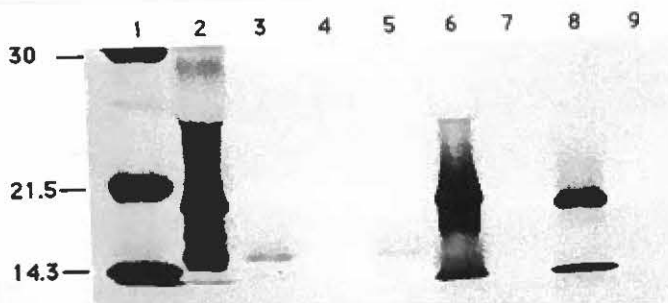
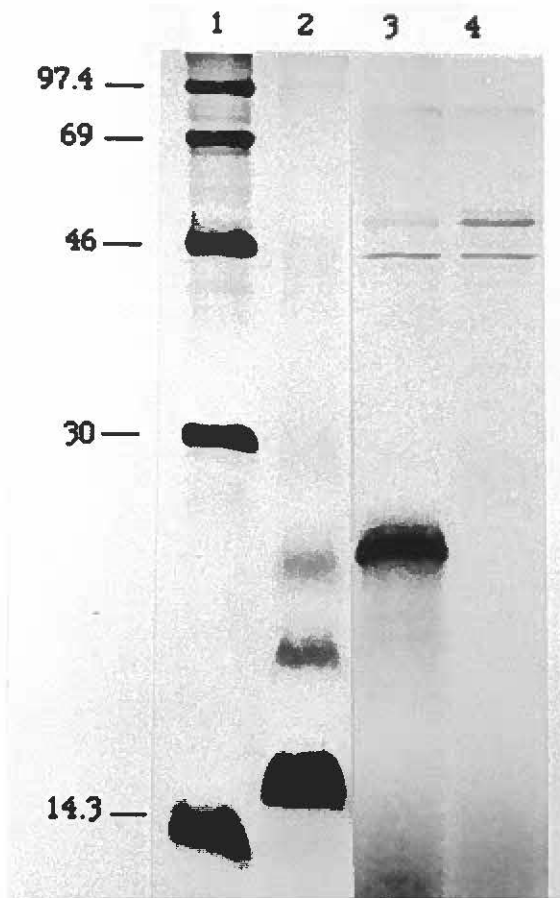


FIGURE 23: Glycosylation of the *in vitro* translated PRRSV ORF 5 product.

Linearized pBS5 and non recombinant pBS SK+ were *in vitro* transcribed and translated using rabbit reticulocyte lysate in presence of canine pancreatic microsomal membranes. Their products were analysed by SDS-PAGE as shown in lanes 3 and 4, respectively. RIPA profile of the concentrated extracellular virions of the PRRSV IAF-Klop strain, following incubation in the presence of homologous porcine hyperimmune serum, is shown in lane 2. The [¹⁴C] methylated size markers (in kilodaltons) are shown in lane 1.



ARTICLE 4

Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Efficient Differentiation Between Canadian and European Strains by Reverse Transcription and PCR Amplification

**HELMI MARDASSI, LOUISE WILSON, SAMIR MOUNIR, and
SERGE DEA***

*Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier,
Université du Québec, Laval, Québec, Canada, H7N 4Z3*

Journal of Clinical Microbiology (1994), 32: 2197-2203

SUMMARY

Two sets of oligonucleotide primers (1008PS-1009PR and 1010PLS-1011PLR) were designed according to the sequence of the nucleocapsid protein (N) gene of Quebec reference strain IAF-exp91 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV). The primers were used in reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments for detection of viral genomic RNA either from infected Porcine Alveolar Macrophages (PAM) or tissues from experimentally-infected specific pathogen free (SPF) pigs. Considering the high degree of variation detected in the nucleotide sequences of the N genes of IAF-exp91 as compared to the Lelystad virus (LV), the primers 1008PS-1009PR were referred as the specific primers, since they were chosen in such a manner that they could only amplify sequences from IAF-exp91 RNA and not from LV. On the other hand, the primers pair 1010PLS-1011PLR was common to both strains of PRRSV. When analysed by agarose gel electrophoresis, the products of RT-PCR from each set of primers were resolved as single band of the predicted size, the specificity of amplified products being confirmed by southern blotting using a specific IAF-exp91 N gene probe. No amplification was observed when RNA was extracted from uninfected PAM or from other porcine viruses. As expected, only the common primer pair was able to amplify RNA from the Quebec reference strain and two European strains (LV and Weybridge). The resulting bands displayed different electrophoretic mobilities due to the absence of 22 nucleotides in both European strains, thus allowing their differentiation from IAF-exp91 strain. Most of tissue culture-adapted Quebec isolates were detected using both primer pairs. The sensitivity of the enzymatic amplification method for detection of PRRSV from lung tissues was 5 TCID₅₀. RT-PCR was found to be more sensitive than indirect

immunofluorescent assay for detection of PRRSV in tissues from experimentally-infected pigs and as sensitive as virus isolation in PAM, especially when combined with southern blotting using the digoxigenin-labeled N probe and chemiluminescent detection.

INTRODUCTION

Since 1986-1987, many swine herds throughout the world have experienced important outbreaks of a disease characterized by severe reproductive failure in sows of any parities and respiratory problems affecting pigs of all ages (Bilodeau *et al.*, 1991; Keffaber, 1989; Wensvoort *et al.*, 1992a). The disease, named Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS), is caused by a fastidious agent, the Lelystad virus (LV), which can be propagated on primary cultures of porcine alveolar macrophages (PAM) (Wensvoort *et al.*, 1991a). The LV is a spherical, enveloped virus, 48-83 nm in diameter, with a central core measuring 25 to 30 nm (Benfield *et al.*, 1992b; Wensvoort *et al.*, 1991a). In all countries where the disease has been described, viruses with similar morphological characteristics were isolated (Baron *et al.*, 1992, Benfield *et al.*, 1992b; Dea *et al.*, 1992a; Paton *et al.*, 1992, Plana *et al.*, 1992). While European isolates of PRRSV appear to belong to the same serotype, antigenic variability has been demonstrated among North American isolates, and between North American and European isolates (Wensvoort *et al.*, 1992b). Molecular studies have shown that the viral genome consists of a single-stranded RNA molecule with positive polarity, approximately 15 kb in length, which generates in infected cells a 3'-coterminal nested set of six major subgenomic mRNAs (Conzelmann *et al.*, 1993, Meulenber *et al.*, 1993b). The genomic organization and replication strategy of this new porcine virus appear similar to that of the *Arteriviruses*, including Equine Arteritis Virus (EAV), Lactate Dehydrogenase Elevating Virus (LDV) and Simian Haemorrhagic Fever Virus (SHFV) (Plagemann *et al.*, Moennig, 1992). Recently, partial nucleotide sequence analysis of the 3'-terminal region of the genome of a Quebec reference strain (IAF-exp91) of PRRSV revealed major differences with nucleocapsid protein genes of

prototype European strains (Mardassi *et al.*, 1994b). Indeed, the IAF-exp91 strain showed identities of 63% and 59% with that of LV at the nucleotide (nt) and amino acid (aa) level, respectively.

The approaches currently used for detection of the virus are essentially based on virus isolation in PAM or in the established cell lines, CL2621 or MARC-145, derived from MA-104 monkey kidney cell line (Bautista *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1993; Wensvoort *et al.*, 1991b). Final identification of the virus is serologically confirmed by indirect immunoperoxidase (Wensvoort *et al.*, 1991b) or immunofluorescence (Bautista *et al.*, 1993) tests using specific antisera. Both techniques are the most widely used in the serological diagnosis of PRRSV and their effectiveness have been previously studied (Bautista *et al.*, 1993; Wensvoort *et al.*, 1992b; Yoon *et al.*, 1992a). While virus isolation provides unequivocal evidence of PRRSV infection, the procedure is heavily complicated by the continuous preparation of PAM which is time-consuming and laborious. Thus, a sensitive method that does not rely on cell culture techniques should be of great interest for diagnosis of PRRSV infection.

The purpose of the present study was to evaluate the efficacy of reverse transcription and amplification of viral nucleic acid sequences by the polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of PRRSV from infected PAM cultures or lung homogenates from aborted fetuses or dyspneic piglets. Two sets of oligonucleotide primers have been assessed for their ability to detect the nucleocapsid gene of PRRSV, and to differentiate between European and Quebec isolates.

MATERIALS AND METHODS

Virus stocks

The Quebec reference strain, IAF-exp91, of PRRSV was initially isolated from the lung of a specific pathogen-free (SPF) pig which has been intranasally inoculated with pooled homogenate of tissues from suckling piglets in a Quebec herd experiencing a typical acute outbreak of PRRS (Dea *et al.*, 1991). The virus propagated in primary cultures of PAM was shown to reproduce clinical disease and respiratory lesions in SPF pigs, and reproductive disorders in sows (Dea et Garzon, 1991).

Thirteen other Quebec isolates of PRRSV were propagated on PAM from lung homogenates of stillborn fetuses or blood samples of dyspneic piglets obtained from pig farms having experienced acute or chronic outbreaks of PRRS (Mardassi *et al.*, 1994b). Viral identification was confirmed by indirect immunofluorescence (IIF) in PAM using monoclonal antibodies SDOW17 and VO17 (obtained from Drs D.A. Benfield and E. Nelson, South Dakota State University), directed against the p15 nucleocapsid protein of the American reference strain ATCC VR-2332 of PRRSV (Benfield *et al.*, 1992a). Two reference European strains (LV and Wbg) of PRRSV were kindly provided to us by Dr G. Wenswoort (NVLC, Lelystad, The Netherlands) and Dr S. Edwards (CVL, Weybridge, Surrey, UK). Stock viruses were produced by at least five successive passages in PAM. In all cases, infectivity titers ranged between $10^{4.50}$ to $10^{6.50}$ 50% tissue culture-infective doses (TCID₅₀) per ml after the third and fifth passages, respectively. The IAF-Klop isolate was adapted to growth in MARC-145 cells (kindly provided by Dr J. Kwang, U.S. Meat

Animal Research Center, USDA, ARS, Clay Center, Nebraska) and yielded similar infectivity titers after five successive passages.

Other viruses used as controls included the Purdue strain of transmissible gastroenteritis virus (TGEV, ATCC, VR-763), the NADL-2 strain of porcine parvovirus (PPV), the porcine enterovirus type 1 (PEV-1), the 67N strain of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV, ATCC, VR-741) and the Q890 strain of porcine encephalomyocarditis virus (EMCV). The origins and cultivation procedures of these reference porcine viruses have been described elsewhere (Dea et al., 1992a et b). Sucrose gradient-purified bovine viral diarrhea virus (BVDV) was kindly provided to us by Dr P. Tijssen, Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec.

Clinical samples

Twelve five-weeks old SPF pigs were intranasally exposed with 1.5 ml per nostril of the tissue culture-adapted Quebec reference strain IAF-exp91 of PRRSV (dose: $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml). Control pigs received 1.5 ml of non-infected cell culture medium. Four dyspneic piglets were euthanized at 4-10 days post-infection (PID); other necropsies were done at PID 14, 21, and 42. Ten percent lung homogenates were prepared in phosphate-buffered saline (10 mM PBS), pH 7.4, using a Sorvall Omnimixer (Yvan Sorvall Inc., La Jolla, Calif.) and clarified by centrifugation at $5,000 \times g$ for 20 min at 4° C. Specimens were used immediately for virus isolation in PAM or stored at - 70°C. Frozen lung sections were prepared for indirect immunofluorescent staining, as described elsewhere (Dea et Garzon, 1991).

Sources and extraction of genomic RNA

PRRSV-infected PAM and MARC-145 cultures were harvested, following two freeze-thaw cycles, when 50 to 60% of cells ($6 \times 10^{7.0}$ cells) were affected by cytopathic changes. After clarification at $5,000 \times g$ for 30 min, extracellular virions in the supernatant fluids were concentrated by differential centrifugation at $100,000 \times g$ for 2 h through a 30% (W/V) sucrose cushion. RNA was extracted from 50 μ l of the concentrated viral preparations by the guanidinium isothiocyanate-acid phenol method of Chomczynsky and Sacchi (1987) and resuspended in 10 μ l of DEPC-treated water containing 1 μ l of RNase inhibitor (RNA guardTM, Pharmacia LKB, Baie d'Urfé, Pointe-Claire, Québec). The same procedure was used for extraction of PRRSV RNA from lung samples (0.5 g) obtained from experimentally-infected pigs, except that total RNA was resuspended in a 50 μ l volume of DEPC-treated water. In one experiment, 0.5 ml of each ten-fold dilution from an initial IAF-Klop viral suspension titrating 10^6 TCID₅₀/ml, was directly injected into different sites of a 1 g lung sample from a SPF piglet. For negative controls, total RNA was extracted from mock-infected PAM and MARC-145 cultures and lung tissue of a normal SPF pig.

Primers

The designs of primers for RT-PCR amplification were based on the 3'-terminal nucleotide sequence of the Quebec IAF-exp91 strain (Mardassi *et al.*, 1994b) and the nucleotide sequences of ORFs 6 and 7 of the LV strain of PRRSV (Meulenberg *et al.*, 1993b). Sequence analyses for selection of primers were performed on an Apple MacIntosh computer with the McVector 3.5 (International Biotechnologies) and Gene Works 2.2 (IntelliGenetics inc., Mountain View, Calif.) programs. Oligonucleotides used in the RT-PCR were synthesized on an automated Gene

Assembler DNA Synthesizer (Pharmacia LKB). The primer localizations and sizes of the predicted amplified products are shown in Fig. 24. Their sequences (5' to 3') are as follows: 1008PS (position 3 to 22), TAAATATGCCAAATAACAAC; 1009PR (position 450 to 470), TAGGTGACTTAGAGGCACA; 1010PLS (position 51 to 69), ATGGCCAGCCAGTCAATCA; and 1011PLR (position 464 to 483), TCGCCCTAATTGAATAGGTG.

Reverse transcription

One μg of total RNA was mixed with 25 pmol of one of the reverse oligonucleotide primers (1009PR, 1011PLR) in 10 μl of DEPC-treated distilled water, denatured at 70°C for 10 min, then immediately cooled on ice. Reverse transcription of the RNA into cDNA was made in a final volume of 20 μl of reaction buffer containing 1 x PCR buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM DTT), 0.5 mM (each) dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U of RNase inhibitor per μl and 200 U of RNase H⁻ MoMLV reverse transcriptase (GIBCO BRL, Burlington, Ont., Canada). After incubation for 1 h at 42°C, the mixture was heated to 94°C for 5 min and quickly chilled on ice. In every set of experiments, we included a negative control in which DEPC-treated distilled water was used instead of RNA.

Polymerase chain reaction

For the PCR step, the RT reaction volume (20 μl) was made to 100 μl with 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl_2), 0.2 mM (each) dGTP, dATP, dCTP and dTTP, and 25 pmol of each of the reverse and sense primers. After addition of 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.), the reaction mixtures were overlaid with 50 μl of mineral oil (ICN

Biomedicals Ltd., Mississauga, Ontario). The tubes were subjected to 35 amplification cycles, each cycle consisting of 1 min denaturation, 1 min annealing and 2 min elongation steps at temperature of 94, 60, and 72°C, respectively. The PCR was ended with a final elongation step of 10 min at 72°C. Amplified products were detected by electrophoresing 5-10 µl aliquots through 2 % agarose gels (Promega, Madison, WI, USA) in TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, pH 8.5, and 0.002 M EDTA) in the presence of ethidium bromide for approximately 30 min at 10 V/cm and photographing the gels under UV illumination.

Molecular probe preparation and labeling.

A PRRSV nucleocapsid specific probe was prepared from a plasmid vector (clone 12) containing the 3' terminal 530 nucleotides of the IAF-exp91 strain genome, which encompasses most of the nucleocapsid protein gene and the downstream non coding region (Mardassi *et al.*, 1994b). This fragment was isolated from the plasmid vector by *Bam*HI-*Eco*RI digestion, and the probe (463 bp) was generated by cutting the resulting fragment with the *Hae* III endonuclease enzyme. The genomic region corresponding to the probe is represented in Fig. 24. Labeling with [³²P]-dCTP was performed on 400 ng of the *Hae* III fragment using a commercial oligolabeling kit (Pharmacia LKB).

Southern blot analysis

Capillary transfer in 20x SSC (1x SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M Na citrate, pH 7.0) was used to transfer PCR products from the denatured gel (15 and 20 min in 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) to a positively charged nylon membrane (Nytran⁺, Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada). After a 12 h transfer, the membrane was washed twice in 2x SSC, baked for 30 min at 80°C and prehybridized for 4 h

at 42°C in 10 ml of prehybridization solution (6x SSC, 5x Denhardt's reagent, 0.5% SDS, 100 µg/ml of salmon sperm DNA, 50% formamide). The blot was probed with 10^6 cpm of the [^{32}P]-dCTP labeled probe in 10 ml of the prehybridization solution for 12 h, and visualized by autoradiography. Alternatively, the probe was randomly-labeled with digoxigenin-dUTP and detection of hybridization was performed using the DIG Luminescent Detection Kit following the manufacturer instructions (Boehringer Mannheim).

RESULTS

Selection of oligonucleotide primers

Previous attempts to amplify genomic fragments corresponding to the 3' end of the IAF-exp91 genome, using sets of oligonucleotide primers chosen on the basis of the published LV nt sequence, were unsuccessful (Mardassi *et al.*, 1994b; Meulenber *et al.*, 1993b). These preliminary results led us to sequence the 3' end genomic region of our reference IAF-exp91 strain, in which we identified the nucleocapsid (N) gene and a downstream non coding region (Mardassi *et al.*, 1994b). Computer analysis of the published nt sequences of both the LV and Quebec reference strain of PRRSV revealed high level of variations in the ORF 7 nt sequences resulting from a number of substitutions, insertions or deletions; these variations were more frequent in the first half of the N gene (Mardassi *et al.*, 1994b). Such variability allowed us to select two oligonucleotide primer pairs on the basis of the IAF-exp91 sequence (Fig. 24). The first primer pair, designated 1008PS-1009PR, was chosen in such a manner that it could amplify exclusively the 3' genomic region of the Quebec reference strain. In contrast, the second primer pair, designated 1010PLS-1011PLR, corresponds to regions of absolute sequence conservation within the 3' genomic regions of the LV and Quebec strains; since this primer pair was designed to amplify the N gene of both Quebec and European strains of PRRSV, it was referred to as the common primer pair.

Enzymatic amplification of PRRSV genomic RNA by RT-PCR

As illustrated in Fig. 25 A, specific primer pair 1008PS-1009PR yielded a PCR product of the expected size (468 bp) for the IAF-exp91 strain and 13 other tissue culture-adapted Quebec isolates tested. In contrast, no genomic fragment could be

enzymatically amplified by the PCR procedure for both European isolates (LV and Wbg strains) using the specific primer pair, and this, even after propagating these isolates for more than 3 times in PAM to increase infectivity titers ($>10^{5.0}$ TCID₅₀/ml) (Fig. 25A, lanes 8 and 10). Nevertheless, the expected PCR fragment was less efficiently amplified in the case of three of the Quebec isolates, IAF-CHA, IAF-NUT and IAF-PVFA (Fig. 25A, lanes 14, 22, and 26). On the other hand, common primer pair 1010PLS-1011PLR allowed N gene amplification of both European strains (Fig. 25A, lanes 7 and 9) and most of the Quebec isolates (Fig. 25A, lanes 1, 3, 11, 15, 17, 23, and 27). Interestingly, comparison analysis of the published nt sequences of reference PRRSV strains revealed the absence in the LV genome of a total of 22 nt confined to the 3' end of the N gene and the beginning of the downstream non coding region (Mardassi *et al.*, 1994b). Consistent with that observation, was the difference in electrophoretic mobility of the 1010PLS-1011PLR fragment amplified from European strains; the latter migrated more rapidly (433 bp expected product) than did the corresponding products obtained for the Quebec isolates (Fig. 25A, compare lanes 7 and 9 to lanes 1, 3, 11, 15, 17, 23, and 27). Thus, based on such a difference in the electrophoretic mobility of the amplified products, the common primer pair appeared to represent an efficient tool for differentiation between European and Quebec PRRSV isolates.

Specificity and sensitivity of RT-PCR for detection of PRRSV

The specificity of the PCR products was confirmed by southern blot analyses using the radiolabeled nucleocapsid probe described above (Fig. 25B). As expected, no amplification product was obtained when RNA or DNA from several heterologous porcine viruses were used as templates (data not shown), as well as with RNA prepared from mock-infected cells or when distilled water was used as

starting material (Fig. 25A, lanes 5-6 and 19-20, respectively). With other porcine viruses, no hybridization signal could be observed by southern blot even after a 12 h-exposition period (data not shown).

Strong hybridization signals were obtained with the two primer pairs amplified products of the IAF-exp91 strain (Fig. 25A, lanes 27-28) as well as with the amplified products of IAF-KLOP, IAF-183, IAF-BUT (Fig. 25A, lanes 1-2, 3-4, and 23-24, respectively), LHVA-1, LHVA-2 and IAF-CM strains (data not shown), indicating that the amplified DNA bands contained sequences encoding for the N protein. Surprisingly, the hybridization pattern observed for IAF-BAJ, LHVA-3, and IAF-SBC (Fig. 25B, lanes 11-12, 15-16 and 17-18) after a 4 h-exposition period, did not correlate with their efficient enzymatic amplification. Indeed, the amplified DNA bands of these isolates were as prominent as those of IAF-KLOP, IAF-183 and IAF-BUT and therefore, the amount of DNA could not account for the lack of hybridization. It is worth of note that this inefficient hybridization, especially in case of the LHVA-3 isolate, was not due to the absence of the N gene in the amplified products, since hybridization signal could be readily observed if the exposure period was extended to 12 hours (data not shown). Southern blot analyses further confirmed, that in cases of the two European strains, no amplification had occurred when the specific primer pair was used (Fig. 25B, lanes 8 and 10). Moreover, amplified products of the common primer pair were not revealed by the IAF-exp91 N probe after 4 h exposure, and only two faint bands could be observed upon an exposure period of 12 hrs (data not shown). Occasionally, with some of the PRRSV isolates tested, an additional discrete band which migrated faster than the predicted RT-PCR products for both primer pairs could be revealed following southern blot analyses (Figs. 25A and 26A).

The RT-PCR was found very sensitive in detecting viral RNA, especially when the specific primer pair was used; the latter still gave an apparent amplification band using RNA extracted from a dilution of the concentrated viral preparation corresponding to 10 TCID₅₀ (Fig. 26A, lane 11). On the other hand, the ability of the common primer pair to detect low amounts of viral RNA was about 10 fold less in magnitude than the specific primer pair (Fig. 26A, lanes 11 and 12). Using the [³²P]-labeled N probe, the sensitivity of RT/PCR was increased to a detection limit of 1 TCID₅₀ for both primer pairs (Fig. 26B).

In order to assess sensitivity of RT-PCR method when done on PRRSV-infected tissue homogenates as opposed to partly purified virus, and to examine whether the efficiency of enzymatic amplification of the viral genome would be compromised by excessive amounts of cellular nucleic acids, various dilutions of a tissue culture-adapted PRRSV strain (IAF-Klop) was injected within 1 g lung tissue from SPF piglet, as described in material and methods. After 40 amplification cycles using primer pair 1008PS-1009PR, it was possible to visualize by ethidium bromide staining an amplified product at the dilution 10⁻⁵ of the injected viral suspension, corresponding to about 5 TCID₅₀ (Fig. 27).

Detection of PRRSV in clinical samples of experimentally-infected pigs

To be more practical, we next attempted to detect PRRSV nucleocapsid gene in crude clinical samples of SPF pigs that had been experimentally infected with Quebec IAF-exp91 strain. At PID 2 to 5, most of the infected pigs were feverish (rectal temperature ranging from 40° to 41.5°C) and, subsequently developed mild clinical signs of respiratory disease. Total RNA was extracted by the same method

used for concentrated virus, except that lung homogenates were extensively disrupted with the guanidinium isothiocyanate solution, by 20 to 30 passages through a 26 G1 1/2 needle. RT-PCR experiments were conducted using the specific primers pair. As shown in Fig. 28, in pigs euthanized 4-10 days post-infection, detection of PRRSV nucleocapsid gene in lungs was observed in two out of four cases after ethidium bromide staining (Fig. 28A, lanes 9 and 11). When combined with southern blotting, using the digoxigenin-labeled N probe and the chemiluminescent detection system, three piglets were found to be positive (Fig. 28B, lanes 9, 10 and 11). In comparison, none of the lungs tested was found positive for PRRSV antigens by indirect immunofluorescence assay, whereas, virus isolation in PAM was successfully achieved in these four cases (Fig. 28C, lanes 9, 10, 11, and 12). PRRSV could not be detected in crude clinical samples from control piglets by both RT-PCR and virus isolation in PAM (Fig. 28, lane 13). By the three methods, negative results were obtained with crude clinical samples of experimentally-infected pigs after 14 days post-infection (Fig. 28, lanes 1, 2, 4-8).

DISCUSSION

Reverse transcription and cDNA amplification is becoming a currently used approach for the detection of several RNA viruses. Diagnostic tests based on this relatively new technology have been successfully applied for HIV (Holodniy *et al.*, 1991), Coronaviruses (Andreason *et al.*, 1991; Verbeek and Tijssen, 1990), Arterivirus (Chirnside and Spaan, 1990), Flaviviruses (Eldadah *et al.*, 1991), measles virus (Shimizu *et al.*, 1993), respiratory syncytial virus (Paton *et al.*, 1992), and Picornaviruses (Hyypia *et al.*, 1989). Results obtained in the present study suggested that RT-PCR may be a suitable diagnostic procedure not only for detection, but also differentiation between North American and European strains of PRRSV, a newly recognized porcine pathogen causing major economic problems to the swine industry.

Efforts to control PRRSV infection have largely been unsuccessful because of the lack of convenient diagnostic test, the airborne spread of the virus, the existence of subclinical infections, and the persistence of the virus in infected populations (Goyal, 1993). The restrictive tropism of this new porcine virus for alveolar macrophages still represents a major problem for large scale propagation of the virus; consequently, this has hampered the preparation of specific immunological probes and the development of rapid and accurate diagnostic tools for detection of the virus or viral antigens from clinical specimens. Although PAM cells have been shown to be highly permissive to the virus, routine isolation from clinical specimens can be done only in a few laboratories having access to a continuous source of SPF piglets, with facilities for harvesting and maintaining the cells. More recently, North American PRRSV isolates could be propagated in the

continuous cell lines ATCC-VR2332 and MARC-145, high permissive cell clones to PRRSV derived from the MA-104 cell line (Benfield *et al.*, 1992b; Bautista *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1993). Nevertheless, among isolates which could be readily cultured in PAM, several of them were unable to grow in both continuous cell lines, and the reciprocal was also true (Bautista *et al.*, 1993, Kim *et al.*, 1993). Consequently, the use of a single cell system may not be adequate for isolation of PRRSV from field cases. For isolation of PRRSV from serum samples, however, PAM were more sensitive probably because antibody enhances PRRSV replication in PAM (Choi *et al.*, 1992). Moreover, replication of PRRSV in susceptible cells did not necessarily induce a cytopathic effect (Bautista *et al.*, 1993; Mardassi *et al.*, 1994a), and final identification needed to be further confirmed by IIF or immunoperoxidase tests using specific antisera. Finally, in most of the cases, it takes more than two weeks to produce a result of virus isolation from clinical specimens.

Beside specificity, a suitable test for the control of PRRS should also be highly sensitive in order to permit identification of asymptomatic carriers which certainly represent a major source of the virus between acute outbreaks. Indeed, it has been demonstrated that the virus can be isolated from serum of PRRSV-inoculated pigs up to PID 41 despite the presence of high titers of antibodies (IIF titers $\geq 1:1,280$). The virus could also be isolated from lung, serum, plasma and buffy coats cells for 6-8 weeks after infection (Stevenson *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1992b). Semen of infected boars may be also a significant source of the PRRSV infection (Hill *et al.*, Proc of the Minnesota Swine Conf for Vet. 1993). In the study with partly purified viral preparations, PCR product was detected at level of 10 TCID₅₀ by direct gel visualization. The technique had a sensitivity of approximately 1 TCID₅₀ when the product was detected by hybridization with a

specific N probe (Fig. 26B). The technique was also proven to be specific as other pig viruses responsible for reproductive and respiratory problems which might be confused with PRRS failed to yield an amplified product by the PCR method. The results indicated that the 13 Quebec isolates propagated in PAM could be amplified by the specific primer pair, and therefore RT-PCR could be used to identify several Quebec isolates. The fact that three of the Quebec isolates were less efficiently amplified comparatively to the others, seemed to result essentially from a very low virus amount, as these isolates used to yield low infectivity titers when propagated in PAM (Mardassi *et al.*, 1994a). No amplification was observed in case of both European strains, thus confirming the specificity of the 1008PS-1009PR primer pair for the Quebec isolates and its potential use for differentiation between Quebec and European isolates of PRRSV. These results were confirmed by southern blot analysis. When the common primer pair 1010PLS-1011PLR was used, both European and Quebec isolates were amplified as expected from their design after aligning the IAF-exp91 3' end nucleotide sequence to that of LV. The fragment amplified from the two European strains showed a faster electrophoretic mobility, confirming our prediction from the sequence analysis (Fig. 25). Interestingly, all the Quebec isolates yielded a 1010PLS-1011PLR amplified product with identical electrophoretic mobility. This finding suggests that all the Quebec isolates, being studied here, could be efficiently distinguished from the two prototype European isolates using the common primer pair.

The high specificity displayed by the two primer pairs as demonstrated by southern blotting, is in favor of their use as a diagnostic tool, especially that the three Quebec isolates IAF-KLOP, IAF-CHA and IAF-NUT which were devoided of any cythopatic effect on PAM (Mardassi *et al.*, 1994a), could be amplified.

Genomic variations among Quebec PRRSV isolates could be deduced from their reactivity with the IAF-exp91 N probe. Indeed the hybridization signal obtained for isolates IAF-BAJ, LHVA-3 and IAF-SBC did not correlate with the abundant amount of the amplified fragments, as it was the case for the other isolates. One can hypothesize that the efficiency of the transfer to the membrane is not equal for each site, however, similar results have been obtained from an independent experiment where the amplified products of these isolates, were run on distinct positions (data not shown). Another proof which points towards a genomic variation, is the fact that the amplified product of the LV which shared only 59% identity with IAF-exp91, was not revealed by the N-probe, and that the signal obtained for IAF-exp91 strain, from which the probe was derived, was very strong. The Weybridge strain for which sequencing data are not yet available, gave the same result as the LV. Nonetheless, a hybridization signal could be observed for the two European strains after a long term exposure.

Large amounts of RNA extracted from lung tissues are of cellular origin. It has been previously shown (Carman *et al.*, 1989), that excess amounts of cellular RNA could inhibit enzymatic amplification of viral genes, by interfering mainly in the reverse transcription step. In our case, the sensitivity of the RT-PCR method did not seem to be compromised when done on PRRSV-infected lung tissues as opposed to partially purified virus; in fact, PRRSV was still detectable by RT-PCR in lung tissues when virus concentration was 5 TCID₅₀ /ml (Fig. 27). The results obtained by the RT-PCR assay over crude lung homogenates from experimentally-infected pigs indicated that RT-PCR was effective for the viral detection up to 11 days post-infection. The enzymatic amplification method appeared as sensitive as

virus isolation in PAM, specially when combined to southern blotting using the digoxigenin-labeled N probe and chemiluminescent detection. Based on the electrophoretic profile obtained following ethidium bromide staining, degradation of RNA in one of the specimen collected at PID 11 probably account for the lack of amplified product in this case, whereas successful virus isolation was obtained after two successive passages in PAM. Comparatively, detection of viral antigen by indirect immunofluorescence on frozen lung sections could not be achieved in all cases tested. Both, RT-PCR and virus isolation in PAM, did not permit detection of PRRSV in lung homogenates of experimentally-infected pigs more than two weeks post-inoculation.

Although, it has been previously reported that PRRSV can be isolated in cell cultures from serum and plasma up to 6 to 8 weeks after infection (Bautista *et al.*, 1993; Stevenson *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1992b), our results should not be interpreted as lack of sensitivity of RT-PCR. Indeed, in natural conditions, pigs are constantly in contact with the virus and consequently reinfections are frequent. This contrasts with the experimental conditions used in the present study. Moreover, PRRSV does not seem to persist for long period in lungs from naturally-infected animals (Goyal, 1993). Nonetheless, the use of RT-PCR can be justified in many situations: (i) several laboratories are unable to support continuous PAM preparations; moreover, it appears that the reliability of virus isolation depends on the macrophages batch, as different levels of sensitivity have been reported even in macrophages from individuals of the same herd (data not shown); (ii) amplification of viral specific sequences does not require the presence of infectious virus; (iii) some isolates do not display a cytopathic effect; (iv) RT-PCR could be used for

both detection and strain differentiation; and (v) detection of the virus by this method can be applied in pathogenesis studies.

In summary, we have shown that RT-PCR is a valuable tool for the detection of PRRSV from infected PAM, even in case of isolates which did not produce cytopathic effect. By selecting strain specific oligonucleotide primers, we were able to detect all the Quebec isolates and to differentiate them from two European strains. Such a result has an important implications on subsequent epidemiological studies. Preliminary results suggested that RT-PCR could be a potential tool which could be applied for the direct detection of PRRSV in clinical samples. Nonetheless, it appeared from this preliminary study that optimization of the method is still needed in order to achieve the objective of eliminating the use of PAM cultures. In view of the results here reported, it is advisable to use RT-PCR in combination with Southern blotting to assure the reliability of the diagnosis with clinical specimens obtained from acute cases, or either make a first passage in PAM cultures of the suspected pathological samples to enhance the subsequent RT-PCR assay.

FIGURE 24: Diagram of the 3' end of PRRSV genome showing the localization of the oligonucleotide primers, the size of the predicted amplified products and N probe described in the text.

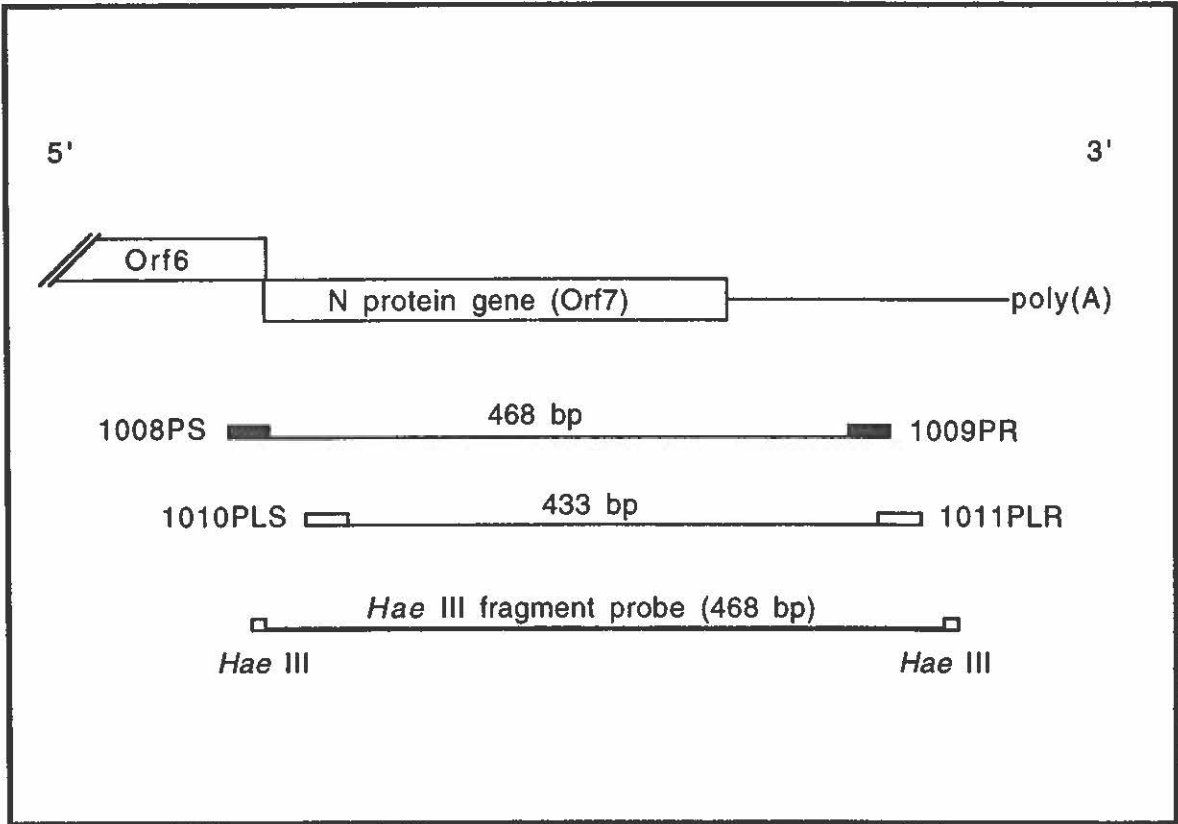
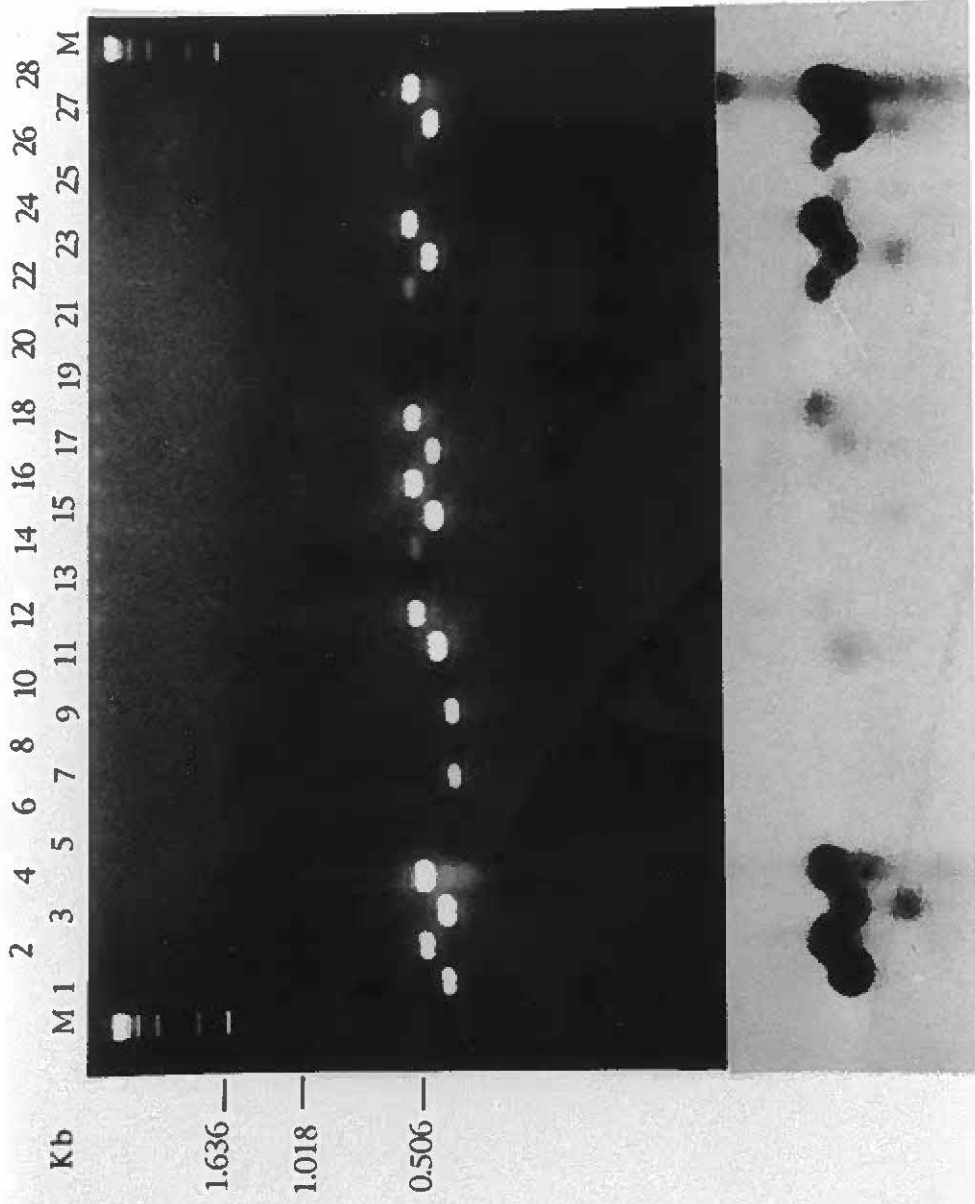


FIGURE 25: PCR amplification of the nucleocapsid protein gene of Quebec and European isolates of PRRSV using specific (even numbers) and common (odd numbers) oligonucleotide primers.

Shown in **A**, are the PCR products of IAF-KLOP, IAF-183, Wbg, LV, IAF-BAJ, IAF-CHA, LHVA-3, IAF-SBC, IAF-NUT, IAF-BUT, IAF-PVFA and IAF-exp91 isolates (Lanes 1-2, 3-4, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14, 15-16, 17-18, 21-22, 23-24, 25-26, and 27-28 respectively). As negative controls, RNA extracted from mock-infected PAM (Lanes 5-6) and amplification with no RNA (Lanes 19-20), are included. The molecular size of three fragments of the 1 kb DNA ladder (Lanes M), are indicated in the left margin. In **B**, the corresponding autoradiogram of the amplified products as revealed by the [³²P]-labeled N probe.



A

B

FIGURE 26: Sensitivity of the RT-PCR procedure in detecting viral specific RNA extracted from 10-fold dilutions of an initial concentrated IAF-exp91 viral preparation corresponding to 10^6 TCID₅₀.

RT-PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% (w/v) agarose gel (A), then probed, after Southern blot, with the [³²P]-labeled *Hae* III fragment (B). The amplification products of the 1008PS-1009PR primer pair are shown in lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13, and those of the primer pair 1010PLS-1011PLR are shown in lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14.

Lane M: 1 kb DNA Ladder.

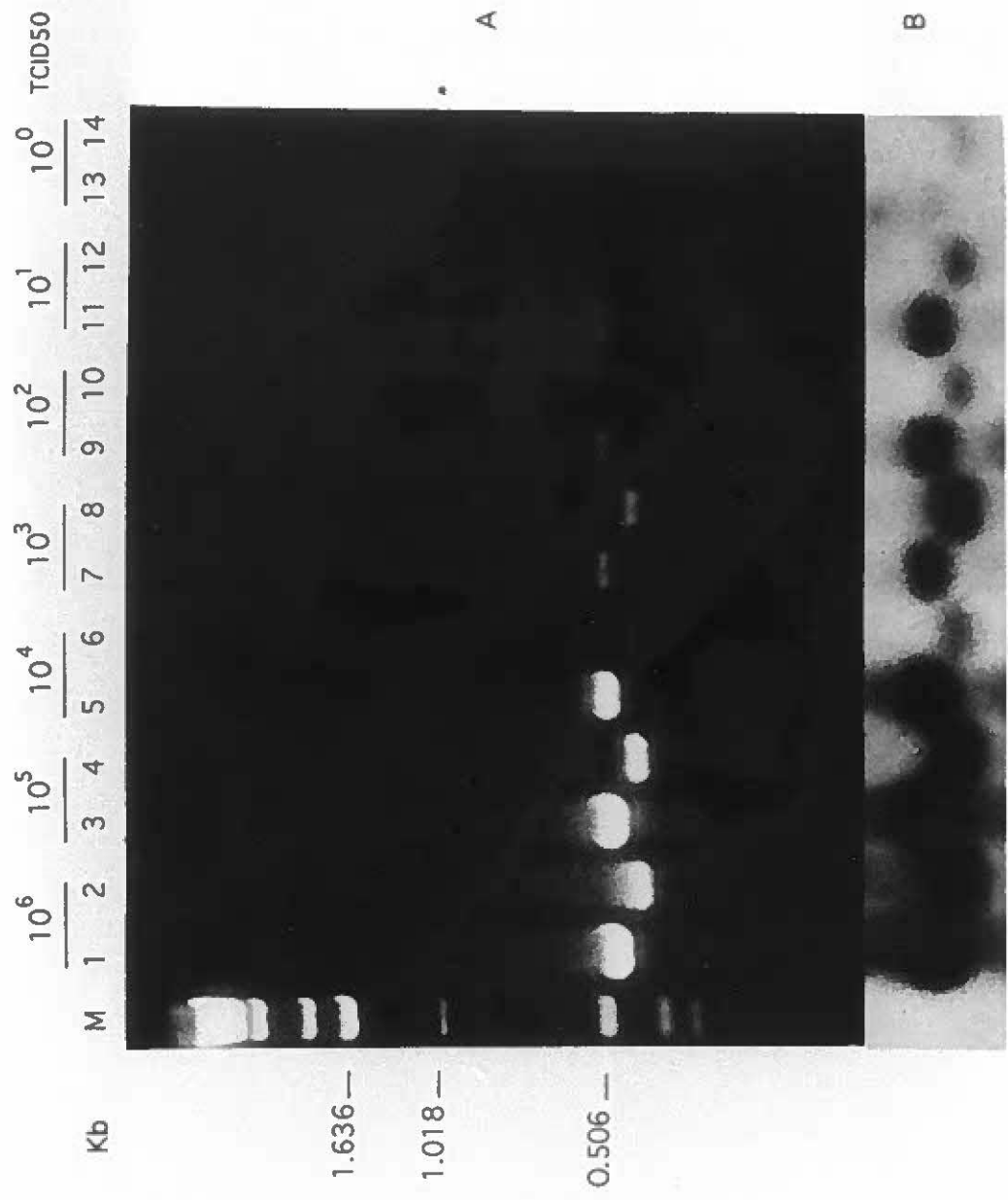


FIGURE 27: RT-PCR products resulting from enzymatic amplification of PRRSV (IAF-Klop strain) genomic RNA extracted from infected porcine lung tissue.

Lanes 3 to 9 correspond to a virus dose of 0.5×10^6 , 0.5×10^5 , 0.5×10^4 , 0.5×10^3 , 0.5×10^2 , 0.5×10^1 , and 0.5 TCID_{50} , respectively. As positive and negative controls, RT-PCR was done using RNA extracted from 10^7 PRRSV-infected MARC-145 cells (Lane 1), and total RNA from lung tissue of an SPF piglet (Lane 2). Lane M: 1-kb DNA Ladder.

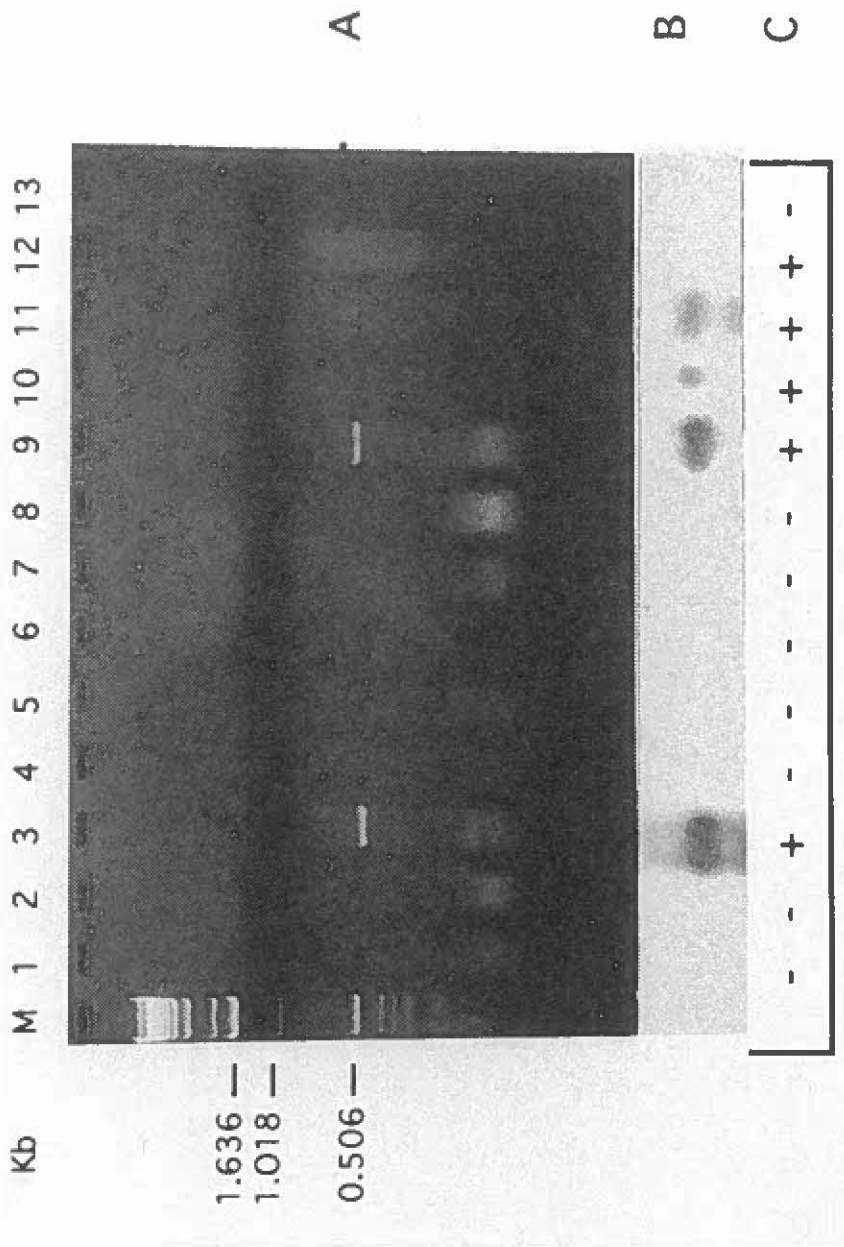


FIGURE 28: Detection of PRRSV in lung tissues of experimentally-infected pigs by RT-PCR, Southern blotting, and virus isolation in PAM cultures.

(A) RT-PCR products resulting from enzymatic amplification of genomic RNA extracted from lung homogenates of PRRSV-infected SPF pigs euthanized at PID 4 (lanes 9 and 11), PID 10 (lanes 10 and 12), PID 14 (lane 1), PID 21 (lanes 2, 4 and 5) and PID 42 (lanes 6, 7 and 8). Lane 3 corresponds to the PCR product obtained in case of lung homogenates containing 0.5×10^6 TCID₅₀ of virus (IAF-Klop strain). Lane 13 corresponds to the negative control. PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel and revealed by ethidium bromide staining. Lane M: 1 kb DNA Ladder.

(B) The DNA fragments from the agarose gel were transferred to a nylon membrane for hybridization with the digoxigenin-labeled N probe and revealed by the chemiluminescent detection system.

(C) Results of virus isolation in PAM cultures and final identification by indirect immunofluorescence using anti-N monoclonal antibody.



CHAPITRE 3:
SYNTHÈSE ET MODIFICATIONS POST-
TRADUCTIONNELLES DES PROTÉINES STRUCTURALES
MAJEURES DU VIRUS DU SRRP

L'étape ultime de notre projet de recherche constitue en fait le but majeur de ce travail de thèse. La réalisation d'une telle étape ne pouvait aboutir sans la disponibilité d'outils spécifiques, qui faisaient défaut au début de ce travail, étant donné l'identification récente du virus du SRRP. Les travaux réalisés précédemment avaient permis d'élucider plusieurs aspects du virus du SRRP. En effet, après avoir caractérisé notre matériel de départ, les protéines structurales majeures du virus furent identifiées et leurs séquences codantes potentielles furent aussi analysées. Nos résultats issus des expériences de traduction *in vitro* suggéraient que les cadres de lecture 5, 6, et 7 codent pour les trois protéines structurales majeures du virus du SRRP. Une telle prédiction fut par la suite confirmée par les travaux de Meulenberg *et al.* (1995) en utilisant des antisérums dirigés contre des peptides synthétiques spécifiques de ces cadres de lecture.

En entamant cette partie du projet de doctorat, notre objectif primaire était de produire des antisérums hautement spécifiques de chacune des protéines structurales du virus, lesquels réactifs constituent l'outil majeur pour l'étude de ces protéines. Pour ce faire les séquences codantes des cadres de lecture 5, 6, et 7 de la souche IAF-Klop, furent exprimées dans *E. Coli* et utilisés afin d'immuniser des lapins. Par le biais des antisérums spécifiques, obtenus contre chacun des produits d'expression, l'assignement des protéines de masse moléculaire, 15 (N), 19 (M) et 24,5 (E) kDa, respectivement, aux cadres de lecture 5, 6, et 7, fut confirmé. Ces antisérums monospécifiques ont permis par la suite d'analyser la nature et le comportement des protéines structurales du virus du SRRP et ce, dès l'étape initiale de leur synthèse jusqu'à leur incorporation dans les particules virales. Tous ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Article 5) qui constitue le corps de ce dernier chapitre.

ARTICLE 5

**Intracellular synthesis, processing and transport of proteins
encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory
syndrome virus**

HELMI MARDASSI¹, BERNARD MASSIE², and SERGE DEA¹

¹Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec,
Laval, Québec, Canada H7N 4Z3, and ²Institut de recherches en biotechnologie,
Montréal, Québec, Canada H4P 2R2

SUMMARY

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), a small enveloped virus containing a positive-strand RNA genome, possesses at least three major structural proteins designated N, M, and E. The N protein is considered as the major component of the nucleocapsid, whereas M and E are membrane-associated. Previous studies using peptide-specific antibodies assigned these proteins to ORFs 7, 6, and 5, respectively. In the present report, monospecific antisera raised against *E. coli*-expressed ORFs 5, 6, and 7 products were used to study the synthesis and processing of PRRSV structural proteins in the highly permissive MARC-145 cell line. Treatment of viral proteins with various glycosidases showed that only E was modified by N-linked glycans. Pulse-chase experiments revealed that intracellular transport of the major envelope glycoprotein was delayed in the pre-medial Golgi compartment. During the first 30 min of chase, E undergoes a gradual downward shift of its apparent molecular weight, thought to result from trimming of the mannose-rich glycan structures. Once E is transported to the medial Golgi or proximal elements, some molecules undergo complete processing of all their high-mannose N-linked oligosaccharides to complex type, while in other molecules only a fraction of N-linked glycans are terminally glycosylated. These two differentially glycosylated forms of E were found to be incorporated into extracellular virions. In cells and virions, both M and E were shown to occur in heterodimeric complexes linked by disulfide bonds. The oligomerization process, as analyzed from pulse-chase experiments, showed that M and E are incorporated into M-E complexes with different kinetics and efficiencies, in a fashion similar to their counterparts in equine arteritis virus. Apparently, all steps of E protein N-glycans processing proceed after its association with M which occurs in the endoplasmic reticulum

(ER). In the infected cells, E and M appear highly membrane-associated, while N is predominantly cytosolic.

INTRODUCTION

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) is the causative agent of a new disease in swine that results in considerable economic losses due to severe reproductive failure in sows of any parities and respiratory signs in unweaned and growing pigs (Benfield *et al.*, 1992b; Collins *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992a; Wensvoort *et al.*, 1991a). The virus was shown to be morphologically, structurally, and genomically similar to members of the Arterivirus genus (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a and 1993b; Benfield *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992a; Wensvoort *et al.*, 1992b), which further includes Equine Arteritis Virus (EAV), Lactate Dehydrogenase-Elevating Virus (LDV), and Simian Hemorrhagic Fever Virus (SHFV). The PRRSV genome is a positive single-strand polyadenylated RNA molecule, approximately 15 kb in length, containing eight open reading frames (ORFs) which are expressed as a nested set of subgenomic RNAs (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a and b). ORF1a and ORF1b (at the 5' end) contain several motifs characteristic of proteins involved in the replication process, whereas ORFs 2 to 6 (from 5' to 3' end) are predicted to encode for membrane-associated proteins, and ORF 7 for a highly basic protein. The virion contains three major structural proteins: a nucleocapsid protein of 15 kDa (N), an unglycosylated membrane protein of 18-19 kDa (M), and a glycosylated membrane protein of approximately 25 kDa (E), which are encoded by ORFs 7, 6 and 5, respectively (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1993). In the case of EAV, four structural proteins (N, M, G_L, and G_S) have been identified and shown to be encoded by ORFs 7, 6, 5, and 2, respectively (De Vries *et al.*, 1992). The N, M, and G_L of EAV correspond to the products of PRRSV ORFs 7, 6, and 5, respectively (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*,

1995). The protein profile displayed by LDV is similar to that of EAV. However, as for PRRSV, the counterpart for the G_S protein has not yet been identified in purified virus preparations (Faaberg and Plagemann, 1995). Four major structural proteins have been reported for SHFV, and with the exception of the p15 and p20 species, which have been shown to be encoded by ORFs 7 and 6, respectively, the gene assignment for the other proteins is still unknown (Godeny *et al.*, 1995). Recently, the synthesis and processing of EAV structural proteins have been investigated. Gel electrophoresis under nonreducing conditions revealed that G_S occurs in the infected cells in three distinct monomers and as a disulfide-linked dimer (De Vries *et al.*, 1995a), and that M and G_L are engaged into disulfide-linked heterodimers (De Vries *et al.*, 1995b). Such association between the two major envelope proteins of the virions has been also demonstrated in the case of LDV and was claimed to be essential for viral infectivity (Faaberg *et al.*, 1995). In the present study, we have confirmed the gene assignment of the three major structural proteins of PRRSV using monospecific antisera raised against *E. coli*-expressed ORFs 5, 6, and 7 products. Then, we analyzed the intracellular synthesis, processing and transport of the three major viral structural proteins, and demonstrated that the two putative membrane-associated proteins fold into disulfide-linked heterodimers, as their counterparts in EAV and LDV. Finally, we discussed the implications of our findings for virus assembly.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses

The Québec cytopathic strain IAF-Klop of PRRSV (Mardassi *et al.*, 1994a) was propagated in MARC-145 cells (Kim *et al.*, 1993), a clone of MA-104 cells highly permissive to PRRSV, kindly provided to us by J. Kwang, U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center, Nebraska. Infectivity titers were determined by titration of clarified tissue culture medium using an endpoint dilution procedure and calculation of 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) per ml (Dea *et al.*, 1992a). For the present study, the virus was plaque-purified twice, and then passaged at low multiplicity of infection (0.01 TCID₅₀/cell).

Recombinant DNA clones

All constructs were made by using standard methods (Sambrook *et al.*, 1989). The coding sequence of PRRSV ORFs 5 and 6 were inserted into pBS SK+ plasmid vector (Stratagene) to yield pBS5 and pBS6, as previously described (Mardassi *et al.*, 1995). Both genes were then subcloned from their respective plasmids, following digestion with *EcoRI* and *NotI* endonucleases, within the appropriate sites of the procaryotic expression vector pGEX-4T1 (Pharmacia), in frame with the Glutathione S-Transferase (GST) gene to form pGEX-5, pGEX-6, respectively. The ORF7 gene was amplified by RT-PCR using the primer pair SRRP-ENS/SRRP-NI, as previously described (Mardassi *et al.*, 1994b). Sequences of the oligonucleotide primers were derived from the 3' end genomic region of the Québec IAF-exp91 reference strain (EMBL/GenBank Accession No. L40898); their sequence and position were SRRP-ENS (5'-CTAAATATGCCAAATAACAAC-3'; 2307-2327) and SRRP-NI (5'-CTCAAGAATGCCAGCTCA-3'; 2700-2683). For directional

cloning, *EcoRI* and *Bam* HI recognition sites were added at the 5' end of these primers, respectively. The amplified product was cloned into *EcoRI*-*Bam*HI digested pMALTM-c2 procaryotic expression vector (New England Biolabs Ltd, Mississauga, Canada), in frame with the maltose-binding protein (MBP) gene to form pMAL-7.

Production of GST-ORF5, GST-ORF6, and MBP-ORF7 fusion proteins

Plasmids pGEX-5 and pGEX-6 were introduced into BL21(DE3) (Novagen)-competent *E. coli* cells, according to standard methods (Sambrook *et al.*, 1989). The recombinant bacteria were grown in 2x YT medium containing 2% D-Glucose and 100 µg/ml of ampicillin. To prepare GST-ORF5 and GST-ORF6 fusion proteins, an overnight culture of the recombinant bacteria was diluted 1:10 in 2x YT medium lacking glucose and allowed to grow at 37°C to an optical density (OD) at 600 nm of 1.0. Protein expression was induced by the addition of 0.1 mM IPTG to the culture medium. After 4 hr at 37°C, the cells were collected by centrifugation, resuspended in Laemmli sample buffer at 1:30 of the original culture volume, and subjected to 10% SDS-PAGE. The bands corresponding to GST-ORF5 and GST-ORF6 fusion proteins were electroeluted from the gel at 45 V for 6 hr in electrophoresis buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3), then for 1 hr in the same buffer but lacking SDS, using a BIO-RAD Electro-Eluter (Richmond, CA). Expression of MBP-ORF7 from TB1 strain of *E. coli* (New England Biolabs) transformed with pMAL-7 was induced by IPTG (Mounir *et al.*, 1995). The fusion protein was purified by affinity using an amylose column and an elution buffer that contains 10 mM of maltose, as recommended by the manufacturer (New England Biolabs).

Generation of antisera specific to PRRSV ORFs 5, 6, and 7 products

New-Zealand albino rabbits were inoculated subcutaneously with 250 to 300 μ g of the eluted GST-ORF5 and GST-ORF6 fusion proteins emulsified with complete Freund's adjuvant (GIBCO BRL). The rabbits were boosted four times with the same amount of fusion protein given intramuscularly at two weeks intervals. In case of ORF7, the fusion protein MBP-ORF7 was subjected to digestion with factor Xa, electrophoresed, and the band corresponding to ORF7 product was electroeluted. Immunization of rabbits with the unfused ORF7 product was carried out as described above. Reactivity of the antisera was assessed by indirect immunofluorescence assay (Mardassi *et al.*, 1994a) using IAF-Klop-infected MARC-145 cells. Antisera to GST-ORF5, GST-ORF6, and to unfused ORF7 product, were designated α 5, α 6, and α 7, respectively. A porcine hyperimmune serum raised against IAF-Klop isolate was used as positive control (Mardassi *et al.*, 1995).

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western immunoblotting

Supernatants of PRRSV-infected MARC-145 cells displaying 75% cytopathic effect (CPE) were clarified at 8,000g for 30 min, then extracellular virions were concentrated and purified by isopycnic ultracentrifugation on continuous 30 to 50% sucrose gradients prepared in TNE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA), as previously described (Dea *et al.*, 1989b). Replicas of virus proteins, separated by electrophoresis through 12% SDS-polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes, were also prepared as previously described (Mardassi *et al.*, 1994a). After saturation with 5% blotto (skim milk powder in 50 mM Tris-buffered saline (TBS) solution), nitrocellulose

membranes were incubated for 2 hr at room temperature with porcine convalescent anti-PRRSV serum, or rabbit antisera $\alpha 5$, $\alpha 6$, or $\alpha 7$, diluted 1:200 in blocking buffer. After washing in TBS containing 0.05% Tween 20, the membranes were further incubated in the presence of 1:1500 dilution of either alkaline phosphatase-conjugated anti-porcine or anti-rabbit IgG (Boehringer Mannheim) for 45 min. The immune complexes were revealed using a commercial alkaline phosphatase conjugate substrate kit (BIO-RAD) containing nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate in TBS.

Metabolic labeling of PRRSV proteins

Confluent monolayers of MARC-145 cells in 25 cm²-tissue culture flasks (Falcon) were infected with PRRSV at a m.o.i. of 1. At 24 hr post-infection (p.i.), infected cultures were rinsed twice with PBS and incubated in methionine-free DMEM for 1 h at 37°C. Following this starvation period, [³⁵S]methionine (sp activity of 1,120 Ci/mmol, Amersham Searle Co., Oakville, Ontario) was added at a final concentration of 100 μ Ci/ml. Incubation was continued for 2 hr, then cells were washed twice in cold PBS and solubilized in either LB-1 lysis buffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM Na EDTA, 1% Triton X-100, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mg/ml of aprotinin) or LB-2 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM PMSF, 1 μ g/ml of aprotinin). Wherever indicated, 20 mM *N*-ethylmaleimide (NEM) or 50 mM iodoacetamide (IAA) was added to PBS and lysis buffer. Cell lysates were clarified at 10,000g for 30 min and used for immunoprecipitation. Cell lysates from uninfected MARC-145 cells were prepared similarly in parallel. Alternatively, extracellular virions, from the supernatant of PRRSV-infected cultures isotopically-labeled for a period of 12 hr, were gradient-

purified, as described above. For pulse-chase analyses, infected cells were labeled for 15 min at 24 hr p.i with 300 $\mu\text{Ci/ml}$ of [^{35}S]methionine (pulse), then washed twice with DMEM containing 5 mM unlabeled methionine, and incubated thereafter in the same medium for different time periods (chase). Supernatants were removed at various intervals, and cells were washed and lysed, as described above. Extracellular virions released in the culture fluid of chased cells were pelleted by centrifugation at 100,000g for 2 hr, and virus proteins were finally solubilized in LB-2 lysis buffer prior to immunoprecipitation.

Subcellular localization of PRRSV proteins

MARC-145 cell monolayers were infected with PRRSV at a m.o.i. of 1. At 24 hr p.i, cells were isotopically labeled for 2 hr, as mentioned above. The monolayers were rinsed twice and scraped into PBS, and cells were pelleted by centrifugation at 8,000 X g for 5 min. Cell pellets were resuspended in a hypotonic buffer containing 20 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) at pH 7.4, 10 mM NaCl, and 1 mM MgCl_2 , and disrupted by passage 25 times through a 27-gauge hypodermic needle. The nuclear fraction was obtained by pelleting disrupted cells by centrifugation at 1,000 g for 5 min. The supernatant was recentrifuged at 30,000 g for 30 min to yield a microsomal fraction (pellet) and a cytosolic fraction (supernatant). All steps were performed at 4°C. The various fractions were adjusted to 1X in LB-1 lysis buffer, passed several times through a 27-gauge needle, and finally clarified before immunoprecipitation with a pool of $\alpha 5$, $\alpha 6$, and $\alpha 7$ antisera.

Immunoprecipitation of viral proteins and endoglycosidases treatment

Aliquots of PRRSV-labeled proteins from purified virus preparations or infected-cell lysates were adjusted with LB-1 or LB-2 lysis buffer to a final volume of 0.5 ml and incubated overnight at 4°C with 5 µl of the porcine anti-PRRSV hyperimmune serum or rabbit antisera to the recombinant viral proteins. The immune complexes were then adsorbed to protein A-Sepharose beads (Pharmacia), washed and dissolved in electrophoresis sample buffer in the presence or absence of 5% (v/v) β-mercaptoethanol (β-ME), as previously described (Dea and Tijssen, 1989). For treatments with endoglycosidases, immune complexes were resuspended in 200 µl of either Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase H (endo H) (Boehringer Mannheim) buffer (50 mM sodium acetate, pH 6, 2 mM PMSF, 1 µg/ml of aprotinin), Endoglycosidase F/*N*-Glycosidase F (glyco F) (Boehringer Mannheim) buffer (50 mM sodium acetate, pH 6, 10 mM EDTA, 1% (v/v) β-ME, 2 mM PMSF, 1 µg/ml of aprotinin), or Endo-β-Galactosidase (Endo β) (Boehringer Mannheim) buffer (50 mM sodium acetate, pH 5.8, 200 µg/ml bovine serum albumin, 2 mM PMSF, 1 µg/ml of aprotinin), and digested overnight at 37°C with 4, 200, and 3 mU of enzyme, respectively. After incubation, immunoprecipitates were washed in 20 mM Tris-HCl at pH 7.6, and analyzed by SDS-PAGE, as described above. Specific conditions for each immunoprecipitation experiment are detailed in the figure legends.

RESULTS

Identification of PRRSV ORFs 5, 6, and 7 encoded proteins and related products in virions and infected cells

To identify and analyse in detail the proteins specified by PRRSV ORFs 5, 6, and 7, their entire coding sequences were expressed in *E. coli* (Fig. 29) in order to raise monospecific antisera. The latter were first employed in immunoblotting and immunoprecipitation experiments to identify the products of ORFs 5 to 7 derived from virus-infected MARC-145 cells. Figure 30A shows the reactivity profiles of antisera $\alpha 5$, $\alpha 6$, and $\alpha 7$ when tested by western immunoblotting against sucrose gradient-purified disrupted virions. Antiserum $\alpha 5$ (anti-ORF5 product) reacted strongly with a protein species comigrating with the viral E protein, which was also recognized by the homologous porcine anti-PRRSV (αV) hyperimmune serum. Antiserum $\alpha 6$ (anti-ORF6 product), recognized a single protein which was indistinguishable from the authentic viral M protein. Finally, $\alpha 7$ antiserum detected principally a protein that corresponds to the viral N protein, together with a faster migrating product. The latter band appeared essentially when extracellular virus was analyzed, and thus may represent a degradation product of N. Although very minor bands could be detected by these antisera, they were not constantly apparent from one experiment to another, and thereby, could not be associated with specific reactions, considering that some of them were slightly reactive with most of the preimmune sera $p\alpha 5$, $p\alpha 6$ and $p\alpha 7$. These results indicate that PRRSV N, M, and E proteins are encoded by ORFs 7, 6, and 5, respectively, confirming what has been previously reported using antipeptide sera (Meulenberg *et al.*, 1995). The recognition patterns of $\alpha 5$, $\alpha 6$ and $\alpha 7$ antisera were also analyzed by radioimmunoprecipitation assay (RIPA) (Fig. 30B). When [^{35}S]methionine-labeled

purified virus was disrupted with a lysis buffer containing Triton X-100 as the only detergent (LB-1), antiserum $\alpha 5$ precipitated the E protein and substantial amount of M. Similarly, antiserum $\alpha 6$ precipitated both M and E proteins. The N protein, which was strongly precipitated by antiserum $\alpha 7$, was also apparent in the immunoprecipitates of $\alpha 5$ and $\alpha 6$ antisera. However, neither M nor E protein were precipitated by $\alpha 7$ antiserum. Under "more stringent" conditions, when detergents such as NP-40, SDS, and sodium deoxycholate were incorporated into the lysis buffer (LB-2), both M and E still coprecipitated, whereas N protein was no longer precipitated along with M and E from both extracellular virions (Fig. 30C) and infected cells (see Figs. 34A and C). The finding that PRRSV N protein was not precipitated by protein A-sepharose in the absence of any specific antiserum and using LB-1 lysis buffer (data not shown), suggests a specific interaction between PRRSV envelope proteins and the viral nucleocapsid. Collectively, these data show that the two major PRRSV envelope proteins are associated both in infected cells and in virions, despite the presence of several detergents.

PRRSV E protein incorporated into virions contains N-linked oligosaccharides of the high-mannose and complex types

To study the processing of PRRSV N, M, and E proteins, we first analyzed their sensitivity to various endoglycosidases. PRRSV proteins from purified [^{35}S]methionine-labeled virus were precipitated using a cocktail of $\alpha 5$, $\alpha 6$, and $\alpha 7$ antisera and digested with either endo H which cleaves high-mannose and hybrid oligosaccharides (Tarentino and Maley, 1974), or with glyco F which cleaves all N-linked oligosaccharides (Tarentino *et al.*, 1985). The presence of N-linked glycans modified by poly-N-acetyllactosamine was checked by digestion with endo- β -galactosidase (Scudder *et al.*, 1983). Despite the presence of potential N-linked

glycosylation sites, as predicted from their amino acid sequences, neither N nor M protein was sensitive to any endoglycosidase treatment, indicating that during the virus infection these proteins are not modified by addition of N-linked oligosaccharides. Unlike N and M, PRRSV E protein was completely sensitive to glyco F giving rise to a 16.5 kDa species (E_0) (Fig. 31, lane F). Interestingly, treatment with endo H resulted in the appearance of a new 21 kDa species (E_1), while E protein was still present, but in lesser amounts (Fig. 31, lane H). In contrast, the E protein was completely resistant to treatment with endo- β -galactosidase (Fig. 31, lane B). No degradation could be observed in the case of untreated proteins which have been processed similarly but without addition of endoglycosidases (Fig. 31, lane M). Both E_0 and E_1 were obtained in other independent experiments, and thus, represent truly digested products. A similar digestion pattern was obtained for N, M, and E proteins analyzed from cell lysates (data not shown). These results confirm that among PRRSV N, M, and E proteins, only the membrane-associated E protein is glycosylated. If we assume that acquisition of one N-linked carbohydrate side chain results in approximately 2.6 kDa increase in the molecular weight (MW) of a given protein (Bergman and Kuehl, 1982), the 8 kDa difference in the apparent MW of the undigested and Glyco F-treated E proteins (E vs E_0), suggests that *in vivo*, each one of the three potential N-linked glycosylation sites predicted from the IAF-Klop amino acid sequence (data not shown) bears an N-glycan moiety. Unexpectedly, aside from the presence of complex N-glycans, a considerable amount of E protein incorporated into virions contains N-linked oligosaccharides of the high-mannose type. The fact that after digestion with endo H, substantial amount of endo H-resistant form of E was still present, and that after glyco F treatment all the protein was converted into a single species (E_0), suggests that some E molecules may contain both types of N-linked oligosaccharides,

whereas others contain only oligosaccharides which have been completely processed to complex type in the Golgi apparatus. Indeed, if all E molecules contained the two types of N-linked oligosaccharides, endo H treatment would have resulted in the complete conversion of E to E₁ species. In the case of molecules modified by both types of N-linked oligosaccharides, the reduction in the apparent MW of E after endo H treatment, which is about 3.5 kDa, correlates with the complete removal of one oligosaccharide side chain.

Intracellular processing of PRRSV N, M, and E proteins

Pulse-chase experiments were performed to examine in greater detail the processing of N, M, and E proteins. At 24 hr p.i, PRRSV-infected MARC-145 cells were pulse-labeled with [³⁵S]methionine for 15 min and processing of intracellular and extracellular viral proteins was monitored during a chase period that varied from 15 to 240 min. Viral proteins were solubilized from extracellular virions or infected cell lysates, and analyzed by RIPA using a cocktail of α 5, α 6, and α 7 monospecific antisera, as described in materials and methods. The immunoprecipitation pattern of intracellular N, M and E proteins is illustrated in Fig. 32. At zero min of chase (following pulse), the three major viral proteins were efficiently precipitated and migrated in the gel with the expected mobility, except for E which appeared to be first synthesized as a 26 kDa protein which represents an increase of its MW of approximately 1.5 kDa. A gradual shift to faster mobility of this protein was then observed after 15 to 30 min of chase, its final MW of 24.5 kDa being obtained after 60 min of chase. No further change in E mobility was noticed until 240 min of chase, time at which the intensity of this protein dramatically decreased (Fig. 32A). Resistance of E to treatment with endo H, a property which indicates that proteins have reached the medial Golgi

compartments (Dunphy and Rothman, 1985), was evident after 60 min of chase (Fig. 32B). Indeed, when immunoprecipitates were subjected to endo H digestion, E was fully sensitive and completely reduced to its E₀ precursor form from zero to 30 min of chase, indicating that it still resides in the ER wherein trimming reactions are known to begin (Kornfeld and Kornfeld, 1985). After 60 min of chase, resistance to endo H was readily observed and was manifested by the appearance of the completely resistant form E and the partially sensitive form E₁ that have been previously identified in purified virions. After 240 min of chase, the intensity of both E and E₁ forms declined, in accordance with the pattern observed when immunoprecipitates were not digested with endo H. In the case of N and M proteins, their apparent MW, as well as their intensity, were practically unchanged during the whole chase period (Fig. 32A). These proteins were resistant to digestion with endo H during the entire chase period (Fig. 32B), confirming the results obtained with purified virions. In addition, M protein seemed to be synthesized at a higher amount than E provided that $\alpha 5$ and $\alpha 6$ were equally efficient in precipitating the corresponding proteins. Finally, when RIPA was performed with the extracellular virions of chased cells, N, M, and E proteins were precipitated all together after 60 min, time at which the intracellular form of E protein has reached its mature MW (Fig. 32A vs 32B).

In virions, PRRSV M and E proteins occurred essentially in a heterodimeric form

Previous studies with LDV and EAV have revealed that their two putative membrane-associated proteins are linked via disulfide bonds; the cysteine residues which may be involved in this linkage were found to be conserved at the amino termini of all arteriviruses membrane proteins (De Vries *et al.*, 1995b; Faaberg and

Plagemann, 1995). To seek for the presence of disulfide bonds between the two envelope proteins of PRRSV, gradient-purified [^{35}S]-methionine labeled extracellular virions were precipitated using the rabbit monospecific antisera, then finally analyzed by SDS-PAGE under reducing and nonreducing conditions. Fig. 33A shows once again, that in the presence of the reducing agent β -mercaptoethanol, both M and E are coprecipitated using either $\alpha 5$ or $\alpha 6$ antiserum. Under nonreducing conditions, M and E proteins were no longer apparent, and two new bands corresponding approximately to 40 and 87 kDa polypeptide species were precipitated using both antisera. In the case of $\alpha 7$ antiserum, a predominant protein of 29 kDa and a protein species migrating slightly slower than the authentic viral N protein were recognized in the absence of β -ME. The 29 kDa species was also present in the immunoprecipitates obtained with $\alpha 5$ and $\alpha 6$ antisera presumably as a result of N protein coprecipitation. It is likely that the 40 and 87 kDa proteins represent heterooligomers of M and E proteins. To confirm this assumption, we took advantage of the fact that in western immunoblotting assay, each monospecific antiserum recognizes only its homologous gene product. If indeed in western immunoblotting assay under nonreducing conditions, both $\alpha 5$ and $\alpha 6$ antisera recognize simultaneously the 40 and 87 kDa proteins, this would indicate that these species are complexes of M and E proteins. Effectively, when PRRSV proteins were electrophoresed without β -ME, transferred to nitrocellulose, and reacted with either $\alpha 5$ or $\alpha 6$ antiserum, two proteins with a migration pattern similar to the 40 and 87 kDa protein species were strongly recognized by both antisera (Fig. 33B). Taken together, the data obtained suggest that in PRRSV virions, M and E proteins are associated via disulfide bonds giving rise to two heterooligomeric forms of 40 and 87 kDa. On the basis of their apparent MW, the 40 kDa protein may represent a heterodimer of M and E (M-E), whereas the slower

migrating band of 87 kDa probably resulted from the association of two or three M-E heterodimers. Under nonreducing conditions, no homodimers of M or E proteins could be observed in virions. On the other hand, the N protein incorporated into virions was principally revealed as a 29 kDa species both in RIPA (Fig. 33A) and Western immunoblotting (data not shown), which likely represents a disulfide-linked homodimer of N.

PRRSV M and E proteins are recruited into heterodimeric complexes with different kinetics and efficiencies

Oligomerization of PRRSV M and E proteins was next investigated in the infected cells by analyzing the mobility shifts of pulse-labeled, chased, and *in situ* alkylated proteins. Radiolabeled PRRSV-infected cells were washed and lysed in presence of 20 mM NEM to prevent the formation of non-native disulfide bonds during or after cell lysis (Braakman *et al.*, 1992; De Vries *et al.*, 1995a). Proteins were precipitated from cell lysates using either $\alpha 5$ or $\alpha 6$ antiserum. Under reducing conditions, both M and E coprecipitated using either $\alpha 5$ (Fig. 34A) or $\alpha 6$ (Fig. 34C) antiserum. This coprecipitation was apparent upon the pulse period, and once again involved all E protein intermediates which varied in their molecular weight (from 0 to 60 min of chase). As mentioned earlier, since proteins were disrupted with LB-2 lysis buffer which provides more stringent conditions for protein dissociation, the N protein was no longer precipitated with M and E following incubation with $\alpha 5$ or $\alpha 6$ antiserum. In the case where precipitation was performed using $\alpha 5$ antiserum and analyzed under nonreducing conditions (Fig. 34B), M-E complexes were consistently apparent upon the pulse period, indicating that association of M and E via disulfide bonds occurred very shortly after their synthesis. After only 15 min of chase, practically most of the E monomers were

incorporated into M-E complexes. The monomeric M protein was only coprecipitated when a fraction of E monomers was still present (Fig. 34B, lane 0), which would mean that M-E complexes are highly stable. During the chase period, M-E heterodimers accumulated in infected cells being still present at considerable amounts after 240 min. Precipitation of proteins with $\alpha 6$ antiserum revealed two striking features. First, unlike E, M protein was recruited much slower into M-E complexes and remains association competent during the whole period of chase. Second, antiserum $\alpha 6$ precipitated a protein, which on the basis of its MW is considered as a disulfide-linked dimer of M (M-M). These two features of PRRSV M protein, have been previously identified for EAV M protein (De Vries *et al.*, 1995a). Finally, though abundantly precipitated from virions, neither the 87 kDa protein (Figs. 34B and D) nor the 29 kDa protein (data not shown) was precipitated from cell lysates that have been prepared in the presence of 20 mM of the alkylating agent NEM. Therefore, we concluded that the latter proteins were generated by the formation of aberrant disulfide bonds which could be prevented by alkylation of free sulfhydryl groups during preparation of cell lysates. Collectively, these data indicate that oligomerization of PRRSV M and E proteins in infected cells resulted in the formation of heterodimers very shortly after their synthesis, and that unlike M, newly synthesised E protein molecules are rapidly and more efficiently recruited into M-E complexes.

PRRSV M protein associates to E regardless of its glycosylation state

Data obtained from pulse-chase experiments suggested that the oligomerization process of E and M is probably independent of the glycosylation state of the E protein and that the two mechanisms operate simultaneously. To confirm such assumptions, M and E were precipitated from cell lysates of the above

pulse-chase experiment, using a pool of $\alpha 5$ and $\alpha 6$ antisera, treated or untreated with endo H and analyzed by SDS-PAGE under nonreducing conditions. In the absence of endo H treatment, M-E complexes were precipitated (Fig. 35A) as well as the monomeric forms of M and E. Once treated with endo H, three additional protein bands could be observed (Fig. 35B). Because their kinetics of appearance mimic that of E₀, E₁, and E proteins, we assumed that these species represent differentially glycosylated M-E complexes corresponding to M-E₀, M-E₁, and M-E heterodimers. Therefore, the data obtained are more consistent with the view that M-E heterodimers formation precedes oligosaccharide modification.

Intracellular localization of PRRSV major structural proteins

The finding that in PRRSV-infected cells M-E heterodimers formation occurs shortly after their synthesis, and presumably prior to oligosaccharide modifications of E, suggests that M protein accumulates in the ER and interacts herein with E. The fluorescence patterns obtained following incubation of PRRSV-infected cells with $\alpha 6$ and $\alpha 5$ antisera, although not identical, revealed a perinuclear fluorescence which is characteristic of proteins that localize in the ER (Figs. 36B and C, respectively). On the other hand, fluorescence associated with N as probed by $\alpha 7$ antiserum was cytoplasmic and diffuse, being more intense near the perinuclear region (Fig. 36A). Moreover, data obtained following cell fractionation experiments showed that the bulk of M and E proteins fractionated with microsomal membranes, whereas N was essentially found in the cytosolic fraction (data not shown). Treatment of the microsomal fraction with a high salt buffer (0.5 M NaCl, 10 mM EDTA) did not result in the solubilization of neither E nor M (data not shown), indicating that these two proteins are not loosely associated to membranes

but represent true integral membrane proteins as predicted from their amino acid sequence.

DISCUSSION

In the present study, monospecific antisera raised against *E. coli*-expressed ORFs 5, 6 and 7 products were used to investigate the synthesis, processing, interactions, and transport of the major structural proteins of PRRSV propagated in the highly permissive MARC-145 cell line. The polypeptide specificities of the various monospecific antisera was confirmed by western immunoblotting and RIPA. In agreement with previous findings (Nelson *et al.*, 1993; Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1995), three major viral structural proteins, with apparent MW of 15, 19 and 24.5 kDa, could be identified from purified virus preparations using convalescent anti-PRRSV sera. Virus fractionation experiments with the Lelystad virus (LV), the prototype european strain of PRRSV, demonstrated that these proteins correspond respectively to the nucleocapsid protein N, the unglycosylated membrane protein M, and the glycosylated membrane protein E (Meulenberg *et al.*, 1995). As expected, the $\alpha 5$, $\alpha 6$, and $\alpha 7$ monospecific antisera reacted specifically with the E, M, and N proteins, in agreement with earlier findings on the coding assignments of ORFs 5 to 7 of the PRRSV genome (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1995). Although in the case of EAV a minor envelope protein (G_S) has been identified as an additional structural component (De Vries *et al.*, 1992), such polypeptide species from purified virus could not be identified in the case of PRRSV. The possibility that the presence of small amounts of a G_S-like protein could be missed, since no specific antiserum was available, cannot be ruled out. Similarly, three major viral proteins, within the same size range as those of EAV, have been also identified for LDV, but the presence of a counterpart to the EAV G_S protein incorporated into virions, has not been unequivocally demonstrated (Faaberg and Plagemann, 1995; Faaberg *et al.*, 1995).

Among the three major PRRSV structural proteins, only E was modified by asparagine-linked oligosaccharides. Processing of PRRSV E protein N-linked glycans resulted in two stable forms, a heterogeneously glycosylated form, bearing complex type glycans as well as high-mannose oligosaccharides, and a second form containing only complex type carbohydrates. These two forms were shown to occur both in cells and in virions, the heterogeneous form being present at higher amounts. These results substantiate previous findings reported with LV (Meulenber *et al.*, 1995). The apparent size of LV E protein propagated in the CL2621 cell line (also derived from the MA104 cell line) decreased about 1 kDa when virions were treated with Endo H, whereas in the case of IAF-Klop strain such treatment resulted in a molecular weight reduction of about 3.5 kDa. Thus, unlike LV, data obtained following endo H treatment of IAF-Klop E protein incorporated into virions correlate with the removal of a complete oligosaccharide side chain bearing endo H sensitive N-glycan moiety. Therefore, oligosaccharide side chains processing of IAF-Klop E molecules seems to be incomplete which is consistent with the slow transport of this protein in the pre-medial Golgi compartment comparatively to its equivalent in EAV (De Vries *et al.*, 1992; De Vries *et al.*, 1995a). Indeed, consistent acquisition of endo H-resistant material occurred after a chase of 30 min in the case of E, but only after a pulse labeling of 15 min for G_L. The retardation of E in a pre-medial Golgi compartment is accompanied by a marked gradual decrease in its molecular weight which likely results from a very slow trimming process of the mannose-rich carbohydrate chains. In comparison to the hemagglutinin protein of influenza virus, for which trimming is accomplished after only 10 min of chase (Copeland *et al.*, 1986), this phenomenon is particularly slow in the case of PRRSV E protein, considering the longer pulse labeling time

used in our experiment. It remains to be demonstrated whether the slow processing of E protein carbohydrates is cell-type specific, the natural host of PRRSV being porcine alveolar macrophages.

Early steps in the maturation of E protein may lead to its slow processing within the ER. In this compartment, a "quality control" system ensures that transport is restricted to properly folded and assembled proteins (Doms *et al.*, 1993; Gething and Sambrook, 1992; Hurlley and Helenius, 1989; Pelham, 1989). The lumen of the ER contains a variety of enzymes and molecular chaperones which participate in the folding and oligomeric assembly of proteins (Gething and Sambrook, 1992).

Glycosylation is one of the most common modification that occurs in the ER. It has been demonstrated that trimming of high mannose units, which results in the removal of the three terminal glucose residues, is necessary for the efficient transport of proteins from the ER to the Golgi complex (Lodish and Kong, 1984). It has been also speculated that removal of glucose confers a mature functional conformation to proteins that allows their transport (Schlesinger *et al.*, 1984; Kornfeld and Kornfeld, 1985; Hammond *et al.*, 1994). The finding that E displays essentially endo H resistance only after complete maturation, strongly suggests that its transport to the medial Golgi requires the protein to be properly folded. Since the carbohydrate trimming process is known to begin in the ER and to continue in the proximal cisternae of the Golgi complex (Kornfeld and Kornfeld, 1985), we assume that PRRSV E protein is retarded during its transit in these compartments due to a slow trimming process. Furthermore, because release of virions, as shown by concomitant precipitation of the three PRRSV structural proteins, occurs

predominantly and rapidly when complete trimming has been achieved (one hour-chase), elements between the ER and the medial Golgi may represent the maturation site for PRRSV virions. These molecular data are in agreement with previous electron microscopy studies on PRRSV maturation that has been performed using either MARC-145 cells (Dea *et al.*, 1995), or porcine alveolar macrophages (Pol and Wagenaar, 1992). In both types of cells, budding and accumulation of enveloped virus particles could only be observed within smooth-walled vesicles of the ER and Golgi apparatus.

The association of M and E proteins and their incorporation into virions in the form of disulfide-linked heterodimers, may suggest that they are present in virus particles in equimolar amounts. This assumption is substantiated by the fact that no residual monomeric forms of either M or E were present in radioimmunoprecipitation and western immunoblotting profiles analyzed under nonreducing conditions. This has been previously demonstrated with EAV where roughly equal amounts of M and G_L were found on virions (De Vries *et al.*, 1992). Pulse-chase experiments showed that E is rapidly and efficiently incorporated into M-E complexes, whereas the M protein engages into these complexes at a slower rate. Such behaviour which has been previously demonstrated for the two envelope proteins of EAV (De Vries *et al.*, 1995a) is consistent with the view that M, being synthesized at higher amounts than E, tends to accumulate at the site of oligomerization and interacts with newly synthesized E molecules.

A tendency of M protein to fold into disulfide-linked dimers in cells but not in virions was also demonstrated in the present study. In the case of EAV, it has been speculated that such dimers may act as intermediates for the formation of M-E

complexes, or may simply represent dead-end products (De Vries *et al.*, 1995b). In contrast to EAV M complexes, PRRSV M homodimers declined over an extended period of chase, and displayed a similar kinetics pattern as M monomers. We do not know whether the fading out of M-M dimers is due to their conversion into M-E complexes or whether they are subjected to intracellular degradation.

Although most of the data accumulated so far converged for a pre-Golgi budding site for PRRSV as well as for the other arteriviruses (Dea *et al.*, 1995; Magnusson *et al.*, 1970; Plagemann and Moennig, 1992; Pol and Wagenaar, 1992; Snijder *et al.*, 1993), it is still premature to define a precise role for the envelope protein complexes in the virus assembly and budding processes. The data obtained in the present study suggest that the interaction between M and E precedes budding, but we cannot yet exclude that virus assembly occurs synchronously with formation of M-E complexes. However, in light of the present data and those previously reported, a general scenario for the synthesis, assembly and budding of PRRSV virions may be anticipated. We assume that assembly of virions may start at the ER where M and E are linked via disulfide bonds, then interact with N that has already accumulated in the cytosol at essentially the perinuclear region, as shown by indirect immunofluorescence. Thereafter, vesicles containing enveloped nucleocapsids are derived from the ER and transported until the pre-medial or medial Golgi where budding takes place and some E molecules undergo terminal glycosylation, probably due to their relative proximity with the medial Golgi environment. At the end of its transit from the ER to the Golgi or proximal elements, E protein acquires its mature structure which seems to greatly influence the onset of virus release shown to occur by exocytosis (Pol and Wagenaar, 1992).

FIGURE 29: Analyse par SDS-PAGE (10%) des produits d'expression dans *E. coli* des ORFs 5, 6 et 7 de la souche IAF-Klop du virus du SRRP.

La séquence codante de chacun des ORFs 5 et 6 fut exprimée par le biais du vecteur procaryotique pGEX-4T1 (Pharmacia), alors que dans le cas de l'ORF 7, le vecteur pMAL-c2 (New England Biolabs) fut utilisé. Les lignes 2 et 4 représentent respectivement les produits d'expression des ORFs 5 et 6 (fusionnés à la protéine GST), analysés à partir d'un lysat cellulaire total. La ligne 3 contient le produit d'expression du vecteur pGEX-4T1 non recombinant, et enfin dans la ligne 5 se trouve le produit d'expression de l'ORF 7 (fusionné à la protéine MBP) purifié par affinité sur colonne d'amylose. Le marqueur de poids moléculaire est inclus dans la ligne 1.

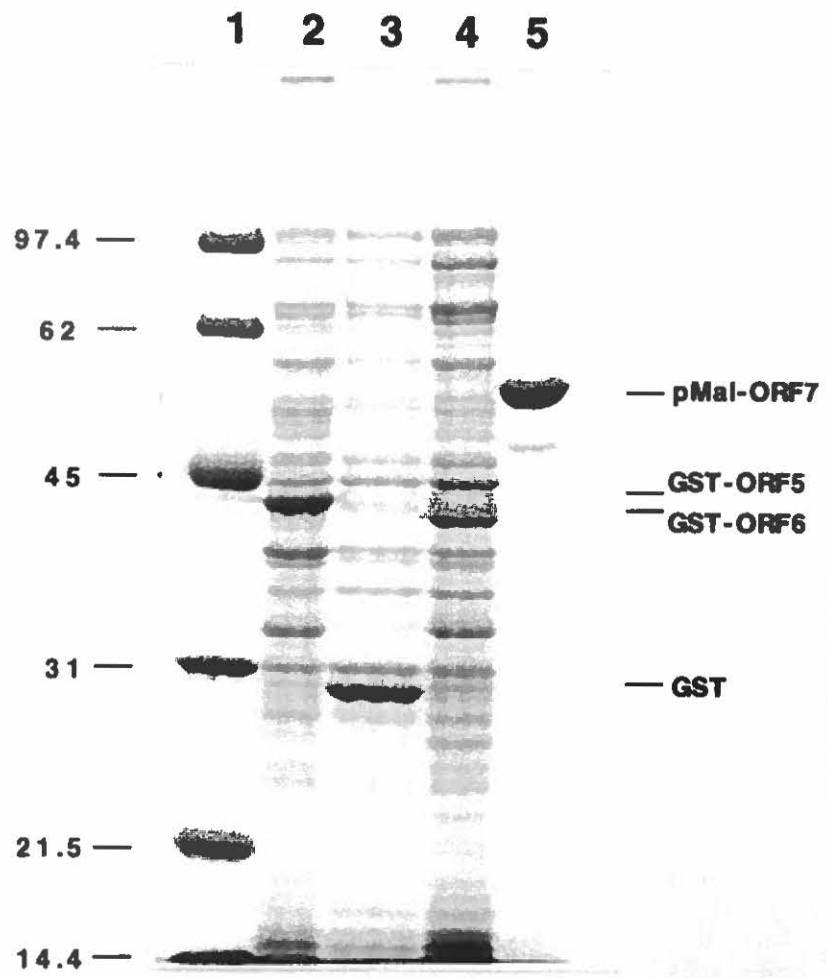


FIGURE 30: Identification of proteins encoded by PRRSV ORFs 5, 6, and 7 in purified viral preparations.

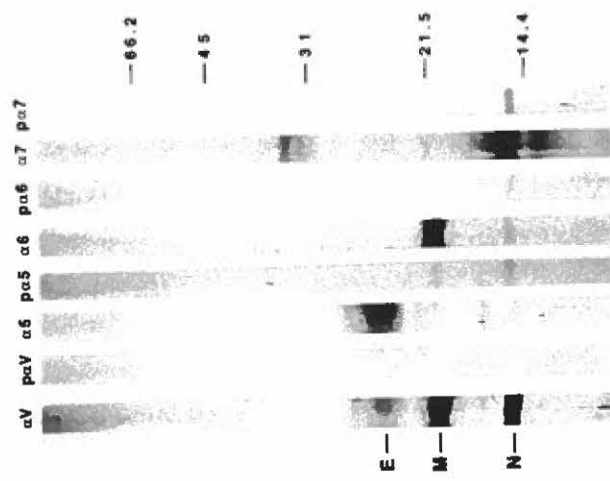
(A) Reactivity of monospecific antisera $\alpha 5$, $\alpha 6$, and $\alpha 7$ were first analyzed by western immunoblotting assay. Proteins from sucrose-gradient purified virus were separated in denaturing 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. Strips of nitrocellulose were probed with either $\alpha 5$, $\alpha 6$, or $\alpha 7$ monospecific antiserum or their corresponding pre-serum collected prior to immunization ($p\alpha 5$, $p\alpha 6$, or $p\alpha 7$, respectively). As controls, nitrocellulose strips were reacted with an hyperimmune porcine anti-PRRSV serum (αV) or its pre-serum ($p\alpha V$). With $\alpha 7$ antiserum, two closely migrating bands with apparent MW slightly above 30 kDa were not constantly revealed and should be considered as non specific.

(B) Gel analysis of PRRSV proteins immunoprecipitated from lysates of [^{35}S]methionine-labeled and sucrose gradient-purified virus. Viral proteins were solubilized with LB-1 lysis buffer containing 1% Triton X-100 followed by immunoprecipitation with αV , $\alpha 5$, $\alpha 6$, or $\alpha 7$ antiserum.

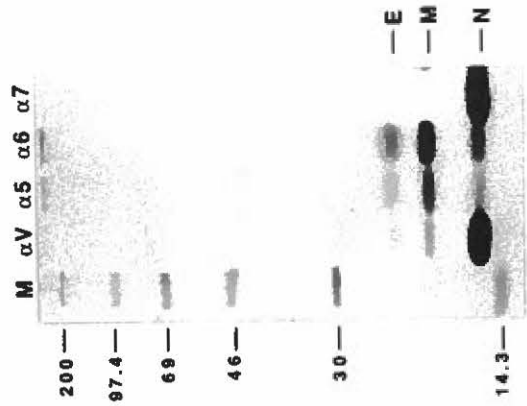
(C) Similar as B, except that LB-2 lysis buffer was used to solubilize viral proteins. Under these conditions, the N protein was no longer coprecipitated with E and M using either $\alpha 5$ or $\alpha 6$ antiserum.

The MW of [^{14}C]methylated size marker protein bands (lane M) are to the left of gels B and C, and positions of the three PRRSV major structural proteins N, M, and E, are indicated in the left of gel A and in the right of gels B and C.

A



B



C

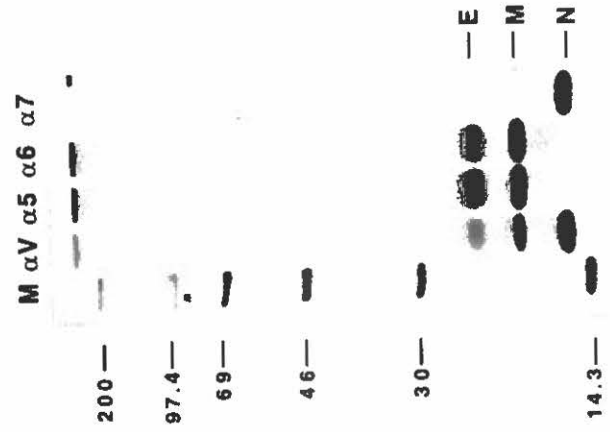


FIGURE31: Identification of PRRSV glycosylated proteins.

PRRSV was labeled with [^{35}S]methionine and purified on sucrose gradient. Viral proteins were precipitated with a pool of $\alpha 5$, $\alpha 6$, and $\alpha 7$ antisera, treated overnight at 37°C with endo H (lane H), glyco F (lane F), endo β (lane B), or mock-treated (lane M), and finally analyzed by SDS-PAGE (12%) under reducing conditions. The glyco F-fully digested (E_0) and endo H-partially resistant (E_1) forms of E protein are indicated in the left margin, and the three major viral structural proteins N, M, and E are to the right. The various enzymatic treatments did not affect the electrophoretic mobilities of both N and M proteins.

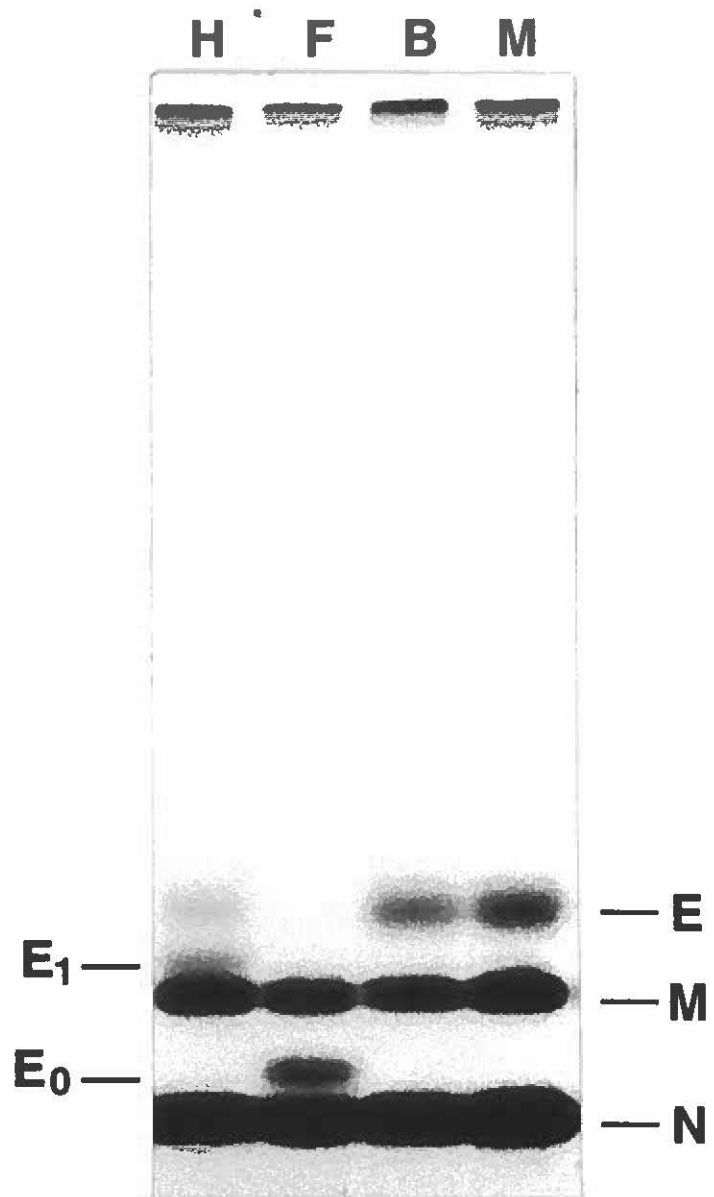
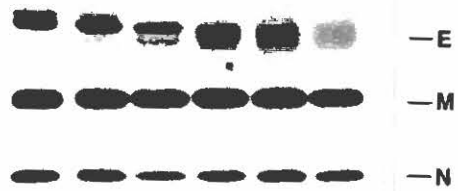


FIGURE 32: Processing of PRRSV N, M, and E proteins.

IAF-Klop-infected MARC-145 cells were labeled with 300 $\mu\text{Ci/ml}$ of [^{35}S]methionine at 24 hr p.i for 15 min (0) and chased for various times (15, 30, 60, 120, and 240 min). Labeled proteins were solubilized from cells with a combination of ionic and nonionic detergents (LB-2 lysis buffer) and subjected to radioimmunoprecipitation with a pool of $\alpha 5$, $\alpha 6$, and $\alpha 7$ antisera. Immunoprecipitates were split in two equal portions and analyzed by SDS-PAGE without prior treatment (A) or after being treated with endo H (B). Released virions derived from each of the above labeling time periods were collected from supernatants upon a centrifugation of 100,000g. Proteins from extracellular virus were immunoprecipitated with a cocktail of $\alpha 5$, $\alpha 6$, and $\alpha 7$ antisera and analyzed by reducing SDS-PAGE (12%) (C). PRRSV E, M, and N proteins as well as the endo H-sensitive (E_0) and endo H-partially resistant (E_1) forms of E are indicated on the right.

A

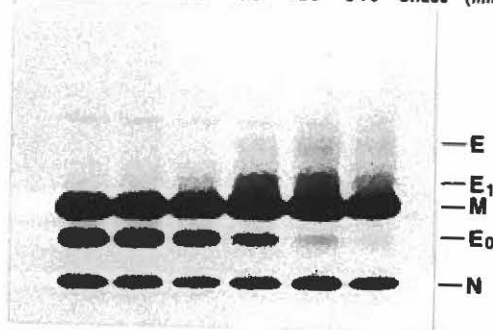
0 15 30 60 120 240 Chase (min)



Cells - endo H

B

0 15 30 60 120 240 Chase (min)



Cells + endo H

C

0 15 30 60 120 240 Chase (min)



Supernatant

FIGURE 33: Interactions between PRRSV envelope proteins via disulfide bonds.

(A) Analysis of immunoprecipitated viral proteins under reducing and nonreducing conditions. Proteins from sucrose gradient-purified virus were immunoprecipitated with either anti-E ($\alpha 5$), anti-M ($\alpha 6$), or anti-N ($\alpha 7$) antiserum, and analyzed by 12% SDS-PAGE under reducing (RC) or nonreducing conditions (NRC). The new protein bands that arose only under nonreducing conditions are indicated on the right. The protein band of high intensity on top of the nonreducing gel precipitated by $\alpha 5$ and $\alpha 6$ antisera, may represent large aggregates of proteins. The complex of proteins precipitated by $\alpha 7$ antiserum which appears in the bottom of the gel, may result from a degradation process, and should not be considered as the nonreduced form of N protein. Indeed, when intracellular N protein was precipitated with $\alpha 7$ antiserum and analyzed under nonreducing conditions, it migrated slightly faster than its reduced form (data not shown).

(B) Identification of disulfide-bonded M-E complexes by western immunoblotting assay. PRRSV proteins from sucrose gradient-purified virus were resolved by reducing (RC) or nonreducing (NRC) 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and finally stained with either $\alpha 5$ or $\alpha 6$ antiserum. Note that in nonreducing conditions, both p40 and p87 (indicated on the right) were recognized simultaneously by $\alpha 5$ and $\alpha 6$ antisera confirming that they represent complexes of M and E proteins. In addition, no residual monomers of M and E proteins could be observed either in radioimmunoprecipitation or in western immunoblotting profiles. Monomers of E, M, and N are indicated on the left margin of gels A and B.

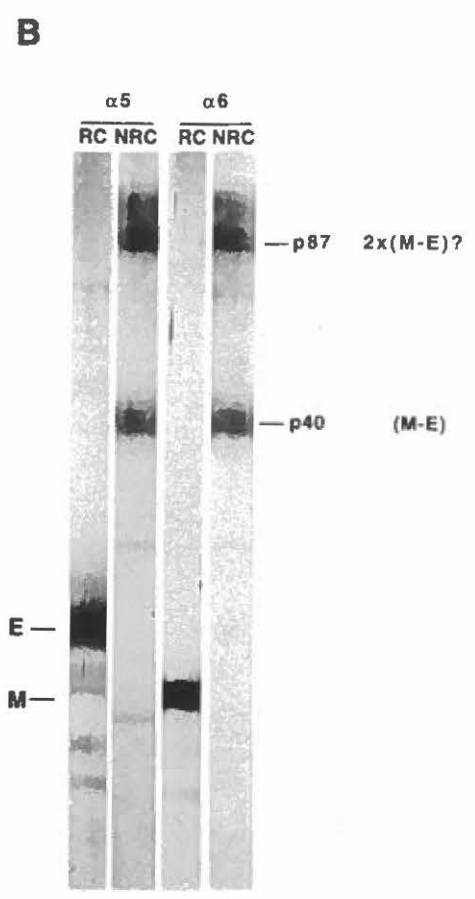
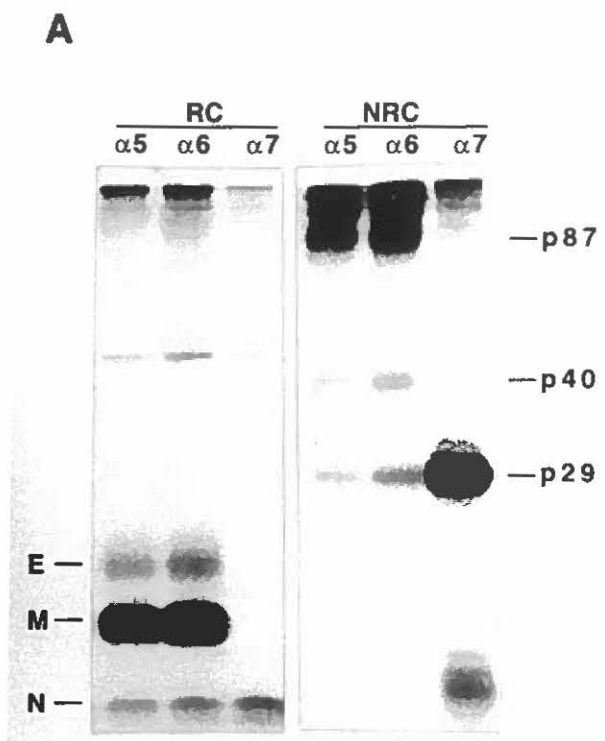


FIGURE 34: Kinetics of PRRSV envelope proteins interactions.

IAF-Klop-infected MARC-145 cells were pulse-labeled and chased as described in the legend to Fig. 32. After each labeling period, cells were washed twice in pre-chilled PBS containing 20 mM NEM to prevent further rearrangement of disulfide bonds. Thereafter, cells were solubilized in LB-2 lysis buffer which also contained 20 mM NEM and proteins were immunoprecipitated with either anti-E (**A** and **B**) or anti-M (**C** and **D**) serum. Immunoprecipitates were finally analyzed in 12% SDS-polyacrylamide gels under reducing (**A** and **C**) or nonreducing (**B** and **D**) conditions. In presence of NEM, a faint band migrating closely with M-E complexes was generated. An additional band of approximately 35 kDa was particularly apparent in the immunoprecipitates of anti-M serum that was analyzed under nonreducing conditions (**D**). Given its apparent MW and its recognition by anti-M serum, this protein band may represent a homodimer of M protein. M and E proteins in their monomeric form or as disulfide-linked complexes are indicated on the right. Molecular sizes (in kDa) are given on the left.

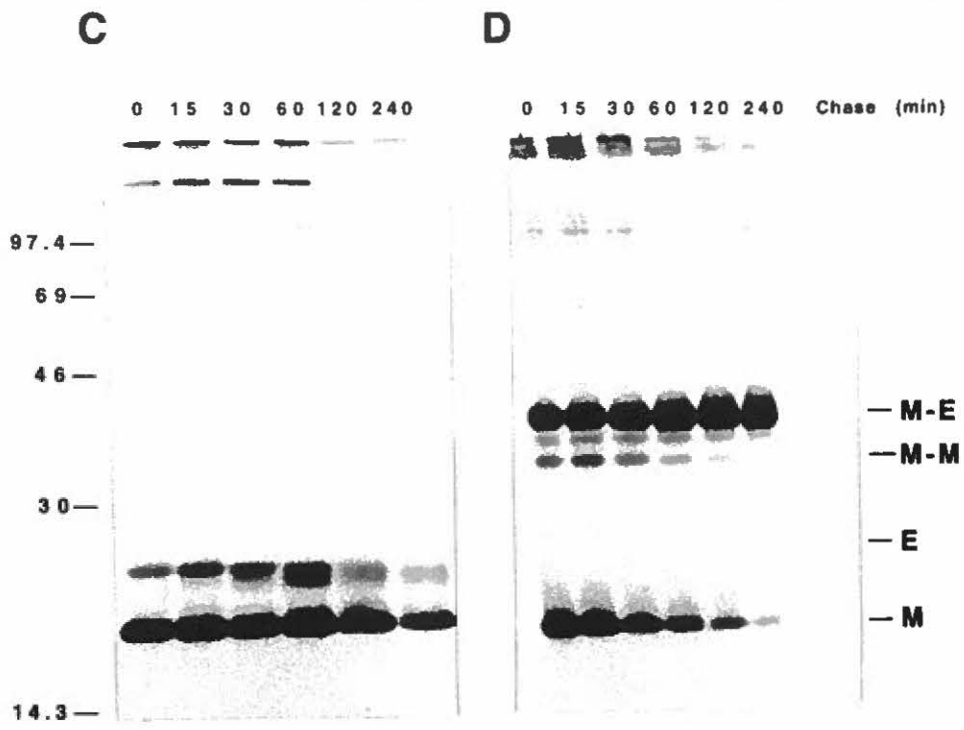
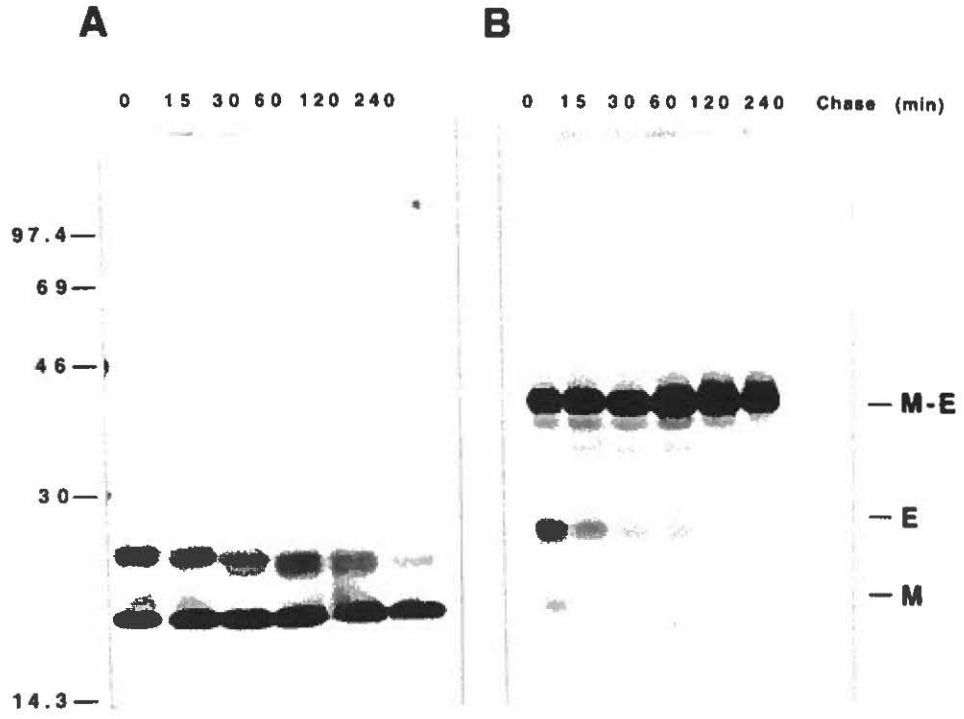


FIGURE 35: Intracellular transport of PRRSV M-E complexes.

Intracellular PRRSV proteins were labeled with [³⁵S]methionine and solubilized as described in the legend to Fig. 32. A pool of anti-E and anti-M monospecific sera was used to immunoprecipitate the M-E complexes which were split in equal portions. One aliquot was treated with endo H (+ endo H) (**B**), and the other was left untreated (- endo H) (**A**) prior to analysis by 12% nonreducing SDS-PAGE. Heterodimers of M and E, as well as their monomeric forms, are shown on the left. The endo H-sensitive (M-E₀), endo H-partially resistant (M-E₁), and endo H-resistant (M-E) forms of M-E complexes are indicated by dashes on the right.

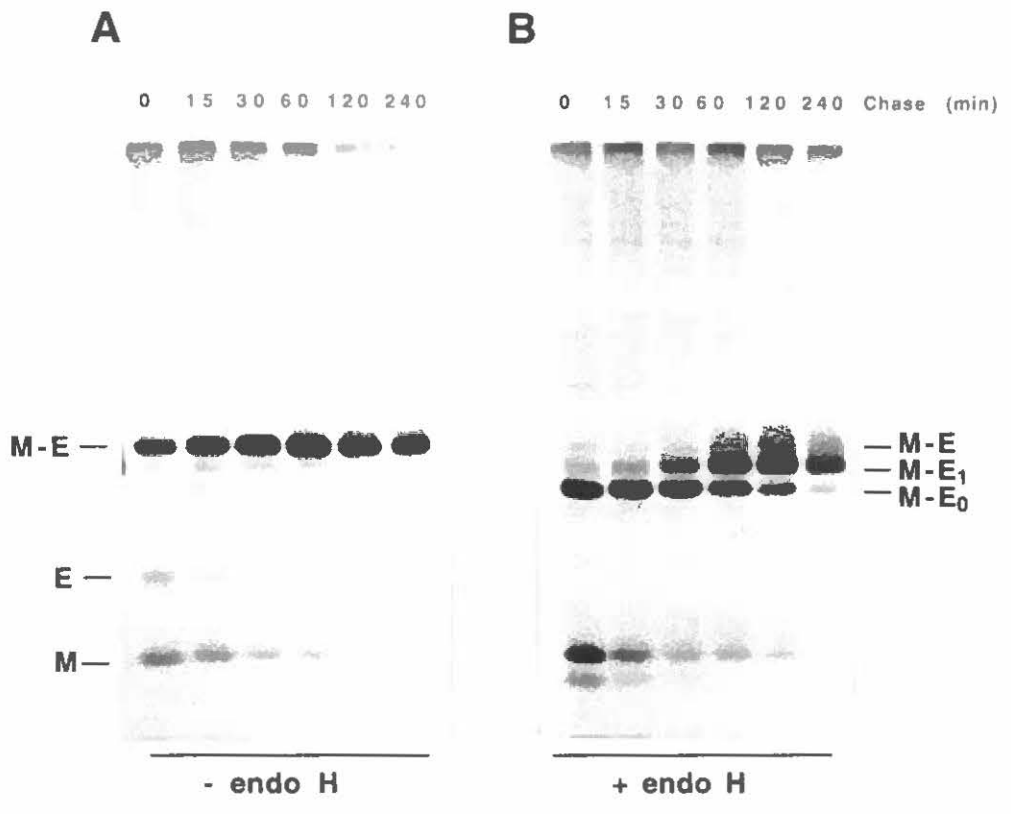
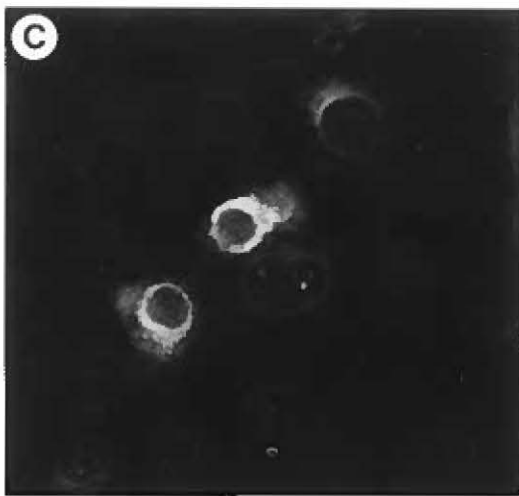
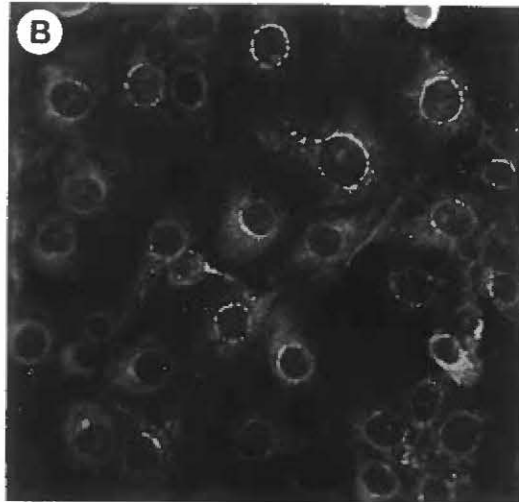
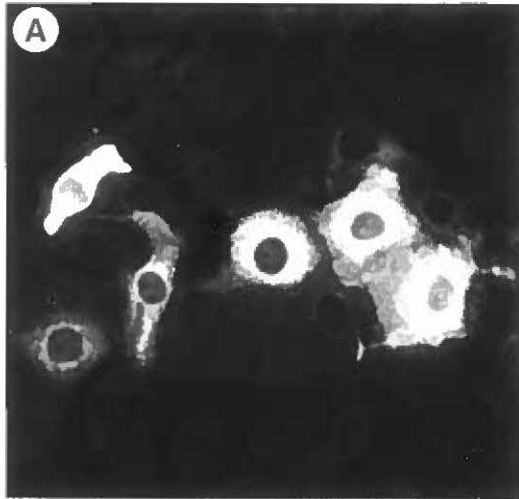


FIGURE 36: Intracellular localization of the E, M, and N proteins in PRRSV-infected MARC-145 cells as revealed by indirect immunofluorescence.

MARC-145 monolayers were infected with IAF-Klop strain at a m.o.i. of 1 and fixed at 24 hr p.i, as described in materials and methods. They were then stained with either anti-N (A), anti-M (B), or anti-E (C) serum. Note the distribution pattern of E and M proteins which tend to accumulate essentially at the perinuclear area, whereas N is mainly cytosolic.



**PARTIE III:
DISCUSSION GÉNÉRALE**

Tel que mentionné lors de l'introduction générale, le présent travail fut entrepris dans le but ultime de fournir suffisamment de données moléculaires afin d'orienter au mieux les études sur l'immunobiologie des protéines structurales du virus du SRRP, et permettre enfin de concevoir la meilleure stratégie de vaccination. L'étape cruciale d'un tel projet, consiste tout d'abord à identifier ces composantes structurales ainsi que leur(s) région(s) codante(s) respective(s). La réalisation de cette étape nous a doté d'outils précieux pour l'étude détaillée de la nature des protéines structurales du virus. Cette dernière partie du projet nous a effectivement permis de dégager plusieurs propriétés ayant des implications d'une part au niveau du cycle de multiplication du virus, et d'autre part au niveau de la rationalisation de la stratégie à entreprendre en vue de développer un moyen efficace de lutte contre sa propagation.

Les différents travaux de cette thèse ayant été discutés à part dans chacun des articles, nous reprendrons au cours de cette discussion générale l'ensemble de nos résultats de façon globale tout en rapportant certains éléments qui ne figurent pas nécessairement dans les publications. Toutefois, pour fin de clarté, cette discussion fut subdivisée en cinq points en référence aux objectifs préalablement fixés.

A- ANALYSE SÉROLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE D'ISOLATS QUÉBÉCOIS ASSOCIÉS AU SRRP.

Étant donné l'identification très récente du virus du SRRP, il était au départ nécessaire de procéder à la caractérisation générale des souches en notre

possession et ce, afin de pouvoir identifier notre matériel de départ et se situer par rapport aux autres laboratoires du monde. Cette étude sur l'analyse préliminaire des souches du virus du SRRP isolées au Québec nous a permis de mieux maîtriser la propagation et la purification de ce nouvel agent et ce, à travers les travaux conduits sur la souche de référence IAF-exp91.

Dix souches du virus du SRRP (Tableau 2) isolées de spécimens cliniques reçus d'élevage de porc de la province du Québec et antigéniquement apparentées à la souche américaine de référence ATCC VR 2332, furent propagées sur les cellules MAP. Contrairement à la plupart des souches, la multiplication de certaines d'entre elles ne s'accompagnait pas d'un effet lytique et ce, indépendamment de leur pathogénicité chez le porc. En effet, ces souches non-lytiques pouvaient être associées aussi bien à des troubles aigus qu'à la forme chronique du syndrome. Les troubles cliniques ainsi que les lésions observés chez les animaux ayant permis leur isolement étaient variables et ne permettaient pas de les distinguer des souches à ECP fortement lytique. Dans tous les cas, les cellules infectées ont démontré une fluorescence cytoplasmique suite à leur incubation en présence de sérums hyperimmuns produits contre la souche de référence québécoise ou des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine virale de 15 kDa. Après 3 à 5 passages sur les cellules MAP, les titres viraux de la majorité des souches variaient de $10^{4.5}$ à $10^{6.5}$ DICT₅₀/ml. L'ECP quand il se manifestait, apparaît 24 à 48 heures p.i dépendamment du titre viral. Les cellules commencent par perdre la régularité de leur contour, leur cytoplasme devient granuleux et les cellules finissent par devenir affaissées. Dans certains cas, les cellules avaient tendance à se grouper en amas. Ces premières modifications étaient généralement assez discrètes et passaient souvent inaperçues. L'infection conduisait par la suite à la fragmentation totale des cellules.

Un tel ECP s'observait dans le cas de la souche de référence du Québec, IAF-exp91 (souche PLO). Cette dernière fut utilisée pour la suite de nos travaux de caractérisation, des titres avoisinant 10^6 DICT₅₀/ml pouvant être obtenus sur les cellules MAP.

Les résultats obtenus au cours de cette étude préliminaire ont permis de constater que sur le plan physico-chimique et morphologique, la souche IAF-exp91 est similaire aux souches prototypes européenne (virus LV) (Wensvoort *et al.*, 1991a) et américaine (souche VR 2332) (Benfield *et al.*, 1992b). Les micrographies électroniques, après imprégnation négative (Figs. 6, 7, 8B et 9), ont permis de démontrer l'aspect togaviriforme des particules virales (particules sphériques enveloppées à contour lisse, de taille inférieure à 100 nm et contenant une nucléocapside isométrique) précédemment rapporté pour les souches prototypes (Benfield *et al.*, 1992b; Terpstra *et al.*, 1991). En outre, l'aspect intracellulaire du virus, tel qu'observé par microscopie électronique sur des sections ultraminesces de cellules MAP (Fig. 7), fut clairement démontré, confirmant ainsi les résultats moins évidents des chercheurs néerlandais (Pol et Wagenaar, 1992). Il a été démontré que le virus semble bourgeonner au niveau des membranes des vésicules intracellulaires, principalement au niveau de la région de l'appareil de Golgi. À aucune occasion, il fut possible d'observer de bourgeonnement au niveau de la membrane cytoplasmique, indiquant que le processus entier de la maturation et du bourgeonnement du virus du SRRP a lieu dans un compartiment intracellulaire.

En fait, cette étude générale conduite sur la souche IAF-exp91 fut grandement conditionnée par la susceptibilité des cellules MAP vis-à-vis du virus. Les titres viraux étaient généralement très variables ce qui n'a pas permis d'assurer une

continuité dans les travaux de caractérisation. En plus, la non disponibilité d'antisérums hautement spécifiques a compliqué et entravé grandement les travaux préliminaires de caractérisation des protéines structurales du virus. Il fut tout de même possible de produire un antisérum contre le virus entier par hyperimmunisation de lapins en utilisant des préparations purifiées sur gradients de chlorure de césium. Les premières analyses de radioimmunoprécipitation utilisant du virus marqué à la méthionine ^{35}S et concentré à travers un coussin de saccharose à 30 % (préparation semi-purifiée), ont permis d'identifier de façon régulière deux protéines dont les masses moléculaires furent estimées à 15 et 19 kDa (Fig. 10A). Ces mêmes protéines furent aussi identifiées dans les profils d'immunobuvardage (Fig. 10B), la protéine de 15 kDa étant dans les deux cas plus fortement reconnue. Deux protéines additionnelles de 26 et 42 kDa pouvaient aussi être révélées, mais de façon moins consistante que les deux premières. Il est fort probable que la protéine de 42 kDa soit modifiée par l'addition de chaînes hydrocarbonées, puisqu'elle n'était pas révélée dans les préparations virales semi-purifiées provenant de cultures de cellules infectées traitées par la tunicamycine. De toutes ces protéines, celle ayant une masse moléculaire 15 kDa semble être la plus immunogène, puisqu'elle fut révélée par tous les antisérums de porc et de lapin. De même, par radioimmunoprécipitation, cette protéine fut reconnue par trois anticorps monoclonaux (SDOW17, VO17, EP147) dirigés contre la souche ATCC VR2332 (Fig. 11). Toutefois, aucun anticorps monoclonal n'a démontré de réactivité vis-à-vis cette protéine par le test d'immunobuvardage, ce qui suggère la nature conformationnelle du ou des épitopes contre lesquels ils sont dirigés. Par ailleurs, la réactivité de ces trois anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine de 15 kDa, indique que des épitopes communs à la souche ATCC VR2332 et IAF-exp91, sont présents sur cette protéine.

Ces données accumulées lors de nos travaux préliminaires sur la souche IAF-exp91 sont en accord avec ce qui était préalablement décrit pour ce virus, dont notamment l'aspect togaviriforme des particules virales et la similarité antigénique qui existe entre les souches nord-américaines. Ces travaux ont aussi permis de constater la difficulté inhérente à la propagation du virus sur les cellules MAP. Hormis les contaminations bactériennes fréquentes, les cellules MAP se sont avérées inconstantes quant à leur sensibilité vis-à-vis du virus. Pour une même préparation de ces cellules primaires, deux passages tout au plus, ne pouvaient être utilisés pour multiplier le virus, limitant ainsi les quantités produites. En outre, la susceptibilité au virus étant variables pour différents porcs, le premier passage sur les cellules MAP était généralement peu productif, probablement à cause de la réadaptation du virus. L'ECP et les titres viraux étaient généralement plus importants au second passage.

B- IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU GÉNOTYPE DU VIRUS DU SRRP

Les difficultés liées à la propagation du virus du SRRP telles que décrites ci-dessus, nous ont amenés à adopter une approche moléculaire pour l'étude de cet agent. À la lumière des résultats obtenus (Mardassi *et al.*, 1994a), ainsi que ceux précédemment rapportés par Nelson *et al.* (1993), le nombre exact ainsi que la nature des protéines structurales de ce nouveau virus, demeuraient inconnus. Par ailleurs, la classification des souches virales en deux sérogroupes, l'un constitué par les souches européennes et l'autre par la majorité des souches nord-américaines (Wensvoort *et al.*, 1992a; Nelson *et al.*, 1993), soulevait plusieurs questions quant à

la nature de cette variation antigénique, laquelle variation est encore plus notable au sein des souches du séro groupe nord-américain. Pour toutes ces considérations, nous nous sommes proposés d'analyser la séquence de l'extrémité 3' terminale du virus, qui sur la base de travaux précédemment réalisés sur les artérovirus, devait correspondre à la région des gènes codant pour les protéines structurales du virus (DeVries *et al.*, 1992; Conzelmann *et al.*, 1993; Godeny *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993b).

Les premiers essais de clonage de la région 3'-terminale de la souche IAF-exp91 furent sans succès et ce, à cause de l'impossibilité d'amplifier des régions spécifiques par la technique de transcription inverse et amplification en chaîne par la polymérase Taq (RT-PCR) en utilisant des amorces oligonucléotidiques dérivées de la séquence du virus LV (Meulenberg *et al.*, 1993b) (Fig. 16). L'incapacité d'amplifier plusieurs fragments de l'extrémité 3'-terminale de la souche IAF-exp91 n'était pas associée à un défaut dans notre procédure expérimentale, puisque dans les mêmes conditions, de tels fragments d'ADNc ont pu être générés par RT-PCR en utilisant comme brin matrice la molécule d'ARN du virus LV (Fig. 16). En conséquence, l'existence de variations génomiques importantes entre les deux souches devenait fortement suspecte, ce qui nous amena à réaliser une banque d'ADNc par la méthode classique. En tenant compte du fait que le génome viral est constitué d'une molécule d'ARN polyadénylée, la méthode de Gübler et Hoffmann (1983) fut pratiquée sur de l'ARN viral extrait à partir de virus purifié. Plusieurs fragments d'ADNc d'une taille variable furent identifiés d'abord par séquençage, puis par hybridation moléculaire en utilisant comme sonde un fragment d'ADNc dont la séquence fut préalablement analysée. Le clone plasmidique contenant le fragment d'ADNc qui fut utilisé comme sonde, fut préalablement identifié comme

étant spécifique au virus, puisque par hybridation moléculaire, il ne réagissait qu'avec l'ARN total provenant de cellules infectées par le virus. Au total 12 clones plasmidiques contenant des fragments d'ADNc spécifiques de la souche IAF-exp91 d'une taille variant de 0.5 à 3 kb (Fig. 12) ont pu être obtenus suite à la réalisation de trois banques génomiques. Tous ces clones ont été séquencés de telle sorte que chaque nucléotide fut vérifié au moins à quatre reprises. Après que les données de séquençage furent assemblées, une séquence de 2834 nucléotides correspondant à l'extrémité 3' terminale du génome viral fut déduite. Sur cette séquence, les cadres de lecture 3 à 7, ainsi que la région 3' non codante furent identifiés (Fig. 18).

Par comparaison au virus LV, des variations génomiques majeures ont été observées au niveau des différents cadres de lecture. Les changements observés consistaient en des délétions, des additions et des mutations. Ces variations génomiques ont entraîné des modifications majeures au niveau des séquences en acides aminés, surtout pour les cadres de lecture 5, 3 et 7. Bien que ces variations sont distribuées de façon aléatoire pour la plupart des cadres de lecture, dans certains cas (ORFs 3 et 5), elles apparaissent plus prédominantes au niveau des extrémités aminées (Fig. 19).

Selon les résultats obtenus, la région 3' non codante est aussi la cible de variations importantes. Elle excède celle du virus LV de 37 nucléotides, résultant d'une part d'un arrêt précoce de la traduction du cadre de lecture 7, et d'autre part, de l'insertion de 22 nucléotides. Ainsi, la partie 3'-non codante de la souche nord-américaine IAF-exp91 est la plus longue de toutes celles des artérovirus. La signification biologique d'une telle trouvaille demeure inconnue, toutefois, elle a été mise à profit pour la distinction entre souches européennes et nord-américaines du

virus du SRRP par RT-PCR (Mardassi *et al.*, 1994c). En dépit de ces variations nucléotidiques auxquelles la région 3'-non codante fut assujettie, un motif de huit nucléotides (5'-CCGAAAUU-3') localisé immédiatement en amont de la queue poly(A) (Fig. 15), s'avéra hautement conservé non seulement chez toutes les souches du virus du SRRP (européennes et nord-américaines), mais aussi chez le virus LDV. La conservation d'un tel motif à l'extrémité 3' du génome viral pourrait traduire un rôle fonctionnel, notamment dans la réplication du génome. En effet, Yu et Leibowitz (1995) ont démontré qu'un motif de 11 nucléotides (5'-UGAAUGAAGUU-3'), hautement conservé chez les souches du virus MHV et présent parmi les 40 derniers nucléotides de l'extrémité 3' du génome, est critique pour l'interaction avec plusieurs protéines de la cellule-hôte ainsi que pour la réplication de l'ARN viral. À ce sujet, il est important de noter la très forte identité qui existe au niveau des six derniers nucléotides de l'extrémité 3' de ces motifs identifiés chez le coronavirus MHV et les artérovirus de la souris (LDV) et du porc (virus du SRRP).

Un autre point important concernant la stratégie de réplication du virus du SRRP peut être dégagé à partir des résultats des comparaisons génomiques. En effet, le motif de jonction UCAACC, entre la séquence de tête et le corps des ARNs sous génomiques identifié dans le cas du virus LV (Meulenberg *et al.*, 1993a), ne semble pas être conservé dans le cas de la souche IAF-exp91. Conséquemment, il est probable que le processus de fusion de la séquence de tête aux différents ARNs sous génomiques soit très fortement imprécis dans le cas de ce virus.

Dans l'ensemble, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs sur l'importante variabilité sérologique qui existe entre les souches

européennes et nord-américaines (Wensvoort *et al.*, 1992a; Nelson *et al.*, 1993). Les variations génomiques observées se traduisent par des changements majeurs au niveau de la composition en acides aminés des différents cadres de lecture (Fig. 19). Ces résultats suggèrent l'existence d'au moins deux génotypes du virus du SRRP (Mardassi *et al.*, 1994b et 1995). D'autres travaux sur l'analyse des séquences de l'extrémité 3' du génome viral de plusieurs souches américaines (Kwang *et al.*, 1994; Meng *et al.*, 1994 et 1995a et b; Morozov *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995) ont confirmé l'existence de deux génotypes, le premier représenté par les souches européennes qui s'avèrent très bien conservées (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993b; Suarez *et al.*, 1994), et le second représenté par les souches nord-américaines relativement plus hétérogènes. Il semble donc exister un lien direct entre les modifications génomiques et le comportement sérologique des souches du virus du SRRP. En effet, la comparaison sérologique des souches virales des deux continents à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre des déterminants antigéniques des protéines N et M, a aussi démontré qu'elles appartiennent à deux sérotypes distincts (Nelson *et al.*, 1993; Drew *et al.*, 1995; Dea *et al.*, 1996).

Certes, des variations génomiques au sein des souches du virus EAV (Murphy *et al.*, 1992; Chirnside *et al.*, 1994; Balasuriya *et al.*, 1995) et des souches du virus LDV (Plagemann *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1995) furent rapportées, toutefois elles sont d'une moindre ampleur comparativement aux variations identifiées pour les souches du virus du SRRP. Contrairement à ce dernier, les variations génomiques observées chez les virus EAV et LDV ne semblent pas induire des changements sérologiques majeurs qu'on peut identifier par le biais de sérums polyclonaux (Plagemann *et al.*, 1992; Balasuriya *et al.*, 1995). De par la pression sélective qui

pourrait être exercée par le système immunitaire, les artérovirus comme la plupart des virus à ARN, sont enclins aux variations génomiques et ce, à cause de la fréquence des erreurs commises par l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (Goldbach et Wellink, 1988; Strauss et Strauss, 1988; Domingo *et al.*, 1993). Dans le cas particulier des artérovirus, dont la stratégie de réplication est similaire à celle des coronavirus, il est plausible de postuler que les phénomènes de recombinaisons génétiques (Lai, 1992) puissent avoir joué un rôle dans leur émergence ainsi que dans leur évolution. Toutefois, les contraintes biologiques et environnementales qui font que le virus du SRRP ait subi le plus de variations par rapport aux autres artérovirus demeurent inconnues. On ne sait pas non plus, pourquoi le virus étant apparu en Europe est si différent génomiquement et sérologiquement des souches nord-américaines. Ce fait est contradictoire avec les études épidémiologiques qui préconisent une transmission du SRRP par le biais de mouvements d'animaux d'un continent à l'autre (Meredith, 1995). En effet, si l'apparition en Europe d'un nouveau génotype ait été la résultante de l'accumulation de plusieurs variations génomiques, on se demande alors pourquoi un tel génotype n'existe pas parmi les souches virales nord-américaines isolées et séquencées jusqu'à date (Kwang *et al.*, 1994; Mardassi *et al.*, 1994b et 1995; Meng *et al.*, 1994 et 1995a et b; Murtaugh *et al.*, 1995; Morozov *et al.*, 1995). En fait, l'éventualité de l'existence d'un génotype européen dans les pays nord-américains n'est pas à exclure, toutefois, on peut affirmer que si tel est le cas, sa fréquence dans les élevages infectés serait très faible.

C- IDENTIFICATION DES PROTÉINES STRUCTURALES DU VIRUS DU SRRP ET DE LEUR(S) RÉGION(S) GÉNOMIQUE(S) CODANTE(S)

À ce stade de la recherche sur le virus du SRRP, les gènes codant les protéines structurales étaient encore inconnus. Au cas où ces gènes seraient localisés au niveau de la portion 3' terminale hautement variable, on pourrait alors associer les variations sérologiques à des changements majeurs au niveau de la séquence en acides aminés des gènes structuraux, lesquels devraient coder pour les protéines immunodominantes. Deux facteurs ont contribué à faciliter les travaux sur l'identification des protéines structurales, soit la disponibilité d'une lignée cellulaire continue hautement permissive au virus, les cellules MARC-145 (Kim *et al.*, 1993), et l'obtention d'antisérums spécifiques ayant été obtenus suite à l'immunisation de porcelets avec des préparations virales purifiées. La souche IAF-Klop, antigéniquement et structurellement similaire à la souche de référence, et produisant des titres infectieux supérieurs à 10^6 DICT₅₀/ml a été utilisée pour ces travaux. Malgré plusieurs tentatives, il a été impossible de propager la souche IAF-exp91 sur les cellules MARC-145, ce qui démontre que certaines souches ont un tropisme très restreint pour les macrophages alvéolaires. Les analyses par radioimmunoprécipitation et immunobuvardage des préparations de virus purifié, ont permis de révéler la présence de trois protéines structurales majeures dont les masses moléculaires furent estimées à 15, 19 et 24.5 kDa (Figs. 21 et 30). Ces trois protéines ont pu être régulièrement identifiées par les mêmes tests en utilisant des antisérums provenant d'animaux naturellement ou expérimentalement infectés, suggérant leur nature immunodominante. Seule la protéine de 24.5 kDa semblait être glycosylée (Fig. 21B), vue sa sensibilité vis-à-vis de l'endoglycosidase F/N-glycosidase F (Glyco F) qui hydrolyse tous les types de chaînes hydrocarbonées, et

ce, indépendamment de leur stade de maturation (Tarentino *et al.*, 1985). La digestion par cette enzyme a donné naissance à une protéine de 16.5 kDa, considérée comme étant la forme non glycosylée de la protéine de 24.5 kDa. D'autre part, les trois protéines identifiées semblent être structurales puisqu'elles ont pu être révélées à partir de préparations de virus purifié sur gradient de densité de saccharose. Les travaux préalablement conduits sur le virus EAV ont permis de conclure à la présence de quatre protéines structurales désignées par G_S (29 kDa), G_L (29-46 kDa), M (16 kDa), et N (14 kDa), codées respectivement par les cadres de lecture 2, 5, 6, et 7. Les protéines G_L, M et N, sont majeures, seule la première étant glycosylée (DeVries *et al.*, 1992). En faisant abstraction de la protéine G_S, la nature des autres protéines du virus EAV ressemble à celle des protéines structurales du virus SRRP, identifiées par nos travaux de radioimmunoprécipitation. En conséquence, la possibilité que les protéines de 15, 19 et 24.5 kDa, soient respectivement codées par les cadres de lecture 7, 6 et 5, devenait de plus en plus vraisemblable et ce, à cause de la similarité de l'organisation génomique entre le virus EAV et celui du SRRP. Les résultats de nos travaux de traduction *in vitro* en l'absence ou en présence de membranes microsomales canines couplés au test de radioimmunoprécipitation (Figs. 22 et 23) étaient en faveur d'une telle prédiction.

La confirmation finale de l'assignement respectif des ORFs 7, 6 et 5 aux protéines structurales de 15, 19 et 24.5 kDa a pu être obtenue suite à l'obtention d'antisérums monospécifiques dirigés contre les produits d'expression dans *E.coli* de chacun de ces cadres de lecture (Fig. 30). Ainsi, dans les tests d'immunobuvardage réalisés avec des préparations virales purifiées, les antisérums dirigés contre les protéines de fusion des ORFs 7, 6 et 5, reconnaissent

respectivement les protéines virales de 15, 19 et 24.5 kDa. Ces résultats confirment les récents travaux de Meulenberg *et al.* (1995) qui, en utilisant des sérums contre des peptides spécifiques des cadres de lecture 7, 6 et 5, ont pu démontrer que ces derniers codent respectivement pour des protéines de 15, 18, et 25 kDa du virus LV. Ces protéines qui furent respectivement désignées par N, M et E semblent correspondre aux protéines 15, 19 et 24.5 kDa identifiées par nos travaux sur la souche IAF-Klop. La protéine N fut associée à la nucléocapside, alors que les protéines M et E sont membranaires (Meulenberg *et al.*, 1995). Hormis les protéines structurales N, M et E, la nature des produits codés par les cadres de lecture 2, 3 et 4 est très peu connue, bien que des travaux très récents semblent indiquer qu'ils font partie de la structure du virion (Drews *et al.*, 1995; Van Nieuwstadt *et al.*, 1996). Les travaux ayant permis de faire cette conclusion sont basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui se sont avérés spécifiques des produits des cadres de lecture 3 et 4. En fait, dans le cas du virus EAV, le produit du cadre de lecture 2 semble être plutôt accidentellement incorporé dans les particules virales (De Vries *et al.*, 1992 et 1995b). La protéine issue de ce cadre de lecture est en effet abondante dans la fraction intracellulaire, alors qu'elle est très minoritaire dans la fraction extracellulaire. Le produit du cadre de lecture 2 du virus LV, tel que obtenu par traduction *in vitro* en présence de membranes microsomales canines, présente une masse apparente de 30 kDa (Meulenberg *et al.*, 1995). Dans les cellules MARC-145 infectées par la souche IAF-Klop, une protéine d'une masse moléculaire apparente de 29 kDa, similaire à celui du produit de traduction *in vitro* de l'ORF2 du virus LV, fut précipitée par notre sérum polyclonal de porc (Fig. 21A). Cette protéine n'a pas pu être reconnue au niveau de la fraction virale purifiée et fut par conséquent considérée comme non structurale. D'autre part, une protéine de 42 kDa, soit d'une masse moléculaire très proche du produit de la traduction *in vitro* du cadre de

lecture 3 du virus LV (45 kDa) (Meulenberg *et al.*, 1995), fut aussi précipitée dans la fraction intracellulaire et non à partir des préparations de virus extracellulaire (Fig. 21A). Par conséquent, vu leur masse moléculaire apparente, ces protéines de 29 et 42 kDa présentes dans la fraction intracellulaire pourraient être respectivement associées aux ORFs 2 et 3. Par ailleurs, en se basant sur la taille du produit de la traduction *in vitro* du cadre de lecture 4 du virus LV qui est de 31 kDa, la protéine de 29 kDa pourrait plutôt représenter le produit de l'ORF4 et non celui de l'ORF2. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'antisérum dirigé contre le peptide spécifique de l'ORF2 ne réagit pas en test d'immunoperoxidase avec les cellules infectées par le virus LV (Meulenberg *et al.*, 1995). Il est important de noter, que seules trois protéines structurales furent détectées chez le virus LDV (Faaberg *et al.*, 1995a et b), lequel est génomiquement plus proche du virus du SRRP que ne l'est le virus EAV (Tableau 5) (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993b; Mardassi *et al.*, 1994b et 1995; Meng *et al.*, 1994).

Ainsi, trois protéines structurales majeures désignées par N (15 kDa), M (19 kDa) et E (24.5 kDa) furent identifiées dans le cas de la souche IAF-Klop du virus du SRRP, parmi lesquelles seule la protéine E semble être glycosylée. Ces protéines sont respectivement codées par les ORFs 7, 6 et 5. Étant reconnues par plusieurs antisérums provenant d'animaux infectés de façon expérimentale ou par la voie naturelle, ces trois protéines semblent être les plus immunodominantes. Ainsi, la variation sérologique entre les souches européennes et les souches nord-américaines peut s'expliquer par des changements majeurs au sein de la séquence en acides aminés de ces protéines structurales immunodominantes. Ceci fut notamment démontré pour les protéines E et N dont les degrés d'homologie avec

leurs équivalents chez le prototype européen (virus LV), sont respectivement de 51 et 59%.

D- MATURATION DES PROTÉINES STRUCTURALES DU VIRUS DU SRRP

L'étude détaillée de la maturation des protéines virales nécessite la disponibilité d'un système virus-hôte cellulaire hautement synchrone, ceci afin de pouvoir suivre dans le temps et dans l'espace la progression des protéines à partir de leur lieu de synthèse jusqu'à leur libération sous forme de particules virales. La méthodologie souvent utilisée pour de telles études consiste essentiellement à réaliser des marquages métaboliques très brefs suivis de périodes de chasse, en incorporant dans le milieu de culture un excès de l'équivalent non marqué de l'acide aminé radioactif utilisé au cours de la période du marquage. Tel que mentionné ci-dessus, la mise en pratique d'une telle méthodologie nécessite une synchronisation de l'infection virale de telle sorte qu'au moment du marquage bref, suffisamment de protéines virales seront marquées afin qu'elles puissent être analysées par des techniques de radioimmunoprécipitation. Pour ce faire, il faut idéalement procéder par des infections virales à de très hautes multiplicité d'infection, ce qui n'a pas pu être réalisé dans le cas de la souche IAF-Klop du virus du SRRP propagée dans la lignée continue MARC-145. En effet, les titres couramment obtenus, même après avoir cloné le virus par la technique des plages, dépassaient rarement $10^{6.5}$ DICT₅₀/ml. Les nombreuses tentatives dans le but d'augmenter le titre viral soit en concentrant le virus, soit en modifiant les conditions de culture (maintien d'un pH légèrement acide, incorporation de sérum de cheval dans le milieu de culture, incubation à 39°C, dilution de l'inoculum afin d'éliminer les particules défectives

interférentes) n'étaient pas concluantes et ce, vraisemblablement à cause de la fragilité du virus. De même, l'utilisation d'autres souches virales sérologiquement similaires n'a pas permis de surmonter ce problème, car dans tous les cas, les titres obtenus étaient similaires à ceux de la souche IAF-Klop. Dans les meilleures conditions, le maximum de marquage intracellulaire obtenu des protéines virales lors de travaux préliminaires s'observait à 24 heures p.i, ce qui correspond apparemment au deuxième cycle de réplication du virus. Ainsi, la maturation des protéines structurales du virus du SRRP fut suivie dans le temps, en réalisant un marquage bref de 15 minutes à 24 heures p.i par la méthionine ³⁵S, suivi de périodes de chasse variant de 15 à 240 minutes. En exposant les protéines précipitées à partir de ces différents temps à une digestion par l'endo- β -N-acetylglucosaminidase H (endo H), il fut démontré que, contrairement à son homologue chez le virus EAV (G_L) (De Vries *et al.*, 1995b), la protéine E du virus du SRRP semble anormalement retardée dans un compartiment pré-médian de l'appareil de Golgi. En effet au cours de la période de marquage bref, ainsi que pendant les 30 premières minutes de chasse (Fig. 32), la majeure partie de la protéine E s'est avérée sensible à cette endoglycosidase qui hydrolyse les chaînes hydrocarbonées de structure simple ou hybride (sucres à haut contenu en mannose) (Tarentino et Maley, 1974). Le produit qui résulta de cette digestion était d'une masse moléculaire de 16,5 kDa, ce qui correspond à la taille du produit qu'on obtient après digestion de cette protéine par la Glyco F (Fig. 31, ligne F). Ce produit qui fut désigné par E₀, correspondrait au précurseur non glycosylé de la protéine E, à partir duquel la séquence signal de l'extrémité aminée, qui permet aux protéines d'accéder à la lumière du réticulum endoplasmique (RE), aurait été clivée par les aminopeptidases cellulaires. Ce précurseur E₀ est ainsi de plus petite taille par rapport à ce qui est prédit par la séquence en acide aminés de la protéine E, en se basant sur la méthode de Von

Heijne (1986) (Tableau 4). Un tel résultat peut être expliqué par le fait que les peptidases cellulaires utiliseraient un site différent de celui qui est prédit par la méthode de Von Height. D'autre part, les masses moléculaires souvent prédites lors de l'analyse des séquences en acides aminés ne correspondent pas souvent aux masses moléculaires apparentes déterminées suite à une électrophorèse sur gels de polyacrylamide. Par ailleurs, si l'on tient compte que chaque chaîne hydrocarbonée correspond à une masse moléculaire de 2,6 kDa (Bergman et Kuehl, 1982), la différence de masse moléculaire apparente entre E et E₀ suggère que les trois sites potentiels de N-glycosylation prédits par la séquence en acides aminés de la protéine E de la souche IAF-Klop seraient tous modifiés par des chaînes hydrocarbonées.

Les résultats obtenus suggèrent que durant son transit retardé, vraisemblablement au niveau du compartiment pré-médian de l'appareil de Golgi, la protéine E subit une chute progressive de sa masse moléculaire, qui au début de sa synthèse excède celui de la protéine mature de 1,5 kDa. C'est seulement au bout d'une heure que la masse moléculaire de la protéine E mature est atteinte. Ainsi on peut observer avant ce temps trois intermédiaires de migration. Ces derniers ne peuvent toutefois être associés à différents stades conformationnels dus à l'établissement de ponts disulfures intramoléculaires, puisque les protéines furent analysées en conditions réductrices. Parmi les différentes hypothèses envisageables, la plus plausible serait que ces intermédiaires de migration résultent du processus d'élimination séquentielle des trois résidus de glucose terminaux qui a normalement lieu très tôt après l'addition des chaînes hydrocarbonées des glycoprotéines (Lodish et Kong, 1984; Kornfeld et Kornfeld, 1985). Plusieurs constatations plaident en faveur de cette hypothèse. En effet, tous ces intermédiaires de migration

sont sensibles à l'endo H, et il est reconnu que les réactions conduisant à l'élimination des résidus de glucose terminaux ont lieu dans un compartiment pré-médian du Golgi. D'autre part, les travaux de Lodish et Kong (1984) indiquent que l'élimination rapide de ces résidus de glucose favorise un transport rapide des glycoprotéines vers l'appareil de Golgi. Puisque le transport de la protéine E semble anormalement retardé dans un compartiment pré-médian du Golgi, un défaut dans l'élimination de ces glucoses terminaux par les glucosidases cellulaires I et II, pourrait expliquer ce retard au niveau de ce compartiment cellulaire.

Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent que les deux protéines majeures de l'enveloppe du virus du SRRP (M et E) s'associent très tôt après leur synthèse par des ponts disulfures donnant naissance à des hétérodimères (Fig. 34), et que c'est sous cette forme que ces deux protéines sont présentes au sein du virion (Fig. 33). De même, le processus entier de glycosylation de la protéine E semble avoir lieu après son association avec la protéine M (Fig. 35). Par conséquent, il est plausible de croire que la protéine M serait responsable du transport anormalement lent de la protéine E, tel que démontré auparavant dans le cas des coronavirus (Vennema *et al.*, 1990). Une telle situation semble peu probable dans le cas des artérovirus. En effet, dans le cas du virus EAV, bien que les deux protéines majeures de l'enveloppe s'associent à la manière des protéines M et E, le transport de la glycoprotéine G_L , l'équivalent de la protéine E du virus du SRRP, n'est pas pour autant retardé.

En dépit de leur grande similarité structurale, la protéine E du virus du SRRP semble subir un processus de maturation différent de celui de son homologue G_L du virus EAV. Effectivement, le transport intracellulaire de la protéine G_L est très

rapide, et la protéine semble même atteindre des compartiments du trans-Golgi. Ceci est suggéré du fait de la modification de ses chaînes hydrocarbonées par plusieurs résidus lactosamine qui lui donnent un aspect diffus sur gel de polyacrylamide (DeVries *et al.*, 1992 et 1995b). Un tel aspect a aussi été observé dans le cas de la glycoprotéine d'enveloppe du virus LDV, suggérant le même type de modification et donc un cheminement intracellulaire plutôt similaire à la protéine G_L du virus EAV (Faaberg *et al.*, 1995). La protéine E du virus du SRRP incorporée dans les particules virales, s'est avérée quant à elle résistante à l'endo- β -galactosidase (endo β) témoignant de l'absence de résidus lactosamine (Scudder *et al.*, 1983). D'autre part, une grande fraction des molécules E incorporées dans les particules virales contiennent des chaînes hydrocarbonées non complexes suggérant qu'elles n'ont jamais été en contact avec l'environnement du compartiment médian du Golgi. Ces résultats, qui sont en faveur d'un cheminement intracellulaire différent pour la protéine E du virus du SRRP en comparaison à ses homologues chez les virus EAV et LDV, indiquent qu'il existerait certainement des signaux au niveau de la structure primaire de ces protéines qui déterminent leur transport intracellulaire.

Enfin, les résultats obtenus suggèrent que l'association des protéines majeures d'enveloppe par le biais de ponts disulfures est possiblement une stratégie commune à la plupart des artérovirus (De Vries *et al.*, 1995; Faaberg *et al.*, 1995). Faaberg *et al.* (1995) ont démontré que ces ponts disulfures sont nécessaires pour maintenir l'infectivité du virus LDV. Selon ces auteurs, de tels ponts disulfures ne semblent pas être critiques pour la stabilité structurale des virions mais auraient plutôt un rôle dans l'attachement du virus à son récepteur cellulaire. Si tel est le cas, compte tenu de la similitude structurale de toutes leurs protéines d'enveloppe, les

artérovirus devraient alors utiliser chez les macrophages des récepteurs structurellement très proches.

E- ASSEMBLAGE DU VIRUS DU SRRP (Schéma hypothétique)

L'étude de la maturation des protéines virales du virus du SRRP a révélé plusieurs points importants ayant possiblement une implication dans le processus d'assemblage du virus. La précipitation de la protéine N dans les particules virales, en l'absence des protéines majeures de l'enveloppe (Fig. 32C), indique probablement que la protéine N interagirait avec les protéines M et E préexistantes qui n'ont pas encore incorporé la méthionine ³⁵S. Ceci implique une interaction très précoce de la protéine de la nucléocapside avec celles de l'enveloppe. En fait, une interaction effective et spécifique entre les protéines de l'enveloppe et de la nucléocapside des artérovirus a pu être mise en évidence pour la première fois dans la présente étude (Fig. 30B). Pour des raisons encore inconnues, la protéine N des virus LDV et EAV fut toujours précipitée de façon non spécifique avec la protéine A ou la protéine G (DeVries *et al.*, 1992 et 1995a et b; Faaberg *et al.*, 1995). Dans le cas de notre étude, cette interaction non spécifique n'a pas eu lieu. En outre, la coprecipitation de la protéine N avec les protéines de l'enveloppe n'a pu être observée que lorsque des conditions douces de dissociation des protéines virales avaient été employées (Fig. 30B vs Fig. 30C). Curieusement, en utilisant ces conditions peu astringentes dans le cas de lysats de cellules infectées, seule la protéine M coprecipitait avec la nucléocapside suite à l'incubation en présence d'un antisérum dirigé contre cette dernière (résultat non illustré). Dans les mêmes conditions expérimentales, un tel résultat n'a jamais pu être obtenu en utilisant des

particules virales purifiées. Bien que cela reste à démontrer, il est possible de spéculer que dans les cellules infectées, la nucléocapside interagit avec la protéine M, avant que cette dernière s'associe par le biais de ponts disulfures avec la protéine E. Cette hypothèse corrobore le fait que l'association de la protéine N avec les protéines de l'enveloppe semble être très précoce précédant même le processus d'oligomérisation de M et E.

Par la présente étude, on peut affirmer que l'association des deux protéines majeures de l'enveloppe virale via des ponts disulfures, précède de peu ou a lieu de façon concomitante au processus de glycosylation portant sur la protéine E (Fig. 35). Cette dernière continue à voir ses chaînes hydrocarbonées modifiées alors qu'elle est déjà complexée à la protéine M. Toutefois, cette étude n'a pas permis de démontrer si l'association précoce entre les protéines M et E, qui a vraisemblablement lieu dans le RE, est un pré-requis pour l'assemblage viral. Autrement dit, cette association aurait-elle un rôle quelconque dans le contrôle de la molarité respective de ces deux protéines, ou plutôt dans le transport de chacune d'entre-elles? L'expression individuelle de chacune de ces protéines et l'analyse de leur transport permettront d'apporter des éléments de réponse à cet aspect. Néanmoins, on peut déjà assigner à ces complexes M-E un rôle dans le contrôle de la molarité de ces protéines, si l'on tient compte du fait que bien que la protéine M soit synthétisée beaucoup plus abondamment dans les cellules infectées, elle semble être présente dans les particules virales à une quantité apparemment égale à celle de la protéine E (Voir légende de la Fig. 33). En effet, ni la forme dimérique ni la forme monomérique de la protéine M était apparente dans les profils de radioimmunoprécipitation et d'immunobuvardage analysés dans les conditions non réductrices.

Les profils de digestion des protéines virales par l'endo H ont révélé que plusieurs molécules de la protéine E, incorporées dans les particules virales et relarguées dans le milieu extracellulaire, contiennent encore des chaînes hydrocarbonées dont l'état de maturation est de type simple (riche en résidus mannose) (Fig. 31). Ceci suggère que certaines chaînes hydrocarbonées de la protéine E n'ont pas été en contact avec l'environnement du compartiment médian de l'appareil de Golgi et qu'elles ont pu être ainsi incorporées dans les particules virales pour être enfin libérées dans le milieu extracellulaire. Par conséquent, il est possible que le compartiment cellulaire impliqué dans le bourgeonnement du virus du SRRP soit situé entre le RE et l'appareil du Golgi. Cette hypothèse est conforme avec les résultats d'études en microscopie électronique de la morphogénèse du virus du SRRP (Pol et Wagenaar, 1992; Dea *et al.*, 1995), du virus EAV (Magnusson *et al.*, 1970) et des coronavirus (Tooze *et al.*, 1988; Klumperman *et al.*, 1994; Krijnse Locker *et al.*, 1994).

Enfin, nous assumons que dans le cas du virus du SRRP, l'assemblage des particules virales débute par l'interaction de la protéine de la nucléocapside avec la protéine M. L'interaction entre ces deux protéines, assurément de nature non covalente, serait médiée par leurs extrémités aminées hautement basiques (Faaberg et Plagemann, 1995). Par la suite, la protéine M s'associerait avec la protéine E par le biais de ponts disulfures, vraisemblablement au niveau du RE. Les processus de glycosylation qui s'exercent au niveau de la protéine E, se poursuivraient après que cette dernière ait été déjà recrutée dans les complexes M-E. Sur la base du type de glycosylation de la protéine E, le bourgeonnement des particules virales prendrait place dans un compartiment intermédiaire situé entre le RE et l'appareil de Golgi. Sauf quelques exceptions, ce processus de maturation est similaire à celui observé

pour les coronavirus (Dubois-Dalcq *et al.*, 1984; Klumperman *et al.*, 1994; Tooze *et al.*, 1984; Krijnse Locker *et al.*, 1994)

F- IMPLICATIONS DE L'ANALYSE MOLÉCULAIRE DANS L'ÉTUDE IMMUNOBIOLOGIQUE DES PROTÉINES STRUCTURALES DU VIRUS DU SRRP ET DANS LA CONCEPTION D'UNE STRATÉGIE DE VACCINATION.

Il a été démontré dans ce travail que le virus du SRRP est doté de trois protéines structurales immunodominantes (N, M et E), auxquelles a été assignée leur séquence codante (ORFs 7, 6 et 5, respectivement). Des variations majeures ont aussi été identifiées entre les souches nord-américaines et européennes et concernent surtout les séquences en acides aminés des protéines N et E. L'antisérum monospécifique dirigé contre la protéine E de la souche nord-américaine IAF-Klop exprimée chez *E. coli*, n'a présenté aucune réactivité vis-à-vis de son homologue européen (résultat non illustré). Si une telle protéine était impliquée dans la protection contre l'infection virale, un vaccin basé sur une souche donnée, aurait seulement une activité restreinte vis-à-vis de la souche homologue.

Les résultats du présent travail suggèrent aussi que les trois sites potentiels de N-glycosylation de la protéine E seraient modifiés par des chaînes hydrocarbonées. Comme dans le cas du virus LDV, ces chaînes hydrocarbonées font partie de l'ectodomaine de la protéine E qui est très court (autour de 30 résidus) (Faaberg et Plagemann, 1995). Ainsi, cet ectodomaine serait très lourdement chargé par ces chaînes hydrocarbonées, ce qui pourrait éventuellement expliquer les faibles taux

d'anticorps neutralisants produits après infection par ces virus. Il est important de noter à ce sujet que la protéine G_L du virus EAV, contre laquelle des anticorps neutralisants ayant de hauts titres peuvent être plus facilement induits, est dotée d'un ectodomaine plus long (90 résidus) dont le processus de glycosylation porte sur un seul site (De Vries *et al.*, 1992). Il est tout de même important de rapporter un résultat récent obtenu dans notre laboratoire, qui consiste en la production d'au moins une dizaine d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine E, dont certains s'avèrent neutralisants, toutefois à des titres assez faibles (1/32 au maximum). Ce résultat diffère de ce qui vient d'être récemment rapporté par une équipe néerlandaise, selon laquelle des anticorps monoclonaux dirigés contre le produit de l'ORF4 du virus LV sont doués d'une activité neutralisante (Van Nieuwstadt *et al.*, 1996).

Au cours des présents travaux, il a été aussi démontré que les deux protéines majeures de l'enveloppe virale, M et E, sont associées sous forme d'hétérodimères stabilisés par des ponts disulfures. Dans le cas du virus LDV (Faaberg *et al.*, 1995), il a été proposé que cette association serait cruciale dans l'interaction du virus avec son récepteur cellulaire. Une stratégie de vaccination adéquate contre le virus du SRRP, devrait donc tenir compte de cette particularité structurale. Enfin, des études parallèles effectuées dans notre laboratoire (Loemba *et al.*, 1996) et par d'autres équipes concernant la réponse immunitaire à l'infection par le virus du SRRP (Christianson et Joo, 1994; Nelson *et al.*, 1994, Yoon *et al.*, 1995), semblent démontrer que les anticorps neutralisants sériques ne conduisent pas à l'élimination du virus. Basé sur le fait que les animaux ayant précédemment contracté une infection virale sont immuns vis-à-vis d'une réinfection (Goyal, 1993; Christianson et Joo, 1994), les travaux sur l'immunobiologie du virus du SRRP devraient

s'orienter sur la nature des rôles potentiels et de l'immunité locale et de l'immunité cellulaire.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats obtenus au cours de ces travaux peuvent être inscrits dans le cadre général des artérovirus qui contenaient, avant l'isolement du virus du SRRP, les virus EAV, LDV et SHFV. Ces virus sont groupés au sein du genre Artérovirus sur la base de similitudes biologiques, structurales et moléculaires. Ces virus sont génomiquement très liés aux membres de la famille *Coronaviridae*, mais suffisamment différents sur le plan morphologique, afin de justifier leur groupement dans une famille à part.

Nos travaux ont permis de démontrer que contrairement aux autres membres des artérovirus, le virus du SRRP se distingue par sa haute variabilité génomique, notamment au niveau des gènes structuraux dont la conséquence directe est l'émergence de variants antigéniques. Par ailleurs, et compte tenu de la nature de ces variations génomiques, l'émergence de génotypes distincts ne semble pas être la résultante unique d'une pression sélective exercée par le système immunitaire. En effet, ces variations sont plutôt d'une distribution aléatoire et concernent aussi de façon très importante des régions non structurales à savoir la région 3' non codante et des séquences aminées ayant un rôle potentiel de peptide signal. En outre, la conservation de la structure des protéines en dépit d'une très haute variabilité de leur séquence en acides aminés, suggère que la viabilité de certains variants en dépend.

Comme pour le virus EAV, il a été possible de démontrer que les protéines structurales majeures N, M, et E du virus du SRRP sont respectivement codées par les cadres de lecture 7, 6 et 5, situés à l'extrémité 3' terminale du génome viral. Les travaux réalisés en regard de la maturation de ces protéines structurales ont démontré que le cheminement intracellulaire de la glycoprotéine majeure de

l'enveloppe (E), bien que structurellement très proche de ses homologues chez les virus EAV et LDV, subit un processus de maturation assez différent de ces dernières. Toutefois, les deux protéines majeures de l'enveloppe virale, M et E, se présentent au niveau du virion sous forme d'hétérodimères, soit de façon similaire à leurs homologues chez les autres artérovirus. Ces interactions interprotéiques pourraient avoir un rôle important sur l'immunobiologie des protéines structurales du virus, et il est judicieux d'en tenir compte. En effet, des sites antigéniques résultant de l'association de ces deux protéines, pourraient jouer un rôle crucial dans la protection contre l'infection virale.

Pour les virus EAV et LDV, les glycoprotéines majeures de surface sont responsables de la neutralisation du virus *in vitro*. Présentement, il n'existe pas d'études prouvant qu'il en est de même pour la protéine E du virus du SRRP. Les antisérums obtenus au cours des présents travaux, contre une protéine E recombinante produite chez *E. coli*, se sont avérés incapables de neutraliser l'infectivité du virus *in vitro*. Étant donné que les modifications post-traductionnelles ne s'opèrent pas de façon adéquate dans les cellules procaryotes, le choix d'un système eucaryote s'impose pour l'expression des protéines structurales du virus du SRRP et l'étude de leur immunobiologie. Un tel choix devrait aussi tenir compte de la nature de l'infection par le virus et de la réponse immunitaire qu'il suscite. Étant donné que la voie principale de pénétration du virus est la muqueuse oronasale, et que les anticorps neutralisants sériques ne semblent pas jouer un rôle protecteur dominant, un système favorisant l'établissement d'une immunité locale, afin de bloquer l'infection au stade primaire, devrait être envisagé. À ce propos, les travaux dans notre laboratoire qui s'inscrivent dans le cadre de l'étude immunobiologique des protéines N, M et E, s'orientent vers l'utilisation de vecteurs

adénoviraux, qui de par leur capacité d'assurer les modifications post-traductionnelles authentiques (glycosylation et établissement de ponts disulfures intermoléculaires), sont capables de mimer la voie naturelle d'infection.

La présente étude a permis de dévoiler certains aspects concernant les processus d'assemblage et de bourgeonnement des particules virales qui rapprochent davantage les artérovirus des membres de la famille *Coronaviridae*. Les résultats obtenus sont en faveur d'un processus d'assemblage et de bourgeonnement prenant place dans un compartiment cellulaire situé entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Une telle hypothèse est appuyée par les illustrations de microscopie électronique ainsi que par la nature des modifications post-traductionnelles de la protéine majeure de l'enveloppe virale. En perspective, nous nous proposons dans un futur proche de bloquer la maturation des protéines virales à différents compartiments cellulaires, et d'en analyser l'effet sur le bourgeonnement viral. D'autre part, des résultats récents obtenus dans le cas des coronavirus indiquent un nouveau mode d'assemblage des particules virales qui est indépendant de l'interaction de la nucléocapside avec les différentes protéines de l'enveloppe (Vennema *et al.*, 1996). Cette trouvaille est très intrigante, et il convient de voir si dans le cas des artérovirus un tel mode d'assemblage serait aussi opérationnel. Présentement nous disposons d'un système d'expression transitoire dans des cellules eucaryotes permettant d'analyser le comportement des protéines N, M et E, exprimées soit de façon individuelle soit de façon combinée. De même, la disponibilité d'antisérums spécifiques de chacune de ces protéines virales, produits au cours des travaux de cette thèse, facilitera les études qui porteront sur l'assemblage des virions.

RÉFÉRENCES

- ALBINA, E., Y. LEFORBAN, T. BARON, J.P. DURAN et P. VANNIER. 1992a. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann. Rech. Vet.* **23**: 167-176.
- ALBINA, E., F. MADEC et P. VANNIER. 1992b. Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP) (PRRS-Maladie mystérieuse). *Journées de Recherches porcines en France* **24**: 115-125.
- ALBINA, E., F. MADEC, R. CARIOLET, F. PABOEUF, E. HUTET, J.F. PANSART, A. KERANFLEC'H et Y. LEFORBAN. 1993. Le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP): Persistance du virus chez l'animal et dans les élevages infectés. *Journées de Recherches porcines en France* **25**: 363-372.
- ANDREASON, J.R., M.W. JACKWOOD et D.A. HILT. 1991. Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* **35**: 216-220.
- BAKER, S.C. et M.M.C LAI. 1990. An *in vitro* system for the leader-primed transcription of the coronavirus mRNAs. *EMBO Journal* **9**: 4173-4179.
- BALASURIYA, U.B.R., P.J. TIMONEY, W.H. MCCOLLUM et N.J. MACLACHLAN. 1995. Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the G_L envelope glycoprotein. *Virology* **214**: 690-697.
- BARIC, R.S., S.A, STOHLMAN et M.M.C. LAI. 1983. Characterization of replicative intermediate RNA of mouse hepatitis virus: presence of leader RNA sequences on nascent chains. *J. Virology* **48**: 633-640.
- BARIC, RS, S.A. STOHLMAN, M.K. RASAVI et M.M.C. LAI. 1985. Characterization of leader-related small RNAs in coronavirus-infected cells: further evidence for leader-primed mechanism of transcription. *Virus Res.* **3**: 19-33.
- BARON, D., E. ALBINA, Y. LEFORBAN, F. MADEC, H. GUILMOTO, J. PLANA DURAN et P. VANNIER. 1992. Report on the first outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation. *Ann. Vet. Res.* **23**: 161-166.

BAUTISTA, E.M., S.M. GOYAL, I.J. YOON, H.S. JOO et J.E. COLLINS. 1993. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5:163-165.

BENFIELD, D.A., J.E. COLLINS, A.L. JENNY et T.J. LOULA. 1992a. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In "Diseases of swine" (Leman A.D., B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire et D.J. Taylor, Eds). 7th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, pp. 756-762.

BENFIELD, D.A., E. NELSON, J.E. COLLINS, L.HARRIS, S.M. GOYAL, D. ROBINSON, W.T. CHRISTIANSON, R.B., MORRISON, D. GORCYCA et D. CHLADEK. 1992b. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:127-133.

BERGMAN, L. W. et W.M. KUEHL. 1982. Translation and glycosylation. In "The glycoconjugates," Vol. III. Glycoproteins, glycolipids, and proteoglycans, Part A. (M. I. Horowitz, Ed.), Academic Press, New York, pp. 82-86.

BILODEAU, R., S. DEA, G.P. MARTINEAU et R. SAUVAGEAU. 1991. Porcine reproductive and respiratory syndrome in Québec. *Vet. Rec.* 129: 102-103.

BILODEAU R, D. ARCHAMBAULT, S-A. VÉZINA, R. SAUVAGEAU, M. FOURNIER, et S. DEA. 1994. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation. *Can. J. Vet. Res.* 58: 291-298.

BLAHA T. 1992. Epidemiologic investigations into PEARS in Germany: consequences in fattening pigs. *Proceedings of the 12th Congress International Pig Veterinary Society, the Netherlands* 1: 126.

BLAHA, T, R.B. MORRISON, T. MOLITOR et G. WENSVOORT. 1995. Update on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Swine Health and Production* 3: 263-265.

BLOEMRAAD, M., E.P. DE KLUIJVER, A. PETERSEN, G.E. BUKHARDT et G. WENSVOORT. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet. Microbiol.* 42: 361-371.

BOURSNELL, M.F.G., T.D.K. BROWN, I.J. FOULDS, P.F. GREEN, F.M. TOMLEY et M.M. BINNS. 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.* **68**: 57-77.

BRAAKMAN, I., J. HELENIUS et A. HELENIUS. 1992. Manipulating disulphide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* **11**: 1717-1722.

BREEDENBEEK, P.J., C.J. PACHUK, A.F.H. NOTEN, J. CHARITÉ, W. LUYTJES, S.R. WEISS et W.J.M. SPAAN. 1990. The primary structure and expression of the second open reading frame of the polymerase gene of the coronavirus MHV-A59. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1825-1832.

BRIERLEY, I., M.E. BOURSNELL, M.M. BINNS, B. BILIMORIA, V.C. BLOK, T.D.K. BROWN et S.C. INGLIS. 1987. An efficient ribosomal frameshifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO Journal* **6**: 3779-3785.

CAFRUNY, W.A., S.P.K. CHAN, J.T. HARTY, S. YOUSEFY, K. KOWALCHYK, D. MCDONALD, B. FOREMAN, G. BUDWEG G et P.G.W. PLAGEMANN. 1986. Antibody response of mice to lactate dehydrogenase-elevating virus during infection and immunization with inactivated virus. *Virus Res.* **5**: 357-375.

CARMAN, W.F., C. WILLIAMSON, B.A. CUNLIFFE et A.H. KIDD. 1989. Reverse transcription and subsequent DNA amplification of rubella virus RNA. *J. Virol. Methods* **25**: 21-30.

CARMEN, S., S.E. SANFORD et S. DEA. 1995. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario-1978 to 1982. *Can. Vet. J.* **36**: 776-777.

CAVANAGH, D., P.J. DAVIS et D.J.C. PAPPIN. 1986. Coronavirus IBV glycopolypeptides: locational studies using proteases and saponin, a membrane permeabilizer. *Virus Res.* **4**: 145-156.

- CHEN, Z., L. KUO, R.R.R. ROWLAND, C. EVEN, K.S. FAABERG et P.G.W. PLAGEMANN. 1993. Sequence of 3' end of genome and of 5' end of open reading frame 1a of lactate dehydrogenase-elevating virus and common junction motifs between 5' leader and bodies of seven subgenomic mRNAs. *J. Gen. Virol.* **74**: 643-660.
- CHIRNSIDE, E.D. et W.J.M. SPAAN. 1990. Reverse transcription and cDNA amplification by the polymerase chain reaction of equine arteritis virus (EAV). *J. Virol. Methods* **30**: 133-140.
- CHIRNSIDE, E.D., C.M. WEARING, M.M. BINNS et J.A. MUMFORD. 1994. Comparison of M and N gene sequences distinguishes variation amongst equine arteritis virus isolates. *J. Gen. Virol.* **75**: 1491-1497.
- CHO, S.H., W.R. FREEZE, I.J. YOON, A.V. TRIGO et H.S. JOO. 1993. Seroprevalence of indirect immunofluorescent antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in selected swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**: 259-260.
- CHOI, C., W. CHRISTIANSON, J.E. COLLINS, H.S. JOO et T. MOLITOR. 1992. Antibody-dependent enhancement of SIRS virus replication. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* **4**: 30.
- CHOMCZYNSKY, P. et N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- CHRISTIANSON, W.T., J.E. COLLINS, D.A. BENFIELD, L. HARRIS, D.E. GORCYCA, D.W. CHLADEK, MORISSON et H.S. JOO. 1991. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* **53**: 485-488.
- CHRISTIANSON, W.T., J.E. COLLINS, D.A. BENFIELD, L. HARRIS, T.W. MOLITOR, R.B. MORISSON et H.S. JOO. 1992. Experimental reproduction of SIRS in pregnant sows. *Am. Assoc. Swine. Pract. Newsl.* **4**: 24.
- CHRISTIANSON, W.T. et H.S. JOO. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: a review. *Swine Health and Production* **2**: 10-28.

CHRISTOPHER-HENNINGS, J., E.A. NELSON, J.H. REBECCA, J.K. NELSON, S.L. SWENSON, J.J. ZIMMERMAN, C.C.L. CHASE, M.J. YEAGER et D.A. BENFIELD. 1995. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* **7**: 456-464.

COLLINS, J.E., D.A. BENFIELD, W.T. CHRISTIANSON, L. HARRIS, J.C. HENNINGS, D.P. SHAW, S.M. GOYAL, S. MCCULLOUGH, R.B. MORRISON, H.S. JOO, D. GORCYCA et D. CHLADEK. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**: 117-126.

CONZELMANN, K. K., N. VISSER, P. VAN WOENSEL et H.J. THIEL. 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* **193**: 329-339.

COOPER, V.L., A.R. DOSTER, R.A. HESSE et N.B. HARRIS. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. *J. Vet. Diagn. Invest.* **7**: 313-320.

COPELAND, C.S., R.W. DOMS, E.M. BOLZAU, R.G. WEBSTER et A. HELENIUS. 1986. Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. *J. Cell Biol.* **103**: 1179-1191.

DEA, S. et P. TIJSSEN. 1988. Identification of the structural proteins of turkey enteric coronavirus. *Arch. Virol.* **99**: 173-186.

DEA, S., S. GARZON, H. STRYKOWSKI et P. TIJSSEN. 1989a. Ultrastructure and protein A-gold immunolabelling of HRT-18 cells infected with turkey enteric coronavirus. *Vet. Microbiol.* **20**: 21-33.

DEA, S., S. GARZON et P. TIJSSEN. 1989b. Isolation and trypsin-enhanced propagation of turkey enteric (Bluecomb) coronaviruses in a continuous human rectal tumor (HRT-18) cell line. *Am. J. Vet. Res.* **50**: 1310-1318.

DEA, S. et P. TIJSSEN. 1989. Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **70**: 1725-1741.

DEA, S. et S. GARZON. 1991. Identification of coronaviruses by the use of indirect protein A-gold immunoelectron microscopy. *J. Vet. Diagn. Invest.* **3**: 297-305.

DEA, S., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU et G.P. MARTINEAU. 1991. Outbreaks in Quebec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **3**: 275-282.

DEA, S., R. BILODEAU, R. ATHANASSIOUS, R. SAUVAGEAU et G.P. MARTINEAU. 1992a. PRRS syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. *Vet. Rec.* **130**: 167.

DEA, S., R. BILODEAU, R. ATHANASSIOUS, R. SAUVAGEAU et G.P. MARTINEAU. 1992b. Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *Can. Vet. J.* **33**: 801-808.

DEA, S., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU, C. MONTPETIT et G.P. MARTINEAU. 1992c. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**: 380-392.

DEA, S. et G.P. MARTINEAU. 1994. Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin au Québec. *Agriculture décembre*: 11-14.

DEA, S., N. SAWYER, R. ALAIN et R. ATHANASSIOUS. 1995. Ultrastructural characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone. In "Corona and related viruses". Vol. 380 (P. Talbot and G. Levy, Eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 95-98.

DEA, S., C.A., GAGNON, H. MARDASSI et G. MILLANE. 1996. Antigenic variability among North american and European strains of PRRSV as defined by monoclonal antibodies to the M protein. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1488-1493.

DEE, S. 1992. Investigation of a nationwide outbreak of SIRS using a telephone survey. *Am. Assoc. Swine. Pract. Newsl.* **4**: 41-44.

DEN BOON, J.A., E.J. SNIJDER, E.D. CHIRNSIDE, A.A.F. DE VRIES, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1991a. Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronavirus superfamily. *J. Virol.* **65**: 2910-2920.

DEN BOON, J.A., E.J. SNIJDER, E.D. CHIRNSIDE, A.A.F. DE VRIES, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1991b. Another triple-spanning envelope protein among intracellularly budding RNA viruses: the torovirus E protein. *Virology* **182**: 655-663.

DE VRIES, A.A.F., E.D. CHIRNSIDE, P.J. BREDENBEEK, L.A. GRAVESTAIN, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1990. All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3241-3247.

DE VRIES, A.A.F., E.D. CHIRNSIDE, M.C. HORZINEK et P.J.M. ROTTIER. 1992. Structural proteins of equine arteritis virus. *J. Virol.* **66**: 6294-6303.

DE VRIES, A.A.F., S.M. POST, M.J.B. RAAMSMAN, M.C. HORZINEK et P.J.M. ROTTIER. 1995a. The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. *J. Virol.* **69**: 4668-4674.

DE VRIES, A.A.F., M.J.B. RAAMSMAN, H.K. VAN DIJK, M.C. HORZINEK et P.J.M. ROTTIER. 1995b. The small envelope glycoprotein (G_S) of equine arteritis virus folds into three distinct monomers and a disulfide-linked dimer. *J. Virol.* **69**: 3441-3448.

DIAL, D., R.D. HULL, C.L. OLSON, H.T. HILL et G.A. ERIKSON. 1990. Mystery swine disease: implications and needs of the North American swine industry. Mystery swine disease meeting, Denver: Livestock conserv. Institute. 10/16. p3-6.

DOMINGO, E., J. DIEZ, M.A. MARTINEZ, J. HERNANDEZ, A. HOLGUIN, B. BORREGO et M.G. MATEU. 1993. New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J. Gen. Virol.* **74**: 2039-2045.

DOMS, R.W., R.A. LAMB, J.K. ROSE, et A. HELENIUS. 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**: 545-562.

DONE, S.H. et D.J. PATON. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Rec.* **136**: 32-35.

- DREW, T.W., J.J.M. MEULENBERG, J.J. SANDS et D.J. PATON. 1995. Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* **76**: 1361-1369.
- DUBOIS-DALCQ, M.E., K.V. HOLMES, et B. RENTIER. 1984. Assembly of RNA viruses, Springer-Verlag, New York, pp. 100-148.
- DUNPHY, W.G. et J.S. ROTHMAN. 1985. Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* **42**: 13-21.
- EDWARDS, S., I.B. ROBERTSON, J. WILESMITH, J. RYAN, C. KILNER, D. PATON, T. DREW, I. BROWN et J. SANDS. 1992. PRRS (blue-eared pig disease) in Great Britain. *Amer. Assoc. Swine. Pract. Newsl.* **4**: 32-36.
- ELDADAH, Z.Z., D.M. ASHER, M.S. GODEC, K.L. POMEROY, L.G. GOLDFARB, S.M. FEINSTONE, H. LEVITAN, C.J. GIBBS et D. C. GAJDUSEK. 1991. Detection of flavivirus by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Med Virol.* **33**: 260-267.
- FAABERG, K.S., C. EVEN, G.A. PALMER, et P.J.M. PLAGEMANN. 1995. Disulfide bonds between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for viral infectivity. *J. Virol.* **69**: 613-617.
- FAABERG, K.S. et P.J.M. PLAGEMANN. 1995. The envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus and their membrane topography. *Virology* **212**: 512-525.
- FRANCKI, R.I.B., C.M. FAUQUET, D.L. KNUDSON et F. BROWN. 1992. Classification and nomenclature of viruses: Arterivirus. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virology (suppl.)*. **2**: 220-222.
- GETHING, M.-J. et J. SAMBROOK. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45.
- GODENY, E.K., D.W. SPEICHER et M.A. BRINTON. 1990. Map location of lactate-dehydrogenase-elevating virus (LDV) capsid protein (Vp1) gene. *Virology* **177**: 768-771.

GODENY, E.K., L. CHEN, S.N. KUMAR, S.L. METHVEN, E.V. KOONIN et M.A. BRINTON. 1993. Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV). *Virology* **194**: 585-596.

GODENY, E. K., L. ZENG, S.L. SMITH et M.A. BRINTON. 1995. Molecular characterization of the 3' terminus of the simian hemorrhagic fever virus genome. *J. Virol.* **69**: 2679-2683.

GOLDBACH, R. et J. WELLINK. 1988. Evolution of plus-strand RNA viruses. *Intervirology* **29**: 260-267.

GOYAL, S.M. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**: 656-664.

GRAVELL, M., W.T. LONDON, M.E. LEON, A.E. PALMER et R.S. HAMILTON. 1986. Differences among isolates of simian hemorrhagic fever (SHFV) virus. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* **181**: 112-119.

GÜBLER, U. et B.J. HOFFMAN. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25**: 263-269.

HALBUR, P.G., P.S. PAUL , X-J. MENG, M.A. LUM , J.J. ANDREWS et J.A. RATHJE. 1996. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**: 11-20.

HAMMOND, C., I. BRAAKMAN et A. HELENIUS. 1994. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 913-917.

HOLODNIY, M.S., D. KATZENSTEIN, S. SENGUPTA, A.M. WANG, C. CASIPIT, D.H. SCHWARTZ, M. KONRAD, E. GROVES et T.C. MERIGAN. 1991. Detection and quantitation of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use of the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **163**: 862-866.

HOOPER, C.C, G.W. VAN ALSTINE, W. STEVENSON et C.L. KANITZ. 1994. Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**: 13-15.

HOPPER, S.A., M.E.C. WHITE et N. TWIDDY. 1992. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet. Rec.* **131**: 140-144.

HORZINEK, M., J. MAESS et R. LLAUFS. 1971. Studies on the ultrastructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhea, and hog cholera viruses. *Arch. Ges. Virusforsch.* **33**: 306-318.

HORZINEK, M.C., T.H. FLEWETT, L.J. SAIF, W.J.M. SPAAN, M. WEISS et G.N. WOOD. 1987. A new family of vertebrate viruses: *Toroviridae*. *Intervirology* **27**: 17-24.

HU, B., C. EVEN et P.G.W. PLAGEMANN. 1992. Immune complexes that bind to ELISA plates not coated with antigen in mice infected with lactate dehydrogenase-elevating virus: relationship to IgG2a and IgG2b-specific polyclonal activation of B cells. *Viral. Immunol.* **5**: 27-38.

HURTLEY, S.M. et A. HELENIUS. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **5**: 277-307.

HYYPIA, T., P. AUVINEN et M. MAARONEN. 1989. Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **70**: 3261-3268.

INADA, T. et C.A. MIMS. 1985. Pattern of infection and selective loss of Ia positive cells in suckling and adult mice inoculated with lactic dehydrogenase virus. *Arch. Virol.* **86**: 151-165.

JACKS, T.D., D.H. MADHANI, F.R. MASIARZ et H.E. VARMUS. 1988. Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell* **55**: 449-458.

KEFFABER, K.K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Amer. Assoc. Swine. Pract. Newsl.* **1**: 1-9.

KEFFABER, K.K., G. STEVENSON, W. VAN ALSTINE, C. KANITZ, L. HARRIS, D. GORCYCA, K. SCHLESINGER, R. SCHULTZ, D. CHLADEK et R. MORRISON. 1992. SIRS virus infection in nursery/grower pigs. *Amer. Assoc. Swine. Pract. Newsl.* **4**: 45-46.

KIM, H.S., H.S. JOO et M.E. BERGELAND. 1989. Serologic, virologic, and histopathologic observations of encephalomyocarditis virus infection in mummified and stillborn pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **1**: 101-104.

KIM, H.S., J. KWANG, I.J. YOON, H.S. JOO et M.L. FREY. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* **133**: 477-483.

KLUMPERMAN, J., J. KRIJNSI LOCKER, A. MEIJER, M.C. HORZINEK, H.J. GEUZE, H.J. et P.J.M. ROTTIER. 1994. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J. Virol.* **68**: 6523-6534.

KORNFELD, R., et S. KORNFELD. 1985. Assembly of asparagine linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 631-664.

KRIJNSE LOCKER, J., M. ERICSSON, P.J.M. ROTTIER et G. GRIFFITHS. 1994. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J. Cell. Biol.* **124**: 55-70.

KUO, L., J.T. HARTY, L. ERICKSON, G.A. PALMER et P.G.W. PLAGEMANN. 1991. A nested set of eight RNAs is formed in macrophages infected with lactate dehydrogenase-elevating virus. *J. Virol.* **65**: 5118-5123.

KUO, L., Z. CHEN, R.R. ROWLAND, K.S. FAABERG et P.G.W. PLAGEMANN. 1992. Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV): subgenomic mRNAs, mRNA leader and comparison of 3' terminal sequences of two LDV isolates. *Virus Res.* **23**: 55-72.

KWANG, J., H.S. KIM et H.S. JOO. 1994. Cloning, expression, and sequence analysis of the ORF4 gene of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus MN-1b. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**: 293-296.

KYTE, J. et R. DOOLITTLE. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol Biol.* **157**: 105-132.

LAI, M.M.C. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Reviews* **56**: 61-79.

LAPPS, W., B.G. HOGUE et D.A. BRIAN. 1987. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* **157**: 47-57.

LEE, H., C. SHIEH, A.E. GORBALENYA, E.V. KOONIN, N.L. MONICA, J. TULER, A. BAGDZHADZHYAN et M.M.C LAI. 1991. The complete sequence (22 kilobases) of murine gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. *Virology* **180**: 567-582.

LINDHAUS, W. et B. LINDHAUS. 1991. Rätselhafte Schweinekrankheit. *Der Pract. Tierarzt*. **5**: 423-425.

LODISH, H.F. et N. KONG. 1984. Glucose removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secretory glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **98**: 1720-1729.

LOEMBA, H.D., H. MARDASSI, S. MOUNIR et S DEA. 1996. Kinetics of the humoral immune response to the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch. Virol.* **141**: 751-761.

LOULA, T. 1991. Mystery pig disease. *Agri-Practice* **12**: 23-34.

LUNKENHEIMER, K., F.T. HUFERT et H. SCHMITZ. 1990. Detection of Lassa virus RNA in specimens from patients with Lassa fever by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2689-2692.

MAGNUSSON, P., B. HYLLSETH et H. MARUSYK. 1970. Morphological studies on equine arteritis virus. *Arch. Gesamte Virusforsch* **30**: 105-112.

MAKINO, S., S.A. STOHLMAN et M.M.C. LAI. 1986. Leader sequences of murine coronavirus mRNAs can be freely reassorted: evidence for the role of free leader RNA in transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4202-4208.

MARDASSI, H., R. ATHANASSIOUS, S. MOUNIR et S. DEA. 1994a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated to acute and chronic outbreaks of PRRS. *Can. J. Vet. Res.* **58**: 55-64.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1994b. Identification of major differences in the nucleocapsid genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* **75**: 681-685.

MARDASSI, H., L. WILSON, S. MOUNIR et S. DEA. 1994c. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between canadian and european strains by reverse transcription and PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2197-2203.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1995. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Québec reference strain. *Arch. Virol.* **140**: 1405-1418.

MARDASSI, H., B. MASSIE et S. DEA. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **221**: 98-112.

MARTINEAU, G.P., R. BILODEAU, R. SAVAGEAU, C. MOORE et S. DEA. 1991. Syndrome «Hyperthermie-Anorexie-Avortement de la Truie» et de pneumonie interstitielle virale au Québec. *Journées de recherche porcine en France.* **23**: 179-188.

MARTINEAU, G.P., R. BILODEAU, R. SAVAGEAU et S. DEA. 1992. Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin au Québec: données cliniques, pathologiques et virologiques. *Journées de recherche porcine en France* **24**: 127-136.

MCCOLLUM, W.H. 1986. Responses of horses vaccinated with avirulent modified-live equine arteritis virus propagated in the E. Derm (NBL-6) cell line to nasal inoculation with virulent virus. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 1931-1934.

MENG, X-J., P.S. PAUL et P.G. HALBUR. 1994. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* **75**: 1795-1801.

MENG, X-J., P.S. PAUL, P.G. HALBUR et M.A. LUM. 1995a. Phylogenetic analysis of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A and Europe. *Arch. Virol.* **140**: 745-755.

MENG, X-J., P.S. PAUL, P.G. HALBUR et I. MOROZOV. 1995b. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* **76**: 3181-3188.

MENGELING, W.L., K.M. LAGER et A.C. VORWALD. 1994. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* **55**: 1391-1398.

MEREDITH, M.J. 1992. Review of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Pig Disease Information Centre*. University of Cambridge.

MEREDITH, M.J. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Pig Disease Information Centre*. University of Cambridge.

MEULENBERG, J.J.M., E.J. DE MEIJER et R.J.M. MOORMANN. 1993a. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *J. Gen. Virol.* **74**: 1697-1701.

MEULENBERG, J.J.M., M.M. HULST, E.J. DE MEIJER, P.L.J.M. MOONEN, A. DEN BESTEN, E.P. DE KLUYER, G.WENSWOORT et R.J.M. MOORMANN. 1993b. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* **192**: 62-72.

MEULENBERG, J.J.M., A.P. DEN BESTEN, E.P. DE KLUYER, R.J.M. MOORMANN, V.M.M. SCHAPER et G. WENSVOORT. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad Virus. *Virology* **206**: 155-163.

MOLITOR, T., G. LEITNER, C. CHOI, J. RISHDAHL, K. ROSSOW et J. COLLINS. 1992. Modulation of host immune response by SIRS virus. *Amer. Assoc. Swine. Pract. Newsl.* **4**: 27-28.

MORIN, M., et Y. ROBINSON. 1991. Porcine reproductive and respiratory syndrome in Quebec. *Vet. Rec.* **129**: 367.

MOROZOV, I., X-J. MENG et P.S. PAUL. 1995. Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* **140**: 1313-1319.

MORRISON, B.R., J.E. COLLINS, L. HARRIS, W.T. CHRISTIANSON, D.A. BENFIELD, D.W. CHLADEK, D.E. GORCYCA et H.S. JOO. 1992a. Serologic evidence incriminating a recently isolated virus (ATCC VR-2332) as the cause of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**: 186-188.

MORRISON R., E. BAUTISTA, S. GOYAL, J. COLLINS et J. ANNELLI. 1992b. Seroprevalence of SIRS virus in the United States in 1990. *Amer. Assoc. Swine Pract. Newsl.* **4**: 47.

MOUNIR, S., H. MARDASSI, et S. DEA. 1995. Identification and characterization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 7, 5 and 4 products. In "Corona and related viruses", Vol. 380 (P. Talbot and G. Levy, Eds), Plenum Publishing Corporation, New York. pp. 317-320.

MURPHY, T.W., W.H. MCCOLLUM et P.J. TIMONEY. 1992. Genomic variability among globally distributed isolates of equine arteritis virus. *Vet. Microbiol.* **32**: 101-115.

MURTAUGH, M.P., M.R. ELAM et L.T. KAKACH. 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.* **140**: 1451-1460.

NELSON, E.A., J.C. HENNINGS et D.A. BENFIELD. 1992. Characterization and diagnostic use of monoclonal antibodies to U.S. isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. 73 rd Annual Meeting of the CRWAD, Chicago: p73.

NELSON, E.A., J.C. HENNINGS, T.W. DREW, G. WENSVOORT, J.E. COLLINS et D.A. BENFIELD. 1993. Differentiation of US and European Isolates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Monoclonal Antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 3184-3189.

NELSON, E.A., J.C. HENNINGS et D.A. BENFIELD. 1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**: 410-415.

OHLINGER, V., F. WEILAND, B. HAAS, N. VISSER, R. AHL, T.C. METTENLEITER, E. WEILAND, H.J. RZIHA, SAALMÜLLER A. et O.C. STRAUB. 1991. "Der Seuchenhafte Spätabort beim Schwein"-Ein Beitrag zur Ätiologie des "porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)". *Tierärztl. Umsch.* **48**: 703-708.

OHLINGER, V., B. HAAS, A. SALLMULLER, J. BEYER, J. TEUFFERT, N. VISSER et F. WEILAND. 1992 In vivo and in vitro studies on the immunobiology of PRRS. *Amer. Assoc. Swine Pract. Newsl.* **4**: 27-28.

ONYEKABA, C.O., J.T. HARTY et P.G.W. PLAGEMANN. 1989. Extensive cytocidal replication of lactate dehydrogenase-elevating virus in cultured peritoneal macrophages from 1-2 week old mice. *Virus Res.* **14**: 327-338.

PALMER, G.A., L. KUO, Z. CHEN, K.S. FAABERG et P.G.W. PLAGEMANN. 1995. Sequence of the genome of lactate dehydrogenase-elevating virus: heterogeneity between strains P and C. *Virology* **209**: 637-642.

PARK, B.K., H.S. JOO, S.A. DEE et C. PIJOAN. 1995. Evaluation of an indirect fluorescent IgM antibody test for the detection of pigs with recent infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **7**: 544-546.

PATON, D.J., I.H. BROWN., S. EDWARDS et G. WENSVOORT. 1991. Blue ear disease of pigs. *Vet. Rec.* **128**: 617.

PATON, D.J., I.H. BROWN, A.C. SCOTT, S.H. DONE et S. EDWARDS. 1992. Isolation of a Lelystad virus-like agent from British pigs and scanning electron microscopy of infected macrophages. *Vet. Microbiol.* **33**: 195-201.

PATON, A.W., J.C. PATON, A.J. LAWRENCE, P.N. GOLDWATER et R.J. HARRIS. 1992. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 901-904.

PELHAM, H.R.B. (1989). Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **5**: 1-23.

PLAGEMANN, P.G.W., HARTY J.T. et G. EVEN. 1992. Mode of neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus by polyclonal and monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* **123**: 89-100.

PLAGEMAN, P.G.W. et V. MOENNIG. 1992. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv. Virus. Res.* **41**: 99-192.

PLANA DURAN, J., M. VAYREDA, J. VILARRASA, M. BASTONS, R. ROSELL, M. MARTINEZ, A. SAN GABRIEL, J. PUJOLS, J.L. BADIOLA, J.A. RAMOS et M. DOMINGO. 1992. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet. Microbiol.* **33**: 203-211.

POL, J.M.A., J.E. VAN DIJK, G. WENSVOORT et C. TERPSTRA. 1991. Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet. Q.* **13**: 137-143.

POL, J. et F. WAGENAAR. 1992. Morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. *Amer. Assoc. Swine Pract. Newsl.* **4**: 29.

POLSON, D.D., MARSCH W.E. et G.D. DIAL. 1990. Financial implication of Mystery Swine Disease (MSD). Mystery Swine Disease Com. Meeting, Denver: Livestock Conservation Institute. 10/6. pp. 8-28.

PRINGLE, C.R. 1992. Committee pursues medley of virus taxonomic issues. *ASM News* **58**: 475-476.

RAMOS, J.A., J. PUJOLS, M. DOMINGO, M.A. MILLER, R. ROSSELL, I. BADIOLA, A. PÉREZ DE ROZAS, N. MAJO et A. SAN GABRIEL. 1992. Experimental infection of weaner pigs with PRRS. *Amer. Assoc. Swine Pract. Newsl.* **4**: 25.

ROSSOW, K., E. BAUTISTA, S. GOYAL, M. MURTAUGH, T. MOLITOR, R. MORRISSON, D.A. BENFIELD et J. COLLINS. 1992. The effect of pig age on clinical disease and immunopathogenesis of SIRS virus infection. *Amer. Assoc. Swine Pract. Newsl.* **4**: 26.

ROSSOW, K.D., R.B. MORRISON, S.M. GOYAL, G.S. SINGH et J.E. COLLINS. 1994. Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**: 371-375.

ROTTIER, P., D. BRANDENBURG, J. ARMSTRONG, B. VAN DER ZEIJST et G. WARREN. 1984. Assembly *in vitro* of a spanning membrane protein of the endoplasmic reticulum: the E1 glycoprotein of coronavirus mouse hepatitis virus A59. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1421-1425.

ROTTIER P.J.M., G.W. WELLING, S. WELLING-WESTER, H.G.M. NIESTER, J.A. LENSTRA et B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1986. Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. *Biochemistry* **25**: 1335-1339.

ROTTIER, P.J.M. 1995. The coronavirus membrane glycoprotein. In "the Coronaviridae." (Siddell, S.G., Ed). Plenum Press, New York. pp. 115-139.

ROWLAND, R.R.R., C. EVEN, G.W. ANDERSON, Z. CHEN, B. HU et P.G.W. PLAGEMANN. 1994. Neonatal infection of mice with lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) results in suppression of humoral antiviral immune response but does not alter the course of viremia or the polyclonal activation of B cells and immune complex formation. *J. Gen. Virol.* **75**: 1071-1081.

ROWSON, K.D.F. et B.W.J. MAHY. 1985. Lactate dehydrogenase-elevating virus. *J. Gen. Virol.* **66**: 2297-2312.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

SANGER, F., S. NICKLEN, et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

SAWIKI, S.G. et D.L. SAWIKI. 1990. Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediated function in RNA synthesis. *J. Virol.* **64**: 1050-1056.

SCHLESINGER, S., C. MALFER et M.J. SCHLESINGER. 1984. The formation of vesicular stomatitis virus (San Juan strain) becomes temperature-sensitive when glucose residues are retained on the oligosaccharides of the glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **259**: 7597-7601.

SCUDDER, P., K-I. UEMURA, J. DOLBY, M.N. FUKUDA et T. FEIZI. 1983. Isolation and characterization of an endo- β -galactosidase from *Bacteroides fragilis*. *Eur. J. Biochem.* **168**: 585-593.

SETHNA, P.B., S-L. HUNG et D.A. BRIAN. 1989. Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5626-5630.

SHIMIZU, H., C.A. MCCARTHY, M.F. SMARON et J.C. BURNS. 1993. Polymerase chain reaction for detection of measles virus in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1034-1039.

SNIJDER, E.J., J.A. DEN BOON, P.J. BREDENBEEK, M.C. HORZINEK, R. RIJNBRAND et W.J.M. SPAAN. 1990a. The carboxyl-terminal part of the putative Berne virus polymerase is expressed by ribosomal frameshifting and contains sequence motifs which indicate that toro- and coronaviruses are evolutionary related. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4535-4542.

SNIJDER, E.J., M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1990b. A 3'-coterminal nested set of independently transcribed mRNA is generated during Berne virus replication. *J. Virol.* **64**: 331-338.

SNIJDER E.J. et M.C HORZINEK. 1993. Toroviruses: replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. *J. Gen. Virol.* **74**: 2305-2316.

SNIJDER, E.J., M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1993. The coronavirus-like superfamily. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**: 235-244.

SNIJDER, E.J. et W.J.M. SPAAN. 1995. The coronaviruslike superfamily. In "The Coronaviridae." (Siddell, S.G., Ed). Plenum Press, New York. pp. 239-255.

SPAAN, W.J.M., D. CAVANAGH et M.C. HORZINEK. 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. *J. Gen. Virol.* **69**: 2939-2952.

STEVENSON, G.W., W.G. VAN ALSTINE, C.L. KANITZ et K.K. KEFFABER. 1993. Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**: 432-434.

STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., J.A. NAVARRO et J. POHLENZ. 1992. Placental alterations in sows from herds with PEARs: light and electron-microscopic findings. *Proceedings of the 12th Congress International Pig Veterinary Society, the Netherlands* **1**: 128.

STRAUSS, J.H. et E.G. STRAUSS. 1988. Evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**: 657-683.

STUECKEMANN, J.A., M. HOLTH, W.J. SWART, K. KOWALCHYK, M.S. SMITH, A.J. WOLSTENHOLME, W.A. CAFRUNY et P.G.W. PLAGEMANN. 1982a. Replication of lactate dehydrogenase-elevating virus in macrophages. 2. Mechanism of persistent infection in mice and cell culture. *J. Gen. Virol.* **59**: 263-272.

STUECKEMANN, J.A., D.M. RITZI, M. HOLTH, M.S. SMITH, W.J. SWART, W.A. CAFRUNY et P.G.W. PLAGEMANN. 1982b. Replication of lactate dehydrogenase-elevating virus in macrophages. 1. Evidence for cytocidal replication. *J. Gen. Virol.* **59**: 245-262.

SUAREZ, P., R. ZARDOYA, C. PRIETO, A. SOLANA, E. TABARÉS, J.M. BAUTISTA et J.M. CASTRO. 1994. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch. Virol.* **135**: 89-99.

TARENTINO, A. et F. MALEY. 1974. Purification and properties of an endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* **249**: 811-817.

TARENTINO, A.L., C.M. GOMEZ et T.H., JR. PLUMMER. 1985. Deglycosylation of N-linked glycans by peptide N-glycosidase F. *Biochemistry* **24**: 4665-4671.

TERPSTRA, C., G. WENSVOORT et J.M.A. POL. 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet. Q.* **13**: 131-136.

TIMONEY, P.J., W.H. MC COLLUM, A.W. ROBERTS et T.W. MURPHY. 1986. Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Res. Vet. Sci.* **41**: 279-280.

TOOZE, S.A., J. TOOZE J et G. WARREN. 1984. Replication of coronavirus MHV-A59 in Sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell. Biol.* **33**: 281-293.

TOOZE, S.A., J. TOOZE J et G. WARREN. 1988. Site of addition of *N*-acetylgalactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J. Cell Biol.* **106**:1475-1487.

VAN BERLO, M.F., M.C. HORZINEK MC et B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1982. Equine arteritis virus-infected cells contain six polyadenylated virus-specific RNAs. *Virology* **118**: 3345-3352.

VAN BERLO, M.F., P.J.M. ROTTIER, M.C. HORZINEK et B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1986. Intracellular equine arteritis virus (EAV)-specific RNAs contain common sequences. *Virology* **152**: 492-496.

VAN NIEUWSTADT, A.P., J.J.M. MEULENBERG, A. VAN ESSEN ZANDBERGEN, A. PETERSEN-DEN BESTEN, R.J. BENDE, R.J.M. MOORMANN et G. WENSVOORT. 1996. Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (*Arteriviridae*) are structural proteins of the virion. *J. Virol.* **70**: 4767-4772.

VENNEMA, H., L. HEIJNEN, A. ZIJDERVELT, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1990. Intracellular transport of recombinant coronavirus spike proteins: implication for virus assembly. *J. Virol.* **64**: 339-346.

VENNEMA, H., G-J. GODEKE, J.W.A. ROSSEN, W.F. VOORHOUT, M.C. HORZINEK, D.-J.E. OPSTELTEN et P.J.M. ROTTIER. 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* **8**: 2020-2028.

VERBEEK, A. et P. TIJSSEN. 1990. Polymerase chain reaction for probe synthesis and for direct amplification in detection of bovine coronavirus. *J. Virol. Meth.* **29**: 243-256.

VÉZINA, S-A, H. LOEMBA, M. FOURNIER, S. DEA et D. ARCHAMBAULT. 1996. Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* **60**: 94-99.

VIROLOGY DIVISION NEWS (VDN). 1994. Revision of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus and Arterivirus genera. *Arch. Virol.* **135**: 227-237.

VOICU I.L., A. SILIM, M. MORIN et M.A.S.Y. ELAZHARY. 1994. Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Vet. Rec.* **134**: 422-423.

VON HEIJNE, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**: 4683-4690.

WENSVOORT, G., C. TERPSTRA, J.M.A. POL, E.A. TER LAAK, M. BLOEMRAAD, E.P. DE KLUYVER, C. KRAGTEN, L. VAN BUITEN, A. DEN BESTEN, F. WAGENAAR, J.M. BROEKHUIJSEN, P.L.J.M. MOONEN, T. ZETSTRA, E.A. DEBOER, H.J. TIBBEN, M.F. DE JONG, P. VAN'T VELD, G.L. R. GROENLAND, J.A. VAN GENNEP, M.T. VOETS, J.H.M. VERHEIJDEN et J. BRAAMSKAMP. 1991a. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* **13**: 121-130.

WENSVOORT, G., C. TERPSTRA, J.M.A. POL et M. WHITE. 1991b. Blue ear disease of pigs. *Vet. Rec.* **128**: 574.

WENSVOORT, G., E.P. DE KLUYVER, E.A. LUIJTZE, A. DEN BESTEN, L. HARRIS, J.E. COLLINS, W.T. CHRISTIANSON et D. CHLADEK. 1992a. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**: 134-138.

WENSVOORT, G., E.P. DE KLUYVER, J.M.A. POL, F. WAGENAAR, R.J.M. MOORMANN, M.M. HULST, R. BLOEMRAAD, A. DEN BESTEN, T. ZETSTRA, et C. TERPSTRA. 1992b. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. *Vet. Microbiol.* **33**: 185-193.

WHITE, M.E.C. 1991. Blue ear disease of pigs. *Vet. Rec.* **128**: 574.

WHITE M.E.C. 1992. The clinical signs and symptoms of blue-eared pig disease (PRRS). *Pig. Vet. J.* **28**: 62-68.

WILLIAMS, A. K., L. WANG. L.W. SNEED et E.W. COLLISSON. 1992. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. *Virus Res.* **25**: 213-222.

YOON, I.J., W.T. CHRISTIANSON, H.S. KIM, J.E. COLLINS et R. B. MORRISON. 1992a. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**: 144-147.

YOON, I.J., H.S. JOO, W.T. CHRISTIANSON, H.S. KIM, J.E. COLLINS, J.H. CARLSON et S.A. DEE. 1992b. Isolation of a cytopathic virus from weak pigs on farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**: 139-143.

YOON, I.J., H.S. SAGAR, M. GOYAL et T.W. MOLITOR. 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**: 289-292.

YOON, K.J., J.J. ZIMMERMAN, S.L. SWENSON, M.J. MCGINLEY, K.A. ERNISSE, A. BREVIK, L.L. RHINEHART, M.L. FREY, H.T. HILL et K.B. PLATT. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* **7**: 305-312.

YU, W. et J.L. LEIBOWITZ. 1995. A conserved motif at the 3' end of mouse hepatitis virus genomic RNA required for host protein binding and viral RNA replication. *Virology* **214**: 128-136.

ZIMMERMAN, J., T. SANDERSON, K.A. ERNISSE, H.T. HILL et M.L. FREY. 1992. Transmission of SIRS virus from convalescent animals to commingled penmates under experimental conditions. In: Proc. of Inter. Symp. on SIRS/PRRS/PEARS, Minnesota: p17.

REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer ma profonde gratitude envers mon professeur et directeur de thèse, le **Dr Serge Dea**, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et procuré une excellente formation scientifique. Le Dr Dea a toujours veillé à ce que tous les moyens nécessaires à la réalisation du travail de cette thèse soient disponibles. Ses qualités humaines immenses font que je ne le remercierai jamais assez.

J'adresse aussi mes sincères remerciements au **Dr Samir Mounir** qui m'a initié aux techniques de biologie moléculaire et qui a codirigé mes travaux portant sur l'analyse des séquences. Par la même occasion, je remercie le **Dr Pierre Talbot** qui m'a permis, à un certain moment, de réaliser certaines étapes de mes travaux dans son propre laboratoire.

Mes remerciements vont également à l'endroit du **Dr Bernard Massie**, pour les nombreuses discussions et les conseils judicieux en matière d'expression des protéines.

J'aimerais aussi faire part de ma reconnaissance envers **Mesdames Louise Wilson et Nicole Sawyer**, du laboratoire du Dr Dea, pour leur disponibilité et leur aide technique.

Mes remerciements s'adressent aussi à **Mme Marcelle Benoît** pour ses conseils en matière de culture de tissus. De même, la contribution de **Mme Micheline Chénard** dans les tests d'immunofluorescence est fortement appréciée.

Je saisis l'occasion pour remercier **Mesdames Joanne Roger et Lise Forget**, du service de séquençage, pour avoir toujours rapidement effectué les travaux requis.

J'apprécie fortement le travail de qualité effectué par **Mr André Levac** et **Mme Ginette Larose**, du service d'art graphique, concernant respectivement les photos et les différents montages.

Je désire aussi souligner la contribution de tous les membres de l'animalerie lors des expériences d'immunisation.

Je désire aussi remercier **Mr Roger Dubuc**, qui par sa propre initiative, a préparé les étiquettes des copies de la thèse.

Mes vives remerciements pour les **Drs Claude Montpetit, Robert Assaf et Grégoire Marsolais**, du MAPAQ, ainsi que **Robert Bilodeau**, pour avoir assuré le lien avec l'aspect clinique du SRRP.

Je remercie également toutes les techniciennes et les techniciens du service du diagnostic vétérinaire, qui par leur comportement agréable, ont contribué à l'élaboration de ce projet.

Enfin, je suis très reconnaissant envers tous les étudiants avec qui j'ai interagit durant toutes ces années d'études, à savoir: **Leila Michaud, Lucie Canuel, Hughes Loemba, Carl Gagnon, Bouroushan Pirzadeh, Anne Kourtesis et Dominic Therrien**.

Ce travail a été réalisé grâce à des subventions fournies par le **CRSNG**, le **MAPAQ**, la **fédération des producteurs de porc du Québec**, et **Vetrepharm Research Inc.**

**ANNEXE A:
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES
COMMUNICATIONS**

PUBLICATIONS (Auteur principal):

MARDASSI, H., R. ATHANASSIOUS, S. MOUNIR et S. DEA. 1994. Porcine Reproductive and Respiratory syndrome virus: Morphological, Biochemical and Serological Characteristics of Quebec Isolates Associated with Acute and Chronic Outbreaks of PRRS. *Can. J. Vet. Res.* **58**: 55-64.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1994. Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Québec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* **75**, 3: 681-685.

MARDASSI, H., L. WILSON et S. MOUNIR, S. DEA. 1994. Detection of PRRSV and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2197-2203.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1995. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Québec reference strain. *Arch. Virol.* **140**: 1405-1418.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1995. Structural gene analysis of a Quebec reference strain of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). In P Talbot and G Levy (Eds), Corona and related viruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology series*. Vol **380**. New York: Plenum Publishing Co, pp. 277-281.

MARDASSI, H., B. MASSIE et S. DEA. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus proteins encoded by ORFs 5, 6, and 7. *Virology* **221**: 98-112.

PUBLICATIONS (coauteur):

MOUNIR, S., H. MARDASSI et S. DEA. 1995. Identification and characterization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 7, 5, and 4 products. In P Talbot and G Levy (Eds), Corona and related viruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology series*. Vol **380**. New York: Plenum Publishing Co, pp. 317-320.

LAROCHELLE, R., H. MARDASSI, S. DEA et R. MAGAR. 1996. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J. Vet Diagn. Invest.* **8**: 3-10.

LOEMBA, H.D., H. MARDASSI, S. MOUNIR et S. DEA. 1996. Kinetics of the humoral immune response to the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch. Virol.* **141**: 751-761.

DEA, S., C.A., GAGNON, H. MARDASSI et G. MILLANE. 1996. Antigenic variability among North American and European strains of PRRSV as defined by monoclonal antibodies to the M protein. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1488-1493.

COMMUNICATIONS (auteur principal)

MARDASSI, H., R. ATHANASSIOUS, S. MOUNIR et S. DEA. 1993. Caractérisation morphologique et structurale d'une souche de référence du virus du syndrome reproducteur et respiratoire du porc (SRRP). Compte-rendu des communications de la 8ième Conférence en santé animale, Orford, Canada, 5-6 mai.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1993. Structure polypeptidique d'une souche Québécoise de référence du virus du SRRP et amplification par PCR du gène de la nucléocapside. Proceedings of the 43 rd Conference of Canadian Laboratory Workers in Animal Diseases, Nepean, Ontario, Canada, 2-3 June.

MARDASSI, H., R. ATHANASSIOUS et S. DEA. 1993. Characterization of an envelopped cytopathic virus associated to PRRS in Québec. Canadian Society of Microbiologists (CSM) (Abstract 119). Toronto, Canada, 1-6 august.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1993. Nucleotide sequence analysis of the 3'-terminal genomic region of the Québec reference strain IAF-exp91 of PRRSV. 74th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD) (Abstract 218). Chicago, USA, Nov.8-9.

MARDASSI, H., L. WILSON, S. MOUNIR et S. DEA. 1993. Detection of PRRSV and efficient differentiation between Canadian and European strains using reverse transcription and cDNA amplification by the polymerase chain reaction (RT/PCR). 74th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD) (Abstract 86). Chicago, USA, Nov.8-9.

MARDASSI, H., S. DEA, R. LAROCHELLE et R. MAGAR. 1993. Investigation of the antigenic and genomic relationships between European and Canadian isolates of PRRS virus. 74th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD) (Abstract 87). Chicago, USA, Nov.8-9, 1993.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1994. Molecular characterization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ORFs 4 to 7. Sixth International Symposium on Corona and Related Viruses. Québec, Canada, August 27 to September 1.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1994. Molecular characterization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ORFs 4 to 7 product. 75th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD). Chicago, USA, Nov. 14-15.

MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA. 1995. Procaryotic expression of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ORFs 7 to 5 and identification of their products. American Society for Virology (ASV). 14th annual meeting (Abstract 11-8). University of Texas, Austin, Texas, USA, July 8-12.

MARDASSI, H., B. MASSIE et S. DEA. 1995. Identification, intracellular location, and structure of proteins encoded by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) ORFs 5 to 7. 76th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD). Chicago, USA, Nov 12-14.

MARDASSI, H., R. ATHANASSIOUS, et S. DEA. 1996. Caractéristiques morphologique et moléculaire du virus du syndrome reproducteur et respiratoire du porc. Conseil des productions animales (CPAQ), Québec, Canada, 30 -31 mai.

MARDASSI, H., B. MASSIE et S. DEA. 1996. Les bases moléculaires de l'assemblage et du bourgeonnement du virus du SRRP. Conseil des productions animales (CPAQ), Québec, Canada, 30 -31 mai.

MARDASSI, H., B. MASSIE et S. DEA. 1996. Folding and intracellular transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) envelope proteins. American Society for Virology (ASV). 15 th Annual Meeting. London, Toronto, Canada, July 15-19. (Abstract W30-6)

COMMUNICATIONS (coauteur):

MOUNIR, S., H. MARDASSI, G. MILANE et S. DEA. 1994. Expression and characterization of PRRSV Envelope and ns4 Proteins. American Society for Virology. 13th annual meeting. University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA, July 9-13.

LOEMBA H, S MOUNIR, H MARDASSI, S DEA. 1995. Viral polypeptide specificity of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. 75th Annual meeting of the CRWAD, Chicago, USA, Nov. 14-15.

LOEMBA H, S MOUNIR, H MARDASSI, S DEA. 1995. Characterization of the humoral immune response to PRRS virus infection. 45th Annual meeting of the Canadian Society of microbiologists (CSM), Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, June 11-15.

LOEMBA H, S MOUNIR, H MARDASSI, S DEA. 1995. Étude de la réponse immune humorale chez les porcs infectés par le virus du SRRP. 10e conférence annuelle en pathologie animale, MAPAQ, Sherbrooke, Canada, 3 et 4 mai.

DEA S, G MILANE, C GAGNON, H MARDASSI. 1995. Antigenic differences between field isolates and vaccine strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein. 76th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD). Chicago, USA, Nov. 12-14.

LAROCHELLE R, H MARDASSI, S DEA, R MAGAR. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. 76th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD). Chicago, USA, Nov. 12-14.

GAGNON C.A., G MILANE, H MARDASSI, S. DEA. 1996. Variabilité antigénique et génomique parmi les isolats du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP). Conseil des productions animales (CPAQ), Québec, Canada, 30 -31 mai.

PIRZADEH B., C.A GAGNON, H MARDASSI, M ARELLA, S.DEA. 1996. Étude de la variabilité sérologique de la glycoprotéine d'enveloppe du virus du SRRP et topographie des déterminants antigéniques majeurs. Conseil des productions animales (CPAQ), Québec, Canada, 30 -31 mai.

GAGNON, C.A, H. MARDASSI et S. DEA. 1996. Antigenic and genomic variations among the ORFs 6 and 7 products of Quebec and Ontario isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). 46th Annual meeting of the Canadian Society of microbilogists (CSM), University of Prince Edward Island, Charlottetown, Ontario, Canada, June 16-20. (Abstract VM2)

GAGNON, C.A, H. MARDASSI et S. DEA. 1996. Investigation of antigenic and genomic variations among canadian isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). 15 th Annual Meeting. London, Toronto, Canada, July 15-19. (Abstract P24-8)

ANNEXE B:
COPIE DES ARTICLES PUBLIÉS

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Morphological, Biochemical and Serological Characteristics of Quebec Isolates Associated with Acute and Chronic Outbreaks of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

H. Mardassi, R. Athanassious, S. Mounir and S. Dea

ABSTRACT

Cytolytic and noncytolytic strains of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) were isolated in primary cultures of porcine alveolar macrophages (PAM) from lung homogenates of stillborn fetuses or blood samples of dyspneic piglets collected from Quebec pig farms having experienced acute or chronic outbreaks of PRRS. Serological identification of the virus was confirmed by indirect immunofluorescence and indirect protein A-gold immunoelectron microscopy using reference antiserum prepared from experimentally-infected specific pathogen free (SPF) piglets and monoclonal antibodies (MoAbs) directed against the p15 nucleocapsid (N) protein of the reference ATCC-VR2332 isolate. Intracytoplasmic enveloped viral particles that tended to accumulate into cytoplasmic vesicles were observed in the infected PAM; no budding was demonstrated at the level of the cytoplasmic membrane. The extracellular virions appeared as pleomorphic but mostly spherical enveloped particles, 50–72 nm in diameter (averaged diameter of 50 particles was 58.3 nm), with an isometric core about 25–30 nm. Buoyant density of the virus in CsCl density gradients was estimated to 1.18–1.20 g/mL. No hemagglutinating activity was

demonstrated. Analysis of semi-purified virions of isolate IAF-exp91 by radioimmunoprecipitation (RIPA) and Western immunoblotting experiments, using reference rabbit and porcine hyperimmune sera, revealed four major viral proteins, a predominant 15 kD N protein and three other proteins with predicted Mr of 19, 26 and 42 kD. Progeny viral particles produced in PRRSV-infected PAM in the presence of tunicamycin lacked the 42 kD protein, thus confirming its N-glycosylated nature. Immunoprecipitation experiments using the anti-ATCC-VR2332 MoAbs confirmed the close antigenic relationships between Quebec and American reference isolates of PRRSV.

RÉSUMÉ

Des souches cytotytiques et non-cytolytiques du virus responsable du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) ont été propagées sur cultures de macrophages alvéolaires de porc (PAM) à partir d'homogénats de poumons de fœtus mort-nés ou des sérums de porcelets dyspnéiques, provenant de fermes du Québec ayant expérimenté des épisodes aigus ou chroniques du syndrome. L'identification de ce virus fut confirmée par immunofluorescence indirecte et par immuno-microscopie élec-

tronique après marquage à la protéine A-or colloïdal utilisant un antisérum de référence obtenu suite à l'infection expérimentale de porcelets assainis et trois anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre la protéine de la nucléocapside (N) de l'isolat de référence ATCC-VR2332. Des particules virales enveloppées ayant tendance à s'accumuler dans la lumière des vésicules cytoplasmiques ont été observées dans les cellules PAM infectées; aucun bourgeonnement n'a pu être démontré au niveau de la membrane cytoplasmique. Les particules virales extracellulaires étaient pléomorphes, mais plutôt sphériques, d'un diamètre variant de 50 à 70 nm (le diamètre moyen de 50 particules étant de 58,3 nm) et possédant une nucléocapside icosaédrique d'environ 25–30 nm. La densité de flottaison des particules virales purifiées sur gradients de densité de CsCl fut estimée à 1,18–1,20 g/mL. Aucune activité hémagglutinante ne fut démontrée. L'analyse du contenu protéique des virions de l'isolat de référence IAF-exp91 suite à des expériences d'immunoprécipitation (RIPA) et d'immunobuvardage, utilisant des antisérums de référence de lapin et de porc, a permis de révéler la présence de 4 protéines majeures, soit une protéine prédominante de 15 kD correspondant à la protéine N et trois autres protéines dont les

Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7N 4Z3.

Reprint requests to Dr. S. Dea.

This report was taken in part from a dissertation to be submitted by H. M. to the Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree.

This research was partly funded by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), la Fédération des Producteurs de porcs du Québec, and Vetrepharm Research Inc., London, Ontario.

Submitted June 22, 1993.

Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Québec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Helmi Mardassi, Samir Mounir and Serge Dea*

Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

The sequence of the 3'-terminal region of the genome of Québec reference strain IAF-exp91 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) was investigated by analysis of four cDNA clones. The 3'-terminal 530 nucleotides (nt) encompassed a large open reading frame with a coding capacity of 123 amino acids (M_r 13649). The predicted protein was extremely basic and hence was considered to correspond to the nucleocapsid (N) protein gene. When compared to the homologous sequences of two reference Netherlands strains (Lelystad and isolate 10) of PRRSV, the IAF-exp91 N protein was found to be five amino acids shorter and displayed a high degree of divergence. Overall, IAF-exp91 strain showed identities of 63% and 59% with both reference European strains at the nucleotide and amino acid level, respectively. Two

amino acid stretches, STAPM and SQGAS, present respectively at the N- and C-terminal regions of the N protein of European strains, were missing in the IAF-exp91 N protein sequence. The 3'-terminal non-coding region (151 nt) of the IAF-exp91 strain was 22 nt longer than that of the European strains. The aligned nucleotide sequence of this non-coding region exhibited an overall identity of 59% with that of the European strains. The Québec reference strain of PRRSV appeared to be related more closely to equine arteritis virus and lactate dehydrogenase-elevating virus than are the two European strains of the virus. Preliminary data obtained by reverse transcription-PCR experiments, using specific or common oligonucleotide primers, suggested that this approach could be useful for distinguishing between PRRSV strains from different geographic origins.

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) was first described in the United States (Polson *et al.*, 1990) and Canada (Bilodeau *et al.*, 1991) in 1986 to 1987. The disease was initially characterized by severe reproductive failure in sows of any parities (late-term abortions, increased numbers of stillborn, mummified and weakborn pigs, increased preweaning mortality), and respiratory problems affecting pigs of all ages, but mainly unweaned piglets. In 1990, a similar disease was observed in Germany (Lindhaus & Lindhaus, 1991) and rapidly swept through Western European countries in 1991 (Baron *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992b).

The aetiological agent of the syndrome (PRRSV) has been definitively identified as a small spherical enveloped virus, 50 to 65 nm in diameter, with a central isometric nucleocapsid of approximately 25 to 30 nm (Benfield *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992b). The viral genome is a positive-stranded polyadenylated RNA of about 15 kb,

which generates in infected cells a 3'-coterminal nested set of six subgenomic mRNAs (Meulenberg *et al.*, 1993; Conzelmann *et al.*, 1993). The genomic RNA contains at least eight open reading frames (ORFs) organized similarly to those of equine arteritis virus (EAV) and lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) genomic RNAs. The latter two viruses have been proposed as members of the genus *Arterivirus*, family *Togaviridae* (Plagemann & Moennig, 1992; Conzelmann *et al.*, 1993). European isolates of PRRSV appear to belong to the same serotype, whereas antigenic variability has been demonstrated among American isolates, and between American and European isolates (Wensvoort *et al.*, 1992a). Here we report the sequence analysis of the 3'-terminal 530 nucleotides (nt) of the reference Québec strain IAF-exp91 of PRRSV (Dea *et al.*, 1992).

IAF-exp91 was propagated in primary cultures of porcine alveolar macrophages (PAM) prepared as described by Wensvoort *et al.* (1991). After complete degeneration of the monolayers, supernatant fluids were clarified by centrifugation at 5000 *g* for 20 min, followed by ultracentrifugation through a cushion of 30% sucrose

The nucleotide sequence data reported here will appear in the EMBL and GenBank nucleotide sequence databases under accession number U02095 (N-PRRS-IA).

Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Québec reference strain*

H. Mardassi, S. Mounir, and S. Dea

Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec,
Laval, Québec, Canada

Accepted March 30, 1995

Summary. The cDNA sequence of the 3'-terminal genomic region of the Québec IAF-exp91 strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) was determined and compared to those of other reference strains from Europe (Lelystad virus) and US (ATCC VR2385, MN-1b). The sequence (2834 nucleotides) which encompassed ORFs 3 to 7 revealed extensive genomic variations between the Québec strain and Lelystad virus (LV), resulting from high number of base substitutions, additions and deletions. The ORFs 5, 3, and 7 seemed to be relatively the most variable; the predicted encoding products of the Québec and LV strains displayed only 52%, 54%, and 59% amino acid identities, respectively. Nevertheless, in vitro translation experiments of the structural genes (ORFs 5, 6, and 7) and radio-immunoprecipitation assays with extracellular virions gave results similar to those previously reported for LV. In contrast, close genomic relationships were demonstrated between Québec and US strains. Taking together, these results indicate that, although structurally similar, North American PRRSV strains belong to a genotype distinct from that of the LV, thus supporting previous findings that allowed to divide PRRSV isolates into two antigenic subgroups (U.S. and European).

Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a small enveloped RNA virus which has been found to be the causative agent of a new pig disease that occurs in North America and Europe [1, 5, 7, 34]. The disease is characterized by severe reproductive failure in sows and respiratory problems affecting pigs of all ages [12]. The European prototype strain of PRRSV, known as the Lelystad virus (LV), shows close similarities with the *Arteriviruses* from morphological,

* The nucleotide sequence data reported in this paper will appear in the EMBL and GenBank nucleotide sequence databases under accession number L40898.

Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Efficient Differentiation between Canadian and European Strains by Reverse Transcription and PCR Amplification

HELMI MARDASSI, LOUISE WILSON, SAMIR MOUNIR, AND SERGE DEA*

Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

Received 21 January 1994/Returned for modification 6 April 1994/Accepted 21 June 1994

Two sets of oligonucleotide primers (1008PS-1009PR and 1010PLS-1011PLR) were designed according to the sequence of the nucleocapsid protein (N) gene of Quebec reference strain IAF-exp91 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). The primers were used in reverse transcription and PCR (RT-PCR) experiments for detection of viral genomic RNA either from infected porcine alveolar macrophages (PAM) or tissues from experimentally infected specific-pathogen-free pigs. Considering the high degree of variation detected between the nucleotide sequences of the N genes of IAF-exp91 and Lelystad virus (LV) strains of PRRSV, the primers 1008PS-1009PR were referred to as the specific primers, since they were chosen in such a manner that they could amplify only sequences from IAF-exp91 RNA and not from LV. On the other hand, the primer pair 1010PLS-1011PLR was common to both strains of PRRSV. When analyzed by agarose gel electrophoresis, the products of RT-PCR from each set of primers were resolved as single band of the predicted size, the specificity of amplified products being confirmed by Southern blotting with a specific IAF-exp91 N gene probe. No amplification was observed when RNA was extracted from uninfected PAM or from other porcine viruses. As expected, only the common primer pair was able to amplify RNA from the Quebec reference strain and two European strains (LV and Weybridge). The resulting bands displayed differences in electrophoretic mobilities due to the absence of 37 nucleotides in both European strains, thus allowing their differentiation from the IAF-exp91 strain. Most of the tissue culture-adapted Quebec isolates were detected with both primer pairs. The sensitivity of the enzymatic amplification method for detection of PRRSV from lung tissues was a 50% tissue culture infective dose of 5. RT-PCR was found to be more sensitive than indirect immunofluorescence assay for detection of PRRSV in tissues from experimentally infected pigs and as sensitive as virus isolation in PAM, especially when combined with Southern blotting with the digoxigenin-labeled N probe and chemiluminescence detection.

Since 1986-1987, many swine herds throughout the world have experienced important outbreaks of a disease characterized by severe reproductive failure in sows of any parity and respiratory problems affecting pigs of all ages (5, 19, 35). The disease, named porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), is caused by a fastidious agent, the Lelystad virus (LV), which can be propagated on primary cultures of porcine alveolar macrophages (PAM) (34). The LV is a spherical, enveloped virus, 48 to 83 nm in diameter, with a central isometric nucleocapsid approximately 25 to 30 nm in diameter (4, 33). In all countries where the disease has been described, viruses with similar morphological characteristics were isolated (2, 4, 12, 26, 28). While European isolates of PRRS virus (PRRSV) appear to belong to the same serotype, antigenic variability has been demonstrated among North American isolates, and between North American and European isolates (32). Molecular studies have shown that the viral genome consists of a single-stranded RNA molecule with positive polarity, approximately 15 kb long, which generates in infected cells a 3'-coterminal nested set of six major subgenomic mRNAs (10, 24). The genomic organization and replication strategy of this new porcine virus appear similar to those of the

arteriviruses, including equine arteritis virus, lactate dehydrogenase-elevating virus, and simian hemorrhagic fever virus (27). Recently, partial nucleotide sequence analysis of the 3'-terminal region of the genome of a Quebec reference strain (IAF-exp91) of PRRSV revealed major differences from nucleocapsid protein genes of prototype European strains (23). Indeed, the IAF-exp91 strain showed identities of 63 and 59% with that of LV at the nucleotide and amino acid levels, respectively.

The approaches currently used for detection of the virus are essentially based on virus isolation in PAM or in the established cell lines, CL 2621 or MARC-145, derived from the MA-104 monkey kidney cell line (3, 20, 34). Final identification of the virus is serologically confirmed by indirect immunoperoxidase (34) or immunofluorescence (3) tests using specific antisera. Both techniques are the most widely used in the serological diagnosis of PRRSV, and their degrees of effectiveness have been previously studied (3, 33, 36). While virus isolation provides unequivocal evidence of PRRSV infection, the procedure is heavily complicated by the continuous preparation of PAM which is time-consuming and laborious. Thus, a sensitive method that does not rely on cell culture techniques should be of great interest for diagnosis of PRRSV infection.

The purpose of the present study was to evaluate the efficacy of reverse transcription and amplification of viral nucleic acid sequences by PCR (RT-PCR) for detection of PRRSV from infected PAM cultures or lung homogenates from aborted

* Corresponding author. Mailing address: Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3. Phone: (514) 686-5303. Fax: (514) 686-5627.

Intracellular Synthesis, Processing, and Transport of Proteins Encoded by ORFs 5 to 7 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

HELMI MARDASSI,* BERNARD MASSIE,† and SERGE DEA*¹

*Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3; and
†Institut de recherches en biotechnologie, Montréal, Québec, Canada H4P 2R2

Received January 29, 1996; accepted April 25, 1996

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), a small enveloped virus containing a positive-strand RNA genome, possesses at least three major structural proteins designated N, M, and E. The N protein is considered as the major component of the nucleocapsid, whereas M and E are membrane-associated. Previous studies using peptide-specific antibodies assigned these proteins to ORFs 7, 6, and 5, respectively. In the present report, monospecific antisera raised against *Escherichia coli*-expressed ORFs 5, 6, and 7 products were used to study the synthesis and processing of PRRSV structural proteins in the highly permissive MARC-145 cell line. Treatment of viral proteins with various glycosidases showed that only E was modified by N-linked glycans. Pulse-chase experiments revealed that intracellular transport of the major envelope glycoprotein was delayed in the premedial Golgi compartment. During the first 30 min of chase, E undergoes a gradual downward shift of its apparent molecular weight, thought to result from trimming of the mannose-rich glycan structures. Once E is transported to the medial Golgi or proximal elements, some molecules undergo complete processing of all their high-mannose N-linked oligosaccharides to complex type, while in other molecules only a fraction of N-linked glycans are terminally glycosylated. These two differentially glycosylated forms of E were found to be incorporated into extracellular virions. In cells and virions, both M and E were shown to occur in heterodimeric complexes linked by disulfide bonds. The oligomerization process, as analyzed from pulse-chase experiments, showed that M and E are incorporated into M-E complexes with different kinetics and efficiencies, in a fashion similar to their counterparts in equine arteritis virus. Apparently, all steps of E protein N-glycans processing proceed after its association with M which occurs in the endoplasmic reticulum (ER). In the infected cells, E and M appear highly membrane-associated, while N is predominantly cytosolic.

© 1996 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) is the causative agent of a new disease in swine that results in considerable economic losses due to severe reproductive failure in sows of any parities and respiratory signs in unweaned and growing pigs (Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1991). The virus was shown to be morphologically, structurally, and genomically similar to members of the *Arterivirus* genus (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenber *et al.*, 1993a and 1993b; Benfield *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992), which further includes equine arteritis virus (EAV), lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV), and simian hemorrhagic fever virus (SHFV). The PRRSV genome is a positive single-strand polyadenylated RNA molecule, approximately 15 kb in length, containing eight open reading frames (ORFs) which are expressed as a nested set of subgenomic RNAs (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenber *et al.*, 1993a). ORF1a and ORF1b (at the 5' end) contain several motifs characteristic of proteins involved in the replication process, whereas ORFs 2 to 6 (from 5' to 3' end)

are predicted to encode for membrane-associated proteins, and ORF 7 for a highly basic protein. The virion contains three major structural proteins: a nucleocapsid protein of 15 kDa (N), an unglycosylated membrane protein of 18–19 kDa (M), and a glycosylated membrane protein of approximately 25 kDa (E), which are encoded by ORFs 7, 6, and 5, respectively (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenber *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1993). In the case of EAV, four structural proteins (N, M, G_L, and G_S) have been identified and shown to be encoded by ORFs 7, 6, 5, and 2, respectively (De Vries *et al.*, 1992). The N, M, and G_L of EAV correspond to the products of PRRSV ORFs 5, 6, and 7, respectively (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenber *et al.*, 1995). The protein profile displayed by LDV is similar to that of EAV. However, as for PRRSV, the counterpart of the G_S protein has not yet been identified in purified virus preparations (Faaberg and Plogemann, 1995). Four major structural proteins have been reported for SHFV, and with the exception of the p15 and p20 species, which have been shown to be encoded by ORFs 7 and 6, respectively, the gene assignment for the other proteins is still unknown (Godeny *et al.*, 1995).

Recently, the synthesis and processing of EAV structural proteins have been investigated. Gel electrophoresis under nonreducing conditions revealed that G_S occurs in the infected cells in three distinct monomers and

¹To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: (514) 686-5627. E-mail: Serge_Dea@IAF.UQUEBEC.CA.