

**Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier**

Campus Laval

**CARACTÉRISATION DES PRODUITS DE L'ORF2 (a et b) DU VIRUS DU
SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN (VSRRP)**

**par
Barthélémy Ontsouka**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en virologie et immunologie**

Jury d'évaluation

Président de jury:	Patrick Labonté, Ph.D., Professeur Adjoint, INRS
Examineur externe:	Samir Mounir, Ph.D., MBA, CDP Capital- Technologies, Biotechnologie et Sciences de la vie, CDP Capital
Directeur de recherche:	Serge Dea, DMV, Ph.D. (<i>in memoriam</i>) Professeur titulaire, INRS
Codirecteurs:	François Shareck, Ph.D., Professeur titulaire, INRS Carl A. Gagnon, DMV, Ph.D. Professeur Adjoint Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, ex-directeur du Centre de biologie expérimentale, INRS

Dédicace

À mes enfants Gaétan Gautier et Marie-Sophie et à mon épouse Tatiana Strajnova qui m'ont supporté et encouragé durant mes études ainsi que pour leur patience.

À mon feu père Boumandou François pour l'éducation reçue.

À ma mère Voa Marie pour tout ce que je suis devenu sur cette terre.

À la mémoire du Dr. Serge Dea qui m'a fait confiance et qui a cru jusqu'à ses derniers jours à mes capacités de mener à terme ce projet.

Table des matières

Dédicace	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	vii
Sommaire.....	xi
Introduction générale.....	1
Revue de bibliographie.....	9
1.1 Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin.	10
1.2 Taxonomie	11
1.2.1 Ordre <i>Nidovirales</i>	11
1.2.2 Genre <i>Artérovirus</i> : Biologie, caractéristiques et propriétés.....	11
1.3 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin	15
1.3.1 Structure et morphologie.....	15
1.3.2 Organisation et variations génomiques.....	15
1.4 Protéines non-structurales et structurales	20
1.4.1 Protéines non-structurales (pns).....	20
1.4.2 Protéines structurales.....	22
1.4.3 Variabilité séquentielle des protéines structurales	32
1.5 Stratégies de transcription et de réplication	34
1.5.1 Attachement et pénétration	34
1.5.2 Transcription et réplication.....	35
1.5.3 Assemblage des virions et bourgeonnement.....	36
1.6 Pathogénie de l'infection par le VSRRP	36

1.6.1 Virulence.....	36
1.6.2 La réponse immunitaire et les vaccins.....	37
1.6.3 Persistance de l'infection.....	39
1.7 Conclusions	40
2. Matériel, méthodes et résultats	42
2.1 Article.....	43
2.2 Accusé de réception.....	44
2.3 Résumé en français.....	45
2.4 Attestation de la contribution des auteurs	46
2.5 Antibody response towards PRRSV GP _{2a} and P _{2b} , and their interaction with other structural proteins	47
3. Discussion générale.....	95
4. Perspectives.....	103
5. Remerciements.....	104
6. Annexe.....	107
6.1. Annexe : Liste des présentations et séances d'affiche	108
7. Bibliographie.....	109

Liste des tableaux

Tableau 1 : Pourcentage d'identité en acides aminés des ORFs 2 à 7 de la souche européenne LV et des souches de VSRRP provenant de différents pays et aussi de deux autres <i>Artérovirus</i>	17
Tableau 2 : Caractéristiques comparatives des produits des ORFs 2-7 des souches nord-américaines et européennes.....	24
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par RT-PCR.....	86
Tableau 4 : Réponse immune anti-GP _{2a} et anti-P _{2b} des lapins et souris suite à l'immunisation avec les plasmides recombinants codant pour les gènes de l'ORF2a et l'ORF2b du VSRRP et avec les protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b.....	87
Tableau 5 : Caractéristiques des anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre les protéines GP _{2a} et P _{2b} de la souche IAF-Klop du VSRRP obtenus après immunisation génétique des souris avec les plasmides recombinats pRc-ORF2a et pRc-ORF2b....	89

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la classification virale du VSRRP	13
Figure 2 : Représentation schématique du VSRRP du génogroupe nord-américain	18
Figure 3 : Organisation génomique et mode de réplication du VSRRP.....	28
Figure 4 : Séquence du gène de l'ORF2 de la souche IAF-Klop du VSRRP numéro d'accession Genbank AF003343	30
Figure 5 : Profil électrophorétique des protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b et leur réactivité avec un sérum hyperimmun anti-PRRSV de porc	74
Figure 6 : Cinétique d'apparition des anticorps anti-GP _{2a} et anti-P _{2b} chez les porcs expérimentalement infectés par la souche IAF-Klop du VSRRP	76
Figure 7 : Réactivité des sérums hyperimmuns anti-GST-ORF2a et anti-GST-ORF2b de lapins avec les protéines virales natives.....	78
Figure 8 : Test d'immunobuvardage de type Western blot. Réactivité des protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b avec des sérums hyperimmuns et des anticorps monoclonaux (AcMo) obtenus par immunisation génétique	80
Figure 9 : Test d'immunofluorescence indirecte sur un feuillet de cellules MARC-145 infectées par la souche IAF-Klop du VSRRP. Réactivité des AcMo anti-GP _{2a} et anti-P _{2b}	82
Figure 10 : Co-immunoprécipitation du complexe de protéines GP _{2a} , P _{2b} et N de la souche IAF-Klop du VSRRP détectée par le test de RIPA	84
Figure 11 : Expression transitoire de l'ORF2a et ORF2b du VSRRP dans les cellules HEK 293A révélée par immunofluorescence indirecte 72 heures après la transfection	91
Figure 12 : Expression eucaryotique du gène de l'ORF2b du VSRRP dans un feuillet de cellules HEK-293A transfectées avec le plasmide recombinant pCEP-ORF2b et révélée par test d'immunobuvardage de type Western blot	93

Liste des abréviations

aa	Acides aminés
AcMo	Anticorp Monoclonal
ADE	Antibody dependent enhancement
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	American Type Culture Collection
BHK	Cellules reins de Hamster (version anglaise :Baby Hamster Kidney)
Ci	Curie
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
cp	Cystéine protéase
CPE	Effet cytopathique en culture cellulaire (version anglaise : Cytopathic effect)
CMV	Cytomégalo virus
Da	Daltons
DICT ₅₀	Dose infectieuse induisant un effet cytopathique dans 50% des cultures cellulaires infectées
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dpi	Day post infection
DTT	Dithiothreitol
EAV	Virus de l'artérite équine (version anglaise : equine arteritis virus)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Sérum foetal bovin (version anglaise : Fetal bovine serum)
FITC	Fluoresceine isothiocyanate
GAV	Gill-associated virus

GP	Glycoprotéine et le chiffre qui suit indique le numéro de l'ORF codant pour la protéine. Exemple : GP _{2a} est la glycoprotéine de l'ORF2a
GST	Glutathione S-transférase
HAAT	Hyperthermie-Anorexie-Avortement de la Truie
HEK	Cellules de reins d'embryon humain (version anglaise : Human Embryonic Kidney)
IB	Immunobuvardage (version anglaise : immunoblot ou westernblot (WB))
ICTV	International Committee for Taxonomy of Viruses
IFI	Immunofluorescence indirecte
IIF	Indirect Immunofluorescence
Ig	Immunoglobuline
IM	Intra-musculaire
hpi	Heure post-infection
Kb	Kilobases
kDa	Poids moléculaire en kilodalton
LDV	Virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique (version anglaise : lactic dehydrogenase elevating virus)
LV	Virus de Lelystad (souche de référence européenne du VSRRP)
M	Protéine de la matrice
MARC	Cellules de reins de singe du Meat Animal Research Centre
MEM	Modified Eagle's Minimum essential Medium
MOI	Multiplicité d'infection (version anglaise : Multiplicity of infection)
M _r	Masse moléculaire relative
N	Protéine de la nucléocapside
NES	Signal d'export nucléaire (version anglaise : nuclear export signal).
NLS	Signal de localisation nucléaire (version anglaise : nuclear localization signal)
NoLS	Séquence de localisation nucléaire (version anglaise : nuclear localization sequence)
nsp	Protéine non-structurale (version anglaise : nsp- non structural protein)
nt	Nucléotides

ORF	Cadre de lecture ouvert (version anglaise : Open Reading Frame)
PAM	Culture primaire de macrophages alvéolaires de porc (version anglaise : Porcine Alveolar Macrophages)
pb(bp)	Paire de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase (version anglaise : polymerase chain reaction)
pcp	Cystéine protéase de type papaïne (version anglaise : Papaïne cysteine protease)
P.E.I	Polyéthylènimine
PEARS	Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome
pH	Potentiel d'hydrogène
p.i.	Post-infection
PMSF	Phenylmethylsulfonide fluoride
POL	Polyprotéine
PRRS	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome
PRRSV	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
RE	Réticulum endoplasmique (version anglaise : ER)
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RK	Cellules de reins de lapin (version anglaise : Rabbit Kidney cells)
rpm	Révolution par minute
RT	Transcriptase inverse
SDRP	Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide
SHFV	Virus de la fièvre hémorragique simienne (version anglaise : simian haemorrhagic fever)
SIRS	Swine Infertility Respiratory Syndrome
SN	Séroneutralisation
sp	Sérine protéase
SRRP	Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin

STE	Tampon de chlorure de sodium, Tris, EDTA (version anglaise : sodium chloride, Tris EDTA)
TBS	Tampon Tris-NaCl (version anglaise : Tris buffer saline)
TNE	Tampon Tris-HCl, NaCl, EDTA
TBS-SM	TBS-skim milk
TCID ₅₀	Dose Infectieuse induisant un effet cytopathique dans 50% des cultures cellulaires infectées)
TRS	Séquences régulant la transcription (version anglaise : Transcription-regulating sequences)
VN	Test de séroneutralisation virale (version anglaise : virus neutralization)
VSRRP	Virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin.
WB	Western blot (Immunobuvardage de type Western)
YT	Extraits de levures et la tryptone (version anglaise : Yeast extract and Tryptone)

Sommaire

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) est une maladie qui est apparue à la fin des années 80 en Europe et en Amérique du Nord dans plusieurs élevages. L'agent causal fut isolé pour la première fois dans le continent européen, à Lelystad au Pays-Bas, au début des années 90.

L'agent causal est un virus à ARN simple brin de polarité positive de 15 kb. Le génome viral contient 9 cadres de lecture ouvert (ORF) dont l'ORF1a et l'ORF1b représentent plus de 75% du génome entier et codent pour une polyprotéine ayant une activité réplacase et polymérase. Les ORF 2 et 4-7 codent pour les protéines structurales majeures (M, N, GP₅) et mineures (GP_{2a}, P_{2b}, GP₄) à l'exception de l'ORF3 qui code pour une protéine non-structurale (GP₃) et sécrétée sous forme soluble dans le cas de la souche nord-américaine de référence (IAF-Klop). Plusieurs protéines dont la GP₅, N, GP₄, GP₃ et M sont caractérisées et quelques-unes de leurs propriétés ont été déterminées. La GP₅ et la M tout comme la GP₃ et GP₄ ainsi que les molécules de la protéine N interagissent entre elles (formation d'homodimères, d'hétérodimères, de trimères etc...). La protéine GP₅ est l'antigène viral qui est en grande partie reconnu par les anticorps neutralisants. La protéine GP₄ est également capable d'induire la synthèse d'anticorps neutralisants chez la souris mais à de très faibles titres et aucun anticorps neutralisant spécifique à celle-ci n'a pu être démontré dans les sérums de porcs hyperimmuns. Les protéines structurales mineures GP_{2a} et P_{2b} sont peu caractérisées.


Le présent travail consistait à développer des outils qui permettraient la caractérisation des protéines structurales mineures GP_{2a} et P_{2b} codées par l'ORF2 (a et b) du virus SRRP (VSRRP). Les étapes cruciales du projet visaient 1) la production des protéines recombinantes procaryotiques de fusion, 2) la production de sérums monospécifiques de lapins et de souris ainsi que 3) la synthèse d'anticorps monoclonaux (AcMo) spécifiques.

Les protéines recombinantes de fusion obtenues ont permis l'évaluation de la cinétique d'apparition des anticorps chez les porcs expérimentalement infectés par le VSRRP. Ces derniers travaux ont établi que les anticorps dirigés contre la GP_{2a} et P_{2b}

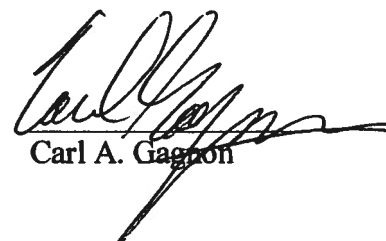
apparaissent dès la première semaine de l'infection expérimentale, soit à 6 jours post-infection (p.i), tout comme ceux dirigés contre les protéines structurales majeures (M, N, GP₅).

Les sérums monospécifiques anti-GST-ORF2a et GST-ORF2b de lapin ainsi que les AcMo obtenus par immunisation génétique de souris ont permis de révéler la présence des deux protéines dans les cellules infectées par le VSR_{RP} et dans les virions semi-purifiés. L'expression des protéines de l'ORF2 (a et b) dans les cellules infectées et dans les virions semi-purifiés ne pouvait être mise en évidence que par le test de radioimmunoprécipitation (RIPA), confirmant leur statut mineur.

Finalement, les résultats préliminaires obtenus avec des sérums monospécifiques et les AcMo semblent détecter des interactions non-covalentes entre les protéines GP_{2a}, P_{2b} et N aussi bien dans les cellules infectées que dans les virions semi-purifiés. La confirmation de la présence de ces interactions nécessite des études supplémentaires.


Barthélémy Ontsouka


François Shareck


Carl A. Gagnon

Introduction générale

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) est une maladie qui se manifeste dans sa forme aiguë par des perturbations de la reproduction chez les truies (avortements, mises bas prématurées et naissances des porcelets mort-nés ou faibles et momification fœtale) ainsi que par des problèmes respiratoires (toux, respiration rapide abdominale, écoulement nasal) d'où son appellation (Benfield *et al.*, 1992a).

C'est une maladie relativement récente qui fut signalée à la fin des années 80 simultanément en Amérique du Nord et en Europe (Keffaber, 1989; Bilodeau *et al.*, 1991b; Cromwijk, 1991; Baron *et al.*, 1992; Paton *et al.*, 1992; Plana *et al.*, 1992; Botner *et al.*, 1994) créant ainsi une panique chez les éleveurs. La mortalité peut atteindre 100% chez les nouveau-nés et la phase initiale de la maladie est souvent suivie d'infections secondaires d'origine bactériennes et virales (Benfield *et al.*, 1992a). Les effets dévastateurs de la maladie sont les plus importants lors de la forme aiguë et ils sont liés à la baisse de la reproduction associée à une diminution drastique du nombre de porcelets nés par portée (Bilodeau *et al.*, 1991a). Les cas de mort-nés peuvent atteindre 80-100% et ils commencent habituellement après une période de baisse du taux d'avortements (Keffaber, 1989).

Actuellement, ce syndrome se retrouve de plus en plus diagnostiqué sous sa forme inapparente (subclinique) dans plusieurs pays où l'élevage porcin est intensif (Larochelle *et al.*, 2003).

Cette maladie occasionne d'importantes pertes économiques à l'industrie porcine et peut compromettre son avenir ainsi que son développement (Bilodeau *et al.*, 1991a). Quelle que soit sa forme, la maladie porte un préjudice énorme à l'industrie porcine et demande de mettre au point, de manière urgente, des moyens de lutte ou de prophylaxie.

L'agent causal du SRRP a été isolé pour la première fois en Hollande en 1991 (Wensvoort *et al.*, 1991) dans la ville de Lelystad d'où son nom de "Lelystad virus"(LV). Par la suite, d'autres équipes de chercheurs en Europe et en Amérique du Nord ont isolé un agent viral (virus du SRRP) partageant les mêmes propriétés biologiques (Benfield *et al.*, 1992b; Collins *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992).

Le VSRRP fait partie de la famille *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997) de l'ordre *Nidovirales* avec le virus de l'artérite virale équine (equine arteritis virus - EAV), le virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique (lactate dehydrogenase-elevating virus - LDV) et le virus de la fièvre hémorragique simienne (simian haemorrhagic fever virus - SHFV).

Cette classification est basée sur la ressemblance de l'organisation génomique, la stratégie de transcription et de réplication, la structure et la biologie de ces virus (Meulenberg *et al.*, 1997). Cependant, l'homologie des séquences est plus prononcée entre le virus du SRRP et celui du virus LDV des souris (24-53%) (Albina, 1997; Dea *et al.*, 2000a) comparativement aux autres virus de la même famille (11 à 28%). Ceci expliquerait l'existence des réactions sérologiques croisées entre ces deux *Artérovirus* (Plagemann *et al.*, 2002).

Au Canada, une enquête sérologique rétrospective a démontré que ce virus circule dans les élevages depuis 1979 (Carman *et al.*, 1995). L'apparition d'une nouvelle entité nosologique laisse toujours place à plusieurs hypothèses quant à son apparition. Cette enquête sérologique peut laisser supposer que l'agent causal pourrait être en évolution lente jusqu'à la sélection d'un mutant susceptible de se répliquer dans l'organisme de l'animal et à la suite d'un déséquilibre des interactions hôte-virus s'est avéré pathogène (Plagemann, 2003), mais causant une forme inapparente de la maladie.

L'hypothèse émise par Plagemann (2003) indique qu'en Europe (en Lituanie) au 19^e siècle, le virus du LDV aurait pu être transmis aux sangliers sauvages à partir des souris infectées. Ce virus a subi une lente évolution jusqu'à la sélection d'un mutant capable de se répliquer dans l'organisme des sangliers sauvages. La première infection des sangliers se serait produite dans l'Est de l'Allemagne (Sachsen-Anhalt) où les premiers porcs séropositifs à l'infection par le VSRRP ainsi que les sangliers infectés furent détectés (Ohlinger, 1992). C'est probablement de cette région que le virus précurseur du VSRRP fut introduit aux États-Unis avec des sangliers sauvages Eurasiatiques en 1912. À partir de ce moment le virus a évolué de manière indépendante en Europe et en Amérique. Cette évolution indépendante serait à l'origine de deux génotypes distincts. L'importance des échanges économiques entre les deux continents peut faire valoir cette hypothèse. En effet, l'analyse des séquences révèle 88-99% d'homologie en acides aminés (aa) parmi les souches d'un même continent, tandis que celle-ci n'est que de 52-63% entre les souches européennes et nord-américaines (Allende *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000; Dea *et al.*, 2000a).

Une approche plus génétique semble appuyer cette hypothèse d'autant plus que l'agent causal, comme confirmé par la suite, est un virus à ARN susceptible de subir des mutations (Drake et Holland, 1999) au cours de son évolution (Laroche *et al.*, 2003).

L'idée de l'émergence du virus SRRP à partir d'un même ancêtre comme celui du virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique (LDV) avec lequel il partage 53% d'homologie en acides aminés (aa) peut être plausible (Plagemann, 2003) même si l'identité nucléotidique entre les deux génogroupes (nord-américain versus européen) n'est que de 63% (Allende *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000). Cependant l'apparition simultanée de la maladie en Amérique du Nord et en Europe reste sans explication.

L'agent causal du SRRP est un virus enveloppé à ARN simple brin d'une longueur de 15 kb, de polarité positive, non segmenté et polyadénylé (Conzelmann *et al.*, 1993). Le génome contient neuf cadres de lecture ouverts (open reading frames, ORFs) dont presque 75% du génome sont composés par l'ORF1a et 1b qui codent pour des protéines non structurales (pns) ou non-structural proteins (nsp) possédant, entre autre, une activité hélicase et réplicase. Les ORFs 2 et 4 à 7 codent pour des protéines structurales qui, selon leur quantité dans le virion, sont considérées comme des protéines structurales majeures ou mineures. La protéine de la nucléocapside N (produit de l'ORF7), la glycoprotéine majeure de l'enveloppe GP₅ (produit de l'ORF5) et la protéine de la matrice non-glycosylée M (produit de l'ORF6) sont considérées comme des protéines structurales majeures (Benfield *et al.*, 1992b; Meulenberg *et al.*, 1993; Mardassi *et al.*, 1995; Dea *et al.*, 2000a). La glycoprotéine GP_{2a} (produit de l'ORF2a), la protéine non-glycosylée P_{2b} (produit de l'ORF2b) et la glycoprotéine GP₄ (produit de l'ORF4) sont désignées comme des protéines structurales mineures (Meulenberg *et al.*, 1995; Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996; van Nieuwstadt *et al.*, 1996; Snijder *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001). La glycoprotéine GP₃ (produit de l'ORF3) est considérée comme étant une protéine non-structurale suite aux résultats obtenus à partir de la souche de référence nord-américaine IAF-Klop (Gonin *et al.*, 1998; Mardassi *et al.*, 1998) contrairement à la GP₃ de la souche de référence européenne LV qui est considérée comme étant une protéine structurale mineure (Meulenberg *et al.*, 1995; van Nieuwstadt *et al.*, 1996).

La caractérisation de la réponse immunitaire à l'infection contre le VSRRP révèle l'activation du système immunitaire tant humoral que cellulaire. Les anticorps dirigés contre les protéines structurales majeures (N, M et GP₅) du VSRRP chez les porcs expérimentalement infectés apparaissent à partir du 6^e jour post-infection (p.i) et perdurent jusqu'à 6-9 semaines p.i (délai d'observation) (Loemba *et al.*, 1996). Par ailleurs, la cinétique de l'apparition des anticorps est plus distincte en fonction des

différents isotypes. Les IgM sont mises en évidence à partir de la première semaine de l'infection et culminent au 14-21^{ème} jour, tandis que les IgG atteignent un niveau élevé entre le 21^{ème} et le 28^{ème} jour et leurs titres restent inchangés jusqu'à la neuvième semaine d'observation (Yoon *et al.*, 1995; Loemba *et al.*, 1996; Murtaugh *et al.*, 2002). Parmi les protéines structurales majeures, la protéine N est la plus immunogène et les anticorps dirigés contre cette protéine sont les plus abondants bien que ne possédant aucune activité neutralisante (Dea *et al.*, 2000a). Les anticorps neutralisants sont plutôt dirigés en majeure partie contre la protéine GP₅ (Pirzadeh et Dea, 1997; Gonin *et al.*, 1999; Weiland *et al.*, 1999) et en faible quantité contre la GP₄ et la protéine M (van Nieuwstadt *et al.*, 1996; Meulenbergh *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000).

Les anticorps dirigés contre les protéines structurales mineures sont détectés en très faible quantité dans les sérums des porcs infectés. De résultats récents (Wu *et al.*, 2001) montrent que les anticorps anti-P_{2b} apparaissent à partir du 18-21^{ème} jour p.i.. Cette détection tardive des anticorps dirigés contre la P_{2b} peut être liée à la faible immunogénicité ou au faible taux d'expression de ces protéines lors du cycle de réplication virale. Les résultats obtenus par certains chercheurs (Bautista *et al.*, 1999) indiquent les produits de l'ORF2 (a et b) semblent être impliqués dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Absents dans la première semaine de l'infection, les anticorps neutralisants sont détectés dans le sang des animaux virémiques soit à partir de la 4^{ème} semaine. Mais leur présence ne semble pas éliminer complètement le virus dans l'organisme de l'animal (Loemba *et al.*, 1996; Wills *et al.*, 1997; Dee *et al.*, 1998). Cependant les résultats récents montrent que le transfert passif par instillation intrapéritonéale de fortes doses d'immunoglobulines (Ig) anti-VSRRP obtenus des porcs convalescents peut conférer une immunité protectrice et stérilisante contre le VSRRP *in vivo* (Osorio *et al.*, 2002). Par ailleurs, la présence des anticorps neutralisants semble stimuler la réplication du VSRRP dans les macrophages (Yoon *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 1997; Shibata *et al.*, 1998) via le phénomène ADE (antibody dependent enhancement).

L'infection par le VSRRP s'accompagne du déclenchement de certains mécanismes et réactions immunopathologiques tels que le mimétisme moléculaire des antigènes viraux et cellulaires, la synthèse des autoanticorps anti-idiotypiques dirigés contre les anticorps anti-GP₅, l'apoptose et la réponse d'hypersensibilité retardée (Bautista et Molitor, 1997; Gagnon, 2001; Weiland et Weiland, 2002; Jiang *et al.*, 2003).

Tous ces facteurs indiquent que la réponse immunitaire dirigée contre le VSRRP doit être examinée sous plusieurs aspects (Murtaugh *et al.*, 2002) bien que le transfert passif des immunoglobulines peut conférer une protection (Osorio *et al.*, 2002).

Les protéines GP_{2a} et P_{2b} du VSRRP présentent un faible taux d'expression dans les cellules infectées ainsi qu'un faible taux d'incorporation dans le virion (Wu *et al.*, 2001). En effet, les produits de l'ORF2 (a et b) des *Artérovirus* exprimés à partir de l'ARNm subgénomique bicistronique (mRNA2) (Snijder *et al.*, 1999) sont exprimés et incorporés dans le virion en quantité difficilement détectable (Plagemann, 2001; Wu *et al.*, 2001), ce qui complique leur caractérisation.

Par conséquent, notre première hypothèse est qu'une amélioration quantitative de l'expression procaryotique et/ou eucaryotique permettrait l'obtention d'une quantité de GP_{2a} et P_{2b} suffisante pour permettre le développement des outils efficaces pour étudier leur immunobiologie et trouver des nouveaux antigènes viraux immunologiquement intéressants pour le développement de nouveaux vaccins.

Malgré les différences évidentes entre les virus du EAV, LDV, VSRRP et SHFV (Meulenberg *et al.*, 1997; Snijder *et al.*, 1999), les connaissances de références associées aux *Artérovirus* sont souvent basées sur les résultats des recherches effectuées chez l'EAV. L'identification des produits de l'ORF2 (a et b) chez les *Artérovirus* indique que ces deux produits, par exemple chez l'EAV, sont essentiels dans la réplication et la formation des particules virales infectieuses (van Dinten *et al.*, 1997; Snijder *et al.*, 1999). L'assemblage des particules virales est une étape cruciale dans la réplication virale et exige une interaction complexe entre les différents composants du virus. L'interaction de la nucléocapside virale avec les protéines de l'enveloppe favorise l'incorporation de celle-ci chez les virus enveloppés (Simons et Garoff, 1980). Des interactions entre les différentes protéines structurales des *Artérovirus* ont été mises en évidence par exemple entre les molécules de la protéine de la nucléocapside N (formation d'homodimère) (Wootton et Yoo, 2003); la protéine M et la GP₅ (formation d'hétérodimère), la GP₃ et la GP₄ (formation de di- et trimère) et que ces interactions permettent aux protéines d'acquies toutes leurs fonctions (Faaberg *et al.*, 1995; Mardassi *et al.*, 1996; Mardassi *et al.*, 1998; Balasuriya *et al.*, 2000; Balasuriya *et al.*, 2002; Snijder *et al.*, 2003).

Récemment chez l'EAV, il a été rapporté que trois protéines structurales mineures (GP_{2b}, GP₃ et GP₄) forment un trimère dans le virion auquel pourrait interagir de façon non-covalente la protéine E (homologue de la protéine P_{2b} dans le cas du VSRRP)

(Wieringa *et al.*, 2003a; Wieringa *et al.*, 2003b). Le rôle de ces interactions reste à être spécifié.

D'autre part l'abolition du codon d'initiation du gène de l'ORF2b et ORF2a chez l'EAV entraîne la perte de l'infectivité du virus (Snijder *et al.*, 1999; Wieringa *et al.*, 2003b). Chez le VSRRP du génogroupe nord-américain, ces deux produits ne sont pas aussi bien caractérisés.

Notre deuxième hypothèse est que les deux protéines de l'ORF2 (a et b) du VSRRP, par analogie à l'EAV, pourraient interagir avec d'autres protéines virales et ainsi influencer l'infectivité et la réplication du VSRRP (Verheije *et al.*, 2003).

Avant ce travail, la caractérisation des produits de l'ORF2 (a et b) VSRRP s'inspirait de celle des produits de l'ORF2 (a et b) du EAV, compte tenu de la ressemblance entre ces deux virus de la même famille. Mais les résultats obtenus montrent une différence évidente entre les produits des deux gènes chez l'EAV et le VSRRP entre autres la taille, l'emplacement inversé, le taux d'expression et d'incorporation dans le virion, la présence d'un signal potentiel d'endocytose - YRPV à base de tyrosine dans la séquence de la protéine E du EAV mais absente dans la protéine P_{2b} chez le VSRRP) (Snijder *et al.*, 1999).

Il existe deux publications concernant l'ORF2a du virus VSRRP du génogroupe européen (Meulenberg *et al.*, 1995; Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996) et quelques données fragmentaires sur l'ORF2a du VSRRP nord-américain sont également disponibles. Récemment, un article scientifique fut publié sur l'ORF2b du VSRRP du génogroupe nord-américain (Wu *et al.*, 2001) et aucune étude n'est disponible sur l'ORF2b du génogroupe européen.

Le premier volet de mon projet de maîtrise examine les modalités de clonage et d'expression procaryotique et eucaryotique des produits de l'ORF2 (a et b) du VSRRP et étudie les propriétés biologiques (l'antigénicité, l'immunogénicité) de ces produits d'expression. Dans le but de répondre aux questionnements du premier volet, les sérums des porcs expérimentalement infectés (Loemba *et al.*, 1996) ont été utilisés pour tester la capacité des protéines recombinantes de fusion obtenues à révéler la présence et la cinétique d'apparition des anticorps chez les porcs expérimentalement infectés. Les protéines obtenues ainsi que l'ADN plasmidique codant pour les deux gènes de l'ORF2 (a et b) ont servi aussi pour l'immunisation des lapins et souris afin d'évaluer la réponse

immunitaire chez des animaux immunisés et de produire et caractériser des anticorps monospécifiques et monoclonaux (AcMo).

Le deuxième volet analyse l'expression des protéines virales dans les cellules infectées par le VSRRP et les possibles interactions entre les protéines GP_{2a}, P_{2b} et les autres protéines structurales du VSRRP.

Revue de bibliographie

1.1 Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin.

Le SRRP fit son apparition à la fin des années 80 en Amérique du Nord et en Europe dans plusieurs élevages porcins. Cliniquement, la maladie se manifeste par des troubles d'ordre reproducteur et respiratoire chez les truies ainsi que chez les jeunes porcelets en période post-sevrage et en engraissement (Martineau *et al.*, 1991). Les troubles reproducteurs se caractérisent par des avortements tardifs, de la momification foetale, des mises bas prématurées et de mort-nés (Goyal, 1993). Au niveau du système respiratoire, on observe une pneumonie interstitielle ou nécrotique accompagnée souvent d'une dyspnée avec une respiration abdominale. La maladie peut se manifester sous forme chronique ou subclinique (Larochelle *et al.*, 2003). Le développement de la maladie pourrait être associé à une immunodéficience (Li et Yang, 2003).

Avant l'isolement de l'agent viral causal plusieurs pathogènes furent suspectés en l'occurrence le virus de l'encéphalomyocardite et un variant du virus de l'influenza porcin de type A (Keffaber, 1989; Martineau *et al.*, 1992), mais leur responsabilité dans la maladie fut écartée car ces agents ne reproduisaient pas tous les signes cliniques du SRRP et les séroconversions envers ces agents n'étaient pas régulièrement observées (Dea *et al.*, 1991; Goyal, 1993).

La maladie fut différemment appelée dans plusieurs pays selon la prédominance des signes cliniques observés. La maladie était appelée entre autres la maladie mystérieuse (mystery swine disease) (Hill, 1990) et l'infertilité porcine et syndrome respiratoire (swine infertility and respiratory syndrome-SIRS) (Collins *et al.*, 1992) aux États-Unis.

Au Canada, le terme du syndrome HAAT-pneumonie interstitielle ou le syndrome d'hyperthermie, anorexie et avortement de la truie (Martineau *et al.*, 1991) fut plutôt utilisé.

En Europe, la maladie fut aussi appelée l'avortement épidémique de la truie et syndrome respiratoire (porcine epidemic abortion and respiratory syndrome : PEARS) (Meulenberg *et al.*, 1993), la maladie des oreilles bleues (Blue ear disease of pigs) (Paton *et al.*, 1991) le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP) (Albina *et al.*, 1992).

Devant cette multitude d'appellations, la confusion semblait évidente avant l'adoption lors du premier symposium international sur la maladie tenu en 1992 à St-Paul au Minnesota (Collins J., First international symposium on SIRS-PRRS, 1992) de l'utilisation du terme "Syndrome reproducteur et respiratoire porcin" (porcine reproductive and respiratory syndrome PRRS) qui est reconnu internationalement pour désigner ce syndrome.

1.2 Taxonomie

1.2.1 Ordre *Nidovirales*

Le VSRRP est un membre de l'ordre *Nidovirales* depuis 1996 lors de la création de cet ordre à Jérusalem par le comité international de la taxonomie des virus (ICTV). L'ordre des *Nidovirales* est constitué de trois familles dont les *Coronaviridae*, les *Arteriviridae* et les *Roniviridae* (figure 1) (Cavanagh, 1997; Cowley *et al.*, 2000). La famille des *Coronaviridae* comprend deux genres : les *Coronavirus* et les *Torovirus*.

Les deux autres familles ne sont constituées que d'un seul genre soit les *Artérvirus* et les *Okavirus* respectivement. Le genre *Okavirus* est constitué d'un nouveau virus découvert chez une espèce de crevette nommée *Penaeus monodon* (Gill-associated virus ou GAV) et ce virus, premier de la catégorie des invertébrés à être répertorié dans l'ordre des *Nidovirales*, est génomiquement plus près des *Coronaviridae* que des *Arteriviridae* (Cowley *et al.*, 2000).

Le VSRRP fait partie des *Artérvirus* auquel appartiennent l'EAV (le virus de l'artérite virale équine (virus de référence), le LDV (le virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique) et le SHFV (le virus de la fièvre hémorragique simienne).

1.2.2 Genre *Artérvirus* : Biologie, caractéristiques et propriétés

Les trois premiers représentants de ce genre (EAV, LDV et SHFV) furent isolés dans les années 50 et 60 (Bryans *et al.*, 1957; Riley *et al.*, 1960; Palmer *et al.*, 1968). La maladie causée par ces *Artérvirus* apparaît sous les formes aiguë, chronique et asymptomatique. Les troubles reproducteurs et respiratoires, la fièvre transitoire ou hémorragique létale et la nécrose des artérioles musculaires sont souvent les signes

manifestes de la maladie (Snijder et Meulenberg, 2001). L'animal infecté peut rester porteur de ces virus pendant une longue période (Snijder et Meulenberg, 1998).

L'animal hôte varie selon le virus et est spécifique aux équidés (pour l'EAV); aux souris (pour le LDV); aux singes africains et asiatiques (pour le SHFV) et aux porcs (pour le VSRRP) (Snijder et Meulenberg, 1998). Cependant certains résultats montrent que les poulets et les canards pourraient être susceptibles à l'infection par le virus SRRP (Zimmerman *et al.*, 1997) car celui-ci peut être isolé des fèces des oiseaux exposés au virus dans l'eau des abreuvoirs. Par contre, actuellement d'autres travaux sont venus infirmer cette dernière hypothèse (Otake *et al.*, 2003).

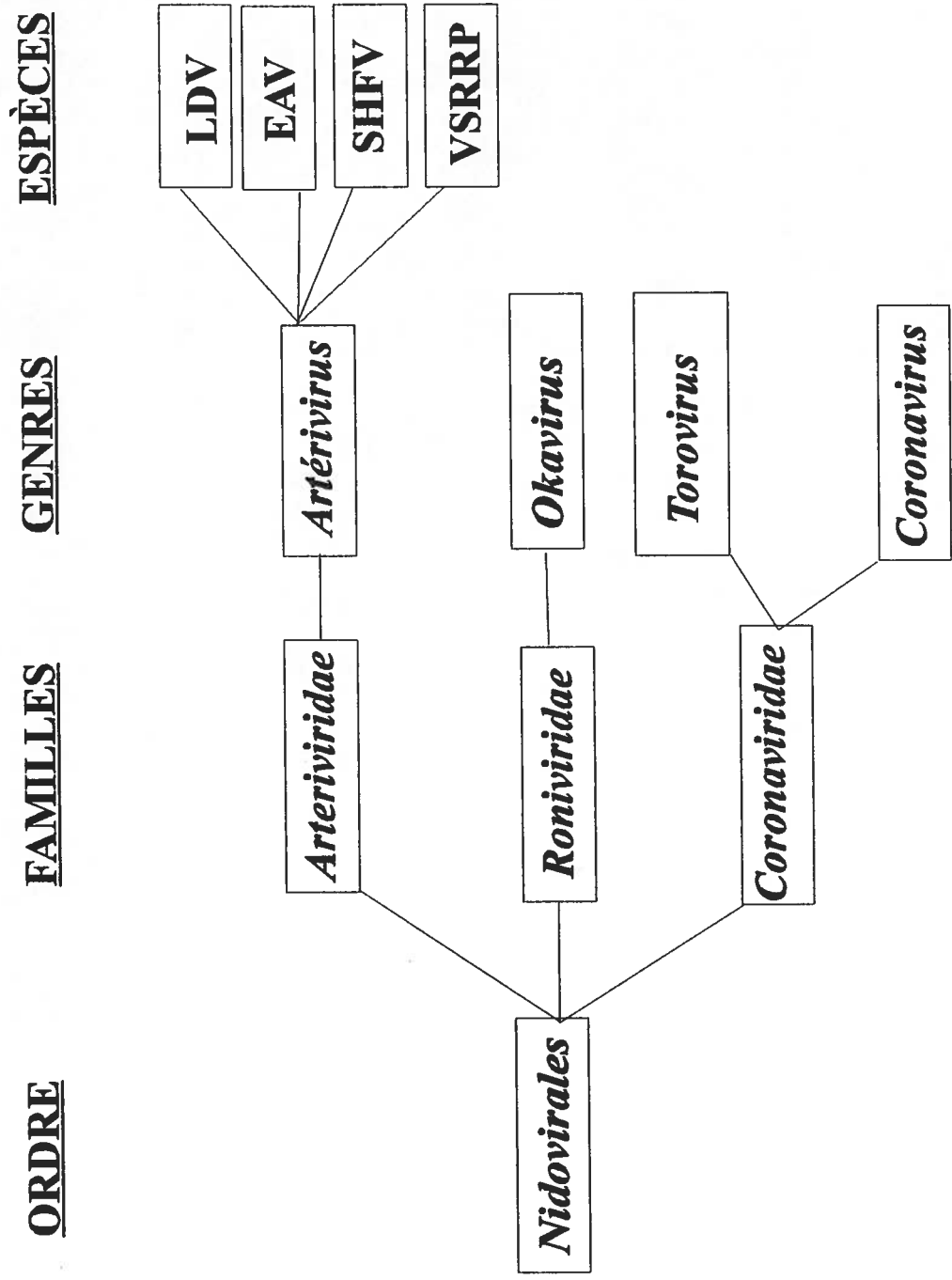
Bien que la voie aérosole de transmission soit la plus suspectée dans plusieurs cas d'infection par des *Artérovirus* (Wensvoort *et al.*, 1992; Timoney et McCollum, 1993; Loemba *et al.*, 1996; Larochelle *et al.*, 2003), la réplication du VSRRP dans les cellules germinales de testicules et la transmission par l'intermédiaire du sperme contaminé représentent une situation préoccupante dans les élevages porcins et équins (Sur *et al.*, 1997).

Les *Artérovirus* partagent plusieurs propriétés biologiques communes. Le macrophage est la première cellule cible où la réplication de tous les virus est cytoplasmique et cytolitique (Pol *et al.*, 1991; Plagemann et Moennig, 1992). La formation des vésicules à double membranes dont le rôle reste inconnu est une caractéristique de la réplication des *Artérovirus* dans les cellules infectées (Pol *et al.*, 1991; Pol *et al.*, 1997). Ces vésicules à double membranes ne contiennent pas de virions et pourraient être impliquées dans la réplication de l'ARN génomique, comme dans le cas de l'EAV où elles seraient formées à partir du réticulum endoplasmique (RE) (Pedersen *et al.*, 1999).

Les particules virales assemblées bourgeonnent à partir de la membrane du RE et/ou du Golgi et sont expulsées de la cellule infectée par exocytose et lyse cellulaire (Magnusson *et al.*, 1970; Pol *et al.*, 1997).

Figure 1 :Représentation schématique de la classification virale du VSRRP

selon Cavanagh (1997) et Cowley et al.(2000). EAV : virus de l'artérite virale équine -virus de référence; LDV : virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique ; SHFV : virus de la fièvre hémorragique simienne; VSRRP : virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.



Ces virus se différencient quant au type de cellules utilisées pour leur réplication. Ainsi, le LDV se réplique spécifiquement dans les cultures primaires de macrophages de souris et aucune lignée de cellules ne semble être capable d'assurer sa réplication (Plagemann et Moennig, 1992). Dans le cas du VSRRP et du SHFV, en dehors des macrophages, les lignées continues de cellules de reins de singe (MA-104) et ses dérivés (CL2621 ou MARC-145) permettent la réplication de ces deux virus (Gravell *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1993). L'EAV se réplique aussi bien dans les cultures primaires de macrophages et de cellules de reins que dans une variété de lignées de cellules telles que les cellules de reins de hamster (BHK-21), les cellules de reins de singe Vero et les cellules de reins de lapin (RK-13) (Hyllseth, 1969; Konishi *et al.*, 1975).

1.3 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

1.3.1 Structure et morphologie

Le VSRRP est un virus enveloppé de petite taille (45-70 nm). Son enveloppe lisse entoure une nucléocapside interne sphérique de 25 à 30 nm, à symétrie icosaédrique (Benfield *et al.*, 1992b; Dea *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992; Mardassi *et al.*, 1994). Sa structure peut être schématisée comme indiqué dans la figure 2.

1.3.2 Organisation et variations génomiques

Le génome du VSRRP est constitué d'une molécule d'ARN simple brin, non segmentée, de polarité positive possédant une séquence de tête coiffée en 5' et qui est polyadénylée en 3'. C'est une molécule de 15 kb qui contient neuf cadres de lecture ouverts (ORFs) désignés ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b et l'ORF3 à 7 ainsi qu'une petite région non-codante localisée entre l'ORF7 et la queue polyadénylée (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993; Snijder et Meulenberg, 1998; Wu *et al.*, 2001). Les ORFs 1a et 1b situés en aval de la séquence de tête (leader sequence) occupent environ 75% du génome (den Boon *et al.*, 1991; Meulenberg *et al.*, 1993). Ils codent pour des polyprotéines qui se clivent en treize protéines non-structurales impliquées dans la réplication virale et la transcription (van Dinten *et al.*, 1999; Wootton *et al.*, 2000; Bautista *et al.*, 2002). Les ORFs 2 et 4 à 6 codent pour des protéines associées à la membrane. La protéine de l'ORF3 serait plutôt non-structurale chez les isolats nord-

américains (Mardassi *et al.*, 1998) contrairement à la souche de référence européenne LV où la GP₃ semble être structurale (Meulenberg *et al.*, 1995). L'ORF7 code pour la protéine hautement basique de la nucléocapside (Mardassi *et al.*, 1995; Snijder et Meulenberg, 1998).

Le VSRRP, comme bien d'autres virus à ARN, est sujet aux variations génomiques (Meng *et al.*, 1995b; Meulenberg *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995; Nelsen *et al.*, 1999). Les variations des ORFs des différents isolats du VSRRP et d'autres *Artérovirus* sont résumées dans le tableau 1.

Les produits des ORF3 et 5 sont les plus variables parmi les différents isolats nord-américains ou européens du VSRRP tandis que le produit de l'ORF6 reste le plus conservé. Les isolats d'un même continent présentent une homologie en aa variant de 88 à 100%. Les produits des ORF2 à 7 des isolats nord-américains diffèrent des isolats européens selon un ordre de grandeur de 21 à 48%. Ce qui montre que les isolats des deux continents appartiennent à deux génogroupes différents provenant probablement d'un ancêtre commun qui pourrait être le LDV (Mardassi *et al.*, 1995; Dea *et al.*, 2000a; Plagemann, 2003).

Parmi les *Artérovirus*, le VSRRP est plus proche du LDV (Albina, 1997) avec 24 à 51 % d'identité en aa et l'existence des réactions sérologiques croisées entre ces deux virus ne peut que justifier cette hypothèse de proximité (Plagemann, 2003).

Les isolats nord-américains présentent une plus grande diversité génétique comparativement aux isolats européens qui sont plus conservés et génétiquement liés entre eux (Morozov *et al.*, 1995; Kapur *et al.*, 1996; Gagnon et Dea, 1998; Pirzadeh *et al.*, 1998). Les isolats asiatiques quant à eux sont plus apparentés au génogroupe nord-américain (Shibata *et al.*, 1996).

Tableau 1. Pourcentage d'identité en acides aminés des ORFs 2 à 7 de la souche européenne LV et des souches de VSRRP provenant de différents pays et aussi de deux autres *Arterivirus*.

Produits des Gènes du virus LV ^a	Souches virales et origines										
	PRRSV-10 ^b Allemagne	VR-2332 ^c US	VR-2385 ^d US	IAF-Klop ^e Canada	DK111-92 ^f Danemark	Olot/91 ^g Espagne	CH-1a ^h Chine	MD-001 ⁱ Taiwan	Kitasato ^j Japon	LDV ^k Strain C	EAV ^l Bucyrus
ORF2	99	63	62	59	94	97	58	60	ND	32	NS
ORF3	99	60	57	54	88	94	56	55	55	28	NS
ORF4	99	70	69	68	91	94	68	67	67	30	NS
ORF5	99	55	54	52	93	93	54	54	52	47	NS
ORF6	100	79	78	81	94	97	80	79	77	53	23
ORF7	100	64	57	59	97	99	60	59	58	44	20

NS = non significatif (< 20%) ; ND = non disponible

Les séquences ont été obtenues de:

^a Meulenbergh et al., 1993a, EMBL/GenBank accession no. M96262.

^b Conzelmann et al., 1993, EMBL/GenBank accession no. L04493.

^c Murtough et al., 1995, EMBL/GenBank accession no. U00153.

^d Meng et al., 1995a; 1995b, EMBL/GenBank accession no. U03040.

^e Mardassi et al., 1995, GenBank accession no. U64928, AF003345, AF003344, AF003343.

^f Madsen et al., 1998, GenBank accession no. AJ223078, avant l'introduction au Danemark de la souche vaccinale Américaine PRRSV MLX.

^g Plansa-Duran et al., 1997, GenBank accession no. X92942.

^h Tong et al. [non publiée], GenBank accession no. AF132118.

ⁱ Chueh and Lee [non publiée], GenBank accession no. AF121131.

^j Takikawa [non publiée], GenBank accession no. AB023782.

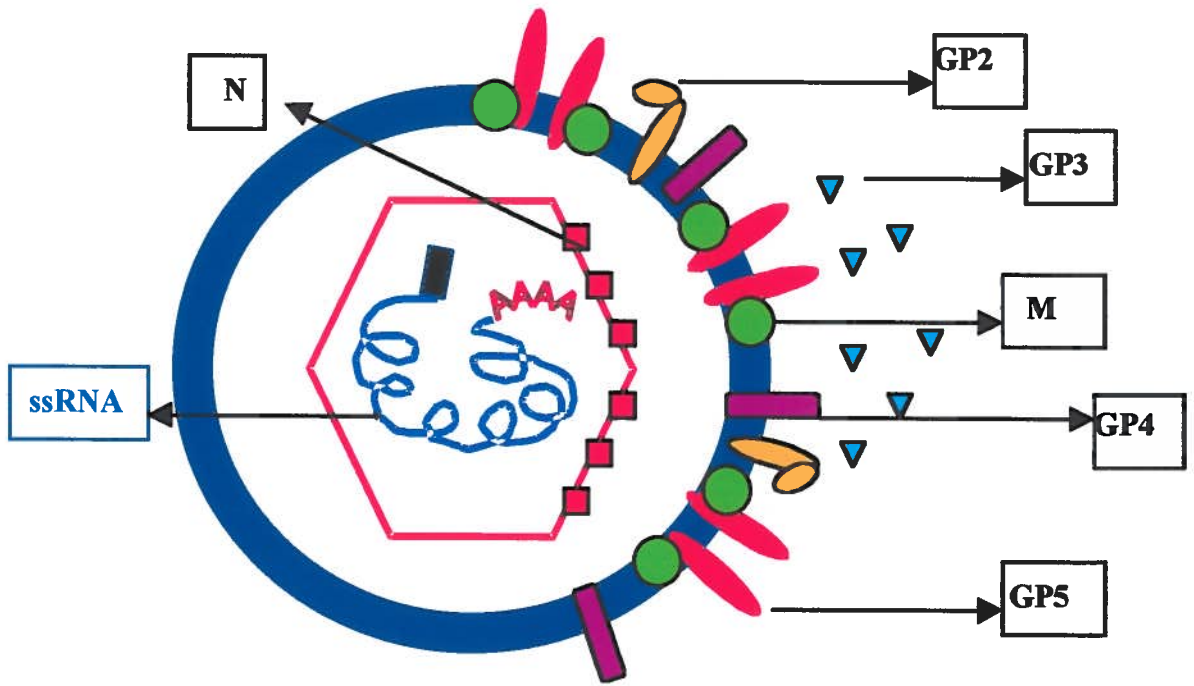
^k Godeny et al., 1993, GenBank accession no. L13298.

^l den Boon et al., 1991, GenBank accession no. X53459.

Tableau partiellement adapté de Meulenbergh et al., 1997a.

Tiré de Dea et al., 2000a.

Figure 2 : Représentation schématique du VSRRP du génogroupe nord-américain
(Tiré de Dea *et al.*, 2000a)



1.4 Protéines non-structurales et structurales

1.4.1 Protéines non-structurales (pns)

Veillez noter que dans cette partie, nous allons aussi examiner les caractéristiques de la GP₃ compte tenu de sa caractéristique controversée chez les deux génogroupes du VSRRP.

Les pns des *Artérovirus* sont codées par le gène de la réplicase (ORF1) dont la traduction génère deux larges polyprotéines : la protéine de l'ORF1a et celle de l'ORF1ab. Chez le VSRRP, très peu de travaux concernant les pns ont été réalisés. Nous allons nous inspirer des résultats obtenus chez l'EAV comme modèle pour présenter la plupart des énoncés de cette section.

Le gène de la réplicase du VSRRP est constitué de deux ORFs, 1a et 1b, qui sont tous deux exprimés à partir de l'ARN génomique (Snijder et Meulenberg, 1998). Cependant, l'ORF1b nécessite un changement de cadre de lecture (ribosomal frameshift) pour être traduit (den Boon *et al.*, 1991).

Le produit de la traduction est une polyprotéine de 3859 aa (POLab) (Meulenberg, 2000) possédant des domaines d'activité protéolytique. Le clivage de ces protéines libère la polymérase intervenant dans la réplication virale (Snijder et Meulenberg, 2001).

Chez l'EAV, cette polyprotéine (ORF1ab) est clivée par trois différentes protéases (nsp1, nsp2, nsp4) codées par l'ORF1a, générant au moins 12 à 15 protéines non structurales et sous-unités fonctionnelles (Snijder et Meulenberg, 1998; Ziebuhr *et al.*, 2000). Les protéases nsp1 (29 kDa) et nsp2 (61 kDa) contiennent un domaine cystéine avec une activité protéolytique qui agit en *cis*, favorisant le clivage de la polyprotéine. La nsp1 et la nsp2 sont respectivement caractérisées comme une protéase de type papaine (PCP) et une cystéine protéase (CP) (Snijder *et al.*, 1995).

La nsp4, protéase principale du virus, est une sérine protéase (SP) et fait partie d'un groupe relativement rare d'enzymes protéolytiques, les sérines protéases de type 3C (Snijder *et al.*, 1996). Cette protéase agit en *trans* dans le clivage d'autres parties de la polyprotéine (van Dinten *et al.*, 1999). Chez le VSRRP et le LDV, une quatrième protéase, le PCPa a été mise en évidence dans la partie N-terminale de la polyprotéine de l'ORF1a (Godeny *et al.*, 1993).

L'ORF1a code pour des protéines régulant l'expression des sous-unités de la réplicase et intervient dans la formation d'un complexe de réplication. L'ORF1ab code pour des protéines intervenant dans la synthèse de l'ARN viral et la transcription des ARNm sous-génomiques (Molenkamp *et al.*, 2000).

1.4.1.1 La glycoprotéine GP3

Une contradiction subsiste entre une souche de référence européenne et nord-américaine quant à la nature structurale de la protéine exprimée par l'ORF3 (Meulenberg *et al.*, 1995; van Nieuwstadt *et al.*, 1996; Gonin *et al.*, 1998; Mardassi *et al.*, 1998).

La GP₃ est la plus grande des protéines du VSRRP (outre l'ORF1a et ORF1ab) avec une taille de 42-50 kDa et elle est la plus glycosylée (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1995). Elle contient 265 aa chez les souches du génogroupe européen tandis que chez les souches nord-américaines, elle présente une délétion de 12 aa dans la partie C-terminale. Cette différence rend cette partie de l'ORF3 hydrophile pour les souches européennes et amphipatique pour les souches nord-américaines (Gonin *et al.*, 1998). La protéine GP₃ serait structurale chez les souches européennes et non-structurale chez les souches nord-américaines. En effet, les résultats de Meulenberg *et al.*(1995) et de van Nieuwstadt *et al.*(1996) indiquent que la GP₃ du virus Lelystad (LV) est incorporée dans le virion. Cependant, cette protéine est sécrétée à partir des cellules infectées sous forme soluble et non associée au virion en ce qui a trait à la souche de référence québécoise IAF-Klop du VSRRP (Gonin *et al.*, 1998; Mardassi *et al.*, 1998). Ces derniers résultats s'accordent avec ceux obtenus pour la GP₃ du LDV (Faaberg et Plagemann, 1997).

Récemment, Wieringa *et al.*(2003), rapportaient que la GP₃ de l'EAV formerait dans le virion un hétérotrimère avec la GP₄ et la GP_{2b}, dont la fonction reste à établir. La GP₃ pourrait être responsable de la réponse autoimmunitaire. En effet, les AcMo dirigés contre la GP₃ réagissent avec les antigènes de l'appareil de Golgi des cellules de porc (Weiland et Weiland, 2002), ce qui indique probablement l'existence d'un mimétisme moléculaire entre les antigènes viraux et cellulaires.

1.4.2 Protéines structurales

Les protéines structurales du VSRRP sont codées par les ORFs 2 et 4-7. Dépendamment de leur quantité dans le virion, elles sont soit majeures soit mineures.

1.4.2.1 Protéines structurales majeures

Le virion du VSRRP se compose de trois protéines structurales majeures soient : la protéine de la nucléocapside (N); la protéine de la matrice (M) et la glycoprotéine majeure de l'enveloppe (GP₅). Elles sont exprimées par les ORF7, ORF6 et ORF5 respectivement. Les principales caractéristiques de ces protéines sont présentées au tableau 2.

1.4.2.1.1 La protéine de la nucléocapside (N)

La protéine de la nucléocapside est une petite protéine non-glycosylée, hautement basique de 15 kDa qui est abondamment exprimée dans les cellules infectées et incorporée dans le virion (Mardassi *et al.*, 1994; Bautista *et al.*, 1996) et elle constitue environ 20 à 40% de toutes les protéines du virion (Nelson *et al.*, 1993; Mardassi *et al.*, 1994; Bautista *et al.*, 1996). La majorité des anticorps contenus dans le sérum de porc infecté sont dirigés contre cette protéine et elle donne toujours un très fort signal dans les tests d'immunobuvardage de type Western qui utilise des sérums hyperimmuns de porcs infectés. Cependant, les anticorps spécifiques anti-N ne possèdent aucune activité neutralisante (Dea *et al.*, 2000a; Murtaugh *et al.*, 2002). La partie N-terminale de la nucléocapside contient 26% d'acides aminés basiques (Arginine, Lysine et Histidine), pouvant faciliter son interaction avec l'ARN génomique (Meulenberg *et al.*, 1993; Mardassi *et al.*, 1994a; Meng *et al.*, 1995a). En effet, cette protéine co-localise partiellement avec le complexe de réplication au site de synthèse de l'ARN viral (Molenkamp *et al.*, 2000).

La protéine N du VSRRP contient différents domaines fonctionnels et structuraux jouant plusieurs rôles (Rowland *et al.*, 2003; Rowland et Yoo, 2003) entre autres la participation dans le transport entre le noyau et le cytoplasme incluant un signal de localisation nucléaire cryptique situé entre les aa 10-13 (nuclear localization signal-NLS) appelé NLS-1, un autre signal fonctionnel NLS-2 (située entre les aa 41-47), une séquence de localisation nucléaire NoLS (nuclear localization sequence) entre les aa 41-

72 et un signal d'export nucléaire NES (nuclear export signal) entre les aa 106-117. Le NLS-2 semble faire partie d'un site d'interactions avec l'ARN situé entre les aa 34-51 (Daginakatte et Kapil, 2001) tandis que le motif NES ferait partie d'une région située entre les aa 111-123 qui détermine la conformation de la protéine N (Rowland et Yoo, 2003). La sérine située à la position 120, bien que non présente chez tous les isolats nord-américains, serait un site potentiel de phosphorylation de la protéine N (Rowland et Yoo, 2003).

La protéine N est souvent révélée sous forme d'homodimère liée par des ponts disulfures ou par liaisons non-covalentes. La région située entre les aa 21-37 est identifiée comme étant responsable des interactions non-covalentes entre les molécules de la protéine N (Rowland et Yoo, 2003) et l'auto-association de cette protéine serait impliquée dans l'assemblage de la nucléocapside du VSRRP (Wootton et Yoo, 2003).

La protéine N du VSRRP se localise dans le nucléole et interagit avec les protéines cellulaires telles que la protéine fibrillarine associée à l'ARN nucléaire ainsi qu'avec les sous-unités 28S et 18S de l'ARN ribosomal (Yoo *et al.*, 2003) et ces interactions sont dépendantes de l'ARN mais indépendantes de la phosphorylation de la protéine N. Les auteurs (Yoo *et al.*, 2003) de cette étude suggèrent que ces interactions indiquent un potentiel lien des stratégies du virus dans la modulation des fonctions de la cellule hôte possiblement à travers le précurseur de l'ARN ribosomal et la biogénèse du ribosome.

Des résultats récents suggèrent l'implication de la protéine N dans des interactions avec d'autres protéines structurales virales (Doan et Dokland, 2003; Ropp *et al.*, 2004).

Tableau 2. Caractéristiques comparatives des produits des ORFs 2-7 des souches nord-américaines et européennes

Gène codant le produit	Protéine	Nombre de résidus d'acides aminés	Poids moléculaire <i>Mr</i> prédit (kDa)		Poids moléculaire <i>Mr</i> apparent (kDa)		Sites de glycosylation		
			Euro	Nam	Euro	Nam	Euro	Nam	
ORF2a	GP _{2a}	249	265	28.4	29.4	29-30	27-29	2	2
ORF2b	P _{2b}	60-70	73	-	10	-	10	-	-
ORF3	GP ₃	265	254	30.6	29.0	45-50	42-45	7	7
ORF4	GP ₄	183	178	20.0	19.6	31-35	31-35	4	4
ORF5	GP ₅	201	200	22.4	22.4	25	24-26	2	2-5
ORF6	M ^a	173	174	18.9	19.1	18	19	2	1
ORF7	N ^a	128	123	13.8	13.6	15	14-15	1	1

Euro : Souches européennes; *Nam* : Souches nord-américaines

^a Malgré les potentiels sites de glycosylation, ces protéines ne sont pas glycosylées

Données obtenues de Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1993 et 1995, Meng *et al.*, 1995a et 1995b; Morozov *et al.*, 1995; Pirzadeh *et al.*, 1998; Snijder *et al.*, 1999.

Tableau tiré de Dea *et al.*, 2000 et complété des données de Wu *et al.*, 2001 et de Ropp *et al.*, 2004.

1.4.2.1.2 La protéine de la matrice (M)

La protéine M est une protéine d'enveloppe non-glycosylée de 18-19 kDa. Elle possède trois régions hautement hydrophobes dans la partie N-terminale qui sont supposées être des domaines transmembranaires (Meulenberg *et al.*, 1993; Mardassi *et al.*, 1995; Albina, 1997) comme dans le cas de la protéine M des coronavirus (Röttier *et al.*, 1986). Une courte région de 10 à 18 résidus d'aa probablement exposée à la surface du virion serait liée à l'adsorption et à la propagation du virus (Andreyev *et al.*, 1999). Elle forme un hétérodimère avec la glycoprotéine majeure de l'enveloppe (GP₅) dans le RE des cellules infectées où elle s'accumule (Mardassi *et al.*, 1996). La protéine M est la plus conservée parmi les isolats des deux génogroupes et semble être capable d'induire la synthèse d'anticorps monoclonaux neutralisants à de très faibles titres (Yang *et al.*, 2000).

À cause des similarités qu'elle partage avec la protéine M des coronavirus, la protéine M du VSRRP pourrait jouer un rôle important dans l'assemblage et le bourgeonnement des virions (Mardassi *et al.*, 1996; Plagemann, 1996).

1.4.2.1.3 La glycoprotéine majeure de l'enveloppe (GP₅)

La GP₅ est une protéine de 24.5-26 kDa possédant selon les souches un nombre variant de sites de N-glycosylation (Rowland *et al.*, 1999; Dea *et al.*, 2000a). La souche européenne LV possède deux sites de N-glycosylation (Meulenberg *et al.*, 1993), alors que la souche québécoise IAF-Klop et la souche de référence américaine contiennent respectivement trois et quatre sites de N-glycosylation (Mardassi *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995; Pirzadeh *et al.*, 1998).

La GP₅ possède un petit ectodomaine de 40 aa contre lequel sont dirigés les anticorps neutralisants (Pirzadeh et Dea, 1997; Weiland *et al.*, 1999). En effet, l'établissement de la corrélation entre le titre des anticorps neutralisants et le titre des anticorps anti-GP₅ dans le sérum des porcs convalescents (Gonin *et al.*, 1999; Plagemann *et al.*, 2002) indique que cette protéine est impliquée dans la neutralisation du virus et peut être considérée comme un candidat potentiel pour la conception de vaccins sous-unitaires.

L'ectodomaine de la GP₅ des deux génogroupes du VSRRP (européen et nord-américain) partage 77% d'homologie en aa avec le LDV, ce qui expliquerait la réaction

croisée observée entre les sérums de porcs anti-VSRRP et les AcMo anti-LDV représentant les peptides des ectodomaines de VSRRP et LDV (Plagemann *et al.*, 2002). La partie C-terminale paraît aussi comme un site antigénique, d'autant plus que les sérums des porcs convalescents testés positifs avec la protéine virale native et la protéine recombinante perdent leur réactivité après la délétion des 50 aa de la partie C-terminale (Dea *et al.*, 2000a). La GP₅ est considérée comme étant responsable de l'induction de la mort cellulaire par apoptose *in vitro* dans les cellules de singe ainsi que dans les macrophages alvéolaires du porc (PAMs) (Suarez *et al.*, 1996) par activation de la voie mitochondriale (Lachapelle *et al.*, 2002) et conséquemment activation de la procaspase-3 (Gagnon *et al.*, 2003).

Récemment, les résultats d'une étude rapportaient la présence chez le porc d'auto-anticorps anti-idiotypiques contre les anticorps anti-GP₅ (Jiang *et al.*, 2003) indiquant l'implication de la GP₅ dans une réponse autoimmune.

1.4.2.2 Protéines structurales mineures

Les protéines structurales mineures sont codées par les ORF4 et ORF2 (a et b). Les principales caractéristiques de ces protéines sont énumérées dans le tableau 2. Elles sont exprimées et incorporées dans le virion en très faible quantité.

1.4.2.2.1 La glycoprotéine GP₄

La glycoprotéine GP₄ est une protéine de 31-35 kDa et contient quatre sites de N-glycosylation conservés parmi les souches des deux génogroupes. Les tests d'immunoprécipitation avec un antiserum spécifique révèlent deux produits différents de la GP₄ du virus LV dans les lysats cellulaires et dans le virus extracellulaire. En effet, la forme intracellulaire de la GP₄ a un poids moléculaire de 20-28 kDa tandis qu'il est de 31-35 kDa chez la forme associée au virion. Cette différence est due à l'addition des résidus N-oligosaccharidiques de types complexes lorsque la GP₄ est incorporée dans le virion (Meulenberg *et al.*, 1997). La GP₄ de la souche LV et NOBL contient des épitopes contre lesquels sont dirigés des AcMo neutralisants de très faibles titres *in vitro* (van Nieuwstadt *et al.*, 1996; Meulenberg *et al.*, 1997; Kwang *et al.*, 1999). Par ailleurs, ces épitopes situés dans la région variable (résidus 39-79 aa) ne semblent pas être conservés chez la plupart des souches. La capacité des AcMo anti-GP₄ à neutraliser le virus est de beaucoup inférieure comparativement à ceux dirigés spécifiquement contre la GP₅ et reste

controversée (Dea *et al.*, 2000a; Wieringa *et al.*, 2002). De plus, la GP₄ ne semble pas induire la production d'anticorps neutralisants chez les porcs infectés (Gonin *et al.*, 1999).

Chez l'EAV, la GP₄ et la GP_{2b} forment un hétérodimère dans les cellules infectées qui se transforme en hétérotrimère en recrutant la GP₃ une fois incorporées dans le virion. (Wieringa *et al.*, 2003a).

1.4.2.2.2 La glycoprotéine GP_{2a} et la protéine P_{2b}

La glycoprotéine GP_{2a} et la protéine P_{2b} sont les produits d'expression de l'ORF2a et ORF2b et sont exprimées à partir du même ARNm sous-génomique bicistronique (ARNm2) du VSRRP (figure 3) et la séquence de l'ORF2b se localise complètement à l'intérieur de l'ORF2a (Gonin *et al.*, 1999) (figure 4) dans un cadre de lecture différent. La nomenclature utilisée pour désigner ces protéines chez les autres *Artérovirus* est différente. Ainsi la GP_{2a} du VSRRP correspond à la GP_{2b} (anciennement G_s) de l'EAV, à la protéine de l'ORF2b du LDV et de L'ORF4b du SHFV. Également, la P_{2b} du VSRRP est considérée être la protéine E, les protéines de l'ORF2a et de l'ORF4a du EAV, LDV et SHFV respectivement et ceci conformément à la disposition de ces gènes dans le génome (de Vries *et al.*, 1995; Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996; Snijder *et al.*, 1999; Plagemann, 2001; Wu *et al.*, 2001).

Selon les travaux réalisés à partir de la souche de référence européenne LV, la glycoprotéine GP_{2a} est une protéine de 29-30 kDa. Le profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide de cette protéine en conditions non-réductrices montre l'apparition d'un doublet indiquant que la GP_{2a} possède des ponts disulfures intramoléculaires sans pourtant former d'homodimères (Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996). Elle contient deux sites potentiels de N-glycosylation. Les résidus N-oligosaccharidiques identifiés au niveau de la GP_{2a} sont similaires à ceux de la GP₅, c'est-à-dire de types complexes (Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996). Malgré sa faible quantité dans le virion comparativement aux protéines N, M et GP₅, chez l'EAV, la protéine analogue, la GP_{2b} forme un hétérodimère avec la GP₃ et GP₄ et semble être au centre d'un pré-assemblage

Figure 3 : Organisation génomique et mode de répllication du VSRRP

ST : séquence de tête; AAAAA : queue poly-A ; ARN 1 à 7 : ARN messagers sous-génomiques.

Ttiré de la thèse de doctorat de Carl A. Gagnon (2001) - INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec.

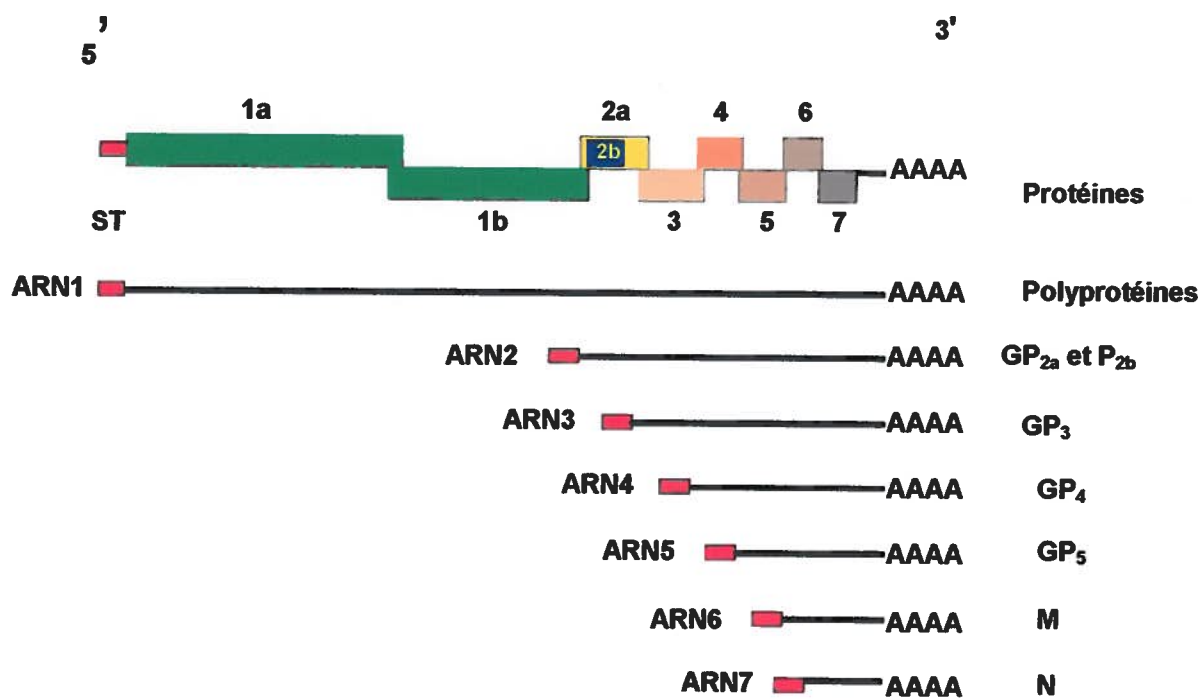


Figure 4 : Séquence du gène de l'ORF2 de la souche IAF-Klop du VSRRP numéro d'accèsion Genbank AF003343 (Gonin et al., 1999)

10	20	30	40	50	60	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ATGAAATGGG	GTCTATGCAA	AGCCTTTTTG	ACAAAATTGG	CCAACTTTTT	GTGGATGCTT	60
TCACGGAGTT	CTGGTGTCC	ATTGTTGATA	TCATCATATT	TTTGGCCATT	TTGTTGGCT	120
TCACCATCGC	CGGTGGCTG	GTGGTCTTTT	GCATCAGATT	GGTTTGACC	ACGATACTCC	180
GTGCGCGCCC	TGCCATTAC	TCTGAGCAAT	TACAGAAGAT	CCTATGAGGC	CTTCCTTCT	240
CAGTGCCGGG	TGGACATTCC	TACCTGGGGA	ACAAAACATC	CCCTGGGGAT	GTTTTGGCAC	300
CATAAGGTGT	CAACTCTGAT	TGATGAAATG	GTGTCGCGTC	GAATATACCG	CACCATGGAG	360
AAAGCAGGAC	AGGCTGCCTG	GAAACAGGTG	GTGAGCGAGG	CCACGTTGTC	TCGCATCAGC	420
AGTTTGGATG	TGGTGGCTCA	TTTCCAGCAC	CTTGCTGCCA	TTGAAGCCGA	GACCTGTAAA	480
TATTTGGCCT	CCCGCTGCC	CATGCTACAC	AACCTGCGCA	TGACAGGGTC	AAATGTGACC	540
ATAGTGTATA	ACAGTACTTC	AAGTCAAGTG	TTTGCTATTT	TCCCAACCCC	TGGCTCTCGG	600
CCAAAGCTTC	ATGATTTTCA	GCAATGGCTA	ATAGCCGTGC	ACTCCTCCAT	ATTTTCTCT	660
GTTGCAGCTT	CTTGCACCCT	TTTTGTTGTG	TTGTGGCTGC	GAGTGCCAAT	GCTTCGTACT	720
GTTTTGGTT	TCCGCTGGTT	AGGGGCAATT	TTTCCTCGA	ACTCCGGTG	A	771

La séquence du gène de l'ORF2b (en rose) se trouvant complètement dans celle de l'ORF2 (désignée actuellement ORF2a) compte 221 nucléotides.

du virus de l'EAV (Wieringa *et al.*, 2003a) qui consiste à un recrutement de la GP3 dans le virion mais pas dans la cellule infectée. Ceci peut justifier son rôle indispensable dans la réplication virale (van Dinten *et al.*, 1997). La GP_{2a} du VSRRP semble jouer un rôle dans la réplication et l'infectivité car l'introduction de mutations dans la séquence de celle-ci à la valine en position 88 et à la phénylalanine en position 95 respectivement par la phénylalanine et par la leucine améliore la réplication du virus recombinant (Verheije *et al.*, 2003).

La protéine P_{2b} est la toute dernière protéine structurale des *Artérovirus* découverte d'abord chez l'EAV (Snijder *et al.*, 1999) comme une protéine de 8 kDa. Ensuite, sa présence fut confirmée chez le VSRRP (Wu *et al.*, 2001) comme une protéine de 10 kDa. Cette protéine non-glycosylée contient un site potentiel de N-myristoylation suivi d'un site de phosphorylation pour la caséine kinase II. Chez l'EAV, la protéine E (homologue du P_{2b} du VSRRP) serait essentielle dans la production des particules virales infectieuses (Snijder *et al.*, 1999) et interagirait avec la GP_{2b} (homologue de GP_{2a} du VSRRP), GP₃ et GP₄ de façon non-covalente (Wieringa *et al.*, 2003b).

Les deux protéines (GP_{2a} et P_{2b}) ne sont pas bien caractérisées chez le VSRRP surtout en ce qui concerne les souches du génogroupe nord-américain.

1.4.3 Variabilité séquentielle des protéines structurales

La comparaison entre les différentes souches du VSRRP a montré que sa molécule d'ARN, comme pour tous les virus à ARN, est sujette aux mutations chez les deux génogroupes (Andreyev *et al.*, 1997; Drew *et al.*, 1997; Drake et Holland, 1999; Meulenberg, 2000; Dea *et al.*, 2000a). Ces variations génomiques déterminent la nature des modifications sur les séquences protéiniques et conséquemment déterminent la variation des sites antigéniques. Les différences entre les isolats des deux génogroupes ont souvent pour origine des mutations ponctuelles ou des délétions (Kwang *et al.*, 1994; Mardassi *et al.*, 1995; Morozov *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2002). Les observations de Suarez *et al.* (1996) lors de l'amplification du VSRRP sur les cultures de macrophages alvéolaires n'ont révélé que deux mutations d'aa au niveau de l'ORF5 après neuf passages. Cependant sur la lignée cellulaire MA-104, on notait cinq mutations sur l'ORF5 et une mutation sur l'ORF7 après six passages.

Dans 75-85% des cas de mutations, les substitutions d'acides nucléiques sont dites silencieuses donc n'impliquent pas de modifications d'aa (Albina, 1997; Chang *et al.*, 2002) et ceci peut indiquer qu'une pression sélective s'exerce en faveur de la conservation de la structure primaire des protéines virales. Par contre, les mutations peuvent entraîner l'acquisition par le virus de nouvelles propriétés biologiques (Allende *et al.*, 2000) comme c'est le cas du LDV chez lequel, la mutation de ces deux sites de N-glycosylation sur l'ectodomaine de la protéine VP-3P (homologue de la protéine GP₅ du VSRRP) le rend neuropathogène pour les souris AKR/C58 et susceptible à la réponse immune humorale de l'hôte (Plagemann *et al.*, 2001a).

La variabilité en aa entre les souches du VSRRP des deux génogroupes est regroupée dans le tableau 1 où l'on peut noter un pourcentage d'identité en aa de plus de 93% entre les souches d'un même continent (Meng *et al.*, 1995b; Gagnon et Dea, 1998) et cette tendance s'observe chez les différentes protéines du VSRRP.

La protéine N est aussi une protéine bien conservée chez les deux génogroupes par contre elle est plus longue chez les souches européennes. Elle présente seulement une homologie de 63% en nt et 59% en aa due au nombre de substitutions, insertions et délétions (Mardassi *et al.*, 1994a).

La glycoprotéine GP₅ est la plus variable des protéines structurales (Chang *et al.*, 2002; Larochelle *et al.*, 2003) et présente seulement une identité en aa de 52-55% (Meulenberg, 2000; Dea *et al.*, 2000a) entre les souches des deux continents alors que cette homologies est de 88 à 99% entre les souches d'un même continent. Les substitutions observées se localisent surtout autour de la région hypervariable (entre les résidus 26 et 39 aa) associée aux sites de N-glycosylation et adjacente à la séquence signale (Meng *et al.*, 1995b; Pirzadeh *et al.*, 1998). Ce qui peut expliquer les différences de poids moléculaire apparent de la GP₅ des isolats du VSRRP sur les gels de polyacrylamide (Magar *et al.*, 1997). La diversité de différents isolats de champs serait attribuée aux mutations dans l'ectodomaine de la GP₅ (Rowland *et al.*, 1999).

Le degré d'identité en aa des protéines mineures parmi les isolats nord-américains varie de 91 à 99% pour la GP_{2a}; 86 à 98% pour la GP₃ et 92 à 99% pour la GP₄ (Mardassi *et al.*, 1995; Kapur *et al.*, 1996; Pirzadeh *et al.*, 1998). L'identité en aa pour ces protéines mineures entre les isolats des deux génogroupes varie de 54 à 74%, mais c'est plutôt la P_{2b} qui présente le taux d'identité le plus élevé (74-75.7%) (Wu *et al.*, 2001; Ropp *et al.*, 2004). La GP₃ présentant un taux d'identité en aa de 54 à 64% entre les isolats des deux

génogroupes est supposée la protéine la moins conservée (Mardassi *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995).

1.5 Stratégies de transcription et de réplication

1.5.1 Attachement et pénétration

Au début des recherches sur le VSRRP, seuls les PAMs obtenus par des lavages bronchoalvéolaires permettaient sa propagation (Dea *et al.*, 1992). Par la suite, d'autres résultats montrèrent que le VSRRP pouvait se répliquer aussi dans les macrophages testiculaires et les cellules germinales ou spermatides (Sur *et al.*, 1997) et *in vitro* dans des lignées de cellules épithéliales de reins de singe MA-104 et ses dérivés ATCC CL2621 et MARC-145 (Benfield *et al.*, 1992b; Kim *et al.*, 1993).

Le tropisme du VSRRP est déterminé par la présence ou l'absence d'un récepteur sur la membrane cellulaire et la permissivité cellulaire semble dépendre de plus d'une molécule car le virus peut s'attacher à la surface de plusieurs types cellulaires (RK-13, BHK-21, PK-15, PT et 293A) sans pour autant pouvoir se propager et se répliquer (Therrien *et al.*, 2000). La production d'anticorps monoclonaux (AcMo) reconnaissant deux protéines membranaires probablement glycosylées de 150 et 210 kDa chez les cellules PAMs et pouvant bloquer l'infection par le VSRRP (Duan *et al.*, 1998; Delputte *et al.*, 2002; Wissink *et al.*, 2003a) semble confirmer cette hypothèse. Le séquençage de la protéine de 210 kDa a montré que cette protéine partage 69 et 78% d'identité en aa avec les sialoadhésines murines et humaines respectivement (Vanderheijden *et al.*, 2003). L'héparine serait aussi impliquée dans l'attachement du virus aux cellules MARC-145 (Jusa *et al.*, 1997) et que cette interaction ait lieu entre les molécules de l'héparine et la protéine M et le complexe hétérodimère M-GP₅ (Andreyev *et al.*, 1999).

Le VSRRP pénètre dans la cellule par endocytose où les particules virales sont internalisées dans des vésicules cytoplasmiques par une voie dépendante des clathrines et dont un pH bas semble être essentiel pour la libération de la nucléocapside de son enveloppe afin de permettre la réplication virale (Kreutz et Ackermann, 1996; Nauwynck *et al.*, 1999). En microscopie électronique, on peut mettre en évidence la présence de nucléocapsides en moins de 6 heures p.i. (hpi) et la formation de particules virales complètes après 9 hpi. (Pol *et al.*, 1997). Les protéines impliquées dans la réplication du EAV (polyprotéines exprimées par le gène de l'ORF1) forment "le complexe de

réplication virale" dans les vésicules à doubles membranes (Pedersen *et al.*, 1999; Snijder *et al.*, 2001). Il est fort probable que ce phénomène survient lors d'une infection par le VSRRP.

1.5.2 Transcription et réplication

Le cycle de réplication des *Artérovirus* a lieu entièrement dans le cytoplasme des cellules infectées. Une fois l'ARN viral libéré dans la cellule infectée, il y a la traduction de l'hélicase et de la réplisase (ARN polymérase ARN dépendante), une enzyme essentielle intervenant dans la transcription des ARN viraux. L'une des particularités des *Nidovirus* est la synthèse des ARN sous-génomiques de différente taille ayant une structure polycistronique mais étant fonctionnellement monocistronique (figure 3) à l'exception de l'ARNm2 qui est bicistronique (Snijder *et al.*, 1999). Ils ont tous en commun la même séquence de tête (leader sequence) d'environ 200 nt qui s'aboute à l'extrémité 5' de chacun des ARNm sous-génomiques par un mécanisme de transcription continue à l'aide d'une séquence très conservée régulant la transcription (transcription-regulating sequences, TRS) (de Vries *et al.*, 1990; Snijder et Meulenberg, 1998; Snijder *et al.*, 1999). La séquence de TRS (UUAAC) précède chaque gène et assure la jonction entre la séquence de tête et le corps de l'ARNm sous-génomique.

Les mécanismes de synthèse de l'ARN génomique et des ARNm demeurent controversés. Il existe deux modèles de transcription (Snijder et Meulenberg, 2001). La transcription de chaque ARNm semblerait être indépendante. La séquence de tête serait libre au cours de la transcription et pourrait ainsi se lier à n'importe quelle séquence régulant la transcription.

Le premier modèle proposé est celui de la transcription de la séquence de tête. Dans ce modèle, il y a tout d'abord la transcription d'un intermédiaire négatif complet du génome. La séquence de tête est libérée du brin positif pour s'apparier à la séquence TRS sur le brin négatif du génome complet pour synthétiser les ARNm sous-génomiques de polarité positive. Ces ARNm sous-génomiques serviront à la synthèse d'intermédiaires de polarité négative qui permettra à nouveau la formation des ARNm (Baric *et al.*, 1983; Spaan *et al.*, 1983; Snijder et Meulenberg, 1998).

Le deuxième modèle fait plutôt prévaloir l'idée d'une transcription continue lors de la synthèse du brin négatif. Dans ce modèle, la polymérase qui transcrit le brin positif en brin négatif doit s'arrêter sur une séquence TRS et saute directement à la portion 3' de

la séquence de tête (Sawicki et Sawicki, 1990; Snijder et Meulenberg, 1998; van Marle *et al.*, 1999). Ce seraient donc des brins négatifs qui permettraient la transcription des ARNm sous-génomiques.

1.5.3 Assemblage des virions et bourgeonnement

L'assemblage du VSRRP commence au moment du bourgeonnement des nucléocapsides à travers les membranes du RE lisse et de Golgi (Pol *et al.*, 1997; Snijder et Meulenberg, 2001). La co-localisation partielle de la protéine N avec le complexe de réplication dans les vésicules à doubles membranes suggère que l'encapsulation semble commencer au site de synthèse de l'ARN viral (Molenkamp *et al.*, 2000). Après bourgeonnement, les virions s'accumulent dans les vésicules intracellulaires et ils sont expulsés de la cellule par exocytose.

1.6 Pathogénie de l'infection par le VSRRP

1.6.1 Virulence

Cliniquement, l'infection causée par le VSRRP se manifeste sous diverses formes (aiguë, chronique, persistante ou asymptomatique). La sévérité de la manifestation des signes cliniques dépend entre autres de la souche virale impliquée, du statut immunitaire des animaux lors de leur infection et de la génétique de l'hôte. Les variations observées au niveau de la symptomatologie du SRRP dans les élevages porcins où le statut sanitaire et les conditions d'élevage sont très variables ont amené les chercheurs à réaliser des infections expérimentales dans des conditions contrôlées chez des porcelets âgés de cinq semaines avec différents isolats américains du VSRRP (Goyal, 1993; Loomba *et al.*, 1996; Halbur *et al.*, 1996a). Également, des infections expérimentales ont été réalisées pour comparer la pathogénicité des souches européennes par rapport aux souches américaines (Halbur *et al.*, 1995). Malgré les différents niveaux de virulence entre les isolats des deux génogroupes, aucune séquence n'a été jusqu'alors identifiée comme étant responsable de la virulence. Néanmoins, le séquençage partiel de certains isolats a été réalisé pour tenter d'établir un lien entre les variations génomiques et les variations cliniques observées (Meng *et al.*, 1995b). Certains auteurs font une relation entre le haut

taux de mortalité parmi les truies et les variations génomiques au niveau de l'ORF5.(Goldberg *et al.*, 2000; Larochelle *et al.*, 2003)

La sévérité des lésions macroscopiques et microscopiques pulmonaires semble dépendre de modifications génétiques des isolats (Larochelle *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'isolat de référence américain ATCC VR2385 induit des lésions pulmonaires plus sévères comparativement à la souche de référence européenne LV (Halbur *et al.*, 1995). Plus récemment, le génome viral d'une souche vaccinale atténuée du VSRRP (Prime PAC PRRS de la compagnie Schering-Plough Animal Health) a été séquencée en totalité (Shen *et al.*, 2000). La protéine nsp2, codée par l'ORF1a, a été déterminée comme étant la protéine non-structurale la plus variable parmi les isolats nord-américains et européens avec des pourcentages d'identité en aa de 81% entre la souche vaccinale et une souche de référence américaine et de plus 37.5% en comparaison avec l'isolat européen LV (Shen *et al.*, 2000). La souche vaccinale possède une insertion de 36 aa au niveau de la nsp2 en plus de 158 substitutions de résidus d'aa, ce qui pourrait expliquer l'atténuation de la souche vaccinale du VSRRP. Mais on n'est pas en droit d'ignorer la présence d'autres mutations ailleurs dans le génome viral pouvant individuellement ou en combinaison avoir un effet significatif sur la virulence des isolats (Yang *et al.*, 1998).

1.6.2 La réponse immunitaire et les vaccins

1.6.2.1 La réponse immunitaire

La réponse immunitaire dirigée contre le VSRRP est un processus très complexe qui est influencé par les interactions du VSRRP avec son hôte. Les macrophages alvéolaires des poumons restent la cellule cible prédominante indépendamment de la voie de pénétration du virus dans l'organisme (Plagemann, 1996). Dans tous les cas d'infection, les animaux développent une réponse immune de type cellulaire et humorale (Nelson *et al.*, 1994; Loemba *et al.*, 1996).

La persistance du virus dans les tissus lymphoïdes et dans le sperme est la caractéristique principale de tous les *Artérovirus*.

Les porcs infectés développent des anticorps dirigés contre les différentes protéines non-structurales (Meulenberg *et al.*, 1993; Oleksiewicz *et al.*, 2001a; Oleksiewicz *et al.*, 2001b) et structurales (GP_{2a}, P_{2b}, GP₃, GP₄, GP₅, M et N) du virus dont ceux dirigés contre la protéine N sont les plus abondants bien que ne possédant aucune

activité neutralisante (Loemba *et al.*, 1996). Les anticorps neutralisants sont plutôt dirigés en grande partie contre la protéine de la GP₅ et en faibles quantités contre la GP₄ et M (Meulenberg *et al.*, 1997a; Pirzadeh et Dea, 1998; Yang *et al.*, 2000; Ostrowski *et al.*, 2002).

Les mécanismes de la réponse immunitaire à médiation cellulaire à l'infection par le VSRRP ont été peu étudiés. Certes, peu de travaux concernant la question sont publiés, mais certains résultats indiquent que la prolifération des cellules T induite par la protéine M est la plus importante par rapport à celle induite par d'autres protéines structurales (Bautista *et al.*, 1999). Certains auteurs attribuent la protection des animaux en l'absence d'anticorps spécifiques à l'activité de l'immunité cellulaire (Plana-Duran *et al.*, 1997b).

1.6.2.2 Les vaccins

L'industrie biopharmaceutique a mis au point différents types de vaccins dont les vaccins atténués (RespPRRS, Boehringer Ingelheim Inc.; PrimePac PRRS, Schering-Plough Animal Health) et vaccins inactivés (CyBlue, Laboratorios Sobrino, S.A, Sui pravac-PRRS, Laboratorios Hipra, Gerona, Spain). Les vaccins atténués semblent plus efficaces que les vaccins tués, car ils diminuent la durée de la virémie et augmentent la durée de la période de protection des animaux vaccinés (Christopher-Hennings *et al.*, 1997; Dee *et al.*, 1998; Mengeling *et al.*, 1999).

La conception des vaccins atténués requiert une prise en considération des critères qui semblent être au premier abord contradictoires (l'absence de la virulence et de la réactivation du virus et sa capacité de se répliquer et la sauvegarde de son immunogénicité) mais essentiels pour éviter des effets néfastes. Quelques cas d'infection liés à la réversion probable de la souche vaccinale atténuée du VSRRP ont été rapportés au Danemark en 1996 (Botner *et al.*, 1997) parmi les animaux vaccinés avec le vaccin vivant à base de la souche nord-américaine VR2332. La recrudescence des cas du SRRP fut signalée au bout de 1-2 mois après la vaccination causant d'importantes pertes économiques. On note également la circulation ainsi que la transmission d'un virus vaccinal des animaux vaccinés aux animaux non-vaccinés (Madsen *et al.*, 1998; Mortensen *et al.*, 2002; Larochelle *et al.*, 2003). Un autre désavantage de ce genre de vaccin est que les tests sérologiques ne permettent pas de distinguer les animaux vaccinés des animaux naturellement infectés. Les vaccins inactivés sont plus sécuritaires mais sont moins efficaces pour induire une protection.

Une stratégie plus prometteuse semble être la vaccination génétique. Des résultats encourageants obtenus par cette approche avec de l'ADN plasmidique exprimant les protéines GP₄, GP₅, M et N ont permis de détecter la présence des anticorps neutralisants anti-GP₅ et anti-GP₄ et la prolifération lymphocytaire chez les porcs infectés (Pirzadeh et Dea, 1998; Kwang *et al.*, 1999). Les résultats d'immunisation génétique avec l'ORF5 ont révélé la présence d'anticorps anti-GP₅ 15 jours après l'immunisation par des tests d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA et les anticorps neutralisants furent détectés seulement 2 à 3 semaines après la seconde injection de rappel et le titre atteignait 1/128 après l'infection défi (Pirzadeh et Dea, 1998). Les auteurs de cette expérience suggèrent que la GP₅ du VSRRP serait un bon candidat pour la conception d'un vaccin recombinant.

Dans une autre expérience, les auteurs (Kwang *et al.*, 1999) notaient la présence des anticorps dirigés contre les protéines N et M après 3 et 4 immunisations respectivement. Cependant les anticorps contre les protéines GP₄ et GP₅ ne furent détectés avant 12 semaines. Les anticorps dirigés contre toutes les 4 protéines étaient mis en évidence par test d'immunobuvardage de type Western blot après 12 semaines. Les anticorps neutralisants anti-GP₄ et GP₅ étaient aussi mis en évidence.

Par contre, cette méthode d'immunisation génétique nécessite une bonne connaissance des propriétés des produits des gènes utilisés. Les résultats rapportés chez l'EAV indiquent que la GP₅, exprimée individuellement dans un système eucaryotique, ne peut pas induire la synthèse des anticorps neutralisants, mais cette propriété est rétablie si elle est co-exprimée avec la protéine M (Balasuriya *et al.*, 2000).

1.6.3 Persistance de l'infection

La persistance de l'infection par le VSRRP dans les élevages peut être liée par un nombre suffisant et susceptible de porcs pour maintenir la chaîne de l'infection. Après une première flambée, l'infection ne conduit pas nécessairement à la séroconversion de tous les animaux dans l'élevage (Albina *et al.*, 1994) et quelques animaux restent susceptibles et peuvent subséquemment être infectés à n'importe quel moment. Le VSRRP peut persister dans l'organisme pendant une longue période variant de 90 à 251 jours (Batista *et al.*, 2002; Wills *et al.*, 2003), mais la période pendant laquelle le porc peut potentiellement transmettre le virus n'est pas connue (Albina *et al.*, 1994; Christopher-Hennings *et al.*, 1995). Les mécanismes utilisés par le virus pour échapper au

système immunitaire et persister chez les porcs infectés ne sont pas bien connus et il semble que lors de la primo-infection, les défenses antivirales non spécifiques sont inopérantes. L'évidence indirecte de l'absence de l'activité intracellulaire antivirale est le manque de l'expression *in vivo* et *in vitro* de l'interféron de type 1 (Albina *et al.*, 1998; Van Reeth *et al.*, 1999) et aucune activité cytotoxique naturelle ne semble se développer contre les macrophages infectés. Cette absence de réponse prive le porc de tout moyen de contrôle précoce de la réplication virale. De même, le virus régule à la baisse l'expression des récepteurs membranaires de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dans le sang périphérique et les nœuds lymphatiques médiastinaux (Thacker et Halbur, 1996). De plus, le virus se réplique dans les macrophages/monocytes et cellules dendritiques spécialisées dans la présentation des antigènes en association avec les molécules du CMH I et II.

Tous ces facteurs peuvent expliquer la difficulté pour le système immunitaire du porc de réagir adéquatement à la présence du VSRRP (Halbur *et al.*, 1996b), malgré l'apparition tardive des anticorps neutralisants.

1.7 Conclusions

L'analyse de la revue bibliographique montre que le SRRP est une entité nosologique menaçante pour l'industrie porcine compte tenu de l'absence de moyens efficaces de prophylaxie et de son impact économique.

Certes, des progrès énormes ont été réalisés dans la compréhension de la biologie moléculaire des *Artérovirus*, en particulier chez l'EAV en vue d'élaborer des moyens de lutte et de prophylaxie. L'élaboration de vaccins efficaces contre le VSRRP exige d'abord une bonne compréhension de son organisation génomique et la caractérisation des protéines virales tant structurales que non-structurales ainsi que des sous-unités fonctionnelles. Les pns du VSRRP bien qu'intervenant dans la réplication virale restent cependant peu explorés.

Un grand nombre de travaux concernant les protéines structurales a permis de cerner la problématique du SRRP et de déceler le déclenchement de certains mécanismes indésirables et réactions d'ordre immunopathologique liés avec l'expression de ces protéines tels que l'apoptose, l'ADE, la synthèse des anticorps auto-anti idiotypes contre la GP₅, l'existence d'un mimétisme moléculaire des antigènes viraux et cellulaires et

l'hypersensibilité retardée suite à l'injection intradermique de VSRRP inactivé chez des porcs préalablement infectés. Si beaucoup de résultats ont été obtenus concernant la caractérisation des protéines structurales majeures, les informations concernant les protéines structurales mineures, en particulier la GP_{2a} et P_{2b}, sont fragmentaires.

En vue de compléter la caractérisation des protéines virales du VSRRP, l'analyse des propriétés des protéines GP_{2a} et la P_{2b} devient une nécessité compte tenu de leur possible implication dans la réplication et la formation des particules virales infectieuses ainsi que dans des interactions protéines-protéines comme il a été rapporté chez l'EAV.

2. Matériel, méthodes et résultats

2.1 Article

2.2 Accusé de réception

-----Message d'origine-----

De : Ellen Strauss [<mailto:strausse@caltech.edu>]

Envoyé : 17 juin 2004 17:15

À : carl.gagnon@inrs-iaf.quebec.ca

Objet : Arc hives Submission

I received the submission from Springer-Verlag on Tuesday June 15. I have not yet had time to send it out for review. Dr. Ellen G. Strauss Editor, Archives of Virology Division of Biology 156-29 California Institute of Technology 1200 E. California Blvd Pasadena, CA 91125, U. S. A.

FAX: (626) 449 - 0756

email: strausse@cco.caltech.edu

2.3 Résumé en français

GP_{2a} et P_{2b} sont des protéines structurales mineures du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP), codées respectivement par l'ORF2a et l'ORF2b à partir de l'ARNm2 subgénomique bicistronique. Les outils immunologiques spécifiques permettant leur caractérisation ne sont pas toujours élaborés due aux faibles titres d'anticorps anti-GP_{2a} et -P_{2b} dans le sérum des porcs infectés. Pour développer de tels outils, les produits de l'ORF2 (a et b) de la souche de référence IAF-Klop du VSRRP amplifiés par PCR ont été clonés dans le vecteur d'expression procaryotique pGEX-4T-1 et sous-clonés dans les vecteurs d'expression eucaryotiques pRc/CMV2 et pCEP-5h. En vue d'obtention de sérums monospécifiques et d'AcMo, les souris et les lapins ont été immunisés avec les protéines recombinantes GST-ORF2a et GST-ORF2b ou avec les plasmides recombinants purifiés pRc/CMV2-ORF2a et pRc/CMV2-ORF2b. Tous les animaux immunisés ont produit des anticorps spécifiques non-neutralisants mais leur titre élevé était détecté chez les animaux immunisés génétiquement avec le plasmide pRc/CMV2-ORF2b.

En vue d'évaluer la cinétique d'apparition des anticorps anti-GP_{2a} et anti-P_{2b}, les protéines recombinantes de fusion furent utilisées comme antigène en immunobuvardage de type Western blot et celles-ci ont permis de révéler la précocité d'apparition des anticorps anti-GP_{2a} et anti-P_{2b} à partir du 6^{ème} jour p.i. chez les porcs expérimentalement infectés.

En RIPA, les résultats obtenus semblent mettre en évidence la co-précipitation des protéines GP_{2a} et P_{2b} avec la protéine N dans les lysats de cellules infectés ainsi que dans le virus semi-purifié incubé avec les sérums monospécifiques anti-GST-ORF2a, anti-GST-ORF2b ou anti-GST-ORF7 ou les AcMo mais pas dans les lysats incubés avec les antisérums dirigés contre les autres protéines structurales.

La confirmation de la présence des interactions entre les protéines GP_{2a}, P_{2b} et N du VSRRP reste à déterminer.

2.4 Attestation de la contribution des auteurs

En tant que premier auteur de l'article, j'ai effectué toutes les manipulations en dehors du clonage des deux gènes de l'ORF2 (a et b) dans le vecteur pGEX-4T-1. J'ai rédigé l'article. Cet article est la partie la plus importante de mon projet.

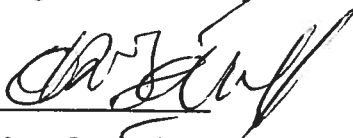
Le Dr Ali Kheyar est intervenu durant la réalisation de ce projet dans beaucoup d'aspects dont la supervision dans la production des anticorps monoclonaux, l'immunisation des souris, la planification de certaines expériences et la correction de l'article. Il faut aussi noter ses critiques et suggestions scientifiques.

La Dre Anne Marie-Josée Sasseville a réalisé le clonage des deux gènes de l'ORF2a et ORF2b dans le vecteur pGEX-4T-1. Elle a émis des suggestions et a corrigé l'article.

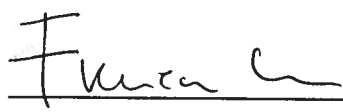
Le professeur François Shareck a supervisé le projet comme co-directeur.

Le Dr. Carl. A. Gagnon est intervenu dès le début dans plusieurs segments du projet dont la conception des amorces, le protocole d'immunisation des lapins, m'a prodigué des conseils pratiques dans la réalisation de plusieurs tests et a participé à la correction de l'article. Il a supervisé le projet comme co-directeur.

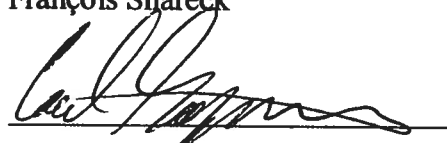
Le Dr Serge Dea fut le responsable de la supervision et de la gestion du projet.



Barthélémy Ontsouka



François Shareck



Carl A. Gagnon

2.5 Antibody response towards PRRSV GP_{2a} and P_{2b}, and their interaction with other structural proteins

B. Ontsouka¹, A. Kheyar¹, A M.-J. Sasseville², F. Shareck¹, C.A. Gagnon^{*1}, and S. Dea^{1§}

[§]In memoriam. Deceased January 2003

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

² Present address : Centre de recherche, Centre hospitalier, Université de Montreal, Montreal, H2L 4M1, Quebec, Canada

Running title : PRRSV GP_{2a} and P_{2b} characterization and interaction with other structural proteins

**Corresponding author* :Dr Carl A.Gagnon,
INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec
531 boul. des Prairies, Laval, P.Q., Canada, H7V 1B7
E-mail : Carl.Gagnon@inrs-iaf.quebec.ca
Tel. : 1-450-687-5010 ext. 4789 Fax : 1-450 686 5592

Summary. GP_{2a} and P_{2b} are minor structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) encoded respectively by ORF2a and ORF2b from the bicistronic subgenomic mRNA 2. Specific immunological tools that allow their characterization are still unavailable, due to low level titers of anti-GP_{2a} and -P_{2b} antibodies in sera of infected pigs. To develop such tools, PCR-amplified ORF2 -a and -b gene products of Quebec IAF-Klop strain of PRRSV were cloned into procaryotic pGEX-4T-1, mammalian pRc/CMV2 and pCEP-5h vectors. Rabbits and mice were immunized either with GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins or with purified recombinant plasmids pRc-ORF2a and pRc-ORF2b to obtain monospecific antisera and monoclonal antibodies (MAbs). All immunized animals produced specific non-neutralizing antibodies. However, their high-titer was obtained only in animals injected with pRc-ORF2b. In a kinetic study, both anti-GP_{2a} and -P_{2b} antibodies were detected by Western blotting as early as 6 days post-infection. Radioimmunoprecipitation experiments seemed to show the co-precipitation of GP_{2a} and P_{2b} with N protein in samples incubated with anti-GST-ORF2a, anti-GST-ORF2b or anti-GST-N serum or MAbs but not with those incubated with antisera directed to other structural proteins. The confirmation of the presence of the interactions between PRRSV GP_{2a}, P_{2b} and N remains to be determined.

1. Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a member of the *Arteriviridae* viral family of the *Nidovirales* order together with equine arteritis virus (EAV), lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV), and simian haemorrhagic fever virus (SHFV). The PRRSV is an enveloped, non-segmented, polyadenylated positive single-stranded RNA virus [6]. The genome of approximately 15 kb contains nine open reading frames (ORFs) which are transcribed in infected cells as a nested set of subgenomic mRNAs. The ORF1a and ORF1b encoding proteins with apparent helicase and replicase activities represent about 80% of the viral genome [6, 31]. The ORFs 2, 4-6 (from 5' to 3') encode for membrane-associated proteins (GP_{2a}, P_{2b}, GP₄, GP₅ and M) and the ORF7 for the nucleocapsid protein (N) [26, 29, 30, 55]. The GP₅, M and N are considered the major viral structural proteins while GP_{2a}, P_{2b} and GP₄ have been identified as minor structural proteins [27, 29, 30, 33, 55]. GP₃ is a non-structural protein in North American strains of PRRSV [18, 28] as in the case of LDV GP₃ [14], but seems to be a structural protein in European PRRSV strains [29, 49]. The N protein is the major immunogenic component of PRRSV [26] and interacts with itself by non-covalent and/or covalent bonds. It forms dimers that progress from nondisulfide- to sulfide-linked via a cysteine at position 23 as the virus buds from the cell [54]. The GP₅ and M proteins are engaged into disulfide linked heterodimers [27, 31]. Such heterodimerization in the case of EAV and LDV is crucial for viral infectivity [13, 46]. PRRSV proteins induce neutralizing antibodies that are essentially directed to GP₅ [19, 22, 36, 37, 51, 56, 58]. However, M and GP₄ proteins may also elicit antibodies which neutralize PRRSV at very low titers [9, 22, 56].

Recently, GP_{2b}, GP₃ and GP₄ of EAV were found to interact and form a heterotrimeric complex in an unusual type of post-assembly biochemical virus modification [52]. In PRRSV, GP_{2a} and P_{2b} proteins are the products of ORF2a and ORF2b genes respectively that are translated from the bicistronic mRNA₂ at different overhanging frames [30, 45, 55]. In the PRRSV, the AUG codon of the ORF2a encoding the GP_{2a} protein (the equivalent of EAV Gs or GP_{2b}) precedes the initiation codon of the EAV/LDV ORF2a homolog by 5 nt and the nomenclature of these ORFs is therefore reversed. The SHFV homologs of PRRSV ORF2a and ORF2b genes are considered to be the ORF4b and the ORF4a respectively [7, 30, 38, 45, 55]. PRRSV GP_{2a} and P_{2b} proteins

may play a role in viral replication or infectivity since in the case of EAV, inactivation of the initiation codon of EAV ORF2b led to the production of non-infectious viral particles [45, 53]. In the PRRSV GP_{2a} sequence, mutations in PRRSV ORF2a gene were able to improve the replication of a mutated PRRSV [50]. The PRRSV GP_{2a} protein has been demonstrated to be implicated in the induction of the cellular immune response and lymphocyte proliferation [3]. In the other two arteriviruses (LDV and SHFV), the GP_{2a} and P_{2b} protein homologs remain uncharacterized.

In the present study, we report the successful procaryotic and eucaryotic expression of the two PRRSV ORF2 a and b genes, the production of monospecific hyperimmune sera and of monoclonal antibodies (MAbs) against the GP_{2a} and P_{2b}, and the early appearance at 6 days post-infection (dpi) of antibodies directed to GP_{2a} and P_{2b} proteins in infected pig sera. We also establish the protein-protein interactions between the GP_{2a}, P_{2b} and the N protein in PRRSV infected MARC-145 cells and in semi-purified virions.

2. Materials and Methods

2.1. Cells and Virus

MARC-145 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 8 % gamma-irradiated fetal bovine serum (FBS) in the presence of penicillin (5 U/ml) and streptomycin (5 µg/ml). The Quebec cytopathogenic reference strain IAF-Klop of PRRSV was propagated in MARC-145 cells as previously described [25]. Infectivity was measured by titration of clarified tissue culture medium using an endpoint dilution procedure and calculation of 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀). Human embryonic kidney (HEK) 293A cells were used for all transfection experiments. They were cultured in DMEM containing 5 % FBS and antibiotics.

2.2. Cloning of ORF2 (a et b) into procaryotic and eucaryotic expression vectors

Whole PRRSV genomic RNA was extracted as described [19] and used as template in RT-PCR experiments to amplify individual ORF2a and ORF2b genes using specific oligonucleotide primer pairs described in Table 3*. Primer design was based on the published nucleotide sequence of IAF-Klop strain of PRRSV ORF2-a and -b genes

(Genbank accession No AF003343). The primers containing the restriction sites *Bam*HI (PG2aS and PG2bS) and *Eco*RI (PG2aAs and PG2bAs) were designed for directional cloning in pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Quebec, Canada), whereas those containing the restriction sites *Not*I (PR2aS and PR2bS) and *Xba*I (PR2aAs and PR2bAs) were designed for directional cloning in pRc/CMV2 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). However, the primers PC2aS, PC2aAs, PC2bS, PC2bAs and PC2S were designed for cloning in the *Bam*HI unique restriction site in pCEP-5h kindly provided by Dr. Kamen (BRI-NRC, Montreal, Canada). The primers PG2aAs, PG2bAs, PR2aAs and PR2bAs contained the 6 mers-Histidine-tag sequence in reverse sense, whereas this tag was inserted in forward sense in the primers PC2aS and PC2bS upstream of enterokinase motif.

The PCR-amplified products were purified using the Qiagen DNA purification kit (Qiagen Inc, Mississauga, Ontario, Canada), digested by corresponding restriction enzymes and ligated into the aforementioned vectors using standard methods [43]. pGEX-ORF2a, pGEX-ORF2b, pRc-ORF2a, pRc-ORF2b, pCEP-ORF2a and pCEP-ORF2b selected clones were verified by sequencing analysis (DNA Landmarks Inc., St-Jean-sur-Richelieu, Quebec, Canada). A pCEP plasmid construct containing the PRRSV ORF7 gene downstream of a 6 mers-Histidine tag (paper in preparation) was used as control to verify the possible interaction between GP_{2a} and P_{2b} proteins and N protein in transfected 293 cells by indirect immunofluorescence (IIF) assay.

*Available on request.

2.3. *Procaryotic expression of GST-ORF2a and GST-ORF2b recombinant fusion proteins*

The pGEX-ORF2a and pGEX-ORF2b recombinant plasmids were used to transform competent *E. coli* strains BL21(DE3) and BL21(DE3)pLysS cells (Novagen, Madison, Wisconsin) using standard methods [43]. Overnight cultures of transformed bacteria were diluted 1:200 in 100 ml 2xYT medium and grown at 37°C to an optical density of 0.7-1.0 at 600 nm and were used to produce stocks of GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins. The induction of protein expression was performed by adding 0.1-0.5 mM isopropylthiogalactoside (IPTG) (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada) to the culture. After 3-4 h incubation at 37°C or 28°C under vigorous agitation (290 rpm), cells were pelleted by centrifugation. Cell lysates of small volume experiments

were first analyzed and the fusion proteins were found entirely in the form of inclusion bodies (data not shown). GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins were purified using the previously described methods [10, 15, 16] with some modifications. Briefly, cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 1:10 of the initial culture volume in ice-cold STE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl) containing 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mg/ml of freshly prepared lysozyme (Roche Diagnostics) and 1% Triton X-100 and incubated on ice for 15 min. Before sonication for 1 min, 100 μ l of 1 M of dithiothreitol (DTT) and 1.4 ml of 10% Sarkosyl were added and mixed thoroughly by inversion. The sonicate product was then centrifuged to remove cell debris. These pellets were washed twice in 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 9.2) and solubilized in 500 μ l of the same buffer containing 8 M urea [16]. Following SDS-PAGE, the separated GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins were electroeluted from the gel slabs for 6 h in electrophoresis elution buffer (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS), using an electroeluter apparatus as recommended by the manufacturer (BioRad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). The electroeluted fusion proteins were cleaved by thrombin protease (Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions. Protein concentrations were finally determined by the method of Lowry.

2.4. *Eucaryotic expression of GP_{2a} and P_{2b} recombinant proteins*

For transient expression assays with pRc-ORF2a, pRc-ORF2b, pCEP-ORF2a, pCEP-ORF2b and pCEP-ORF7 plasmids, 293 cells in 96-well tissue culture plates and 60 mm cell culture dishes were used. All transfection experiments were carried out using polyethylenimine (PEI) gene transfer agent [12] in its 25 kDa linear form (Polysciences, Warrington, Pennsylvania). Briefly, 0.5 to 1 μ g of plasmid DNA were mixed with 1 to 2 μ g of PEI in a total volume of 100 μ l of serum-free DMEM. This mix was incubated at room temperature for 10 min and then 20 μ l per well were added to the sub-confluent 293 cell monolayers and incubated in standard culture conditions for 72 h. Purification of expressed proteins was carried out using a Hitrap chelating affinity column (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé Quebec, Canada) according to the manufacturer's protocol. Authenticity of recombinant proteins expressed either in *E. coli* or in transfected 293 cells

was confirmed by IIF and Western blot (WB) assays with anti-PRRSV hyperimmune pig sera [24].

2.5 Antibodies

Hyperimmune rabbit monospecific antisera directed to GP₃, GP₄, GP₅, M and N proteins have been reported previously [17, 18, 27]. Anti-PRRSV hyperimmune pig sera and sera from PRRSV experimentally infected pigs were also previously described [24]. For production of anti-PRRSV GP_{2a} and anti-PRRSV P_{2b} MAbs, recombinant pRc-ORF2a and pRc-ORF2b plasmid in 100 µl of PBS in combination with non-ionic poloxamer carrier SP1017 (Supratek Pharma Inc., Laval, Quebec, Canada) [23] were injected into the *tibialis cranialis* muscle of Balb/c mice as described in Table 4. Mice were boosted four times with the same amounts of DNA at 3-week intervals or until specific antibodies were detected by IIF, ELISA or WB. Control mice received the same dose of parental control plasmids (Table 4). Production of MAbs was performed as previously described [8]. Briefly, spleen cells of DNA-immunized mice were fused with SP2/0 myeloma cells in the presence of polyethylene glycol-1500 (Sigma-Aldrich Ltd, Oakville, Ontario, Canada). Monospecific anti-GP_{2a} or anti-P_{2b} antibody-secreting hybridomas were screened by a combination of IIF using PRRSV-infected MARC-145 cells and ELISA using electroeluted GST-ORF2a or GST-ORF2b fusion proteins. The MAb isotypes were determined by capture ELISA kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. For the production of monospecific rabbit antisera, two groups of New Zealand white rabbits were used. In the first group, rabbits were injected into multiple sites of the *tibialis anterior* muscle with the recombinant pRc-ORF2a or pRc-ORF2b plasmids diluted in 1ml of PBS containing SP1017 non-ionic carrier. They were boosted four times with the same amounts of DNA at 3-week intervals (Table 4). In the second group, rabbits were injected subcutaneously into multiple sites with electroeluted GST-ORF2a or GST-ORF2b fusion protein (50 µg) (Table 4). Mouse hyperimmune serum directed against GST-*Mycoplasma hyopneumoniae* P46 fusion protein [5] was used as control. Reactivity of monospecific rabbit antisera in both groups was also assessed by WB and IIF with PRRSV-infected MARC-145 cells.

2.6. *Western blot (WB) analysis*

PRRSV-infected MARC-145 cell lysates and semi-purified virions were separated by Tris-tricine SDS-PAGE [44], whereas the Tris-glycine SDS-PAGE was used to separate the fusion proteins and GST control antigen. These antigens were transferred overnight onto a nitrocellulose membrane at 80 mA (Schleicher & Schuell, Xymotech, Montreal, Quebec, Canada) and immunostained as previously described [24]. All the antisera used were pre-incubated with a non-transformed *E. coli* bacterial lysate in order to avoid high background. The membranes were incubated in the presence of either anti-PRRSV hyperimmune pig serum and sera from DNA- and fusion protein-immunized mice and rabbits diluted 1:100, sera from experimentally infected pigs diluted 1:20 or non-diluted hybridoma supernatants. After washing in 0.02 M Tris-buffered saline (TBS) containing 0.05% Tween 80, the membranes were incubated for 45 min in the presence of the appropriate peroxidase-labeled anti-IgG conjugate, diluted 1:2000, in blocking solution (4% skim-milk, 0.05% Tween-80 in TBS:TBS-SM). After three washes, the immune complexes were revealed by incubating the membranes in the enzyme substrate solution containing 4-chloro-1-naphthol and hydrogen peroxide in TBS buffer.

2.7. *Indirect immunofluorescence (IIF)*

For IIF, 293 cells transfected with pRc-ORF2a, pRc-ORF2b, pCEP-ORF2a, pCEP-ORF2b or pCEP-ORF7 as well as PRRSV-infected MARC-145 cells were incubated at 37°C for 48-72 h, fixed with acetone-methanol (1:1) and treated with the sera and MAbs described in WB. The fixed cells were incubated for 45 min with the appropriate anti-IgG-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate diluted 1:100 in PBS.

2.8. *Virus neutralization (VN) test*

The modified procedure for *in vitro* detection of virus-neutralizing (VN) antibodies to PRRSV was used as previously described [57].

2.9. *Metabolic radiolabeling of viral proteins and radio-immunoprecipitation assay (RIPA)*

MARC-145 cells were infected with PRRSV at a TCID₅₀/cell of 0.1-2 and infected or mock-infected cells were starved for 1 h in DMEM methionine/cysteine free

medium (Invitrogen) at 14-18 h post-infection (hpi). Cells were then labeled with 250-600 $\mu\text{Ci/ml}$ of L-[^{35}S] TRAN35S LABELTM methionine/cysteine with a specific activity of 1175Ci/mmol (ICN Biomedicals, Irvine, California) for 6-8 h. Alternatively, infected cells were starved for 1 h in MEM-Earl without leucine (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) and subsequently labeled with 300-400 $\mu\text{Ci/ml}$ of L-leucine (3, 4, 5 ^3H) with a specific activity of 173 Ci/mmol (ICN Biomedicals). For the preparation of radiolabeled virions, the culture supernatants were harvested before cytopathic effects (CPE) were evident at 48 hpi and cells debris were removed by low-speed centrifugation. The [^{35}S] methionine- and [^3H] leucine- labeled virions were pelleted through a 20% sucrose cushion in TNE buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) by a 6 h centrifugation at 100,000g. For the RIPA analysis, labeled cells and virions were solubilized in ice-cold lysis buffer as described [7]. After clarification at 13,000 rpm for 15 min, 200-250 μl of PRRSV- or mock-infected cell lysates were incubated with anti-PRRSV hyperimmune pig sera diluted 1:100, anti-GP_{2a} and anti-P_{2b} MAb supernatants; or monospecific anti-GST-ORF2a and anti-GST-ORF2b rabbit sera diluted 1:2. To immunoprecipitate IgM antibodies, rabbit IgG anti-mouse IgM tertiary antibodies (Allelix, Mississauga, Ontario, Canada) were added to the supernatants and incubated for 2 h at 4°C. Immune complexes were then collected by addition of protein A SepharoseTM CL-4B (Amersham Biosciences), extensively washed and analyzed in Tris-tricine SDS-PAGE [44]. The gels were treated for 30 min with fixing solution (methanol:water:acetic acid, in proportions of 30:60:10) and soaked in AmplifyTM (Amersham Biosciences) for enhancement of the signal and dried following fluorography and exposure for 5-12 days at -80°C. Immunoprecipitation assay with PRRSV-infected MARC-145 cell lysates was performed as described above and immune complexes were analyzed by WB.

3. Results

3.1. Cloning, expression and purification of recombinant fusion GST-ORF2a and GST-ORF2b proteins

The oligonucleotide primers designed in accordance with the published PRRSV ORF2 sequence [19] allowed the amplification of ORF2a and ORF2b gene segments with the predicted sizes of 789 and 238 bp respectively including extra bases introduced for cloning and expression purposes (data not shown). The sequenced PCR products were

ligated into pGEX-4T-1. The procaryotic expression of GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins were done as described in materials and methods. SDS-PAGE analysis of sonicated lysates of IPTG-induced transformed *E. coli* cells revealed the presence of polypeptide bands with a M_r of 50 kDa and 36 kDa respectively corresponding to the predicted molecular masses of GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins (Fig.5A, lanes 3-6). At both temperature regimens and concentrations of IPTG ranging from 0.1 to 0.5 mM, the expression of proteins was similar. The expression of GST-ORF2a fusion protein was observed only in *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS bacterial cells, whereas GST-ORF2b fusion protein was well expressed both in *E. coli* strains BL21(DE3) and in BL21(DE3)pLysS bacterial cells. Despite improved environmental conditions, the expressed fusion proteins were entirely in the form of inclusion bodies (data not shown). These fusion protein species were not detected in lysates of control non-induced transformed bacteria (Fig. 5A, lane 2).

High amounts of GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins were recovered following solubilization of the inclusion bodies and then purified by electroelution. After treatment with 8 M urea, the GST moiety of the two fusion proteins completely lost the ability to bind to glutathione sepharoseTM 4B beads. In contrast, the use of 2-3% Sarkosyl [15] allowed the binding of both fusion proteins to glutathione SepharoseTM 4B beads, but yielded very low amounts of purified proteins (data not shown). In cleavage experiments, the GST-ORF2a protein was partially cleavable, whereas the GST-ORF2b protein became uncleavable by thrombin (data not shown).

The expressed electroeluted fusion proteins were immunologically identified by WB, using the homologous anti-PRRSV hyperimmune pig serum (Fig. 5B, lanes 3-6). The reactivity signal was much higher against GST-ORF2a than against the same amounts of GST-ORF2b fusion protein. However, no reactivity was observed with cell lysate from bacteria expressing GST protein alone (Fig. 5B, lane 1).

To analyze the antigenicity of the electroeluted GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins, sera from pigs experimentally infected with Quebec IAF-Klop strain of PRRSV [24] were tested in WB. Antibodies directed to the GP_{2a} and P_{2b} proteins were detected from 6 dpi (Fig. 6 A and B), and the signal remained unchanged until 63 dpi (observation period). No reaction was noticed with GST alone (Fig. 6C).

3.2. Immunogenicity of *E. coli* expressed GST-ORF2a and GST-ORF2b recombinant fusion proteins

Seroconversion was assessed in sera collected from rabbits and mice immunized with *E. coli*-expressed GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins. Western blots, using the fusion proteins as antigens contained highly immunogenic GST moiety which did not allow proper interpretation of the data. As this GST moiety could not be cleaved out from fusion proteins, the presence of antibodies directed to ORF2a and ORF2b protein moieties was established by RIPA (Fig. 7). The reactivity of anti-GST-ORF2a and anti-GST-ORF2b protein sera against native viral proteins suggested that some protein epitopes did not depend on post-translational modifications that could have been different in eucaryotic and in procaryotic cells. The high background was probably due to the concentration of the sera used (1:2). These results confirm that the PRRSV ORF2a and ORF2b gene products are immunogenic.

3.3 Eucaryotic expression of GP_{2a} and P_{2b} proteins

To establish the expression of PRRSV ORF2a and ORF2b gene products in different expression systems, the recombinant vectors pRc/CMV2 and pCEP-5h carrying the ORF2a and ORF2b genes were constructed, and 293 cells were transfected using PEI as transfection agent.

In transient experiments, the synthesis of recombinant proteins in 293 cells was shown by IIF and WB using anti-PRRSV hyperimmune pig serum, anti-GP_{2a} and anti-P_{2b} MAbs, anti-GST-ORF2a and anti-GST-ORF2b sera and sera from DNA-immunized rabbits. Intense cytoplasmic fluorescence was seen in pCEP-ORF2a-, pCEP-ORF2b-, pRc-ORF2a-, and pRc-ORF2b-transfected cells incubated with anti-PRRSV hyperimmune pig serum, whereas in cells incubated with anti-GST-ORF2a and anti-GST-ORF2b sera, the fluorescence was weak (data not shown). Both proteins seemed to accumulate in the perinuclear area. Transfected cells treated with anti-GP_{2a} or anti-P_{2b} sera obtained by DNA-immunization of rabbits, and by MAbs directed to GP_{2a} and P_{2b} proteins did not yield a detectable signal (data not shown).

The lysates from pRc-ORF2a-, pRc-ORF2b-, pCEP-ORF2a- and pCEP-ORF2b-transfected and mock-transfected 293 cells were tested by WB for their reactivity to anti-

PRRSV hyperimmune pig serum. The protein of ORF2b gene with a M_r of about 12 kDa was revealed only with anti-PRRSV hyperimmune pig serum (data not shown). No reaction was observed with normal pig serum. The increased molecular mass is due to the presence of 6 mer-Histidine tag and enterokinase cleavage site in these constructs. None of the immunized rabbit or mice sera used, could recognize this gene product. The antisera failed to detect such a 12 kDa protein band in lysates of 293 cells transfected with parental plasmid. However, in samples transfected with vectors encoding the ORF2a gene, weak expression was detected.

3.4. Reactivity of anti-GP_{2a} and anti-P_{2b} rabbit and Balb/c mice sera and MAbs obtained after DNA immunization

Rabbits and mice were immunized intramuscularly with pRc-ORF2a and pRc-ORF2b vector constructs. Antibody responses to GP_{2a} and P_{2b} were monitored by WB and ELISA using GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins as antigens and by IIF and RIPA with PRRSV-infected MARC-145 cells. Balb/c mice and New Zealand white rabbits injected with pRc-ORF2b plasmid developed antibodies which were first detected by WB after the second booster injection, with the intensity of the reaction increasing after the fourth booster injection (Fig. 8, lane 1 to 4 and Table 4). Rabbits and mice injected with pRc-ORF2a seroconverted only weakly (Table 4). Furthermore, sera of DNA-injected rabbit reacted neither in IIF nor in RIPA assays (Table 4). To determine whether the anti-GP_{2a} and anti-P_{2b} rabbit and mice antisera could neutralize virus infectivity, they were incubated in serial dilutions with 100 TCID₅₀ of PRRSV in a microneutralization assay [57]. Cytopathic effects (CPE) in PRRSV-infected MARC-145 cells were visualized by microscopic observations. Mouse and rabbit anti-GST-ORF2a and anti-GST-ORF2b sera did not neutralize the homologous IAF-Klop reference strain of PRRSV (Table 4), whereas hyperimmune anti-PRRSV pig serum, used as positive control, neutralized viral infectivity with titers ranging from 1:16 to 1:32 (data not shown).

Fusions performed with spleen cells of mice immunized with GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins did not produce stable antibody-secreting hybridoma clones. Since DNA-immunized mice were able to produce detectable levels of antibody response especially with pRc-ORF2b construct (Fig. 8 and Table 4). MAbs were prepared as previously described [8]. Hybridoma culture media supernatants were screened for the

presence of anti-GP_{2a} and anti-P_{2b} antibodies by ELISA and WB and subcloned by limiting dilution method. Three anti-GP_{2a} and six anti-P_{2b} clones were found to produce detectable levels of antibodies (Table 5). MAb supernatants were characterized by several immunological tests using GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins (WB and ELISA) or native viral proteins from PRRSV infected MARC-145 cells (VN, IIF and RIPA tests) as antigens. The MAbs selected were mainly IgMs. Most of them reacted in ELISA and IIF. However, those used in VN test did not neutralize PRRSV infection in MARC-145 cells. In addition, two anti-GP_{2a} and four anti-P_{2b} MAbs were positive in WB, ELISA, IIF and/or RIPA. In contrast, one anti-GP_{2a} MAb (17D11) and two anti-P_{2b} MAbs (1E10 and 4F7), were negative in WB but reacted positively in ELISA, IIF and/or RIPA (Table 5 and Fig. 8).

The MAbs reacted by immunofluorescence in the perinuclear area of cells (Fig. 9A, C) showed a distribution similar to that obtained with the anti-PRRSV hyperimmune pig serum (Fig. 9F). No reaction was observed in mock-infected cells (Fig 9B, D). In RIPA, incubation of two anti-P_{2b} MAbs with semi-purified [³⁵S] methionine labeled extracellular virions precipitated two forms of proteins. The first band had a *M_r* of 8 kDa, corresponding to the predicted *M_r* of P_{2b} protein and the second band had a *M_r* of 6.5 kDa (Fig. 10C). This electrophoretic band pattern was also observed with anti-PRRSV hyperimmune pig serum (Fig. 7 lane 5 and Fig. 10A, B). It is worth noting that GP_{2a} and N proteins co-precipitated with P_{2b} protein (Fig. 10C) in a way similar to that seen with hyperimmune rabbit sera (Fig. 7). The immunoprecipitation reaction with anti-GP_{2a} MAbs showed a weak signal (Table 5), using the same conditions as with anti-P_{2b} MAbs.

3.5. *Interactions of GP_{2a} and P_{2b} with other PRRSV proteins in RIPA*

To characterize the potential interaction between the GP_{2a} and P_{2b} on the one hand with other PRRSV proteins on the other hand, we verified whether immunoprecipitable protein complexes could be brought down in semi-purified virions or in PRRSV infected MARC-145 cells in the presence of antiserum directed to GP_{2a} or P_{2b} protein. We therefore incubated [³⁵S]-methionine or [³H]-leucine radiolabeled PRRSV-infected MARC-145 cell lysates or semi-purified virions with MAbs directed to GP_{2a} or P_{2b} protein, with monospecific rabbit sera against GST-ORF2a or GST-ORF2b fusion protein, or with anti-PRRSV hyperimmune pig sera (as positive control).

In order to obtain a more sensitive labeling of P_{2b} protein, RIPA was performed using cells metabolically radiolabeled with [³H]-leucine since its leucine content is 13.5 % compared to 2.7 % for that of methionine. [³H]-Leucine-labeled PRRSV-infected MARC-145 cell lysates or semi-purified virions were then incubated with all tested sera and MAbs, but P_{2b} protein was not detected despite overexposure of films. The presence of N protein and faint amounts of GP_{2a} protein were however observed (data not shown). RIPA experiments were conducted with [³⁵S] methionine radiolabeled semi-purified virions and infected cell lysates. Following incubation with anti-GST-ORF2a, anti-GST-ORF2b rabbit serum, or anti-PRRSV hyperimmune pig serum, the GP_{2a} (*M_r* of 29 kDa) and P_{2b} (*M_r* of 8 kDa) proteins were co-immunoprecipitated with N protein (*M_r* of 15 kDa) from PRRSV-infected MARC-145 cell lysates in presence of reducing agents (Fig. 7, lanes 1, 3, 5 and 7). In mock-infected cell lysates (Fig. 7, lanes 2, 4 and 6), no specific signal was detected.

The authenticity of the GP_{2a}, P_{2b} and N proteins was further investigated. The possible protein-protein interactions between GP_{2a}, P_{2b} and N proteins was analyzed by double-immunoprecipitation experiments (Fig. 10 A, B). In these experiments, a sample lysate was first incubated with a monospecific antiserum directed to one of PRRSV structural proteins (N, GP₅, M, GP_{2a}) adsorbed to protein A, and pelleted. The supernatant from this step was then incubated with anti-PRRSV hyperimmune pig serum, adsorbed to protein A, and pelleted to bring down the remaining PRRSV proteins that were not precipitated in the first step. The two pellets from the same sample were then analyzed in Tris-tricine SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions (Fig. 10 A, B respectively). The results of this experiment seemed to show the co-precipitation of GP_{2a}, P_{2b} and N proteins in samples incubated with anti-GST-N sera (Fig. 10A, lanes 7 and 7'). However, with anti-GST-ORF2b protein serum, the high background did not allow to observe any specific reaction under the same experimental conditions. While, anti-P_{2b} MAbs were able to co-immunoprecipitate the complex protein GP_{2a}/P_{2b}/N by simple RIPA test as shown in Fig. 10C.

It is noteworthy that the protein complex (GP_{2a}/P_{2b}/N) was not completely precipitated in the first immunoprecipitation step as remaining amounts were observed with the samples pelleted with anti-PRRSV hyperimmune pig serum in the second step (Fig. 10A, lanes 2 and 8). However, monospecific sera directed to GP₅ and M proteins (Fig. 10A, lanes 3 and 5 respectively) did not co-precipitate GP_{2a}, P_{2b} and N proteins that

were rather precipitated in the second step with the anti-PRRSV hyperimmune pig serum (Fig. 10A, lanes 4 and 6 respectively). In a sample incubated with protein A alone (Fig. 10A, B, lane 9), the amount of N protein that was precipitated due to non-specific interaction (N to protein A) was very low, and could not explain the presence of the N protein in P_{2b} precipitates.

The appearance of a band with a M_r of about 10 to 12 kDa under the N protein observed in the presence of anti-P_{2b} MAbs (Fig. 10C, lanes 1 and 2) and of anti-GST-N serum (Fig. 10A, B, lanes 7 and 7') remains unexplained but may be attributed to a degradation product of the N protein. Furthermore, an additional protein band with a M_r about 30 kDa was observed under reducing conditions in samples precipitated with anti-GST-N serum or anti-P_{2b} MAbs (Fig. 10A, lanes 7 and 7' or Fig. 10C, lanes 1 and 2). The same band was more intense in non-reducing conditions (Fig. 10B, lane 7).

As shown in RIPA, anti-GST-ORF3 and anti-GST-ORF4 sera did not precipitate the GP_{2a}/P_{2b}/N complex (Fig. 10D). However, their mutual interaction (GP₃ vs GP₄) has been observed as anti-GST-ORF3 serum co-precipitated the complex GP₃/GP₄ (Fig. 10D, lane 4) and anti-GST-ORF4 also precipitated this complex (Fig. 10D, lane 2).

In IIF, pCEP-ORF7-transfected 293 cells incubated with anti-GST-ORF2a and anti-GST-ORF2b protein sera or MAbs directed to GP_{2a} or P_{2b} protein or pCEP-ORF2a- and pCEP-ORF2b- transfected 293 cells incubated with anti-GST-N sera did not emit any signal (data not shown). Immunoprecipitation reaction by incubation of PRRSV infected MARC-145 cell lysates or semi-purified virions with anti-GST-ORF2a or anti-GST-ORF2b protein sera or MAbs directed to these two proteins also did not detect the N protein in Western blot (data not shown). Finally, the electrophoretic mobilities of GP_{2a} and P_{2b} remained unchanged and did not depend on the presence or absence of reducing agents (β -mercaptoethanol or DTT) (Figs. 7 and 10A, B, C).

4. Discussion

PRRSV GP_{2a} and P_{2b} which are products of ORF2a and ORF2b genes are minor structural viral proteins translated from bicistronic mRNA₂. Very little is known about their structure and function because of difficulties with their expression in different systems and the unavailability of specific immunological reagents [55]. In this aspect, our study developed immunological reagents necessary for the characterization of the PRRSV GP_{2a} and P_{2b} proteins.

The PRRSV GP_{2a} and P_{2b} proteins seem to have some features in common with their counterparts in other *Arteriviruses* [30, 45, 53, 55]. Comparison between European and North American genotypes of PRRSV showed that amino acid identities varied from 57 to 63% for GP_{2a} [9, 31, 42] and 74-75,7 % for P_{2b} [42, 55]. The percentage of amino acid identity is remarkably high when comparing several isolates from the same continent and can reach 91-99% for GP_{2a} [9]. In the case of EAV, the ORF2a and ORF2b products are abundantly expressed in infected cells [7, 45, 53].

ORF2a protein was expressed only in BL21(DE3)pLysS strain of *E. coli*, whereas the ORF2b protein was obtained in both strains BL21(DE3) and BL21(DE3)pLysS (Fig. 5). The use of *E. coli* strain BL21 (DE3) with the pLysS plasmid presents some advantages e.g. these bacteria have a tolerance for toxic target plasmids, unstable plasmids become stable and plasmids that would not otherwise be established can be maintained and expressed [47]. The expression of ORF2a protein only in the *E. coli* strains BL21(DE3)pLysS may suggest that it is a toxic or instable protein [47]. The expression of PRRSV ORF2a and ORF2b proteins in procaryotic cells showed the formation of inclusion bodies. This phenomenon seems to be prevalent during expression of most of PRRSV proteins in different systems and suggests their association to membrane [10, 19, 39]. The eucaryotic expression of GP_{2a} and P_{2b} proteins were clearly detected in transfected cells by IIF test using anti-PRRSV hyperimmune pig sera, but only the P_{2b} protein was clearly detected in WB. The weak signal and the difficulty to express GP_{2a} protein had been reported by others [3, 30, 39]. It may be explained by its toxicity or its degradation as reported in the case of EAV GP_{2b} protein [7]. Wu and co-workers [55] have recently reported the expression of ORF2a and 2b as enhanced green fluorescent fusion proteins. However, the ORF2b was preferentially synthesized and the expression of GP_{2a} was improved by abrogating the ORF2b start site. These authors suggested that the P_{2b} protein was the principal product of ORF2. On the other hand, these investigators revealed the expression ORF2b gene product from the ORF2a gene sequence in baculovirus-infected cells and suggested that the ORF2b gene completely embedded in ORF2a gene is preferentially translated. Our results did not show the expression of ORF2b product from ORF2a gene in pRc-ORF2a- or in pCEP-ORF2a- transfected 293 cells. This may be due to the choice of plasmid vectors.

Data obtained in RIPA with the Quebec reference IAF-Klop strain of PRRSV indicated that the ORF2 -a and -b encoded proteins were expressed in reasonable amounts

in MARC-145 infected cells but that relatively low amounts were incorporated into virion particles (Fig. 7 vs 10C).

The antigenicity of GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins were conserved since they could be detected with the anti-PRRSV hyperimmune pig serum (Fig. 5B, C) and sera from experimentally infected pigs (Fig. 6A, B), as well as with MAbs directed towards GP_{2a} and P_{2b} (Fig. 8 and Tables 2 and 3). These fusion proteins were used as antigens for the detection of antibodies in sera of experimentally infected pigs (Fig. 6). The presence of antibodies directed to GP_{2a} and P_{2b} was detected for both proteins at 6 dpi and remained unchanged to the end of the observation period (63 dpi). These results indicate that the products of ORF2a (GP_{2a}) and ORF2b (P_{2b}) are parts of the PRRSV antigens and may be used in biological studies to elucidate their properties. Our data constitute the first experimental evidence of the presence of antibodies to PRRSV GP_{2a} and P_{2b} proteins within the first week of experimental infection as demonstrated for PRRSV major structural GP₅, M and N proteins [24]. This suggests that immune response triggers against PRRSV structural proteins at the same time without protein type (minor or major) discrimination.

Previous studies indicated that the detection of antibodies to GP_{2a} in sera of experimentally infected pigs [34] began at 14 dpi. However, sample sera before 14 dpi were not assayed. Our data are therefore different from those obtained by Wu and co-workers [55] who reported that detection of antibodies to P_{2b} started at 18 to 21 dpi. The difference may be explained by the serum dilutions that were too high (1:100) to detect anti-P_{2b} antibodies as we have mentioned in the present study (Fig. 6).

Although, it is well known that recombinant proteins expressed in *E. coli* do not undergo the same post-translational modifications as in eucaryotic systems, monospecific rabbit sera produced with the *E. coli*-expressed GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins were successfully used in RIPA experiments to detect expression of GP_{2a} and P_{2b} in PRRSV infected MARC-145 cells and their incorporation into virion. DNA immunization of rabbits and mice also resulted in the production of monospecific antisera and MAbs.

DNA immunization offers an alternative strategy to study many parameters of immunity. The expressed proteins undergo all post-translational modifications occurring during viral infection. Thus, the synthesized antibodies are expected to detect continuous

and conformation-dependent epitopes [20, 22, 37]. However, other viral proteins might be necessary for the post-translational modifications.

Many successful attempts were reported in pigs with respect to DNA immunization with plasmids encoding PRRSV GP₄, GP₅, M or N protein that led to induction of both humoral and cellular protective immunity [9, 22, 37]. In our study, DNA immunization with the plasmids encoding PRRSV GP_{2a} and P_{2b} proteins stimulated a humoral immune response in rabbits and mice which was detected after two immunization boosts. However, the reactivity of sera against GST-ORF2a fusion protein was weaker in rabbits when tested by immunoblot. It is likely that GP_{2a} produced in rabbit muscles following DNA immunization was less immunogenic than bacterially expressed recombinant proteins. As suggested by other investigators [35], the low level of antibody production may be due to GP_{2a} toxicity in muscle cells, or to its instability [7] making the remaining amounts of GP_{2a} not able to properly stimulate immune response. Another explanation is that the presence of the ORF2b start codon in the entire ORF2a sequence construct decreases the probability of ribosomes to initiate at the ORF2a start codon [55].

However, the situation was different for P_{2b} protein since anti-P_{2b} sera from mice and rabbits immunized with DNA plasmid encoding for P_{2b} protein, reacted strongly with GST-ORF2b fusion protein (Fig. 8). Unexpectedly, DNA-immunized rabbit sera failed to recognize native viral GP_{2a} and P_{2b} proteins in infected cells in RIPA and IIF tests. In contrast, the classical immunization of rabbits with fusion protein antigens yielded strong positive antisera against native viral proteins in RIPA (Figs. 3 and 6). The sequencing analysis did not reveal any alteration or mutation of ORF2a and ORF2b genes during PCR amplification and cloning procedures. A possible explanation for this failure of recognition could be a loss of some conformational properties when the proteins are individually expressed as in the case of EAV GP₅/M heterodimer [1, 2]. These data may suggest that conformational epitopes may be masked or not well presented to the immune system of rabbits.

In contrast to rabbits, DNA-immunized mice produced monospecific anti-GP_{2a} and anti-P_{2b} sera (Table 4), and then were used to produce MABs. Most of MABs were of the IgM isotype, which seems to be a normal consequence of DNA immunization [40, 41]. These MABs reacted efficiently with native viral and fusion proteins (Table 5).

However, their reactivity was different, suggesting that they were directed to different epitopes on both proteins or had different avidities.

The reactivity of anti-GST-ORF2a and anti-GST-ORF2b protein sera and MAbs directed to native viral proteins suggested that these two proteins have linear epitopes as also reported by others [34]. Thus, at least one linear epitope that does not depend on post-translational modifications is expressed in procaryotic and eucaryotic cells, although the conformational epitopes cannot be excluded.

In our experimental conditions, all tested antisera and MAbs directed to GP_{2a} and P_{2b} failed to neutralize viral replication. However, the antisera and MAbs tested in the VN assay were obtained from animals immunized with individually expressed GST-ORF2a or GST-ORF2b fusion protein or DNA plasmids encoding separately ORF2a or ORF2b gene products. Therefore neutralization associated to epitopes generated by protein-protein complexes as reported in EAV [1, 2] remains to be studied.

In the present work, monospecific antisera raised against *E. coli* expressed ORF2a and ORF2b gene products and MAbs directed to GP_{2a} and P_{2b} were used to investigate protein-protein interactions in PRRSV infected MARC-145 cells and in semi-purified virions. RIPA experiments showed that proteins with M_r of 29-30 kDa and 8 kDa corresponding to GP_{2a} and P_{2b} respectively could be immunoprecipitated following incubation with monospecific anti-GST-ORF2a and anti-GST-ORF2b rabbit antisera and MAbs (Figs. 3 and 6). Our finding suggest that different forms of ORF2b gene products are expressed. Heterogeneity of ORF2b gene products has been previously reported in PRRSV [55] or in EAV infected cells [45] and may be the result of P_{2b} degradation. However, analysis of the ORF2b gene sequence of IAF-Klop strain of PRRSV [19] showed in the same reading frame, the presence of a second AUG start codon at the ninth position from the adenine of first ORF2b start codon that could initiate the translation of a smaller P_{2b} protein product [21]. This may explain the fact that two forms of the P_{2b} protein were immunoprecipitated by the same antibody.

Incubation of infected cell lysates with anti-GST-ORF2a rabbit serum seemed to show the presence not only of GP_{2a} but also of P_{2b} and of N proteins. Interestingly, the same three proteins were also precipitated by anti-GST-ORF2b rabbit serum (Fig. 7) and anti-P_{2b} MAbs (Fig. 10C). The co-precipitation of GP_{2a}, P_{2b} and N proteins was unexpected, the presence of N protein may be explained by its possible non-specific link to protein A [48]. Futhermore, after using an anti-GST-N monospecific serum, the GP_{2a}

and P_{2b} proteins were also precipitated together with N protein (Fig. 10 A, B). Such interactions between PRRSV structural proteins (GP₅/M, GP₃/GP₄, N/N) have been reported by others [18, 27, 54]. In our experiments, monospecific sera directed to GP₅ or M protein did not co-precipitate GP_{2a}/P_{2b}/N complex but precipitated the well-known heterodimer (GP₅/M) that was detected by SDS-PAGE (Fig. 10 A, B, lanes 3 and 5 respectively). In addition, anti-GST-ORF3 or anti-GST-ORF4 serum also failed to co-precipitate GP_{2a}/P_{2b}/N complex but their mutual interaction (GP₃ vs GP₄) has been observed (Fig. 10D, lanes 2 and 4).

Interaction between N protein and PRRSV envelope proteins had not been previously reported. However, a recent analysis of the PRRSV N protein structure by crystallography indicated that N protein exists as a tight dimer forming a four-stranded β sheet floor superposed by two long α helices and flanked by two N- and two C- terminal α helices; this suggested that the latter helices would be on the surface of the nucleocapsid and that they would likely interact with the cytoplasmic parts of envelope proteins [11]. Ropp and co-workers [42] suggested that the difference in reactivities between conserved nucleocapsids and the large anti-N MAb panel may be due to an as-yet-uncharacterized interaction of nucleocapsid with another viral protein or viral RNA.

The P_{2b} protein in all *Arteriviruses* contains a conserved potential N-myristoylation site that may facilitate protein-protein interactions by the sequestration of the myristate group as reported in other viral models such as the human immunodeficiency virus and the poliovirus [4, 32, 59].

The co-immunoprecipitation of GP_{2a}, P_{2b} and N proteins did not modify electrophoretic mobilities of GP_{2a} and P_{2b} proteins, indicating that these interactions are non-covalent. However, as illustrated in Fig. 10 (A and C), the N/N dimer band was still seen in samples treated under reducing conditions in the presence of 50 mM DTT. This band may be attributed to an homodimeric form of N protein that could not be completely reduced due to the large amounts of radiolabeled proteins that were used in order to visualize the small quantities of P_{2b} protein. This was also observed in a previous study where after a treatment of extracellular PRRS virions with a high concentration of β -mercaptoethanol (10% or 142 mM), visible amounts of dimeric N complex were detected (Fig. 2) [54].

In the present work, we have demonstrated the expression of recombinant GP_{2a} and P_{2b} proteins in procaryotic and eucaryotic systems that resulted in the production of

monospecific sera and MAbs. These immunological tools allowed the observation of the probable protein interaction between GP_{2a}, P_{2b} and N proteins of PRRSV. The presence of these interactions remain to be confirmed.

Acknowledgements

This research project was sponsored by NSERC of Canada strategic grant # STPGP 234733-00 and Biovet Inc.

This report forms part of a dissertation to be submitted by B.Ontsouka to the INRS-Institut Armand-Frappier in partial fulfillment of the requirements of the M.Sc. degree.

We thank Drs. V. von Messling and E. Potworowski for critically reading the manuscript.

References

1. Balasuriya UB, Heidner HW, Hedges JF, Williams JC, Davis NL, Johnston RE, MacLachlan NJ (2000) Expression of the two major envelope proteins of equine arteritis virus as a heterodimer is necessary for induction of neutralizing antibodies in mice immunized with recombinant Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J Virol* 74: 10623-30
2. Balasuriya UB, Heidner HW, Davis NL, Wagner HM, Hullinger PJ, Hedges JF, Williams JC, Johnston RE, David Wilson W, Liu IK, James MacLachlan N (2002) Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine* 20: 1609-17
3. Bautista EM, Suarez P, Molitor TW (1999) T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 144: 117-34
4. Bouamr F, Scarlata S, Carter C (2003) Role of myristylation in HIV-1 Gag assembly. *Biochemistry* 42: 6408-17
5. Cheikh Saad Bouh K, Shareck F, Dea S (2003) Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 459-68
6. Conzelmann KK, Visser N, Van Woensel P, Thiel HJ (1993) Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 193: 329-39
7. de Vries AA, Raamsman MJ, van Dijk HA, Horzinek MC, Rottier PJ (1995) The small envelope glycoprotein (Gs) of equine arteritis virus folds into three distinct monomers and a disulfide-linked dimer. *J Virol* 69: 3441-8
8. Dea S, Tijssen P (1989) Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 70 (Pt 7): 1725-41
9. Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D (2000a) Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory

- syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* 145: 659-88
10. Dea S, Wilson L, Therrien D, Cornaglia E (2000b) Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli*-expressed nucleocapsid protein as antigen. *J Virol Methods* 87: 109-22
 11. Doan DN, Dokland T (2003) Structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Structure (Camb)* 11: 1445-51
 12. Durocher Y, Perret S, Kamen A (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* 30: E9
 13. Faaberg KS, Even C, Palmer GA, Plagemann PG (1995) Disulfide bonds between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for viral infectivity. *J Virol* 69: 613-7
 14. Faaberg KS, Plagemann PG (1997) ORF 3 of lactate dehydrogenase-elevating virus encodes a soluble, nonstructural, highly glycosylated, and antigenic protein. *Virology* 227: 245-51
 15. Frangioni JV, Neel BG (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210: 179-87
 16. Frorath B, Abney CC, Berthold H, Scanarini M, Northemann W (1992) Production of recombinant rat interleukin-6 in *Escherichia coli* using a novel highly efficient expression vector pGEX-3T. *Biotechniques* 12: 558-63
 17. Gonin P, Gagnon CA, Massie B, Dea S (1997) Procaryotic and Eucaryotic expression of ORFs 2 to 4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), abstr.VM5. In: 47th Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists 1997, Université Laval, Quebec city, Quebec, Canada. Canadian society of microbiologists, p.86.
 18. Gonin P, Mardassi H, Gagnon CA, Massie B, Dea S (1998) A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 143: 1927-40

19. Gonin P, Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S (1999) Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest* 11: 20-6
20. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 18: 927-74
21. Kozak M (1995) Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2662-6
22. Kwang J, Zuckermann F, Ross G, Yang S, Osorio F, Liu W, Low S (1999) Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res Vet Sci* 67: 199-201
23. Lemieux P, Guerin N, Paradis G, Proulx R, Chistyakova L, Kabanov A, Alakhov V (2000) A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 7: 986-91
24. Loemba HD, Mounir S, Mardassi H, Archambault D, Dea S (1996) Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 141: 751-61
25. Mardassi H, Athanassious R, Mounir S, Dea S (1994) 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. *Can J Vet Res* 58: 55-64
26. Mardassi H, Mounir S, Dea S (1995) Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Arch Virol* 140: 1405-18
27. Mardassi H, Massie B, Dea S (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
28. Mardassi H, Gonin P, Gagnon CA, Massie B, Dea S (1998) A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J Virol* 72: 6298-306

29. Meulenbergh JJ, Petersen-den Besten A, De Kluyver EP, Moormann RJ, Schaaper WM, Wensvoort G (1995) Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206: 155-63
30. Meulenbergh JJ, Petersen-den Besten A (1996) Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particles. *Virology* 225: 44-51
31. Meulenbergh JJ (2000) PRRSV, the virus. *Vet Res* 31: 11-21
32. Moscufo N, Chow M (1992) Myristate-protein interactions in poliovirus: interactions of VP4 threonine 28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions. *J Virol* 66: 6849-57
33. Mounir S, Mardassi H, Dea S (1995) Identification and characterization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 7, 5 and 4 products. *Adv Exp Med Biol* 380: 317-323
34. Oleksiewicz MB, Botner A, Normann P (2002) Porcine B-cells recognize epitopes that are conserved between the structural proteins of American- and European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 83: 1407-18
35. Pereyginina L, Patrusheva I, Zurkühlen H, Hilliard JK (2002) Characterization of B virus glycoprotein antibodies induced by DNA immunization. *Arch Virol* 147: 2057-73
36. Pirzadeh B, Dea S (1997) Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* 78 (Pt 8): 1867-73
37. Pirzadeh B, Dea S (1998) Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 79 (Pt 5): 989-99
38. Plagemann PG (2001) An ORF-2a protein is not present at a significant level in virions of the arterivirus lactate dehydrogenase-elevating virus. *Virus Res* 74: 47-52
39. Plana Duran J, Climent I, Sarraseca J, Urniza A, Cortes E, Vela C, Casal JI (1997) Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes* 14: 19-29

40. Pupa SM, Forti S, Invernizzi AM, Giovanazzi R, Twal WO, Argraves WS, Menard S (2003) Monoclonal antibody to fibulin-1 generated by genetic immunization. *J Cell Biochem* 89: 647-52
41. Puttikhunt C, Kasinrerak W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moonsom S, Sittisombut N, Malasit P (2003) Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods* 109: 55-61
42. Ropp SL, Wees CE, Fang Y, Nelson EA, Rossow KD, Bien M, Arndt B, Preszler S, Steen P, Christopher-Hennings J, Collins JE, Benfield DA, Faaberg KS (2004) Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J Virol* 78: 3684-703
43. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
44. Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-79
45. Snijder EJ, van Tol H, Pedersen KW, Raamsman MJ, de Vries AA (1999) Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J Virol* 73: 6335-45
46. Snijder EJ, Dobbe JC, Spaan WJ (2003) Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *J Virol* 77: 97-104
47. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 60-89
48. van Berlo MF, Zeegers JJ, Horzinek MC, van der Zeijst BA (1983) Antigenic comparison of equine arteritis virus (EAV) and lactic dehydrogenase virus (LDV); binding of staphylococcal protein A to the nucleocapsid protein of EAV. *Zentralbl Veterinarmed B* 30: 297-304
49. van Nieuwstadt AP, Meulenberg JJ, van Essen-Zanbergen A, Petersen-den Besten A, Bende RJ, Moormann RJ, Wensvoort G (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: 4767-72
50. Verheije MH, Kroese MV, van der Linden IF, de Boer-Luijtz EA, van Rijn PA, Pol JM, Meulenberg JJ, Steverink PJ (2003) Safety and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome recombinant virus vaccines in young pigs. *Vaccine* 21: 2556-63

51. Weiland E, Wiczorek-Krohmer M, Kohl D, Conzelmann KK, Weiland F (1999) Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol* 66: 171-86
52. Wieringa R, de Vries AA, Rottier PJ (2003a) Formation of disulfide-linked complexes between the three minor envelope glycoproteins (GP2b, GP3, and GP4) of equine arteritis virus. *J Virol* 77: 6216-26
53. Wieringa R, De Vries AA, Post SM, Rottier PJ (2003b) Intra- and intermolecular disulfide bonds of the GP2b glycoprotein of equine arteritis virus: relevance for virus assembly and infectivity. *J Virol* 77: 12996-3004
54. Wootton SK, Yoo D (2003) Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *J Virol* 77: 4546-57
55. Wu WH, Fang Y, Farwell R, Steffen-Bien M, Rowland RR, Christopher-Hennings J, Nelson EA (2001) A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287: 183-91
56. Yang L, Frey ML, Yoon KJ, Zimmerman JJ, Platt KB (2000) Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch Virol* 145: 1599-619
57. Yoon IJ, Joo HS, Goyal SM, Molitor TW (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: 289-92
58. Yoon KJ, Zimmerman JJ, Swenson SL, McGinley MJ, Eernisse KA, Brevik A, Rhinehart LL, Frey ML, Hill HT, Platt KB (1995) Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest* 7: 305-12
59. Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD (1994) Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol* 68: 2556-69

Figure 5 : Profil électrophorétique des protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b et leur réactivité avec un sérum hyperimmun anti-PRRSV de porc

Fig. 5. Procaryotic expression of PRRSV GP_{2a} and P_{2b} recombinant fusion proteins.

Panel A : *E. coli* bacterial cell lysates were run on 12 % SDS-PAGE after induction with 0.2 mM IPTG at 37°C for 3 h. Lane 1: Crude extract of induced pGEX-4-T-1 transformed bacterial cells; Lane 2: non-induced pGEX-ORF2b transformed bacterial cells; Lane 3: induced pGEX-ORF2a transformed BL21(DE3)pLysS cells; Lane 4: induced pGEX-ORF2b transformed BL21(DE3) Lane 5: Urea-treated and electroeluted purified; GST-ORF2a fusion protein and Lane 6: GST-ORF2b fusion protein.

Panel B : Reactivity of anti-PRRSV hyperimmune pig serum to GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins by WB. Lanes 1-6 correspond to the same samples as in panel A.

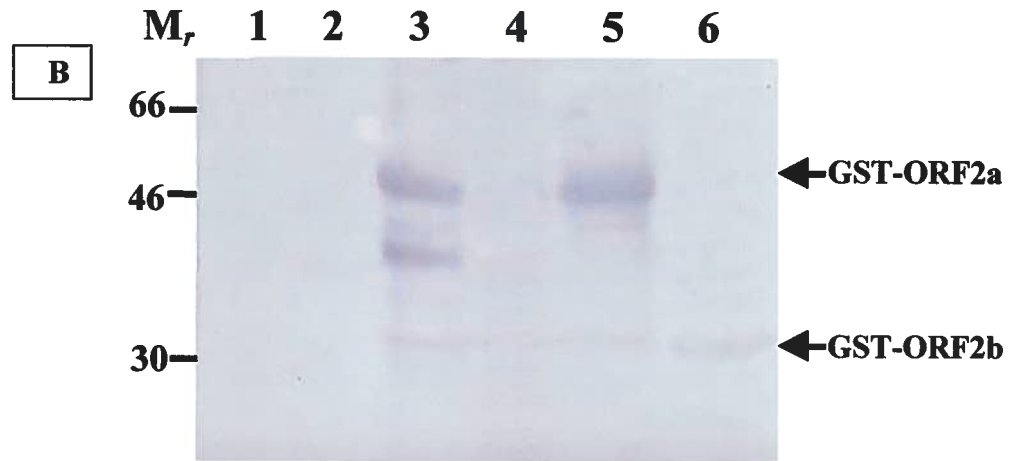
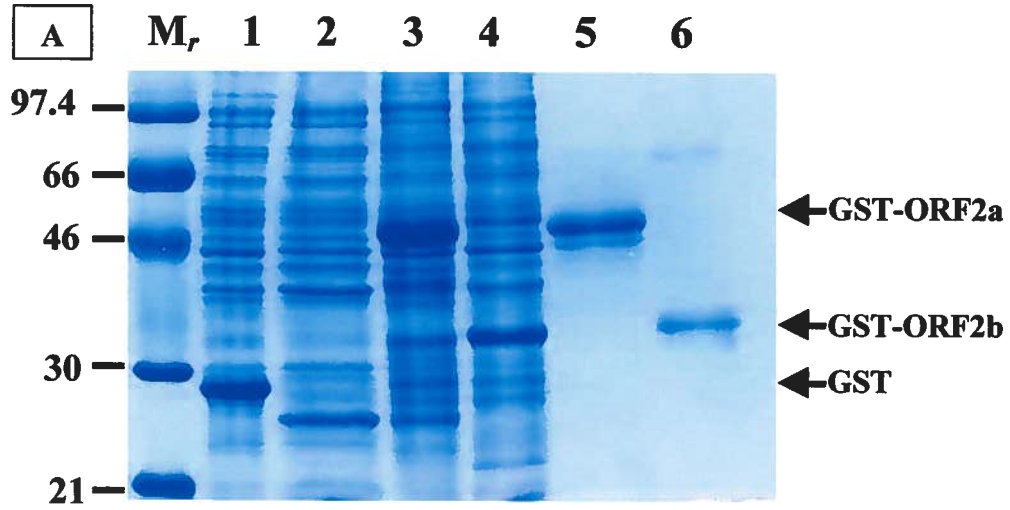


Figure 6 : Cinétique d'apparition des anticorps anti-GP_{2a} et anti-P_{2b} chez les porcs expérimentalement infectés par la souche IAF-Klop du VSSRP

Fig. 6. Kinetics of pig humoral immune response to PRRSV GP_{2a} and P_{2b} proteins detected by Western blotting.

A pool of three sera from experimentally infected pigs # 8979, 8983 and 8984 [24] were collected at various days post-infection (dpi) (0-63 days period) as indicated and tested against electroeluted GST-ORF2a (A) and GST-ORF2b (B) fusion proteins and purified-GST control antigen (C). Anti-PRRSV hyperimmune (P +), pre-immune (P -) pig sera, anti-GST monospecific hyperimmune (M +) and preimmune (M -) mice sera were used as reference sera to GP_{2a} and to visualize GST protein position respectively. Sample sera were diluted 1:20 in TBS-SM. However, pig and mouse hyperimmune sera were diluted 1:100 in TBS-SM.

The arrows indicate GST-ORF2a (◄—), GST-ORF2b (←) and GST (►) protein positions. Molecular weight (kDa) markers are also indicated.

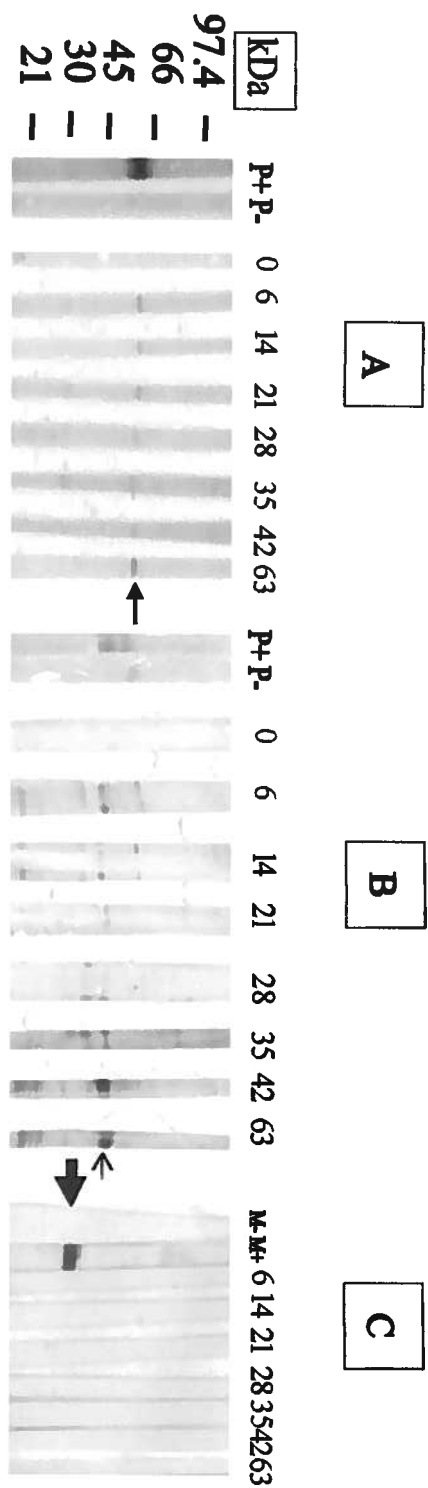


Figure 7 : Réactivité des sérums hyperimmuns anti-GST-ORF2a et anti-GST-ORF2b de lapins avec les protéines virales natives

Fig.7. Reactivity of anti-GST-ORF2a and anti-ORF2b rabbit sera with native PRRSV viral proteins detected by RIPA.

PRRSV-infected (lanes 1, 3, 5 and 7) and mock infected (lanes 2, 4 and 6) and [³⁵S]-methionine radiolabeled MARC-145 cell lysates were incubated in the presence of anti-GST-ORF2a (lanes 1, 2), and anti-GST-ORF2b (lanes 3, 4) monospecific rabbit sera and anti-PRRSV (IAF-Klop strain) hyperimmune pig serum (lanes 5, 6 and 7). Immune complexes were precipitated with protein A-Sepharose beads and analyzed in Tris-tricine SDS-PAGE. Sample in lane 7 is the same sample in lane 5 but originated from a separate gel and was exposed during 72 h (rather than 6 days) to visualize clearly PRRSV structural proteins. Black arrows indicate the positions of visible proteins.

Low range ¹⁴C-radiolabeled protein markers (Amersham Biosciences) (*M_r*) are shown on the left (kDA).

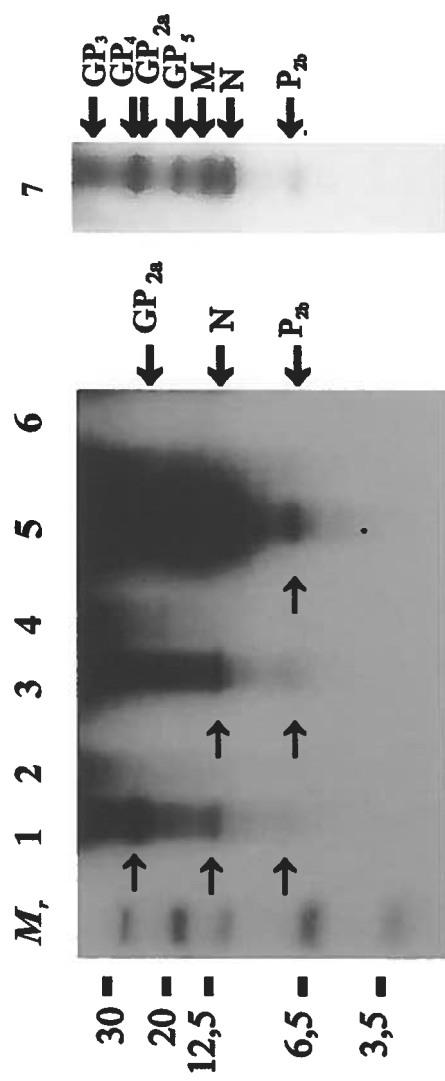


Figure 8 : Test d'immunobuvardage de type Western blot. Réactivité des protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b avec des sérums hyperimmuns et des anticorps monoclonaux (AcMo) obtenus par immunisation génétique

Fig. 8. Western blot analysis of the reactivity of PRRSV GP_{2a} and/or P_{2b} to specific MAbs and monospecific mice and rabbit antisera developed after DNA immunization with pRc-ORF2a and pRc-ORF2b recombinant plasmids.

An amount of 2 µg of electroeluted GST-ORF2b (lanes 1-6), and GST-ORF2a (lanes 7-8) were loaded into each well of a 12 % SDS-PAGE slab and electrotransferred onto a nitrocellulose membrane.

Rabbit (lane 1) and mouse (lane 3) anti-P_{2b} monospecific sera collected after the fourth booster immunization or pre-immune sera of the same animals (lanes 2 and 4; respectively) were used at a dilution of 1:100. MAbs 1G6 (lane 5) and 16C8 (lane 7) media supernatants directed to P_{2b} and GP_{2a}; respectively (see Table 5) or supernatant from non-secreting hybridomas were used undiluted (lanes 6 and 8). Bound antibodies were detected with peroxidase-conjugated anti-rabbit (lanes 1-2) or anti-mouse (lanes 3-8) IgG diluted 1:2000 (ICN Biochemicals) and 4-chloro-1-naphthol as enzymatic substrate. Molecular mass markers are indicated in kDa on the left.

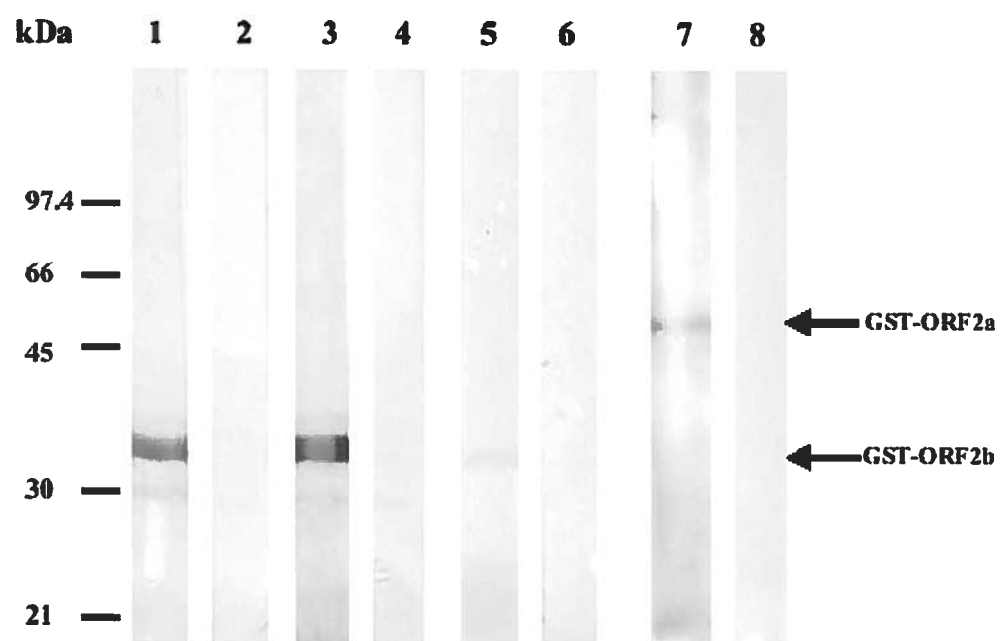


Figure 9 : Test d'immunofluorescence indirecte sur un feuillet de cellules MARC-145 infectées par la souche IAF-Klop du VSRRP. Réactivité des AcMo anti-GP_{2a} et anti-P_{2b}

Fig. 9. IIF assay showing immunoreactivity of anti-GP_{2a} and anti-P_{2b} MAbs compared to anti-PRRSV (IAF-Klop strain) hyperimmune pig serum in PRRSV infected MARC-145 cells.

PRRSV infected (A, C, E, F and H) and Mock-infected (B, D and G) MARC-145 cells were incubated with neat supernatant of anti-P_{2b} MAb 1E10 (A and B), anti-GP_{2a} MAb 16C8 (C and D), and medium supernatant of non-secreting hybridoma as negative control MAb (E) and as positive control antibody with a dilution of 1:100 of anti-PRRSV (IAF-Klop strain) hyperimmune pig serum (F and G) and normal pig serum (H). FITC-conjugated -anti-mouse (A-E) and -anti-porcine (H-G) IgG were used at a dilution of 1:100.

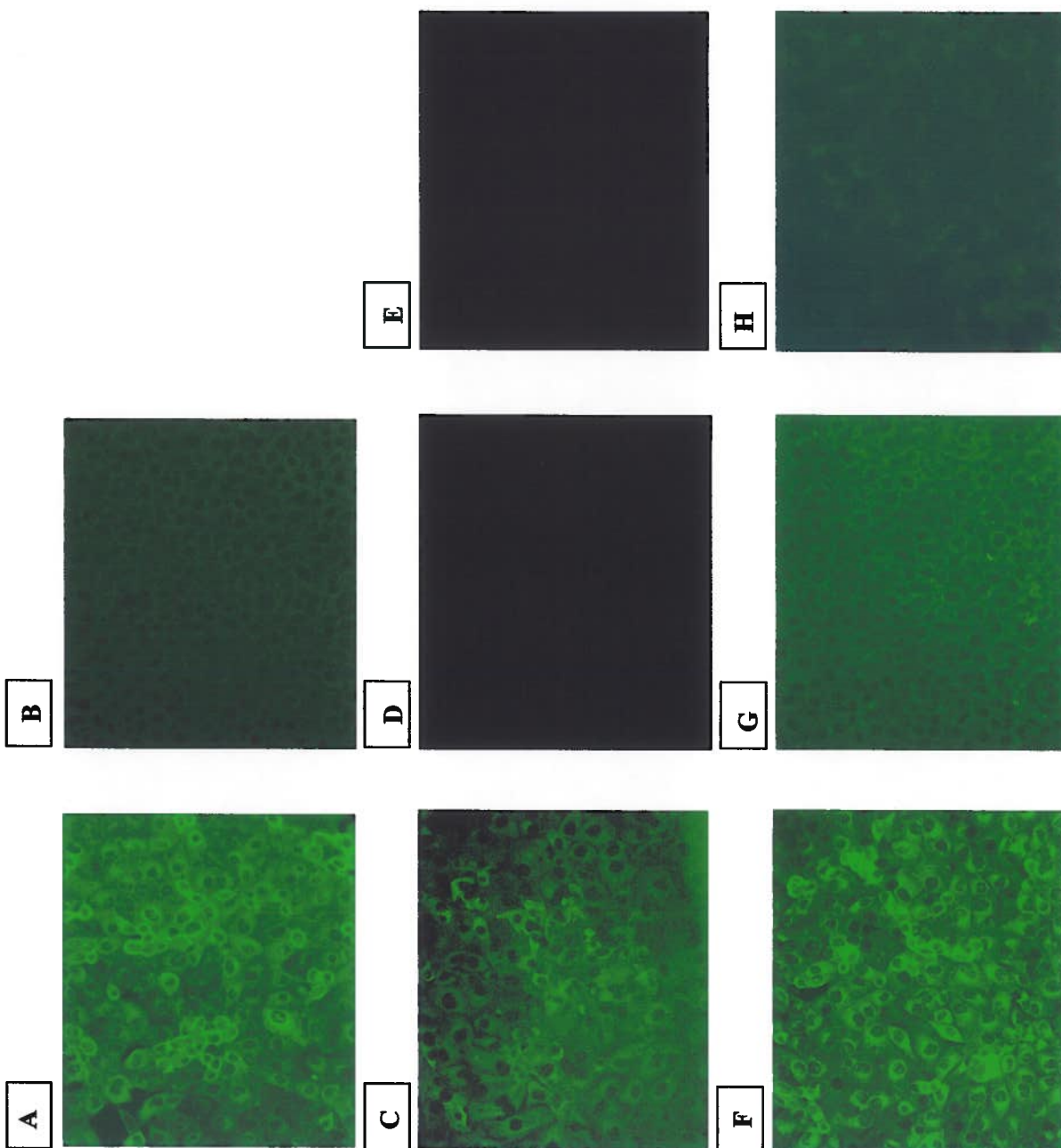


Figure 10 : Co-immunoprécipitation du complexe de protéines GP_{2a}, P_{2b} et N de la souche IAF-Klop du VSRRP détectée par le test de RIPA

Fig. 10. Co-immunoprecipitation of a complex of GP_{2a}, P_{2b}, and N proteins of IAF-Klop strain of PRRSV detected by RIPA.

[³⁵S] methionine radiolabeled cell lysates from PRRSV-infected MARC-145 cells were subjected to a double immunoprecipitation procedure. In a first immunoprecipitation step of antibody incubation (1st IP-Ab), cell lysates were incubated with anti-GST-ORF2a (lane 1); anti-GST-ORF5 (lane 3); anti-GST-ORF6 (lane 5); or anti-GST-ORF7 (lanes 7 and 7') monospecific rabbit sera or without serum to allow adsorption to protein A-Sepharose beads alone (lane 9). In a second immunoprecipitation step of antibody incubation (2nd IP-Ab), supernatants from the first step as well as from infected cell lysates (lane 10) were then incubated with anti-PRRSV hyperimmune pig serum (lanes 2, 4, 6, 8 and 10). Immune complexes were solubilized in sample buffer in the presence (panel A) or absence (panel B) of 50 mM DTT and analyzed in 16,5% Tris-tricine SDS-PAGE. Sample in lane 7' is the same sample in Fig. 10A lane 7 but originated from a separate gel and was exposed during 96 h to visualize the GP_{2a} and the remaining 2N proteins.

Panel C : Simple RIPA showing the co-immunoprecipitation of GP_{2a}, P_{2b} and N proteins from semi-purified PRRSV by using two anti-P_{2b} MAbs, 1G6 (lane 1) and 4F7 (lane 2). Immune complexes were solubilized in sample buffer containing 50 mM DTT and analyzed in 16,5% Tris-tricine SDS-PAGE.

The positions of GP_{2a}, P_{2b} and N proteins are indicated.

Panel D : Simple RIPA showing the co-immunoprecipitation of GP₃ and GP₄ proteins from PRRSV infected (lanes 2 and 4) or mock infected (lanes 1 and 3) MARC-145 cells by using anti-GST-ORF4 monospecific serum (lanes 1 and 2) and anti-GST-ORF3 monospecific serum (lanes 3 and 4). The positions of GP₃ and GP₄ proteins are indicated. In Fig. 10A, white arrows indicate the positions of GP_{2a} and remaining 2N and the black arrow indicates the visible GP_{2a}. In Fig. 10B, white arrows indicate the protein position of GP_{2a} and 2N.

⁴C radiolabeled protein markers 30 to 2.5 kDa mix (*M_{r1}*) and 220 to 14.3 kDa mix (*M_{r2}*) (Amersham Biosciences) are shown.

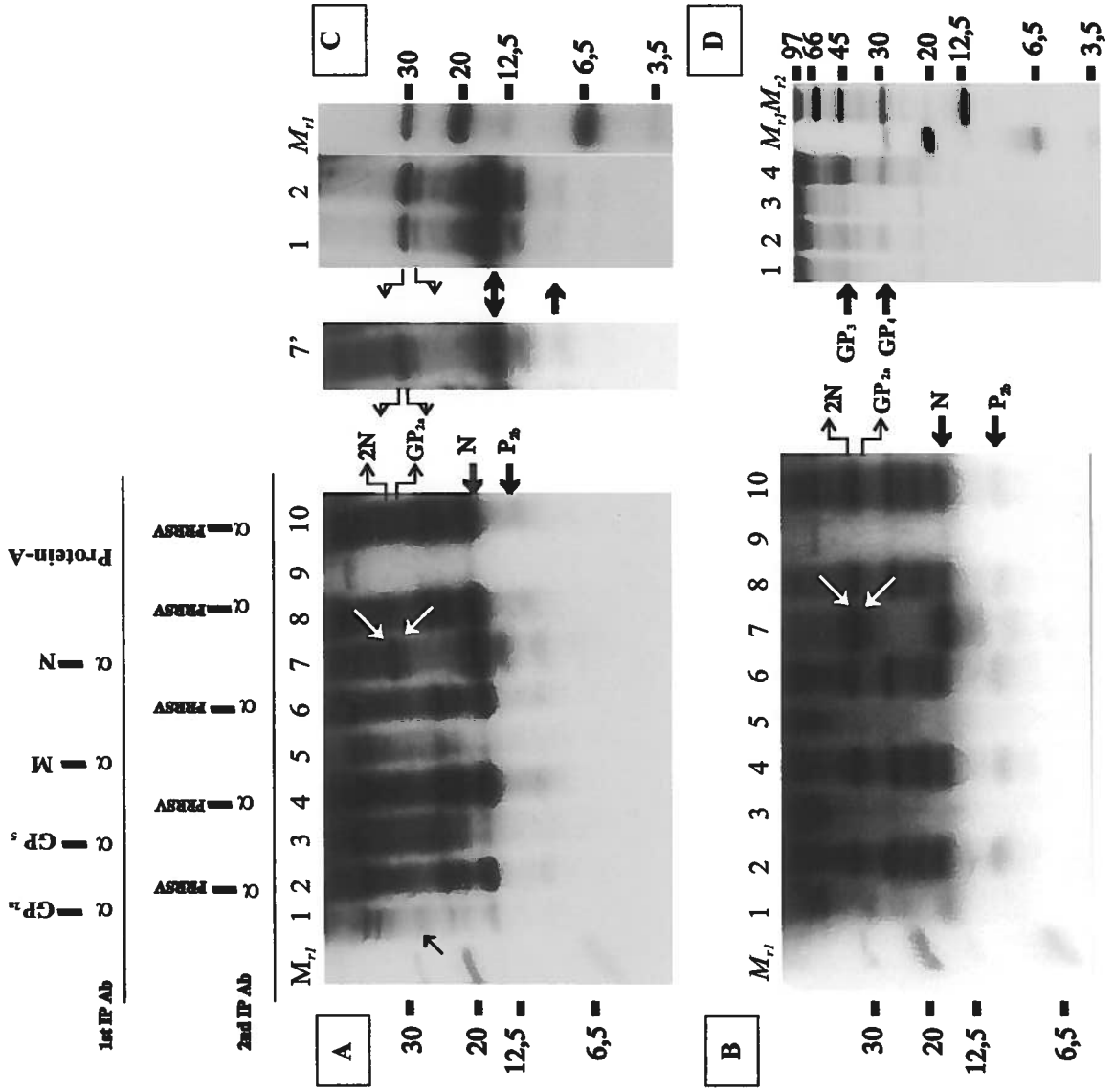


Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par RT-PCR

Table.3. Sequences of the oligonucleotide primers used for RT-PCR

Vector destination	Specificity	Primer designation	Polarity	Sequence (5'to') ¹
pGEX-4T-1	ORF2a	PG2aS	+	<u>ggatccggatccATGAAATGCGGTCTATGC</u>
		PG2aAs	-	<u>gaatccgaatccTCAGtggtggtggtggtggtgCCGGG</u> <u>AGTTCGAAGG</u>
	ORF2b	PG2bS	+	<u>ggatccggatccGGATCCgcccggccATGGGGT</u> <u>CTATGCAAAGC</u>
		PG2bAs	-	<u>GaattcgaattcTCAGtggtggtggtggtggtgTAGGA</u> <u>TCTTCTGTAA</u>
pRc/CMV2	ORF2a	PR2aS	+	<u>gcccggcgcccggcgcccggccATGAAATGGG</u> <u>GTCTATGCAAAG</u>
		PR2aAs	-	<u>TctagatctagaTCAGtggtggtggtggtggtgCCGGG</u> <u>AGTTCGAAGGAAAAATTGCCCC</u>
	ORF2b	PR2bS	+	<u>gcccggcgcccggcgcccggccATGGGGTCTA</u> <u>TGCAAAGCCTT</u>
		PR2bAs	-	<u>TctagatctagaTCAGtggtggtggtggtggtgTAGGA</u> <u>TCTTCTGTAATTGCTC</u>
pCEP-5h	ORF2a	PC2aS	+	<u>catcaccatcaccatcacggtgacgatgacgataaggatAT</u> <u>GAAATGGGGTCTATGCAAAG</u>
		PC2aAs	-	<u>CgaggatccgcccggatccgctCACCGGGAGT</u> <u>TCGAAGGAAAAATTGCCCC</u>
	ORF2b	PC2bS	+	<u>catcaccatcaccatcacggtgacgatgacgataaggatAT</u> <u>GGGGTCTATGCAAAGCCTT</u>
		PC2bAs	-	<u>cgaggatccgcccggatccgctCATAGGATCT</u> <u>TCTGTAATTGCTC</u>
		PC2S ²	+	<u>cgaggatccgcccggatccgctATGGGGGGTTC</u> <u>catcaccatcaccatcacg</u>

¹Lower case residues indicate restriction sites (see Materials and Methods); underlined capital residues indicate ORF2a and ORF2b specific sequences; double-underlined residues indicate gcc repeats Kozak motif
 Bold italicized residues indicate enterokinase motif downstream His-Tag sequence; Bold residues indicate 6 mers-Histidine tag sequence.

²Primer PC2S was used in a second round of PCR amplification in order to extend and introduce *Bam*H1 insertion site at the 5'end of both genes in pCEP-5h vector.

Tableau 4 : Réponse immune anti-GP_{2a} et anti-P_{2b} des lapins et souris suite à l'immunisation avec les plasmides recombinants codant pour les gènes de l'ORF2a et l'ORF2b du VSRRP et avec les protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b

Table 4. Anti-PRRSV GP_{2a} and P_{2b} immune response of rabbits and mice after immunization of animals with recombinant plasmids encoding for the ORF2a and ORF2b genes of PRRSV and with recombinant GST-ORF2a and GST-ORF2b fusion proteins.

Animal	Antigen ¹	Route of inoculation ²	dose ³ (µg)	Serological tests				
				ELISA	WB	IIF	RIPA	VN
Mice	pRc-ORF2a	IM	25	+/- ⁷	+/-	+/-	nd ⁴	nd
	pRc-ORF2b	IM	25	+ ⁵	+	+	+	nd
	pRc-CMV2	IM	25	- ⁶	-	nd	nd	nd
	GST-ORF2a	SC	20	+	+	+	nd	-
	GST-ORF2b	SC	20	+	+	+	nd	-
Rabbits	pRc-ORF2a	IM	200	-	+/-	-	-	-
	pRc-ORF2b	IM	200	+	+	-	-	-
	pRc/CMV2	IM	200	-	-	nd	nd	-
	GST-ORF2a	SC	50	+	+	+	+	-
	GST-ORF2b	SC	50	+	+	+	+	-

¹ The plasmids were suspended in PBS and mixed with 0.01% SP1017 poloxamer carrier but recombinant proteins were emulsified in complete Freund's adjuvant for the first immunization and the boosting doses were prepared with incomplete Freund's adjuvant.

² IM, intramuscular; SC, subcutaneous.

³ Animals were boosted four times at three-week intervals

⁴ nd, not determined

⁵ indicate a detectable positive reactivity (+)

⁶ indicate undetectable or negative (-) reactivity

⁷ indicate a weakly detectable reactivity (+/-)

WB and ELISA were performed with electroeluted GST-ORF2a and GST-ORF2b proteins as antigens, whereas VN, IIF and RIPA tests were performed with PRRSV infected MARC-145 cells. All tests were done as described in material and methods.

Tableau 5 : Caractéristiques des anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre les protéines GP_{2a} et P_{2b} de la souche IAF-Klop du VSRRP obtenus après immunisation génétique des souris avec les plasmides recombinats pRc-ORF2a et pRc-ORF2b

Table 5. Characteristics of MAbs directed against GP_{2a} and P_{2b} proteins of IAF-Klop strain of PRRSV raised after DNA immunization of Balb/c mice with pRc-ORF2a and pRc-ORF2b plasmids.

MAb designation	Immunoglobulin isotypes	MAb Reactivity ^a				
		WB	ELISA	VN	IIF	RIPA
<u>pRc-ORF2a</u>						
16C3	IgM	++ ^b	++	-	+	+
16C8	IgM	+++	++	-	++	+
17D11	IgM	- ^c	+++	-	+	nd
<u>pRc-ORF2b</u>						
1E10	IgM	-	+	nd ^d	+++	nd
1G6	IgG2b	+	+	-	++	++
3H10	IgM	++	++	-	+++	nd
4F7	IgM	-	+	nd	+++	++
5E9	IgM	+	++	nd	+	+
5G9	IgM	+	+	nd	++	nd

^a ELISA plates were coated with 100 ng/well of electroeluted GST-ORF2a or GST-ORF2b. WB and ELISA were performed with electroeluted GST-ORF2a and GST-ORF2b proteins as antigens, whereas VN, IIF and RIPA tests were performed with PRRSV infected MARC-145 cells. All tests were done as described in material and methods.

^b indicate a detectable positive reactivity intensity (+ low, ++ middle, +++ high); ^c indicate undetectable or negative (-) reactivity; ^d reactivity was not determined (nd).

Figure 11 : Expression transitoire de l'ORF2a et ORF2b du VSRRP dans les cellules HEK 293A révélée par immunofluorescence indirecte 72 heures après la transfection

Les cellules ont été transfectées avec les plasmides recombinants pCEP-ORF2a (A et D), pCEP-ORF2b (B) et le plasmide parental de contrôle pCEP-5h (C). Les échantillons sont incubés avec le sérum hyperimmun de porc anti-VSRRP (A, B et C) et sérum négatif de porc (D). Les complexes antigènes-anticorps ont été révélés par incubation avec un conjugué FITC anti-IgG de porc. La présence de la protéine est détectée dans les cellules fluorescentes. On y note l'accumulation de GP_{2a} et P_{2b} dans le cytoplasme et dans la région périnucléaire.

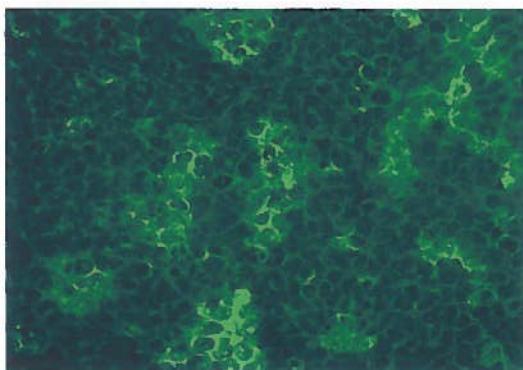
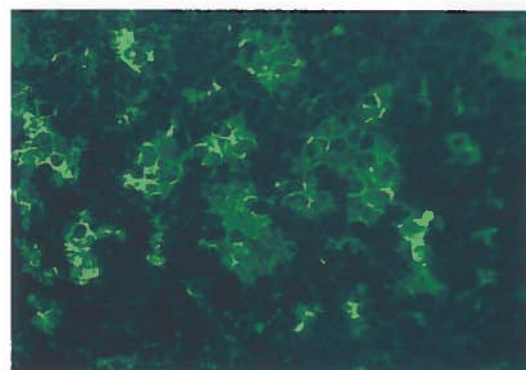
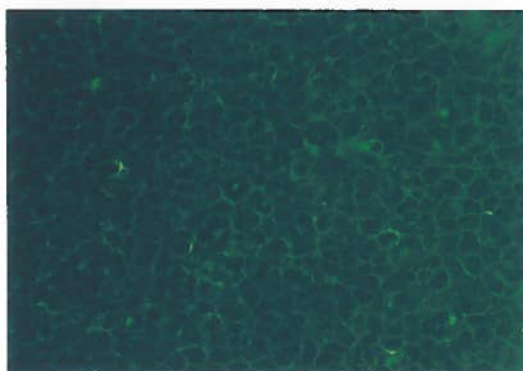
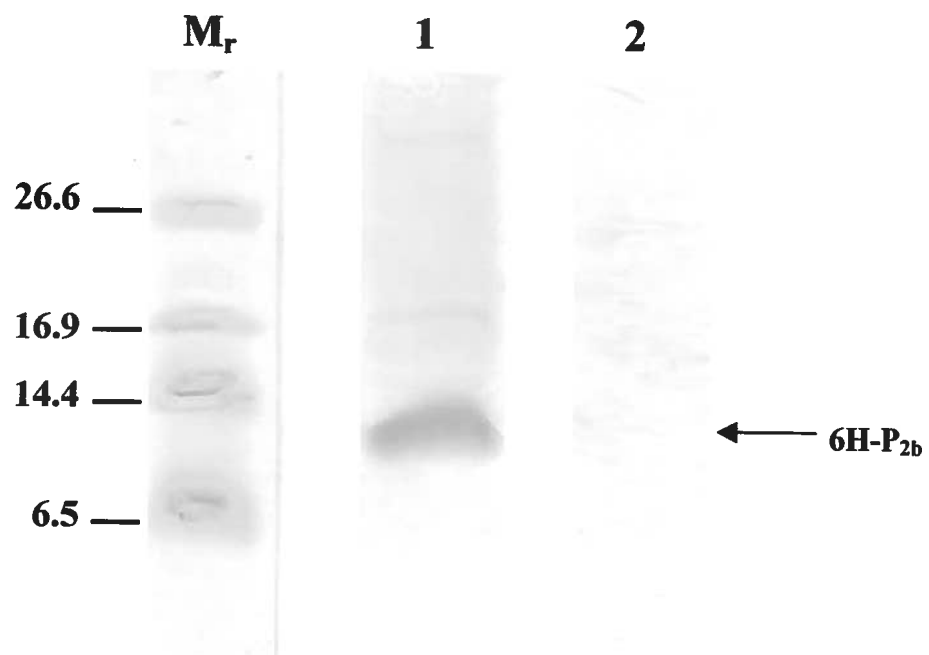
A**B****C****D**

Figure 12 : Expression eucaryotique du gène de l'ORF2b du VSRRP dans un feuillet de cellules HEK-293A transfectées avec le plasmide recombinant pCEP-ORF2b et révélée par test d'immunobuvardage de type Western blot

La protéine de fusion de l'ORF2b Histag-P_{2b} a été purifiée sur colone d'affinité HiTrap, séparée sur gel SDS-polyacrylamide Tris-tricine de 16.5 % et transférée sur membrane de nitrocellulose. Test d'immunobuvardage : La membrane a été incubée pour la première fois avec un sérum hyperimmun de porc anti-VSRRP (lanière 1) et un sérum négatif de porc (lanière 2) et une seconde fois avec une solution d'anti-IgG de porc couplée à la peroxidase. Le marqueur de poids moléculaire standards (M_r) de polypeptides (Bio-Rad) est indiqué à gauche.



3. Discussion générale

Dans l'étude du VSRRP, beaucoup d'informations ont été accumulées, notamment concernant l'organisation génomique et la réplication du VSRRP. Une percée importante a été réalisée dans l'étude des produits de différents ORFs de 3 à 7. Les propriétés des protéines majeures (GP₅, M et N) et mineures (GP₃ et GP₄) ont été déjà établies (Meulenberg *et al.*, 1995; Mardassi *et al.*, 1996; Gonin *et al.*, 1998; Dea *et al.*, 2000a). Quelques données fragmentaires sur les protéines de l'ORF2a et de l'ORF2b avaient été rapportées dans la littérature (Meng *et al.*, 1995b; Morozov *et al.*, 1995; Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996).

Chez le VSRRP, les protéines GP_{2a} et P_{2b} sont peu caractérisées. L'obstacle principal dans la caractérisation de ces deux protéines était la non disponibilité d'outils immunologiques. Notre étude fut entreprise dans le but de développer des outils pouvant permettre la caractérisation des produits de l'ORF2a et l'ORF2b du VSRRP. Dans le laboratoire du Dr Serge Dea, le gène de l'ORF2 (a et b) avait été cloné préalablement dans un vecteur d'expression procaryotique. L'étape cruciale de notre projet consistait tout d'abord à obtenir des protéines recombinantes de l'ORF2a et de l'ORF2b ainsi que des antisérums et AcMo dirigés contre ces deux protéines.

La réalisation de cet objectif a fourni des outils précieux pour l'étude de l'immunobiologie des protéines de l'ORF2a et de l'ORF2b du VSRRP. Dans un premier temps, on a procédé à l'expression procaryotique de l'ORF2a et l'ORF2b grâce au vecteur recombinant pGEX-ORF2a et pGEX-ORF2b. Les deux protéines s'exprimaient entièrement sous forme de corps d'inclusions. Ce phénomène semble être répandu lors de l'expression de plusieurs protéines de VSRRP dans différents systèmes (Plana Duran *et al.*, 1997a; Dea *et al.*, 2000b).

L'expression eucaryotique des deux protéines dans les cellules HEK-293A a été clairement établie en IFI avec les cellules transfectées en utilisant un sérum hyperimmun de porc anti-VSRRP (figure 11).

Par test d'immunobuvardage (IB) de type Western blot en présence du sérum hyperimmun de porc anti-VSRRP, le signal le plus fort était celui contre la protéine de l'ORF2b (figure 12). La protéine de l'ORF2a était faiblement détectée. Les mêmes résultats furent obtenus avec les AcMo dirigés contre la GP_{2a} et la P_{2b}. La faible détection de la protéine de l'ORF2a, la GP_{2a}, fut aussi rapportée par d'autres auteurs (Plana Duran *et al.*, 1997a; Bautista *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001) et peut s'expliquer par plusieurs raisons à savoir : 1) L'instabilité de cette protéine se traduisant par sa dégradation comme

dans le cas de l'EAV (de Vries *et al.*, 1995); 2) la variation des épitopes lors de l'expression individuelle des protéines en l'absence d'autres protéines virales comme il a été suggéré pour la GP₅ du EAV en l'absence de la protéine M (Balasuriya *et al.*, 2000); 3) l'inactivation des épitopes lors du traitement du lysat cellulaire ou de la dénaturation (Dea et Tijssen, 1989; Plagemann, 2001b). Une autre explication de la faible réactivité de la protéine GP_{2a} semble être liée à la faible traduction du gène de l'ORF2a en présence du gène de l'ORF2b. Les résultats de Wu *et al.* (2001) indiquent qu'en présence du gène de l'ORF2b situé complètement à l'intérieur de la séquence du gène de l'ORF2a, l'expression de la protéine de l'ORF2b est préférentielle. Les auteurs de cette étude montrèrent que l'abrogation du codon d'initiation du gène de l'ORF2b améliorerait l'expression de l'ORF2a.

L'identification sérologique de ces deux protéines (50 kDa pour GST-ORF2a et de 36 kDa pour la GST-ORF2b) (Bautista *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2001) fut confirmée par l'épreuve d'immunobuvardage de type Western blot en présence du sérum hyperimmun de porc infecté par la souche homologue du VSRRP. Ces résultats indiquent que ces deux protéines comportent des épitopes qui ne dépendent pas de modifications post-traductionnelles et au moins un de ces épitopes linéaires s'expriment sur les deux protéines comme l'ont rapporté d'autres investigateurs (Oleksiewicz *et al.*, 2002) dans le cas de la protéine de la GP_{2a}.

La réactivité du sérum hyperimmun du porc anti-VSRRP dirigée contre les protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b suggère une similarité antigénique avec les protéines virales natives et démontre que les protéines recombinantes sont antigéniques.

Étant donné que les informations sur la cinétique de production des anticorps anti-GP_{2a} et anti-P_{2b} chez les animaux infectés sont fragmentaires et peu documentées, nous avons utilisé les protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b afin d'évaluer l'apparition des anticorps spécifiques chez les porcs expérimentalement infectés. Les résultats de ces expériences montrent que les anticorps dirigés contre la GP_{2a} et la P_{2b} apparaissent dès le 6^{ième} jour p.i. et le signal reste stable jusqu'au 63^{ième} jour p.i.. Ces résultats indiquent que les anticorps contre les deux protéines structurales mineures, GP_{2a} et P_{2b}, apparaissent au même moment que ceux dirigés contre les protéines structurales majeures (M, N, GP₅) sans discrimination de type de protéines (mineures et majeures) (Loemba *et al.*, 1996; Cléroux, 2001). Nos résultats révèlent une précocité de

l'apparition des anticorps anti-GP_{2a} et anti-P_{2b} qui n'avait pas été rapportée auparavant dans la littérature. Les travaux antérieurs montrent plutôt une réponse tardive (entre le 21 et 56 jours p.i.) dirigée contre ces protéines chez les animaux expérimentalement infectés (Wu *et al.*, 2001; Oleksiewicz *et al.*, 2002).

Cependant les travaux du groupe de Oleksiewicz et co-auteurs (2002) n'ont pas testé les échantillons avant le 14^{ième} jour p.i. pour les anticorps dirigés contre la GP_{2a}. En ce qui concerne les anticorps dirigés contre la P_{2b}, les résultats obtenus suite aux expériences réalisées par Wu *et al.* (2001) révèlent la présence des anticorps entre le 18^{ième} et le 21^{ième} jour p.i. (Wu *et al.*, 2001), mais la haute dilution utilisée (1:100) pourrait expliquer l'absence de détection des anticorps au 6^{ième} jour p.i..

Dans une autre étude, les protéines recombinantes procaryotiques (GST-ORF2a et GST-ORF2b) ainsi que les vecteurs eucaryotiques recombinants pRc-ORF2a et pRc-ORF2b ont été utilisés pour immuniser les souris et lapins en vue d'obtenir des antisérums monospécifiques et des AcMo. L'immunisation conventionnelle des souris et lapins avec les protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b a permis d'obtenir des sérums monospécifiques anti-GST-ORF2a et anti-GST-ORF2b dont la spécificité fut confirmée dans un test de RIPA. Cependant les hybridomes de souris obtenus par cette approche d'immunisation en vue de produire des AcMo s'avèrent instables et les résultats n'ont pas été reproductibles d'une expérience à l'autre.

Il est connu que les protéines exprimées dans les cellules procaryotiques ne subissent pas les mêmes modifications post-traductionnelles qui ont lieu dans les cellules eucaryotiques. L'immunisation génétique peut être une stratégie alternative pouvant permettre d'obtenir des protéines ayant subi toutes les modifications post-traductionnelles appropriées. Ainsi, les sérums obtenus interagiraient spécifiquement avec les épitopes tant conformationnels que linéaires (Pirzadeh et Dea, 1998; Kwang *et al.*, 1999). Dans la réalisation de ce projet, l'immunisation génétique des lapins et des souris a permis d'obtenir des sérums monospécifiques anti-GP_{2a} et anti-P_{2b} détectables en IB et spécifiques pour les protéines recombinantes GST-ORF2a et GST-ORF2b bien que la réaction fut faible avec le sérum anti-GP_{2a}.

D'autre part, les sérums monospécifiques de lapin anti-GP_{2a} et anti-P_{2b} obtenus par immunisation génétique et incubés avec un lysat de cellules infectées par le VSRRP et marquées à la ³⁵S-méthionine n'ont malheureusement pas reconnus les protéines virales natives. Les résultats de séquençage n'ont révélé aucune altération ou mutation des gènes

de l'ORF2a et de l'ORF2b lors de l'amplification par PCR ou durant le clonage. L'efficacité du promoteur CMV (cytomégalo virus) utilisée dans le plasmide pRc/CMV2 a été largement rapportée dans la littérature (Dai *et al.*, 2000; Perelygina *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2004) chez le lapin au cours de l'immunisation génétique. D'ailleurs, les résultats positifs des sérums de lapins obtenus par immunisation génétique avec les protéines recombinantes GST-ORF2a et GST-ORF2b confirment cette efficacité. Le manque de réactivité des sérums de lapins obtenus par immunisation génétique envers les protéines virales natives n'a été révélé qu'avec les sérums monospécifiques obtenus chez les lapins suggérant que les protéines de la GP_{2a} et P_{2b} exprimées dans les muscles de lapins sont moins immunogènes (Perelygina *et al.*, 2002) ou elles ont subi des modifications post-traductionnelles entraînant la variation des épitopes au cours de leur expression individuelle en l'absence d'autres protéines virales (Balasuriya *et al.*, 2000; Plagemann, 2001b; Uprichard et Knipe, 2003).

Chez les souris, les expériences de fusion de cellule ont permis d'obtenir neuf AcMo dont trois dirigés contre la GP_{2a} et six contre la P_{2b}. Il est intéressant de noter que la majorité de ces AcMo était d'isotype IgM. La présence des IgM durant l'immunisation génétique est rapportée dans la littérature et semble être une réaction normale (Monzavi-Karbassi *et al.*, 2003; Puttikhunt *et al.*, 2003). Ces AcMo réagissaient aussi bien avec les protéines virales natives qu'avec les protéines recombinantes de fusion GST-ORF2a et GST-ORF2b. Cependant l'intensité des réactions dans différents tests (immunobuvardage de type Western, ELISA, IFI et RIPA) variait d'un AcMo à un autre. La raison de cette variation de réactivité reste inconnue d'autant plus que les gènes de l'ORF2a et de l'ORF2b selon plusieurs travaux sont stables et subissent peu de mutations chez les *Artérovirus* (Meng *et al.*, 1995b; Morozov *et al.*, 1995; Hedges *et al.*, 1996; Wootton *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2001). Il est possible que la structure et les fonctions de certains épitopes sur les deux protéines soient conditionnées par leur interaction avec d'autres protéines virales (Doan et Dokland, 2003; Ropp *et al.*, 2004) comme dans le cas des protéines GP₅ et M du EAV et du LDV (Balasuriya *et al.*, 2000; Plagemann, 2001b). En effet, comme les résultats de la réalisation de ce projet le montrent, les protéines GP_{2a}, P_{2b} et N semblent interagir aussi bien dans les cellules infectées que dans le virion semi-purifié. Or les AcMo faisant l'objet de cette étude ont été obtenus à partir des souris immunisées avec des ADN codant uniquement pour chacune des deux protéines. Dans ces conditions, certains épitopes liés à ces possibles interactions ne seront plus

fonctionnels et peuvent changer la réactivité des AcMo obtenus (Balasuriya *et al.*, 2000; Balasuriya *et al.*, 2002; Ropp *et al.*, 2004). Ces résultats peuvent suggérer que ces AcMo sont dirigés soit contre différents épitopes dont certains pourraient être altérés durant le traitement des protéines recombinantes ou des lysats cellulaires ou encore des cellules fixées en IFI (Harty *et al.*, 1987; Hwang et Lai, 1993; Weiland *et al.*, 2000; Plagemann, 2001b), soit encore qu'ils présentaient une faible avidité (Kang *et al.*, 1998).

Tous les antisérums et AcMo dirigés contre la GP_{2a} et P_{2b} testés, au cours de la réalisation de projet, n'ont présenté aucune activité neutralisante contre la souche homologue IAF-Klop du VSRRP. Le manque d'une telle activité n'exclut pas leur implication dans la réponse immunitaire. Les travaux de Bautista *et al.* (1999) ont montré qu'à la même concentration, l'implication de la GP_{2a} dans la prolifération des lymphocytes T serait équivalente à celle induite par la GP₅.

Au cours de la réalisation de ce projet, les sérums monospécifiques anti-GST-ORF2a et anti-GST-ORF2b de lapin ainsi que les AcMo dirigés contre la P_{2b} ont été utilisés en vue d'examiner de possibles interactions entre la GP_{2a} et P_{2b} avec d'autres protéines du VSRRP. L'incubation du lysat cellulaire infecté par le virus homologue avec des antisérums anti-GST-ORF2a et anti-GST-ORF2b ou des AcMo dirigés contre la P_{2b} entraîne l'immunoprécipitation d'une protéine de 29 kDa et de 8 kDa respectivement. En présence d'un antisérum ou d'un AcMo anti-P_{2b}, on observe une bande supplémentaire de 6,5 kDa. Ce produit pourrait être le résultat de la dégradation de la protéine P_{2b}. L'hétérogénéité de la protéine P_{2b} (homologue de la protéine E chez l'EAV) a été rapportée par d'autres investigateurs chez le VSRRP (Wu *et al.*, 2001) ainsi que chez l'EAV (Snijder *et al.*, 1999). D'autre part, l'AcMo dirigé contre la P_{2b} tout comme le sérum anti-GST-ORF2b précipitait une protéine de 15 kDa correspondant à celle de la protéine N de la nucléocapside. La précipitation de la protéine N pourrait être attribuée à une liaison non spécifique de celle-ci avec la protéine A (van Berlo *et al.*, 1983). Cependant les résultats obtenus durant la réalisation de ce projet ont montré une précipitation importante de la protéine N. Les travaux antérieurs rapportent que la précipitation non spécifique de la protéine N en présence de la protéine A révélée chez l'EAV (van Berlo *et al.*, 1983) ne semble pas se produire dans les lysats de cellules infectées par le VSRRP (Mardassi *et al.*, 1996; Pirezadeh et Dea, 1997).

Des interactions entre les différentes protéines structurales du VSRRP ont été déjà mises en évidence entre les protéines GP₅/M; GP₃/GP₄ et N/N (Mardassi *et al.*, 1996;

Mardassi *et al.*, 1998; Wootton et Yoo, 2003). La co-précipitation de GP_{2a} et P_{2b} fut observée dans le test de double immunoprécipitation dans les conditions non-réductrices et réductrices en présence des antisérums dirigés spécifiquement contre N et P_{2b}. Les résultats révélaient aussi une précipitation en faible quantité de la protéine N en présence de la protéine A. Mais en présence d'un antisérum anti-GST-N ou d'un AcMo anti-P_{2b} ce taux de précipitation était plus élevé et s'accompagnait au même moment de la co-précipitation de la GP_{2a} et la P_{2b}. L'incubation du lysat cellulaire infecté par le VSRRP avec un sérum anti-GST-N entraîne en dehors de la bande de la protéine N, l'apparition d'une autre bande d'environ 12 kDa dont la nature et le rôle restent à déterminer. La présence de cette bande a été aussi mise en évidence par d'autres auteurs (Mardassi *et al.*, 1996).

Cependant, en présence des antisérums dirigés contre GP₅, M, GP₃ et GP₄, la co-précipitation du trimère GP_{2a}/P_{2b}/N n'était pas observée et c'était plutôt l'hétérodimère GP₅/M ou GP₃/GP₄ qui était immunoprécipité en présence des anti-sérums anti-GP₅ et M ou anti-GP₃ et anti-GP₄ respectivement. En IFI, l'incubation du lysat de cellules 293 transfectées avec le plasmide recombinant pCEP codant pour la protéine de l'ORF7 (N) avec un sérum anti-GST-ORF2a, anti-GST-ORF2b ou des AcMo dirigés contre la GP_{2a} ou la P_{2b} n'a révélé aucune fluorescence spécifique. Cependant celle-ci était intense en présence du sérum anti-GST-N. L'immunoprécipitation suivie d'un test d'IB n'a non plus révélé la présence de la protéine N en présence du sérum anti-GST-ORF2a, anti-GST-ORF2b ou des AcMo dirigés contre les protéines GP_{2a} et P_{2b}. Ces résultats semblent mettre en évidence les interactions de la protéine N observée au cours des tests de RIPA.

La protéine N semble interagir précocement avec la protéine M avant que cette dernière ne s'associe à la GP₅ (Mardassi, 1996) bien que cette interaction n'apparaisse que lorsque les conditions peu astringentes ou douces de dissociation des protéines virales sont appliquées. Les travaux récents (Doan et Dokland, 2003) suggèrent que les feuillettes $\alpha 2$ situés à la surface de la protéine N soient impliqués dans des interactions avec les parties cytoplasmiques des protéines associées à l'enveloppe. D'autres auteurs (Ropp *et al.*, 2004) attribuent la diversité de réactivité des AcMo dirigés contre la protéine N à l'interaction, non caractérisée jusqu'à ce jour de celle-ci, avec les protéines virales ou l'ARN.

Les résultats obtenus semblent montrer que les deux protéines GP_{2a} et P_{2b} interagissent avec la protéine N et que ces interactions peuvent être de nature non-

covalente car la mobilité des deux protéines n'est pas modifiée durant la migration sur gel de polyacrylamide SDS-Tris-tricine dans les conditions réductrices et non réductrices. Des travaux récents évoquent aussi la possibilité d'une interaction non-covalente entre la protéine E du EAV, homologue de la P_{2b} du VSRRP et le trimère GP_{2b}/GP₃/GP₄ (Wieringa *et al.*, 2003b). L'interaction de la protéine N avec les protéines GP_{2a} et P_{2b} pourrait être probablement assurée par les extrémités basiques (Faaberg et Plagemann, 1995; Rowland et Yoo, 2003). Ces interactions protéine-protéines de même que les épitopes résultant de ces interactions pourraient jouer un rôle important dans l'immunobiologie des protéines structurales du virus d'autant plus que l'inactivation du codon d'initiation de la GP_{2b} et E chez l'EAV entraîne la formation des particules virales non-infectieuses (Snijder *et al.*, 1999; Wieringa *et al.*, 2003b).

Il est important de noter que la protéine P_{2b} de tous les *Artérovirus* contient un site potentiel de N-myristoylation qui selon plusieurs auteurs (Moscufo et Chow, 1992; Bouamr *et al.*, 2003) peut faciliter l'interaction avec d'autres protéines par séquestration du groupe myristoyl. Ce phénomène reste à être démontré dans le cas du P_{2b} du VSRRPet d'autres *Artérovirus*.

Le présent travail a permis de développer des outils nécessaires pour la caractérisation des protéines structurales mineures GP_{2a} et P_{2b} du VSRRP.

4. Perspectives

Les résultats présentés dans ce projet ont fourni des outils nécessaires pour la poursuite de l'étude des deux protéines de l'ORF2 (a et b) et vont permettre de compléter la caractérisation de ces deux protéines virales du VSRRP. La mise en évidence des interactions des protéines N, GP_{2a} et P_{2b} nécessite une étude approfondie afin de déterminer les domaines responsables de ces interactions et le rôle de ces interactions. La difficulté d'expression de la protéine GP_{2a} dans les cellules transfectées sera probablement surmontée en faisant des constructions dont le codon d'initiation de la traduction du gène de l'ORF2b sera inactivé (Wu *et al.*, 2001). Une attention particulière devrait être accordée à la vérification de la fonctionnalité du site de N-myristoylation (Glycine-2) de la protéine P_{2b} qui peut avoir beaucoup d'implications dans les fonctions de cette protéine notamment dans les interactions protéines-protéines. Comme il a été rapporté pour d'autres modèles de protéines virales telles que la VP4 du poliovirus (Moscufo et Chow, 1992) et la protéine Gag du virus de l'immunodéficience humaine (Bouamr *et al.*, 2003), le site de N-myristoylation facilite les interactions protéines-protéines. D'autre part, le site de N-myristoylation serait impliqué dans le **formation** des particules virales, la reconnaissance du récepteur, la **stabilité** du virion **ainsi que** l'assemblage et le désassemblage du virus (Moscufo et Chow, 1992; Bouamr *et al.*, 2003; Jones et Lee, 2004). Les AcMo obtenus contribueront considérablement à mieux évaluer ces interactions. Cependant pour augmenter la réactivité, la quantité et la concentration des AcMo produits, il sera préférable de produire les liquides ascites.

Suite aux travaux effectués, plusieurs constructions d'ADN plasmidique recombinant pour l'ORF2a et l'ORF2b ont été obtenues. Les travaux récents (Doan et Dokland, 2003; Rowland *et al.*, 2003; Rowland et Yoo, 2003; Wootton et Yoo, 2003; Yoo *et al.*, 2003) qui ont permis une meilleure caractérisation de la protéine N pourront être utilisés pour élucider et confirmer la présence et le mécanisme des interactions N/GP_{2a}/P_{2b}.

5. Remerciements

J'aimerais exprimer ma gratitude envers le Dr. Serge Dea pour m'avoir accepté dans son laboratoire. Il m'est très difficile de trouver des mots pour exprimer ses qualités humaines. Lui qui m'a fait confiance et jusqu'à ses derniers jours attendait tant pour la réussite de ce projet. Serge : Mission accomplie.

Je remercie le professeur François Shareck et le Dr. Carl Gagnon qui ont accepté de diriger ce projet en l'absence du Dr. Serge Dea ainsi pour de nombreux conseils judicieux et discussions et en vue d'accélérer l'avancement des travaux.

Je remercie également le Dr. Yves St-Pierre pour tout le soutien et pour avoir accepté de superviser le laboratoire en l'absence du Dr. Serge Dea.

Mes remerciements vont à l'endroit du Dr. Ali Kheyar pour tous les conseils et soutien technique dans beaucoup de manipulations et la correction de l'article.

Je remercie Madame Cécile Séguin pour ses conseils en matière de culture cellulaire et pour sa disponibilité.

Je remercie Madame Hélène Drolet pour ses conseils pour le test de RT-PCR.

Je ne saurais remercier Mesdames Wilson Louise, et Lise Cousineau pour leur disponibilité et leur aide technique.

J'aimerais dire merci à tous les techniciens et techniciennes de l'Édifice 27.

Finalement, je désire remercier tous les étudiants avec qui j'ai partagé tous les moments de joie et de douleur à savoir: Kane Cheikh Saad Bouh, Marie-Josée Sasseville, Ahmed Jabrane, Sylvie Chabot, Martine Boutin, Annie Boisvert, Sébastien Racine, Benoît Charbonneau et Faust Okamba.

Ce travail n'a pu se réaliser sans les subventions du CRNSG et Biovet Inc ainsi que la bourse de la Fondation Armand-Frappier.

6. Annexe

6.1. Annexe : Liste des présentations et séances d'affiche

Publication soumise

Ontsouka B, A.Kheyar, A. M.-J Sasseville, F.Shareck, C.A.Gagnon., and S.Dea.

Antibody response towards PRRSV GP_{2a} and P_{2b}, and their interaction with other structural proteins (soumis à Archives of virology)

Liste des séances d'affiche

1. Ontsouka B., A. Kheyar, A.M.-J. Sasseville, F. Shareck, C.A. Gagnon, and S. Dea. Protein interactions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) GP_{2a} and P_{2b} with other viral structural proteins. 2004 –54th Annual meeting of canadian society of microbiologists, Edmonton, Alberta, june 20-23, 2004
2. Ontsouka B, A.Kheyar, F.Shareck, S.Dea and C.A.Gagnon. DNA immunization of rabbit and mice and production of monoclonal antibodies (MAbs) against ORF2 (a and b) gene products of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). 2003 Conference of research workers in animal diseases (CRWAD), Chicago, USA November 7-12
3. Ontsouka B A.Kheyar, F.Shareck, S.Dea and C.A.Gagnon. DNA immunization of rabbit and mice and production of monoclonal antibodies (MAbs) against ORF2 (a and b) gene products of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). 2003 6^{ieme} colloque de l'association de thérapie génique du Québec, Montréal, Québec, 24 octobre
4. Ontsouka B., A. Kheyar, A.M.-J. Sasseville, S. Dea and C.A. Gagnon. Immunobiology of the ORF2a and ORF2b genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) expressed in procaryotic and eucaryotic vectors. 2003 –53^{ieme} Congrès de la société canadienne des microbiologistes, Laval, Québec, 25-28 mai

7. Bibliographie

- Albina E., F. Madec et P. Vannier (1992). Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP) (PRRS-maladie mystérieuse). *Journées Rech Porcine en France* 24: 115-125.
- Albina E., F. Madec, R. Cariolet et J. Torrison (1994). Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet Rec* 134: 567-573.
- Albina E. (1997). [Porcine reproductive and respiratory syndrome: ten years of experience (1986-1996) with this undesirable viral infection]. *Vet Res* 28: 305-352.
- Albina E., L. Piriou, E. Hutet, R. Cariolet et R. L'Hospitalier (1998). Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol* 61: 49-66.
- Allende R., T. L. Lewis, Z. Lu, D. L. Rock, G. F. Kutish, A. Ali, A. R. Doster et F. A. Osorio (1999). North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol* 80 (Pt 2): 307-315.
- Allende R., G. F. Kutish, W. Laegreid, Z. Lu, T. L. Lewis, D. L. Rock, J. Friesen, J. A. Galeota, A. R. Doster et F. A. Osorio (2000). Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype. *Arch Virol* 145: 1149-1161.
- Andreyev V. G., R. D. Wesley, W. L. Mengeling, A. C. Vorwald et K. M. Lager (1997). Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch Virol* 142: 993-1001.

Andreyev V. G., A.G. Cherbakov, V.A. Pylnov et A. A. Gusev. (1999). "Genetic heterogeneity of PRRSV in Russia". In *Proc. of the International symposium on PRRS and Aujeszky's Disease*, pp. 211-211. Ploufragan, France, June 21-24.

Balasuriya U. B., H. W. Heidner, J. F. Hedges, J. C. Williams, N. L. Davis, R. E. Johnston et N. J. MacLachlan (2000). Expression of the two major envelope proteins of equine arteritis virus as a heterodimer is necessary for induction of neutralizing antibodies in mice immunized with recombinant Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J Virol* 74: 10623-10630.

Balasuriya U. B., H. W. Heidner, N. L. Davis, H. M. Wagner, P. J. Hullinger, J. F. Hedges, J. C. Williams, R. E. Johnston, W. David Wilson, I. K. Liu et N. James MacLachlan (2002). Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine* 20: 1609-1617.

Baric R. S., S. A. Stohlman et M. M. Lai (1983). Characterization of replicative intermediate RNA of mouse hepatitis virus: presence of leader RNA sequences on nascent chains. *J Virol* 48: 633-640.

Baron T., 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 rech vet* 23: 161-166.

Batista L., S. A. Dee, K. D. Rossow, J. Deen et C. Pijoan (2002). Assessing the duration of persistence and shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of breeding-age gilts. *Can J Vet Res* 66: 196-200.

Bautista E. M., J. J. Meulenberg, C. S. Choi et T. W. Molitor (1996). Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 141: 1357-1365.

Bautista E. M. et T. W. Molitor (1997). Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol* 10: 83-94.

Bautista E. M., P. Suarez et T. W. Molitor (1999). T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 144: 117-134.

Bautista E. M., K. S. Faaberg, D. Mickelson et E. D. McGruder (2002). Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 298: 258-270.

Benfield D. A., J. E. Collins, A. L. Jenny et T. J. Loula. (1992a). Porcine reproductive and respiratory syndrome disease. Dans *Diseases of swine*, pp. 756-762. Édité par S. D'Allaire : Iowa State University press, AMES, Iowa.

Benfield D. A., E. Nelson, J. E. Collins, L. Harris, S. M. Goyal, D. Robison, W. T. Christianson, R. B. Morrison, D. Gorcyca et D. Chladek (1992b). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4: 127-133.

Bilodeau R., S. Dea, G.-P. Martineau et R. Sauvageau (1991a). Le syndrome reproducteur et respiratoire du porc : Un cas sévère. *La production porcine*: 29-43.

Bilodeau R., S. Dea, R. A. Sauvageau et G. P. Martineau (1991b). 'Porcine reproductive and respiratory syndrome' in Quebec. *Vet Rec* 129: 102-103.

Botner A., J. Nielsen et V. Bille-Hansen (1994). Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet Microbiol* 40: 351-360.

Botner A., B. Strandbygaard, K. J. Sorensen, P. Have, K. G. Madsen, E. S. Madsen et S. Alexandersen (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec* 141: 497-499.

Bouamr F., S. Scarlata et C. Carter (2003). Role of myristylation in HIV-1 Gag assembly. *Biochemistry* 42: 6408-6417.

Bryans J. T., M. E. Crowe, E. R. Doll et W. H. McCollum (1957). Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares; its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet* 47: 3-41.

Carman 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. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142: 629-633.

Chang C. C., K. J. Yoon, J. J. Zimmerman, K. M. Harmon, P. M. Dixon, C. M. Dvorak et M. P. Murtaugh (2002). Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J Virol* 76: 4750-4763.

Christopher-Hennings J., E. A. Nelson, R. J. Hines, J. K. Nelson, S. L. Swenson, J. J. Zimmerman, C. L. Chase, M. J. Yaeger et D. A. Benfield (1995). Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 7: 456-464.

Christopher-Hennings J., E. A. Nelson, J. K. Nelson et D. A. Benfield (1997). Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am J Vet Res* 58: 40-45.

Cléroux P. (2001). Étude de la variabilité des GP₄ et GP₅ du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin et modulation de la réponse immune chez le porc. Thèse de M.sc. INRS-Institut Armand-Frappier, 161 p.

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 et al. (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.

Cowley J. A., C. M. Dimmock, K. M. Spann et P. J. Walker (2000). Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. *J Gen Virol* 81: 1473-1484.

Cromwijk W. A. (1991). [A new virus disease in swine]. *Tijdschr Diergeneeskd* 116: 247-248.

Daginakatte G. C. et S. Kapil (2001). Mapping of the RNA-binding domain of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *Adv Exp Med Biol* 494: 547-552.

Dai B., Z. You, Z. Chen, H. Yan et Z. Fang (2000). Protection against leptospirosis by immunization with plasmid DNA encoding 33 kDa endoflagellin of *L. interrogans* serovar lai. *Chin Med Sci J* 15: 14-19.

de Vries A. A., E. D. Chirnside, P. J. Bredenbeek, L. A. Gravestine, M. C. Horzinek et W. J. Spaan (1990). All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. *Nucleic Acids Res* 18: 3241-3247.

de Vries A. A., M. J. Raamsman, H. A. van Dijk, M. C. Horzinek et P. J. Rottier (1995). The small envelope glycoprotein (Gs) of equine arteritis virus folds into three distinct monomers and a disulfide-linked dimer. *J Virol* 69: 3441-3448.

Dea S. et P. Tijssen (1989). Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 70 (Pt 7): 1725-1741.

Dea S., R. Bilodeau, R. Sauvageau et G.-P. Martineau (1991). Caractéristiques d'isolats des virus influenza et de l'encéphalomyocardite associés au syndrome reproducteur et respiratoire porcin (S.R.R.P) au Québec. *Le médecin vétérinaire du Québec* 21: 170-175.

Dea S., R. Bilodeau, R. Athanaseous, R. A. Sauvageau et G. P. Martineau (1992). PRRS syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. *Vet Rec* 130: 167.

Dea S., C. A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh et D. Rogan (2000a). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* 145: 659-688.

Dea S., L. Wilson, D. Therrien et E. Cornaglia (2000b). Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli*-expressed nucleocapsid protein as antigen. *J Virol Methods* 87: 109-122.

Dee S. A., H. S. Joo, B. K. Park, T. W. Molitor et G. Bruna (1998). Attempted elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a seedstock farm by vaccination of the breeding herd and nursery depopulation. *Vet Rec* 142: 569-572.

Delputte P. L., N. Vanderheijden, H. J. Nauwynck et M. B. Pensaert (2002). Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 76: 4312-4320.

den Boon J. A., E. J. Snijder, E. D. Chirnside, A. A. de Vries, M. C. Horzinek et W. J. Spaan (1991). Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily. *J Virol* 65: 2910-2920.

Doan D. N. et T. Dokland (2003). Structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Structure (Camb)* 11: 1445-1451.

Drake J. W. et J. J. Holland (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13910-13913.

Drew T. W., J. P. Lowings et F. Yapp (1997). Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK. *Vet Microbiol* 55: 209-221.

Duan X., H. J. Nauwynck, H. W. Favoreel et M. B. Pensaert (1998). Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 72: 4520-4523.

Faaberg K. S., C. Even, G. A. Palmer et P. G. Plagemann (1995). Disulfide bonds between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for viral infectivity. *J Virol* 69: 613-617.

Faaberg K. S. et P. G. Plagemann (1995). The envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus and their membrane topography. *Virology* 212: 512-525.

Faaberg K. S. et P. G. Plagemann (1997). ORF 3 of lactate dehydrogenase-elevating virus encodes a soluble, nonstructural, highly glycosylated, and antigenic protein. *Virology* 227: 245-251.

Gagnon C. A. et S. Dea (1998). Differentiation between porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism of their ORFs 6 and 7 genes. *Can J Vet Res* 62: 110-116.

Gagnon C. A. (2001). Propriétés moléculaires et variabilités antigéniques et génomiques des protéines structurales du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP). Thèse Ph.D, Université du Québec. INRS-Institut Armand-Frappier, 267 p.

- Gagnon C. A., G. Lachapelle, Y. Langelier, B. Massie et S. Dea (2003). Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Arch Virol* 148: 951-972.
- 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.
- Goldberg T. L., R. M. Weigel, E. C. Hahn et G. Scherba (2000). Associations between genetics, farm characteristics and clinical disease in field outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Prev Vet Med* 43: 293-302.
- Gonin P., H. Mardassi, C. A. Gagnon, B. Massie et S. Dea (1998). A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 143: 1927-1940.
- Gonin P., B. Pirzadeh, C. A. Gagnon et S. Dea (1999). Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest* 11: 20-26.
- 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 (SHF) virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 181: 112-119.
- Halbur P. G., P. S. Paul, M. L. Frey, J. Landgraf, K. Eernisse, X. J. Meng, M. A. Lum, J. J. Andrews et J. A. Rathje (1995). Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol* 32: 648-660.

Halbur P. G., P. S. Paul, X. J. Meng, M. A. Lum, J. J. Andrews et J. A. Rathje (1996a). 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.

Halbur P. G., P. S. Paul, M. L. Frey, J. Landgraf, K. Eernisse, X. J. Meng, J. J. Andrews, M. A. Lum et J. A. Rathje (1996b). Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol* 33: 159-170.

Harty J. T., S. P. Chan et P. G. Plagemann (1987). Characteristics of monoclonal antibodies to the lactate dehydrogenase-elevating virus. *Intervirology* 27: 53-60.

Hedges J. F., U. B. Balasuriya, P. J. Timoney, W. H. McCollum et N. J. MacLachlan (1996). Genetic variation in open reading frame 2 of field isolates and laboratory strains of equine arteritis virus. *Virus Res* 42: 41-52.

Hill H. (1990). Overview and history of mystery swine disease (swine infertility respiratory syndrome). Proceedings of the mystery swine disease committee meeting, October 6, 1990, Denver, CO and Livestock conservation institute.

Hu J., N. M. Cladel, Z. Wang, R. Han, M. D. Pickel et N. D. Christensen (2004). GM-CSF enhances protective immunity to cottontail rabbit papillomavirus E8 genetic vaccination in rabbits. *Vaccine* 22: 1124-1130.

Hwang S. B. et M. M. Lai (1993). A unique conformation at the carboxyl terminus of the small hepatitis delta antigen revealed by a specific monoclonal antibody. *Virology* 193: 924-931.

Hyllseth B. (1969). A plaque assay of equine arteritis virus in BHK-21 cells. *Arch Gesamte Virusforsch* 28: 26-33.

Jiang Z., E. M. Zhou, M. Ameri-Mahabadi, J. J. Zimmerman et K. B. Platt (2003). Identification and characterization of auto-anti-idiotypic antibodies specific for antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus envelope glycoprotein (GP5). *Vet Immunol Immunopathol* 92: 125-135.

Jones T. R. et S. W. Lee (2004). An acidic cluster of human cytomegalovirus UL99 tegument protein is required for trafficking and function. *J Virol* 78: 1488-1502.

Jusa E. R., Y. Inaba, M. Kouno et O. Hirose (1997). Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res* 58: 488-491.

Kang Y., P. A. Calvo, T. M. Daly et C. A. Long (1998). Comparison of humoral immune responses elicited by DNA and protein vaccines based on merozoite surface protein-1 from *Plasmodium yoelii*, a rodent malaria parasite. *J Immunol* 161: 4211-4219.

Kapur V., M. R. Elam, T. M. Pawlovich et M. P. Murtaugh (1996). Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J Gen Virol* 77 (Pt 6): 1271-1276.

Keffaber K. K. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 1: 1-10.

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.

Konishi S., H. Akashi, H. Sentsui et M. Ogata (1975). Studies on equine viral arteritis. I. Characterization of the virus and trial survey on antibody with vero cell cultures. *Nippon Juigaku Zasshi* 37: 259-267.

Kreutz L. C. et M. R. Ackermann (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res* 42: 137-147.

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.

Kwang J., F. Zuckermann, G. Ross, S. Yang, F. Osorio, W. Liu et S. Low (1999). Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res Vet Sci* 67: 199-201.

Lachapelle G., G.A. Gagnon, S. Dea et B. Massie. (2002). "Mitochondrial involvement in the apoptotic pathway induced by the major glycosylated envelope protein (GP5) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)". In *Proceedings of the 83rd annual meeting of the CRAWD 10-11 november*, pp. 192. St-Louis Missouri.

Larochelle R., S. D'Allaire et R. Magar (2003). Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Quebec. *Virus Res* 96: 3-14.

Li H. et H. Yang (2003). Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination. *Vet Microbiol* 95: 295-301.

Loemba H. D., S. Mounir, H. Mardassi, D. Archambault et S. Dea (1996). Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 141: 751-761.

Madsen K. G., C. M. Hansen, E. S. Madsen, B. Strandbygaard, A. Botner et K. J. Sorensen (1998). Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Arch Virol* 143: 1683-1700.

Magar R., R. Larochelle, E. A. Nelson et C. Charreyre (1997). Differential reactivity of a monoclonal antibody directed to the membrane protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 61: 69-71.

Magnusson P., B. Hyllseth et H. Marusyk (1970). Morphological studies on equine arteritis virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 30: 105-112.

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 porcine reproductive and respiratory syndrome. *Can J Vet Res* 58: 55-64.

Mardassi H., S. Mounir et S. Dea (1994a). Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 75 (Pt 3): 681-685.

Mardassi H., S. Mounir et S. Dea (1995). Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Arch Virol* 140: 1405-1418.

Mardassi H. (1996). Identification et caractérisation moléculaire des protéines structurales majeures du virus du syndrome reproducteur et respiratoire du porc (SRRP). Thèse Ph.D. Université du Québec, Institut Armand-Frappier, 299 p.

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.

Mardassi H., P. Gonin, C. A. Gagnon, B. Massie et S. Dea (1998). A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J Virol* 72: 6298-6306.

Martineau G.-P., R. Bilodeau, R. Sauvageau, C. Moore et S. Dea. (1991). Syndrome <<hyperthermie-Anorexie-Avortement de la truie>> et de pneumonie interstitielle virale au Québec. *Journées Rech Porcine en France* 23: 179-188.

Martineau G.-P., R. Bilodeau, R. Sauvageau et S. Dea. (1992). Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) au Québec : Données cliniques, pathologiques et virologiques. *Journées Rech Porcine en France* 24: 127-136.

Meng X. J., P. S. Paul, P. G. Halbur et M. A. Lum (1995a). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) 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 (Pt 12): 3181-3188.

Mengeling W. L., K. M. Lager et A. C. Vorwald (1999). Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am J Vet Res* 60: 796-801.

Meulenberg J. J., M. M. Hulst, E. J. de Meijer, P. L. Moonen, A. den Besten, E. P. de Kluyver, G. Wensvoort et R. J. Moormann (1993). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192: 62-72.

Meulenberg J. J., A. Petersen-den Besten, E. P. De Kluyver, R. J. Moormann, W. M. Schaaper et G. Wensvoort (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206: 155-163.

Meulenberg J. J. et A. Petersen-den Besten (1996). Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particles. *Virology* 225: 44-51.

Meulenberg J. J., A. Petersen den Besten, E. de Kluyver, A. van Nieuwstadt, G. Wensvoort et R. J. Moormann (1997). Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 55: 197-202.

Meulenberg J. J., A. P. van Nieuwstadt, A. van Essen-Zandbergen et J. P. Langeveld (1997a). Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J Virol* 71: 6061-6067.

Meulenberg J. J. (2000). PRRSV, the virus. *Vet Res* 31: 11-21.

Molenkamp R., H. van Tol, B. C. Rozier, Y. van der Meer, W. J. Spaan et E. J. Snijder (2000). The arterivirus replicase is the only viral protein required for genome replication and subgenomic mRNA transcription. *J Gen Virol* 81: 2491-2496.

Monzavi-Karbassi B., S. Shamloo, M. Kieber-Emmons, F. Jousheghany, P. Luo, K. Y. Lin, G. Cunto-Amesty, D. B. Weiner et T. Kieber-Emmons (2003). Priming characteristics of peptide mimotopes of carbohydrate antigens. *Vaccine* 21: 753-760.

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.

Mortensen S., H. Stryhn, R. Sogaard, A. Boklund, K. D. Stark, J. Christensen et P. Willeberg (2002). Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Prev Vet Med* 53: 83-101.

Moscufo N. et M. Chow (1992). Myristate-protein interactions in poliovirus: interactions of VP4 threonine 28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions. *J Virol* 66: 6849-6857.

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.

Murtaugh M. P., Z. Xiao et F. Zuckermann (2002). Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* 15: 533-547.

Nauwynck H. J., X. Duan, H. W. Favoreel, P. Van Oostveldt et M. B. Pensaert (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J Gen Virol* 80 (Pt 2): 297-305.

Nelsen C. J., M. P. Murtaugh et K. S. Faaberg (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 73: 270-280.

Nelson E. A., J. Christopher-Hennings, T. Drew, G. Wensvoort, J. E. Collins et D. A. Benfield (1993). Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 31: 3184-3189.

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

Ohlinger V. (1992). PRRS/Blue ear disease. Dans SIRS monthly newsletter. Pig Disease Information Center, December 1992. Édité par M. Meredith.

Oleksiewicz M. B., A. Botner et P. Normann (2001a). Semen from boars infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) contains antibodies against structural as well as nonstructural viral proteins. *Vet Microbiol* 81: 109-125.

Oleksiewicz M. B., A. Botner, P. Toft, P. Normann et T. Storgaard (2001b). Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *J Virol* 75: 3277-3290.

Oleksiewicz M. B., A. Botner et P. Normann (2002). Porcine B-cells recognize epitopes that are conserved between the structural proteins of American- and European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 83: 1407-1418.

Osorio F. A., J. A. Galeota, E. Nelson, B. Brodersen, A. Doster, R. Wills, F. Zuckermann et W. W. Laegreid (2002). Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology* 302: 9-20.

Ostrowski M., J. A. Galeota, A. M. Jar, K. B. Platt, F. A. Osorio et O. J. Lopez (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 76: 4241-4250.

Otake S., S. A. Dee, R. D. Moon, K. D. Rossow, C. Trincado et C. Pijoan (2003). Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 67: 265-270.

Palmer A. E., A. M. Allen, N. M. Tauraso et A. Shelokov (1968). Simian hemorrhagic fever. I. Clinical and epizootiologic aspects of an outbreak among quarantined monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 17: 404-412.

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.

Pedersen K. W., Y. van der Meer, N. Roos et E. J. Snijder (1999). Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *J Virol* 73: 2016-2026.

Perelygina L., I. Patrusheva, H. Zurkuhlen et J. K. Hilliard (2002). Characterization of B virus glycoprotein antibodies induced by DNA immunization. *Arch Virol* 147: 2057-2073.

Pirzadeh B. et S. Dea (1997). Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* 78 (Pt 8): 1867-1873.

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

Pirzadeh B., C. A. Gagnon et S. Dea (1998). Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. *Can J Vet Res* 62: 170-177.

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

Plagemann P. G. (1996). Lactate dehydrogenase elevating virus and related viruses. *Field's Virology*. B.N.Fields, Knipe, D.M.,Howley,P.M. Philadelphia, Lippincott-Ravens: 1105-1120.

Plagemann P. G. (2001). An ORF-2a protein is not present at a significant level in virions of the arterivirus lactate dehydrogenase-elevating virus. *Virus Res* 74: 47-52.

Plagemann P. G., Z. Chen et K. Li (2001a). Replication competition between lactate dehydrogenase-elevating virus quasispecies in mice. Implications for quasispecies selection and evolution. *Arch Virol* 146: 1283-1296.

Plagemann P. G. (2001b). Complexity of the single linear neutralization epitope of the mouse arterivirus lactate dehydrogenase-elevating virus. *Virology* 290: 11-20.

Plagemann P. G., R. R. Rowland et K. S. Faaberg (2002). The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. *Arch Virol* 147: 2327-2347.

Plagemann, P. G. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerg Infect Dis* 9: 903-908.

Plana Duran J., I. Climent, J. Sarraseca, A. Urniza, E. Cortes, C. Vela et J. I. Casal (1997a). Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes* 14: 19-29.

Plana J., M. Vayreda, J. Vilarrasa, M. Bastons, R. Rosell, M. Martinez, A. San Gabriel, J. Pujols, J. L. Badiola, J. A. Ramos et al. (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.

Plana-Duran J., M. Bastons, A. Urniza, M. Vayreda, X. Vila et H. Mane (1997b). Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 55: 361-370.

Pol J. M., 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. M., F. Wagenaar et J. E. Reus (1997). Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. *Vet Microbiol* 55: 203-208.

Puttikhunt C., W. Kasinrerak, S. Srisa-ad, T. Duangchinda, W. Silakate, S. Moonsom, N. Sittisombut et P. Malasit (2003). Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods* 109: 55-61.

Riley V., F. Lilly, E. Huerto et a. D. Bardell. (1960). Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasms. *Science* : 132: 545-547.

Ropp S. L., C. E. Wees, Y. Fang, E. A. Nelson, K. D. Rossow, M. Bien, B. Arndt, S. Preszler, P. Steen, J. Christopher-Hennings, J. E. Collins, D. A. Benfield et K. S. Faaberg (2004). Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J Virol* 78: 3684-3703.

Rottier P. J., G. W. Welling, S. Welling-Wester, H. G. Niesters, J. A. Lenstra et B. A. Van der Zeijst (1986). Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. *Biochemistry* 25: 1335-1339.

Rowland R. R., M. Steffen, T. Ackerman et D. A. Benfield (1999). The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology* 259: 262-266.

Rowland R. R., P. Schneider, Y. Fang, S. Wootton, D. Yoo et D. A. Benfield (2003). Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* 316: 135-145.

Rowland R. R. et D. Yoo (2003). Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Res* 95: 23-33.

Sawicki S. G. et D. L. Sawicki (1990). Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J Virol* 64: 1050-1056.

Shen S., J. Kwang, W. Liu et D. X. Liu (2000). Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion. *Arch Virol* 145: 871-883.

Shibata I., K. Uruno et M. Mori (1996). Serological property and replication in cell cultures of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in Japan. *J Vet Med Sci* 58: 805-807.

Shibata I., M. Mori et K. Uruno (1998). Experimental infection of maternally immune pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Med Sci* 60: 1285-1291.

Simons K. et H. Garoff (1980). The budding mechanisms of enveloped animal viruses. *J Gen Virol* 50: 1-21.

Snijder E. J., A. L. Wassenaar, W. J. Spaan et A. E. Gorbalenya (1995). The arterivirus Nsp2 protease. An unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain-like and chymotrypsin-like proteases. *J Biol Chem* 270: 16671-16676.

Snijder E. J., A. L. Wassenaar, L. C. van Dinten, W. J. Spaan et A. E. Gorbalenya (1996). The arterivirus nsp4 protease is the prototype of a novel group of chymotrypsin-like enzymes, the 3C-like serine proteases. *J Biol Chem* 271: 4864-4871.

Snijder E. J. et J. J. Meulenberg (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 79 (Pt 5): 961-979.

Snijder E. J., H. van Tol, K. W. Pedersen, M. J. Raamsman et A. A. de Vries (1999). Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J Virol* 73: 6335-6345.

Snijder E. J. et J. J. M. Meulenberg (2001). Arteriviruses. Dans *Virology* fourth edition Fields Bernard, pp. 1205-1220. Édité par D. M. Knipe. et P. M. Howley: Lippincott Williams and Wilkins.

Snijder E. J., H. van Tol, N. Roos et K. W. Pedersen (2001). Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. *J Gen Virol* 82: 985-994.

Snijder E. J., J. C. Dobbe et W. J. Spaan (2003). Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *J Virol* 77: 97-104.

Spaan W., H. Delius, M. Skinner, J. Armstrong, P. Rottier, S. Smeeckens, B. A. van der Zeijst et S. G. Siddell (1983). Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *Embo J* 2: 1839-1844.

Suarez P., M. Diaz-Guerra, C. Prieto, M. Esteban, J. M. Castro, A. Nieto et J. Ortin (1996). Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol* 70: 2876-2882.

Sur J. H., A. R. Doster, J. S. Christian, J. A. Galeota, R. W. Wills, J. J. Zimmerman et F. A. Osorio (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 71: 9170-9179.

Thacker B. et P. Halbur (1996). " Effect of PRRSV infection on MHC antigen expression and lymphocyte population ". In *Proc. 14th Int. pig veterinary society congress. Bologna Italy, 7-10 july, 376.*

Therrien D., Y. St-Pierre et S. Dea (2000). Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells. *Arch Virol* 145: 1099-1116.

Timoney P. J. et W. H. McCollum (1993). Equine viral arteritis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 9: 295-309.

Uprichard S. L. et D. M. Knipe (2003). Conformational changes in the herpes simplex virus ICP8 DNA-binding protein coincident with assembly in viral replication structures. *J Virol* 77: 7467-7476.

van Berlo M. F., J. J. Zeegers, M. C. Horzinek et B. A. van der Zeijst (1983). Antigenic comparison of equine arteritis virus (EAV) and lactic dehydrogenase virus (LDV); binding of staphylococcal protein A to the nucleocapsid protein of EAV. *Zentralbl Veterinarmed B* 30: 297-304.

van Dinten L. C., J. A. den Boon, A. L. Wassenaar, W. J. Spaan et E. J. Snijder (1997). An infectious arterivirus cDNA clone: identification of a replicase point mutation that abolishes discontinuous mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 991-996.

van Dinten L. C., S. Rensen, A. E. Gorbalenya et E. J. Snijder (1999). Proteolytic processing of the open reading frame 1b-encoded part of arterivirus replicase is mediated by nsp4 serine protease and is essential for virus replication. *J Virol* 73: 2027-2037.

van Marle G., J. C. Dobbe, A. P. Gulyaev, W. Luytjes, W. J. Spaan et E. J. Snijder (1999). Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12056-12061.

van Nieuwstadt A. P., J. J. Meulenberg, A. van Essen-Zanbergen, A. Petersen-den Besten, R. J. Bende, R. J. Moormann et G. Wensvoort (1996). Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J Virol* 70: 4767-4772.

Van Reeth K., G. Labarque, H. Nauwynck et M. Pensaert (1999). Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res Vet Sci* 67: 47-52.

Vanderheijden N., P. L. Delputte, H. W. Favoreel, J. Vandekerckhove, J. Van Damme, P. A. van Woensel et H. J. Nauwynck (2003). Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 77: 8207-8215.

Verheije M. H., M. V. Kroese, I. F. van der Linden, E. A. de Boer-Luijtz, P. A. van Rijn, J. M. Pol, J. J. Meulenber et P. J. Steverink (2003). Safety and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome recombinant virus vaccines in young pigs. *Vaccine* 21: 2556-2563.

Wagner H. M., U. B. Balasuriya et N. James MacLachlan (2003). The serologic response of horses to equine arteritis virus as determined by competitive enzyme-linked immunosorbent assays (c-ELISAs) to structural and non-structural viral proteins. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26: 251-260.

Weiland E., M. Wiczorek-Krohmer, D. Kohl, K. K. Conzelmann et F. Weiland (1999). Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol* 66: 171-186.

Weiland E., S. Bolz, F. Weiland, W. Herbst, M. J. Raamsman, P. J. Rottier et A. A. De Vries (2000). Monoclonal antibodies directed against conserved epitopes on the nucleocapsid protein and the major envelope glycoprotein of equine arteritis virus. *J Clin Microbiol* 38: 2065-2075.

Weiland E. et F. Weiland (2002). Autoantibodies against Golgi apparatus induced by arteriviruses. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48: 279-284.

Wensvoort G., C. Terpstra, J. M. Pol, E. A. ter Laak, M. Bloemraad, E. P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar et et al. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 13: 121-130.

Wensvoort G., E. P. de Kluyver, J. M. Pol, F. Wagenaar, R. J. Moormann, M. M. Hulst, R. Bloemraad, A. den Besten, T. Zetstra et C. Terpstra (1992). Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. *Vet Microbiol* 33: 185-193.

Wieringa R., A. A. de Vries, M. J. Raamsman et P. J. Rottier (2002). Characterization of two new structural glycoproteins, GP(3) and GP(4), of equine arteritis virus. *J Virol* 76: 10829-10840.

Wieringa R., A. A. de Vries et P. J. Rottier (2003a). Formation of disulfide-linked complexes between the three minor envelope glycoproteins (GP2b, GP3, and GP4) of equine arteritis virus. *J Virol* 77: 6216-6226.

Wieringa R., A. A. De Vries, S. M. Post et P. J. Rottier (2003b). Intra- and intermolecular disulfide bonds of the GP2b glycoprotein of equine arteritis virus: relevance for virus assembly and infectivity. *J Virol* 77: 12996-13004.

Wills R. W., J. J. Zimmerman, K. J. Yoon, S. L. Swenson, M. J. McGinley, H. T. Hill, K. B. Platt, J. Christopher-Hennings et E. A. Nelson (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol* 55: 231-240.

Wills R. W., A. R. Doster, J. A. Galeota, J. H. Sur et F. A. Osorio (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol* 41: 58-62.

Wissink E. H., H. A. van Wijk, J. M. Pol, G. J. Godeke, P. A. van Rijn, P. J. Rottier et J. J. Meulenbergh (2003a). Identification of porcine alveolar macrophage glycoproteins involved in infection of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Arch Virol* 148: 177-187.

Wootton S., D. Yoo et D. Rogan (2000). Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Arch Virol* 145: 2297-2323.

Wootton S. K. et D. Yoo (2003). Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *J Virol* 77: 4546-4557.

Wu W. H., Y. Fang, R. Farwell, M. Steffen-Bien, R. R. Rowland, J. Christopher-Hennings et E. A. Nelson (2001). A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287: 183-191.

Yang L., M. L. Frey, K. J. Yoon, J. J. Zimmerman et K. B. Platt (2000). Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch Virol* 145: 1599-1619.

Yang S. X., J. Kwang et W. Laegreid (1998). Comparative sequence analysis of open reading frames 2 to 7 of the modified live vaccine virus and other North American isolates of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 143: 601-612.

Yoo D., S. K. Wootton, G. Li, C. Song et R. R. Rowland (2003). Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Virol* 77: 12173-12183.

Yoon K. J., J. J. Zimmerman, S. L. Swenson, M. J. McGinley, K. A. Eernisse, A. Brevik, L. L. Rhinehart, M. L. Frey, H. T. Hill et K. B. Platt (1995). Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest* 7: 305-312.

Yoon K. J., L. L. Wu, J. J. Zimmerman, H. T. Hill et K. B. Platt (1996). Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol* 9: 51-63.

Yoon K. J., L. L. Wu, J. J. Zimmerman et K. B. Platt (1997). Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet Microbiol* 55: 277-287.

Ziebuhr J., E. J. Snijder et A. E. Gorbalenya (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol* 81: 853-879.

Zimmerman J. J., K. J. Yoon, E. C. Pirtle, R. W. Wills, T. J. Sanderson et M. J. McGinley (1997). Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet Microbiol* 55: 329-336.