

**Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier,
Centre de microbiologie et biotechnologie**

**ANALYSE DU MÉCANISME APOPTOTIQUE DE LA GLYCOPROTÉINE
MAJEURE D'ENVELOPPE DU VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET
RESPIRATOIRE PORCIN (VSRRP)**

**par
Guillaume Lachapelle**

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

Jury d'évaluation

Examinateur externe:	Hugo Soudeyns Ph. D. Université de Montréal
Examinateur interne:	François Denis Ph. D. INRS-Institut Armand-Frappier.
Directeur de recherche:	Serge Dea D.M.V. Ph. D. INRS-Institut Armand-Frappier.
Codirecteur de recherche:	Bernard Massie Ph. D. Institut de Recherche en Biotechnologie.

RÉSUMÉ

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) occasionne des pertes économiques importantes à l'industrie porcine du Québec et des pays producteurs de porc par son impact sur la reproduction et la viabilité des porcs. La faible efficacité des vaccins développés jusqu'à maintenant contre ce virus de la famille des *Arteriviridae*, ne permet pas de prévenir correctement la transmission de l'agent infectieux et l'établissement de la maladie causée par le VSRRP. Depuis qu'il fut démontré que la vaccination génétique à l'aide de la glycoprotéine GP₅ permettait la production d'anticorps neutralisants et menait à la protection de porcs contre une infection-défi, le développement d'un vaccin de type recombinant avec cette protéine devint une avenue très prometteuse. Vu leurs nombreux avantages, les adénovirus recombinant humains (AdV) furent choisis afin d'élaborer un vaccin sous-unitaire permettant d'immuniser les porcs contre le VSRRP. Par contre, une toxicité associée à la protéine GP₅ de la souche IAF-Klop du VSRRP, semblable à l'apoptose rapportée pour la même protéine d'une souche Européenne du VSRRP, occasionne d'importantes difficultés à obtenir de haut titre viral. De fortes concentrations en AdV sont souhaitables pour d'éventuelles applications de vaccinations. Les principaux objectifs du présent mémoire de maîtrise sont de caractériser le mode de maturation ainsi que la voie apoptotique de la protéine GP₅ de la souche IAF-Klop du VSRRP, puis de mettre au point une lignée cellulaire exprimant le répresseur CymR et la protéase PS, afin de produire à de hauts titres une nouvelle génération d'adénovirus recombinants à des fins de vaccination génétique chez le porc. Les résultats présentés dans ce mémoire supportent le fait que la protéine GP₅ soit maturée différemment lorsque exprimée par un AdV, mais que ses propriétés immunogéniques sont conservées. Suite à l'observation qu'une certaine toxicité semblable à de l'apoptose accompagnait l'infection de cellules MARC-145 par les AdV/GP₅, le lien entre apoptose et GP₅ fut approfondie. La cascade apoptotique emprunte la voie mitochondriale, par le relargage du cytochrome *c*, suivie de l'activation de la caspase-9 et de la 3. De plus, une lignée cellulaire 293SF CymR PS fut construite afin de permettre la production de forts titres d'AdV exprimant un transgène toxique, puisque son expression sera restreinte dans ce type de cellule. Les adénovirus délétés pour la protéase (PS) produits dans cette lignée complémentaires pour la PS seront un outil important en vaccination ainsi qu'en thérapie génique, puisqu'ils représentent un moyen efficace de stimuler le système immunitaire de l'hôte sans la production de particules virales, donc plus sécuritaire.

Étudiant :
Guillaume Lachapelle

Directeur de recherche:
Serge Dea, DMV, MSc, PhD.

Co-Directeur de recherche :
Bernard Massie, PhD.

AVANT-PROPOS

Ce présent mémoire traite de divers aspects des protéines structurales majeures du VSRRP et de leurs implications/limitations dans l'élaboration d'un vaccin recombinant contre ce syndrome. Les principaux résultats obtenus au cours de la maîtrise sont divisés en trois chapitres. Les deux premiers chapitres sont présentés sous forme de publications scientifiques rédigées en anglais avec un résumé français. Ils traitent de l'expression différentielle des protéines structurales du VSRRP lorsque exprimées par un adénovirus humain recombinant par rapport à l'infection native et de la voie apoptotique de la GPS du VSRRP. Le dernier chapitre traite du développement d'une lignée cellulaire permettant de produire des adénovirus recombinants pour une protéine toxique, qui seraient plus sécuritaires afin d'être utilisés à des fins de vaccination. Bien que ces chapitres contiennent leur propre introduction et discussion, ils seront tout de même encadrés d'une revue bibliographique ainsi que d'une conclusion générale.

TABLE DES MATIÈRES

<u>Analyse du mécanisme apoptotique de la glycoprotéine majeure d'enveloppe du Virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (VSRRP).....</u>	i
<u>Résumé</u>	ii
<u>Avant-propos</u>	iii
<u>Table des matières</u>	iv
<u>Liste des tableaux et figures</u>	vi
<u>Chapitre 1</u>	1
<u>Revue bibliographique.....</u>	1
<u>1.1-Virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin.....</u>	2
<u>1.1.1- Sous un syndrome se cachait un virus.....</u>	2
<u>1.1.2- Glycoprotéine 5: protéine toxique ou cible thérapeutique prometteuse</u>	9
<u>1.2-L'avenir de la vaccination.....</u>	14
<u>1.2.1-Vaccination génétique</u>	15
<u>1.3-Adénovirus recombinant humain</u>	18
<u>1.3.2-Vaccination par l'adénovirus</u>	19
<u>1.3.3-Vecteur adénoviral exprimant un transgène toxique.....</u>	21
<u>1.4-L'apoptose ou mort cellulaire programmée</u>	22
<u>1.5-Objectifs</u>	38
<u>Chapitre 2</u>	39
<u>Maturation de la GP5 du VSRRP.....</u>	39
<u>2.1-Résumé.....</u>	40
<u>2.2-Contribution des auteurs</u>	41
<u>2.3-Premier article</u>	43
<u>Chapitre 3</u>	81
<u>Étude de la voie apoptotique de la GP5.....</u>	81
<u>3.1-Résumé.....</u>	82
<u>3.2-Participation des auteurs</u>	83
<u>3.3-Deuxième publication</u>	85

<u>Chapitre 4</u>	125
<u>Production d'une lignée cellulaire 293 SF exprimant le répresseur CymR et la protéase de l'adénovirus type 2 humain.....</u>	125
<u>4.1-Résumé.....</u>	126
<u>4.2-Introduction</u>	127
<u>4.3-Matériel et méthodes.....</u>	129
<u>4.4-Résultats.....</u>	133
<u>4.5-Discussion</u>	139
<u>4.6-Conclusion</u>	131
<u>Chapitre 5</u>	149
<u>Conclusion générale</u>	149
<u>5.1-Perspectives.....</u>	155
<u>Chapitre 6</u>	156
<u>6.1-Liste des références</u>	156

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Table 1. Comparaison des caractéristiques des protéines codées par les cadres de lecture ouverts (ORFs) 2 à 7 de la souche Nord Américaine et Européenne du VSRRP (tiré et traduit de Dea <i>et al.</i> 2000).	11
Table 2. Pourcentages d'identité en acide aminé entre les ORFs 2 à 7 du virus LV (La souche Hollandaise) avec celle des souches du VSRRP provenant d'autres pays ou d'autres artérovirus (tiré et traduit de Dea <i>et al.</i> 2000).	12
Table 3. Plusieurs virus codent pour des protéines pro-apoptotiques, agissant sur diverses cibles cellulaires.	35
Table 4. Plusieurs protéines virales possèdent des propriétés anti-apoptotiques.....	36
 Figure I. Organisation structurale du virion du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP).	4
Figure II. Organisation transcriptionnelle et traductionnelle du génome double brin de l'adénovirus de type 2.....	7
Figure III. Fonctionnement de l'interrupteur (switch) sensible au cumate.....	23
Figure IV. Représentation des principales voies menant à l'apoptose.....	33
Figure V. Évaluation colorimétrique du potentiel de répression du pool de cellules 293SF CymR.....	131
Figure VI. Évaluation colorimétrique du potentiel de répression des clones cellulaires 293SF CymR.....	135
Figure VII. Évaluation par chémiluminescence du potentiel de répression des clones cellulaires 293SF CymR.	137
Figure VIII. Immunoblot de type Western effectué à l'aide d'un anticorps anti-répresseur CymR.....	142
Figure IX. Cellules 293SF CymR clone N, exprimant la protéine de fluorescence bleue (BFP).....	144

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aa	acide aminé
Ac	anticorps
AcMo	anticorps monoclonal
Ad	adénovirus humain
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AdV	vecteur adénovirus
Ag	antigène
CIAP	«calf intestine alkaline phosphatase» pour : phosphatase alcaline intestinale de veau
CMV IE	«cytomegalovirus immediate early» pour : promoteur précoce immédiat du cytomégalovirus
CTL	cellule T lymphocytaire
EAV	«equine arteritis virus» pour : virus de l'artérite équine
GFP	«green fluorescent protein» pour : protéine fluorescente verte
GFPq	«green fluorescent protein» pour : protéine fluorescente verte commercialisée par Q-biogene
GP	glycoprotéine
HCMV	«human cytomegalovirus» pour : cytomégalovirus humain
i.d.	intra-dermal
i.m.	intra-musculaire
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton
LDV	«lactate dehydrogenase-elevating virus» pour : virus murin élévateur de la lactate déhydrogénase
LTR	«long terminal repeat» pour : longue répétition terminale
LV	Leysland virus
MMTV	«mouse mammary tumor virus» pour : virus tumoral de la glande mammaire de la souris
MOI	«multiplicity of infection» pour: multiplicité d'infection
ORF	«open reading frame» pour : cadre de lecture ouvert
PAM	«porcine alveolar macrophages» pour : macrophage alvéolaire porcin
PAdV	«porcine adenovirus» pour : adenovirus porcin
PAV3	«porcine adenovirus serotype 3» pour : adénovirus porcin sérotype 3
pb	paire de base
PCR	«polymerase chain reaction» pour : réaction de polymérisation en chaîne
PEG	polyéthylène glycol
pfu	«plaque forming units» pour : unité formatrice de plage
PRV	«pseudorabies virus» pour : virus de la pseudorabie
PS	protéase
RE	réticulum endoplasmique
rpm	révolution par minute
s.c.	sous-cutanée
SHFV	virus de la fièvre hémorragique simienne
TCR	récepteur des cellules T
TNF	« tumor necrosis factor »
tTA	«reverse tetracycline transactivator» pour transactivateur tetracycline inverse
VSRRP	virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1-Virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin

1.1.1- Sous un syndrome se cachait un virus

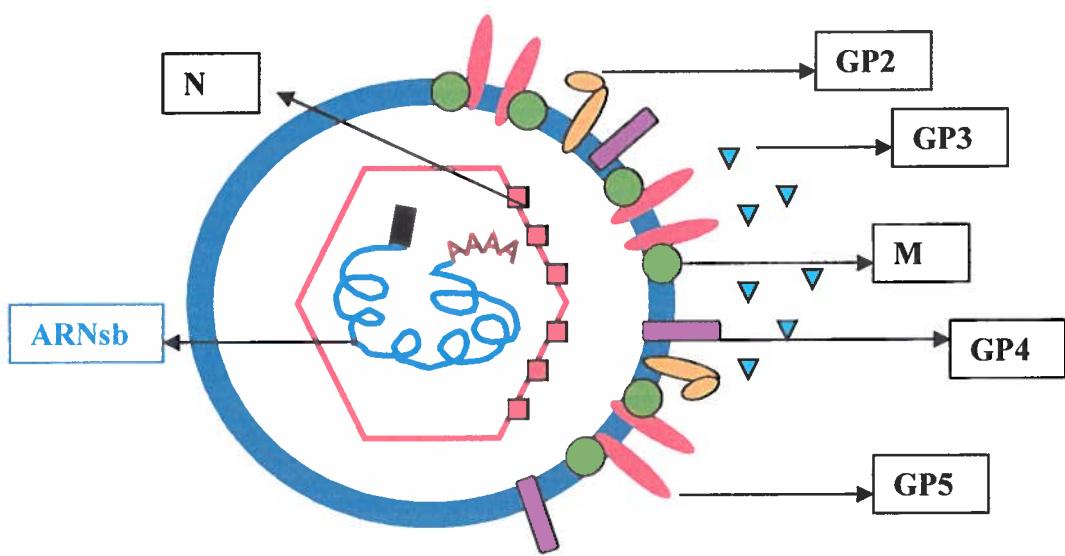
Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) est une maladie infectieuse du porc qui émergea presque simultanément aux États-Unis (Collins, 1992; Keffaber, 1989), au Canada (Bilodeau, Dea et al., 1991), et en Europe (Baron, Albina et al., 1992; Paton, Brown et al., 1991; Wensvoort, Terpstra et al., 1991). De nos jours, le SRRP est endémique dans la plupart des pays producteurs de porcs et est responsable de pertes économiques importantes (Albina, Leforban et al., 1992). Les principales manifestations cliniques de cette maladie sont de sévères problèmes de la reproduction qui affectent les truies de toute parité, et qui se manifestent par des taux accrus de porcelets mort-nés d'avortements tardifs et de mortalité en bas age (Bilodeau, Dea et al., 1991; Pol, 1991), alors que la composante respiratoire de la maladie est associée à une pneumonie interstitielle lymphomononucléaire non-spécifique (Bilodeau, Dea et al., 1991; Christianson, Choi et al., 1993; Halbur, Paul et al., 1995; Rossow, Laube et al., 1996).

L'agent responsable du SRRP fut identifié comme étant un virus à ARN membre de la famille des *Arteriviridae*, du genre *Arterivirus* et appartenant à l'ordre des *Nidovirales*, tout comme le virus de l'artérite équine (EAV), le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV) et le virus murin élévateur de la lactate déhydrogénase (LDV) (Cavanagh, 1997; Conzelmann, Visser et al., 1993; Meulenbergh, Hulst et al., 1994; Plagemann Moennig, 1992). Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP), comme les autres arterivirus (Plagemann, 1996), est très bien adapté à son hôte naturel puisqu'il infecte presque exclusivement les macrophages et les monocytes porcins (Dea, Bilodeau et al., 1992; Voicu, Silim et al., 1994).

Le virion enveloppé se compose d'une capsidé icosaédrique, dont le diamètre fait de 20 à 30 nm (Benfield, Nelson et al., 1992), contenant un génome qui consiste en une molécule d'ARN simple brin d'environ 15 Kb de polarité positive (Conzelmann, Visser et al., 1993). Le génome du VSRRP, tout comme celui du virus de l'artérite équine (EAV), prototype du genre *Arterivirus*, contient huit cadres de lecture ouverts ou ORF («open reading frame») nommés (de 5' à 3') ORF 1a, ORF 1b, et ORF 2 à 7 (Meulenbergh, Petersen-den Besten et al., 1995). Les ORFs 1a et 1b, qui représentent près de 75% du génome, codent pour des protéines associées à des activités répliques et polymérasées

(Conzelmann, Visser et al., 1993; Meulenberg, 2000). Les autres cadres de lecture codent pour des protéines structurales (Mardassi, Mounir et al., 1995; Meulenberg, Petersen-den Besten et al., 1995) : tandis que les glycoprotéines GP2, GP3 et GP4, codées par les ORFs 2 à 4, furent identifiées comme étant des protéines structurales mineures, les protéines codées par les ORFs 5 à 7 sont des protéines structurales majeures puisqu'elles représentent de 90 à 95% du contenu protéique du virion (Kreutz, 1998). Ce sont respectivement; la glycoprotéine majeure de l'enveloppe (GP5), la protéine de membrane (M) et la protéine de la nucléocapside (N) (Bautista, Meulenberg et al., 1996 et *revue dans* Dea, Gagnon et al., 2000) (Figure I). Seulement ces trois protéines structurales majeures furent identifiées à partir du virion purifié et du lysat de cellules infectées (Nelson, Christopher-Hennings et al., 1994; Nelson, Christopher-Hennings et al., 1993). Le virus SRRP pénètre les cellules hôtes par un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendante (Duan, Nauwynck et al., 1998a; Nauwynck, Duan et al., 1999).

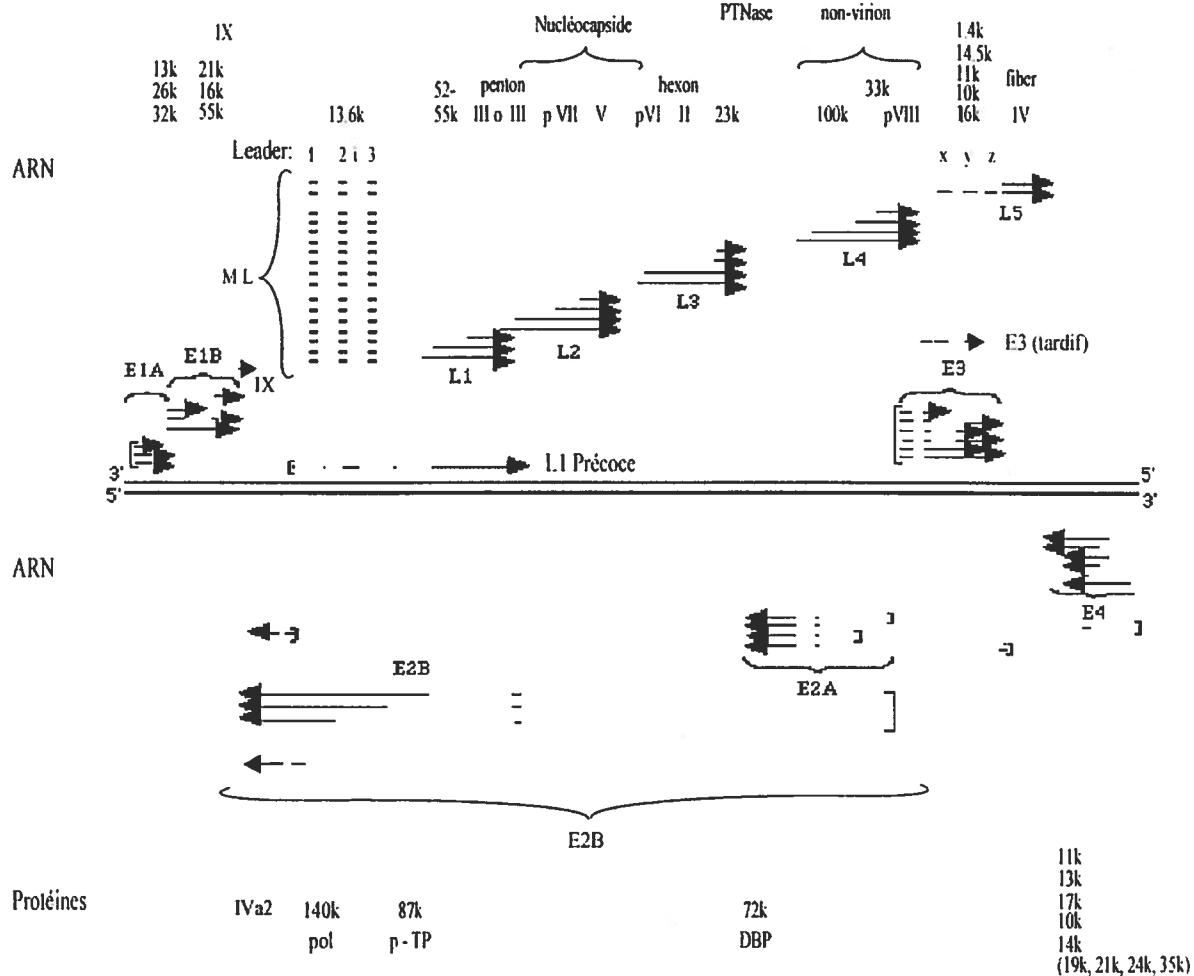
Figure I. Organisation structurale du virion du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) (Tiré de Dea *et al.* 2000 (Dea, Gagnon et al., 2000)). Les glycoprotéines (GP) structurales 2, 3, 4, 5 et la protéine de matrice M constituent ou sont associées à la membrane plasmique, alors que la protéine N forme la nucléocapside, contenant le génome à ARN positif simple brin.



Comme la plupart des virus à ARN enveloppés, les *Arterivirus*, notamment le VSRRP, présentent une certaine variabilité génomique (*revue dans* Snijderet Meulenberg, 1998). Ainsi, les génogroupes européen et nord-américain, représentés respectivement par la souche de Lelystad (LV) et la souche ATCC VR-2332 ne diffèrent que de 21 à 48% au niveau de la séquence des ORFs 2 à 7 (Mardassi, Mounir et al., 1995; Meng, 2000; Murtaugh, Elam et al., 1995). Ces génotypes distincts ont probablement émergés à partir d'un ancêtre commun semblable au virus LDV, comme le suggère la faible variabilité (25-36% de divergence au niveau des aa) existant entre les protéines conservées ORFs 1b et 7 de ces deux souches (Meng, Paul et al., 1995; Murtaugh, Elam et al., 1995; Nelsen, Murtaugh et al., 1999). L'identité en aa des ORFs 2 à 7 fut comparée entre les membres de la famille des *Arteriviridae* et les différentes souches prototypes du VSRRP provenant de différents pays producteurs de porcs (Tableau 1). L'analyse des séquences a permis de démontrer que le VSRRP et le LDV sont plus fortement apparentés entre eux qu'avec l'EAU, et que les protéines codées par les ORFs 3 et 5 sont les plus variables entre les isolats du VSRRP (*revue dans* Dea, Gagnon et al., 2000). Outre certaines divergences au niveau des caractéristiques des protéines produites par les ORFs 2 à 7 entre les souches européennes et nord-américaines du VSRRP (Tableau 2), une grande variabilité antigénique existe entre les souches des deux continents, mais aussi parmi les souches nord-américaines, alors que la variabilité antigénique demeure relativement faible pour les souches européennes (Meng, 2000).

Figure II. Organisation transcriptionnelle et traductionnelle du génome double brin de l'adénovirus de type 2. Le chromosome viral code pour cinq ARNm précoces (désignés E pour «Early» : E1A, E1B, E2, E3, et E4) et une unité de transcription tardive, qui sera clivé en cinq ARNm tardifs (désignés L pour «Late» : L1 à L5). Des régions de transcriptions peuvent aussi être «précoces retardées», comme les ARNm *IVa2* et *IX*. La plupart des ARNm tardifs sont produits grâce au TPL (pour «tripartite leader»), dont les composantes sont désignées 1, 2 et 3. Certains ARNm tardifs contiennent aussi les segments leaders i, y ou z. Les polypeptides produits sont identifiés en chiffres Romains par la structure du virion et par taille (kDa) pour les polypeptides non-structuraux. La transcription des protéines non-structurales peut survenir de façon précoce (DBP, DNA pol) ou tardive (maturation 52/55kDa, protéine de 33kDa et 100kDa).

Protéines



1.1.2- Glycoprotéine 5: protéine toxique ou cible thérapeutique prometteuse

1.1.2.1- BIOLOGIE ET FONCTION DE LA GP5

Le cinquième cadre de lecture ouvert du génome du VSRRP code pour une glycoprotéine de 24.5-26 kDa associé à l'enveloppe du virion. Malgré de grandes variations génomiques entre les GP5 d'isolats nord-américains et européens, les profils hydropathiques sont conservés et ils possèdent tous plusieurs sites de glycosylation qui leur sont caractéristiques. Par exemple, la GP5 de la souche canadienne IAF-Klop possède trois sites potentiels de glycosylation (positionnés aux aa 30-32, 44-46 et 51-53 alors que la souche américaine ATCC VR-2332 en possède un supplémentaire (positionné au niveau des aa 33-35) et que seulement les sites des positions en aa 44-46 et 51-53 sont conservés pour la souche LV (Mardassi, Mounir et al., 1995; Meulenberg, Hulst et al., 1994; Murtaugh, Elam et al., 1995; Pirzadeh, Gagnon et al., 1998). Comme pour son analogue, la protéine G_L du EAV, il existe des ponts disulfures entre la GP5 et la protéine M du VRRSV résultant en la formation d'hétérodimères, probablement au niveau du RE, puisqu'un anticorps monospécifique contre la GP5 ou la M co-précipite les deux protéines (Mardassi, Massie et al., 1996).

Bien que la protéine codée par l'ORF 5 est d'une importance capitale pour l'infectivité du virus, son rôle biologique demeure encore obscur. Pol *et al.* ont proposé que la GP5 puisse jouer un rôle dans l'assemblage du virion (Pol, Wagenaar et al., 1997). La plupart des auteurs s'accordent quant à la possibilité que la protéine responsable du tropisme du virus soit l'une de ses protéines structurales majeures (Duan, Nauwynck et al., 1998a; Kreutz, 1998). Le fait que des anticorps neutralisants dirigés contre la GP5 puissent procurer une immunité protectrice est très suggestif quand à son implication dans l'attachement aux récepteurs cellulaires et/ou dans le processus de pénétration du cytoplasme (Pirzadeh et Dea, 1998). Un groupe de chercheurs américains, impliqués dans la recherche sur le LDV, suggère que la formation d'hétérodimères GP5-M puisse stabiliser le virus au niveau de son site d'attachement avec le récepteur de la cellule hôte, puisque la dissociation de ces hétérodimères diminue l'infectivité du virus (Faaberg, Even et al., 1995). Il est probable qu'une molécule apparentée à l'héparine, localisée à la surface des cellules permitives, puisse servir de molécule d'attachement pour le virus. Cette possibilité a été envisagée suite à la démonstration que l'infection des cellules MARC-145 par le VSSRP peut être inhibée en incubant au préalable le virus avec de l'héparine, et aussi

en pré-traitant les cellules avec de l'héparinase (Jusa, Inaba et al., 1997; Therrien, St-Pierre et al., 2000). Ceci fut récemment confirmé par le groupe de Delputte (2002) qui a démontré que l'attachement du VSRRP aux macrophages alvéolaires porcins (PAM) peut être fortement réduit suite à leur pré-traitement avec de l'héparine. Cet effet semble dose-dépendant et les cellules deviennent réfractaires aux souches tant américaines qu'europeennes (Delputte, Vanderheijden et al., 2002). Un récepteur de type protéoglycane-hépariné est impliqué dans la liaison des virus cytomégalovirus humain, herpès porcin type 1 et le virus Sindbis (Byrneset Griffin, 1998; Kariet Gehrz, 1992; Mettenleiter, Zsak et al., 1990; Neyts, Snoeck et al., 1992). L'effet inhibiteur de l'héparine sur la liaison du VSRRP aux cellules PAM peut aussi être obtenu en pré-incubant les PAM avec de l'héparinase pour des temps variables. Toutefois, les résultats démontrent que l'infection des cellules par le VSRRP ne peut être bloquée complètement suite au traitement à l'héparine, d'où la possibilité de la présence d'un second récepteur intervenant au niveau de l'entrée du VSRRP dans les cellules permissives (Delputte, Vanderheijden et al., 2002). Aussi, un groupe rapporte qu'un AcMo dirigé contre une protéine de surface des cellules PAM de 210 kDa bloque partiellement l'infection par le SRRP. Puisque cet AcMo ne peut complètement bloquer l'infection par le VSSRP, il a été suggéré qu'un second récepteur était requis pour permettre l'entrée du virus (Duan, Nauwynck et al., 1998a; Duan, Nauwynck et al., 1998b).

Table 1. Comparaison des caractéristiques des protéines codées par les cadres de lecture ouverts (ORFs) 2 à 7 de la souche Nord Américaine et Européenne du VSRRP (tiré et traduit de Dea *et al.* 2000).

Gène produit par la région codante	Protéine	Nombre de résidus en aa		M_r Prédicté (kDa)	M_r Apparente (kDa)	Nombre de site de Glycosylation	
		Euro	NAm			Euro	NAm
ORF2	GP ₂	249	256	28.4	29.4	29-30	27-29
ORF3	GP ₃	256	254	30.6	29.0	45-50	42-45
ORF4	GP ₄	183	178	20.0	19.6	31-35	31-35
ORF5	GP ₅	201	200	22.4	22.4	25	24-26
ORF6	M*	173	174	18.9	19.1	18	19
ORF7	N*	128	123	13.8	13.6	15	14-15

Euro = souche Européenne; NAm = souche North Américaine

*= En dépit de potentiels sites de glycosylation, ces protéines ne sont pas glycosylées

Les données furent adaptées de Mardassi *et al.* 1995, Meulenberg *et al.* 1993 et 1995, Meng *et al.* 1995a et 1995, Morozov *et al.* 1995 et Pirzaheh *et al.* 1998.

Table 2. Pourcentages d'identité en acide aminé entre les ORFs 2 à 7 du virus LV (La souche Hollandaise) avec celle des souches du VSRRP provenant d'autres pays ou d'autres artérovirus (tiré et traduit de Dea *et al.* 2000).

Gène produit par LV ^a	Souche virale et origine								AEV ^t
	PRRSV-10 ^b	VR-2332 ^c	VR-2385 ^d	IAF-Klop ^e	DK111-92 ^f	Olov/91 ^g	CH-1a ^h	MD-001 ⁱ	
Allemagne	É.-U.	É.-U.	Danemark	Chine	Taiwan	Japon	Souche C	Bucyrus	
ORF2	99	63	62	59	94	97	58	60	ND
ORF3	99	60	57	54	88	94	56	55	28
ORF4	99	70	69	68	91	94	68	67	30
ORF5	99	55	54	52	93	93	54	52	47
ORF6	100	79	78	81	94	97	80	79	77
ORF7	100	64	57	59	97	99	60	59	44
									20

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

Les renseignements sur les séquences furent tirés de:

^a Meulenbergh et al. 1993, EMBL/GenBank numéro d'accès M96262; ^b Conzelmann et al. 1993, EMBL/GenBank numéro d'accès L04493;

^c Murtaugh et al. 1995, EMBL/GenBank numéro d'accès U00153; ^d Meng et al. 1995a et 1995b, EMBL/GenBank numéro d'accès U03040 ;

^e Mardassi et al. 1995, GenBank numéro d'accès U64928, AF003345, AF003344, AF003343; ^f Madsen et al. 1998, GenBank numéro d'accès AJ223078, avant

l'introduction au Danemark de la souche Américaine vaccinale MLV du virus SRRP; ^g Plana Duran et al. 1997, GenBank numéro d'accès X92942; ^h Tong et al. [non-publié], GenBank numéro d'accès AF132118; ⁱ Chueh et Lee [non-publié], GenBank numéro d'accès AF121131; ^j Takikawa [non-publié], GenBank numéro d'accès AB023782; ^k Godeny et al. 1993, ^k den Boon et al. 1991, GenBank.

Tableau originellement adapté en partie de Meulenbergh et al. 1997. Tableau traduit de Dea et al. (Dea, Gagnon et al., 2000)

1.1.2.2- PROTECTION CONFÉRÉE PAR LA GP5

Il a été démontré que la GP5 était porteuse de déterminants antigéniques associés à la neutralisation du VSRRP. Jusqu'à ce jour, la topographie de ces déterminants n'a pas encore été complétée, mais les résultats de certains auteurs suggèrent que certains sont de nature linéaire et localisées au niveau de l'extrémité C-terminale de la molécule, tandis que d'autres sont plutôt de nature conformationnelle (Pirzadehet Dea, 1997; Weiland, Wieczorek-Krohmer et al., 1999; Weiland, Bolz et al., 2000; Zhang, Sharma et al., 1998). Apparemment, ces derniers ne semblent pas être influencés par la glycosylation puisque les AcMo réagissent autant avec la forme glycosylée que non-glycosylée de la GP5 (Pirzadehet Dea, 1997). Des AcMo dirigés spécifiquement contre la GP5 du VSRRP sont reconnus comme neutralisant l'infection par le virus, comme chez le LDV et le EAV avec leur équivalent de la GP5 (Gonin, Pirzadeh et al., 1999; Pirzadeh et Dea, 1997; Pirzadeh, Gagnon et al., 1998; Weiland, Wieczorek-Krohmer et al., 1999; Zhang, Sharma et al., 1998). Des essais basés sur des peptides synthétiques et sur des mutants de délétion de la GP5 ont permis de déterminer au moins deux domaines antigéniques importants (Dorval *et al.*, *comm. pers.dans* Dea, Gagnon et al., 2000) et suggèrent une grande importance de la région C-terminale pour les déterminants antigéniques et/ou dans le rôle du maintien conformationnel de la protéine (Dea, Gagnon et al., 2000).

La revue de la littérature se rapportant à l'immunisation des porcs par vaccination à l'aide de GP5 synthétique, ou de vaccin à ADN codant pour le gène de l'ORF 5 se retrouve à la section 1.2.1.1-VSRRP et vaccination du présent chapitre.

1.1.2.3- LA GP5 PEUT INDUIRE L'APOPTOSE

Il fut d'abord démontré que le génotype européen du VSRRP pouvait induire l'apoptose dans les lignées permissives PAM et cellules de reins de singe, malgré la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Suarez, Diaz-Guerra et al., 1996). Puis, il fut démontré que les souches du génogroupe américain pouvaient aussi induire l'apoptose sur des cellules de différents tissus (Sur, Doster et al., 1998; Sur, Doster et al., 1997). La protéine GP5 fut associée à ce phénomène en montrant que son expression allait de pair avec une augmentation du nombre de cellules en apoptose (Suarez, Diaz-Guerra et al., 1996). Le mécanisme par lequel la GP5 provoque l'apoptose est largement méconnu, puisqu'aucun des marqueurs spécifiques propres à l'apoptose ne fut analysé autre la morphologie, et les méthodes visant à montrer la fragmentation de l'ADN (migration des fragments d'ADN de petite taille sur gel d'agarose ou TUNEL) (Fernandez, Suarez et

al., 2002; Suarez, Diaz-Guerra et al., 1996; Sur, Doster et al., 1998; Sur, Doster et al., 1997). La transfection transitoire de divers mutants de délétion du gène de l'ORF 5 du PRRSV d'un isolat européen a permis de démontrer que les aa 90 à 119 ont un rôle fondamental dans l'induction de l'apoptose (Fernandez, Suarez et al., 2002). En 1998, le groupe de Sirinarumitr a proposé que l'apoptose induite par une souche américaine du VSRRP soit déclenchée de façon co-latérale (« bystander »). Pour ce faire, ils ont démontré par TUNEL que les cellules mourant d'apoptose étaient non-infectées par le VSRRP, alors que les cellules contenant des particules virales restaient saines (Sirinarumitr, Zhang et al., 1998). L'hypothèse énonçant la possibilité d'une apoptose collatérale fut énoncée environ au même moment par Sur et son groupe suite à des observations semblables (Sur, Doster et al., 1998) dans les tissus, puis dernièrement supportée par Kim et al. (Kim, Benfield et al., 2002).

1.2-L'avenir de la vaccination

La vaccination demeure l'outil le plus efficace pour prévenir les pertes animales occasionnées par les maladies infectieuses. Elle permet d'induire une réponse immune capable de limiter l'infection après une exposition au pathogène naturel, tout en évitant les conséquences négatives de l'infection. Pendant des décennies, les vaccins traditionnels de type atténué ou tué utilisés par les vétérinaires ont démontré leur efficacité contre bon nombre d'agents infectieux (variole et poliomyélite). Toutefois, plusieurs désavantages, tel qu'un possible regain de virulence et des effets secondaires indésirables, une réponse immunitaire faible et peu persistante, leurs coûts et conditions d'entreposage, orientent vers la recherche de vaccins économiques plus sécuritaires et efficaces, pouvant stimuler une forte réponse cellulaire et humorale sans nécessité de rappel (*revue dans* Bowersock et Martin, 1999; van Drunen Littel-van den Hurk, Gerdts et al., 2000).

Tous les pathogènes, et particulièrement les virus (Morrow, Novak et al., 1999), doivent débuter leur infection par les muqueuses (la colonisation des muqueuses) avant de migrer vers leur site de prédilection. Il est donc indispensable d'en stimuler l'immunité lors de vaccination, surtout en considérant que 80% des immunocytes se trouvent associés à ces surfaces et qu'un virus vaccinal se répliquant au niveau des muqueuses pourrait théoriquement stimuler l'immunité mucosale en plus d'une réponse immune systémique (*revue dans* Czerniksky, Anjuere et al., 1999). La voie d'injection est un facteur important dans l'induction d'une réponse protectrice. Par exemple, la réponse immunitaire stimulée par l'injection intramusculaire ou sous-cutanée favorise

l'établissement d'une forte réponse en anticorps de type IgG, ne passant pas nécessairement la barrière des muqueuses, et par conséquent, ne pouvant protéger de la réinfection (*revue dans Bowersock et Martin, 1999*). Selon la voie d'introduction, les vaccins à ADN peuvent induire une réponse mucosale et une immunité cellulaire et aussi humorale, tel que décrit pour plusieurs modèles de maladies murines et de primates (Ban, van Ginkel et al., 1997; Darji, zur Lage et al., 2000; Jones, Corris et al., 1997). Ces vaccins sont avantageux puisqu'ils imitent l'effet des vaccins atténusés dans leur capacité à induire une réponse cellulaire CMH de classe I, peuvent inclure des motifs CpG agissant comme adjuvant naturel sécuritaire et efficace (Ban, Dupre et al., 2000; Decker, Schneller et al., 2000; Krieg, 2000). Il faut aussi tenir compte de leur faible coût de production et de la possibilité de permettre le discernement des individus vaccinés des individus infectés par le pathogène sauvage pour la surveillance des maladies infectieuses (Gurunathan, Sacks et al., 1997; van Drunen Littel-van den Hurk, Gerdts et al., 2000).

1.2.1-Vaccination génétique

Dans un but de vaccination génétique chez l'animal, la méthode d'administration d'ADN est importante. Que ce soit couplé à des lipides ou autres produits favorisant l'entrée d'ADN nu dans les cellules, ou couplé à des billes d'or et injecté dans les tissus avec un pistolet à air comprimé, l'injection de plasmides reste peu efficace, en plus de nécessiter beaucoup de matériel pour les gros animaux (Babiuk, Lewis et al., 1999; Babiuk, van Drunen Littel-van den Hurk et al., 2000; Gurunathan, Sacks et al., 1997). L'utilisation de vecteurs viraux pour acheminer un antigène est avantageuse puisqu'elle peut induire une réponse immunitaire cellulaire et humorale, voir même stimuler l'immunité des muqueuses dépendamment du virus et de la voie d'injection (Babiuk, van Drunen Littel-van den Hurk et al., 2000; Morrow, Novak et al., 1999). Le vecteur poxvirus réplicatif, exprimant une glycoprotéine du virus de la rage, fut l'un des premiers vaccins viraux utilisés (Brochier, Aubert et al., 1996). Pour des raisons de sécurité, l'utilisation des vecteurs viraux non-réplicatifs est maintenant favorisée, tel l'adénovirus défectif ou le poliovirus non-réplicatif (Morrow, Novak et al., 1999; Porter, Kochel et al., 1998) et le virus de la vérole du canari (Rolphet Ramshaw, 1997), ne pouvant se répliquer que chez les mammifères (Babiuk et al., 2000; Randrianarison-Jewtoukoff et Perricaudet, 1995). Le potentiel de vaccination génique de quelques autres virus, tel le virus Sinbis et de l'influenza, est présentement à l'étude (Morrow, Novak et al., 1999).

1.2.1.1-SRRP ET VACCINATION

Des vaccins de type atténus ou sous-unitaires visant à prévenir du VSRRP sont actuellement disponibles commercialement. Les vaccins de type atténus (RespPRRS, Boehringer Ingelheim Inc.; PrimePac PRRS, Schering-Plough Animal Health), permettent de diminuer la durée de la virémie et à mieux protéger les animaux, alors que chez les vaccins de type sous-unitaire (CyBlue, Laboratorios Sobrino, S.A.), aucun n'est actuellement satisfaisant puisqu'une virémie et une propagation aux autres animaux sont observées. L'élaboration d'un vaccin de type sous-unitaire ou recombinant efficace contre le VSRRP impliquerait la stimulation d'une réponse immunitaire protectrice, probablement à partir des muqueuses (*revue dans* Czerkinsky, Anjuere et al., 1999) sans qu'une réactivation de la souche soit possible, en plus de permettre de distinguer les porcs infectés de ceux immunisés, ce qui constituerait un avantage important pour l'industrie porcine du Québec (Gagnon, 2001). Pour que ce vaccin puisse induire une immunité protectrice, il se doit de stimuler le système immunitaire du porc à produire des anticorps permettant de neutraliser l'infection par le VSRRP.

La vaccination de porcs à l'aide d'une protéine GST-GP5 produite chez *E. coli* n'entraîne pas la production d'anticorps neutralisants (Pirzadeh, Gagnon et al., 1998). Cette injection peut même aggraver les symptômes du SRRP (Pirzadeh, Gagnon et al., 1998), probablement par le phénomène des anticorps facilitants ou phénomène ADE pour « antibody-dependant enhancement », déjà observé chez les porcs en présence de VSRRP (Yoon, Wu et al., 1996). La cible principale du VSRRP étant les macrophages possédant bon nombres de récepteurs pour la portion Fc des anticorps, il est fort possible que les anticorps ayant fixé le VSRRP facilitent l'infection du macrophage via son récepteur Fc (Gagnon, 2001). Cependant, la vaccination des porcs à l'aide d'une protéine GP5 recombinante, produite dans un système eucaryote d'insecte (baculovirus), confère une protection partielle contre le VSRRP (Plana Duran, Climent et al., 1997).

Une immunité protectrice associée à la production d'anticorps neutralisants dirigés contre la GP5 a pu être obtenue *in vivo* chez le porc et la souris BALB/c par vaccination génétique suite à l'injection intramusculaire (i.m.) d'un plasmide recombinant portant le gène codant pour la GP5 du VSRRP, sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus humain (HCMV) (Pirzadeh, Gagnon et al., 1998). Les porcs immunisés par vaccination génétique ont développé une immunité les protégeant contre la manifestation des signes cliniques, de la virémie, et des lésions macroscopiques et histopathologiques pulmonaires,

suite à l'infection-défi avec la souche de VSRRP IAF-Klop. Les cellules du sang périphérique des porcs génétiquement immunisés furent soumises à des tests de prolifération lymphocytaire pour révéler la présence d'une réponse immunitaire cellulaire spécifique anti-GP5 (Pirzadeh, Gagnon et al., 1998). Aussi, l'injection i.m. de vecteurs adénovirus non-réplicatifs avec un ORF 5 modifié a suscité la production d'anticorps neutralisants dirigés contre la GP5 (*comm. pers.* Cléroux et al., résultats non-publiés). Des anticorps neutralisants contre l'infection du EAV furent produits chez la souris suite à la co-expression des ORFs 5 et 6 du EAV dans des particules réplicatives du virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (Balasuriya, Heidner et al., 2000). Seul ou via l'interaction avec une autre protéine structurale de l'enveloppe, la GP5 du VSRRP, ou son équivalent chez les autres *Arteriviridae*, semble être un excellent candidat pour l'élaboration d'un vaccin, par ses capacités à induire la production d'anticorps pouvant neutraliser l'infection des dits virus (Oleksiewicz, Botner et al., 2001). Bien que d'autres protéines du VSRRP semblent avoir une certaine importance dans l'induction d'une immunité protectrice, telles les GP3, GP4 et la M qui, selon certains auteurs sont capables d'induire la production d'AcMo neutralisants (Meulenberg, Petersen den Besten et al., 1997; Plana Duran, Climent et al., 1997; van Nieuwstadt, Meulenberg et al., 1996; Yang, Frey et al., 2000). Par contre, la GP5 du VSRRP reste actuellement la protéine la plus prometteuse comme candidat pour les vaccins sous-unitaires (Pirzadeh et Dea, 1997; Pirzadeh, Gagnon et al., 1998). Toutefois, il n'est pas impossible que des protéines non-structurales codées par différentes régions de l'ORF 1, représentant près de 75% du génome, puissent jouer un rôle dans l'immunité protectrice (Gagnon, 2001).

1.3-Adénovirus recombinant humain

Isolé depuis plus de 50 ans (Rowe, 1953), ce virus icosahédrique et non-enveloppé compte une centaine de sérotypes, dont 47 pouvant causer des maladies bénignes chez l'humain en cas d'infection, principalement le rhume, des conjonctivites ou des gastro-entérites (Horwitz, 1996). De tropisme naturel pour les cellules épithéliales, l'adénovirus (Ad) peut infecter une grande variété de cellules, indépendamment de la réPLICATION de ces dernières (Horwitz, 1996; Oualikene et Massie, 2000). L'entrée du virus dans la cellule hôte par endocytose récepteur-dépendante se déroule d'abord par l'attachement de la fibre au récepteur CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor), puis l'internalisation s'effectue par la liaison du motif RGD (Arg-Gly-SDP) de la base du penton aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ et β_5 , servant ainsi de co-récepteurs (Varga, Weibull et al., 1991; Wickham,

Mathias et al., 1993). La caractéristique qui en fait le vecteur viral le plus efficace demeure leur capacité à se répliquer à des taux très élevés, jusqu'à saturer les mécanismes cellulaires avec plus de 3×10^4 unités infectieuses (IU) par cellule (Oualikene et Massie, 2000). Le génome d'environ 35 Kb de ce virus à ADN double brin peut être divisé en deux types de gènes selon le moment de leur expression; soit les gènes précoce E1 à E4 (E pour « Early ») et les gènes tardifs L1 à L5 (L pour « Late »). Sommairement, les gènes précoce permettent la prise en charge de la machinerie cellulaire de l'hôte (certains gènes des régions E1B et E4), le contrôle de l'expression des gènes viraux, de la stabilisation des ARNm et de la stimulation du promoteur majeur des gènes tardifs (MLP) (certains gènes des régions E1A, E1B, E2A et E2B), et l'évasion du système immunitaire de l'hôte, notamment en protégeant de la cytotoxicité des cellules T, du TNF (« tumor necrosis factor ») et du ligand de Fas (certains gènes de la région E3). Les gènes tardifs produisent principalement les protéines structurales du virion, suite à un phénomène d'épissage alternatif (Figure II) (Horwitz, 1996; Oualikene et Massie, 2000; Shenk 1996).

1.3.1.1-VECTEURS ADÉNOVIRaux

Les sérotypes Ad2 et Ad5 du sous-groupe C sont les types de vecteurs (AdV) les plus utilisés puisqu'ils ne sont associés à aucune maladie sévère, n'induit pas d'effets tumorigènes chez les rongeurs, et sont les plus documentés (*revue dans* Oualikene et Massie, 2000). Les AdV furent d'abord employés comme vecteurs pour la production de protéines recombinantes, pour être progressivement utilisés en vaccination génétique (Randrianarison-Jewtoukoff et Perricaudet, 1995) et comme vecteur de transfert génique chez les animaux et les humains (Acsadi, Massie et al., 1995). Selon l'application désirée, deux types d'AdV furent développés, soit les virus non-défectifs, désirables en vaccination puisque le nombre élevé de copies du génome viral favorise une forte expression du transgène qui stimule le système immunitaire, et les virus défectifs, principalement utilisés dans la production de protéines recombinantes et pour des études fonctionnelles (*revue dans* Oualikene et Massie, 2000). Puisque la capacité d'encapsidation du virus est limitée, l'élimination de certains gènes ou régions du génome de l'AdV permet d'augmenter la capacité du vecteur. La délétion de la région E3, permettant d'échapper à la vigilance immunitaire de l'hôte, ne met pas en péril la réPLICATION du virus, mais ne permet qu'une insertion maximale de 4.7 Kb. Pour insérer un plus grand transgène, une région essentielle au cycle réPLICATIF du virus doit être supprimée. Les AdV de première (délétés pour les gènes précoce essentiels à l'initiation de la transcription de la région E1 et pour la région

E3) et de deuxième génération (délétés pour E1, E3, E2A, E2b et/ou E4 complet), permettent l'insertion d'un transgène de 8 Kb et 11 Kb, respectivement (Oualikene et Massie, 2000), alors qu'un vecteur de troisième génération, ne contenant que la séquence d'encapsidation et les ITR, offre une capacité de 27 à 38 Kb, mais nécessite l'aide d'un second virus (Fisher, Choi et al., 1996; Kochanek, Clemens et al., 1996; Parks, Chen et al., 1996). Les AdV E1- sont les virus défectifs les plus utilisés et nécessitent la trans-complémentation des gènes E1A et E1B, produits de façon constitutive par des lignées complémentaires telles les cellules 293 (Graham, Smiley et al., 1977). Un vecteur adénoviral réplicatif non-disséminatif fut dernièrement produit par la délétion de la protéase (PS) (Oualikene, Lamoureux et al., 2000), gène de la région L3 codant pour une enzyme nécessaire à plusieurs étapes de la maturation du virion (Weber, 1995). L'AdV défectif en PS, produit dans des cellules complémentaires exprimant la PS, ne sera capable que d'un cycle réplicatif lors d'infection puisque son ADN sera répliqué, mais aucune progéniture virale ne sera produite ou assemblée (Oualikene, Lamoureux et al., 2000).

1.3.2-Vaccination par l'adénovirus

La plupart des sérotypes adénoviraux entrent et se répliquent initialement au niveau des muqueuses des conduits respiratoires et gastro-intestinaux (Horwitz, 1996), ce qui en fait un vecteur attrayant pour acheminer des vaccins aux surfaces des muqueuses (Babiuk et Tikoo, 2000), conduisant à la stimulation d'une réponse humorale forte (Xiang et Ertl, 1999). Les voies d'injection préconisées en vue de vaccination génétique sont la voie oronasale et intra-trachéale. D'après les résultats préliminaires de Babiuk et Tikoo obtenus avec l'AdV bovin, il semble que l'injection oro-nasale soit plus efficace que la voie intra-trachéale. Ils suggèrent que par la voie intra-nasale, le virus se lie aux muqueuses nasales avant sa neutralisation par les anticorps, alors que l'administration intra-trachéale mène à la neutralisation du virus avant qu'il ne puisse initier l'infection (Babiuk et Tikoo, 2000). En plus des caractéristiques avantageuses des AdVs mentionnés ci-haut, l'absence d'enveloppe rend l'AdV moins sensible à son environnement, contrairement aux virus enveloppés (Babiuk et Tikoo, 2000). En plus des AdVs humains utilisés en vaccination génétique dans des modèles animaux comme la souris (Xiang et Ertl, 1999; Xiang, Yang et al., 1996), des vaccins sont aussi développés à partir d'AdV porcins, bovins, ovins, canins et aviaires (Francois, Eterradossi et al., 2001; Klonjkowski, Gilardi-Hebenstreit et al., 1997; Mittal, Prevec et al., 1995; Reddy, Idamakanti et al., 1999a; Reddy, Idamakanti et al., 1999b; Sheppard, Werner et al., 1998; Xu, Hyatt et al., 1997). Une expérience

comparant la capacité des vecteurs AdV non-réPLICATIF et poxvirus à stimuler le système immunitaire d'animaux en exprimant un même transgène, démontre que l'AdV induit une plus forte production d'anticorps sans que la survie des animaux n'en soit réduite (Gonin, Oualikene et al., 1996). Cependant lors d'une expérience semblable avec le virus de la vaccine recombinant (rVV) réPLICATIF, l'AdV a permis une immunité protectrice suite à une infection-défi (Xiang, Yang et al., 1996). L'interprétation de tels résultats reste cependant incertaine puisque les effets observés peuvent résulter de variations dans l'expression du transgène selon le système étudié (Castagner, 2002).

1.3.2.2-IMMUNISATION DE PORCS PAR UN VACCIN ADÉNOVIRAL

Les avantages que permet la vaccination par les AdVs recombinants ont été démontrés pour immuniser les porcs contre certaines maladies infectieuses porcines. Une réponse protectrice fut obtenue chez des porcs suite à une immunisation par un AdV exprimant la protéine complète ou partielle des péplomères (ou spicules) (S) du coronavirus de la gastro-entérite transmissible du porc (GET) (Smerdou, Torres et al., 1993; Torres, Sanchez et al., 1995) et contre la glycoprotéine D du virus de la pseudoroge (PRV) lors d'une infection-défi par le PRV 16 semaines après une vaccination intramusculaire de porcelets nouveau-nés, suivie ou non d'un rappel (Ambriovic, Adam et al., 1997; Monteil, Le Pottier et al., 2000). Ces résultats ouvrent la voie à une vaccination précoce chez les porcelets nés d'une mère déjà vaccinée ou infectée, ce qui démontre que la présence d'anticorps maternels n'inactivent pas nécessairement le vaccin (Ambriovic, Adam et al., 1997; Monteil, Le Pottier et al., 2000). Par la suite, le groupe de Torres a analysé la réponse cellulaire en antigènes spécifiques contre la protéine S du virus de la GET par immunohistochimie, suite à la vaccination par différentes voies d'administrations des porcs avec un AdV réPLICATIF déléte E3. Les résultats démontrent une meilleure efficacité de la vaccination par voie intra-nasale, puisque les antigènes spécifiques se retrouvent dans les macrophages alvéolaires porcins (PAM), les pneumocytes de type II et dans des cellules épithéliales des bronchioles (Torres, Alonso et al., 1996). Enfin, un groupe a démontré que l'injection d'un rappel, avec un Ad homologue à celui ayant permis l'immunisation première, ne diminue aucunement l'efficacité de la vaccination, puisqu'une immunité protectrice fut obtenue contre le virus de la fièvre aphthuse, et que cette immunité n'était que plus accentuée suite au rappel (Mayr, Chinsangaram et al., 1999; Mayr, O'Donnell et al., 2001).

1.3.3-Vecteur adénoviral exprimant un transgène toxique

L'expression d'un transgène toxique sous le contrôle d'un promoteur constitutif peut compromettre la production des AdVs recombinants. Le stress cellulaire produit par une protéine de ce type peut mener la cellule infectée vers la mort cellulaire par apoptose avant qu'elle n'ait pu répliquer le virus à de forts niveaux (Bruder, Appiah et al., 2000; Massie, Couture et al., 1998; Matthews, Cummings et al., 1999). Pour contrer ce problème, les recherches se sont tournées vers l'utilisation de promoteurs inductibles ou répressibles, permettant ainsi de contrôler l'expression du transgène pendant la phase de production des AdVs (Massie, Couture et al., 1998; Matthews, Cummings et al., 1999). Par contre, l'efficacité de certains promoteurs beaucoup utilisés dans les cellules de mammifères, tel le système inductible tTA (Gossen, Bonin et al., 1993), connaît une efficacité variable selon le type cellulaire et peut aussi avoir une expression basale du transgène, même lorsque l'expression est censée être nulle, dans certaines lignées cellulaires (Mullick et Massie, 2001). Le promoteur CMV5CuO, développé récemment par Mullick et Massie (2001), possède un opérateur (CuO) comprenant une série de répétition d'éléments sensibles au répresseur CymR. Ce système fut isolé à partir d'éléments responsables de la voie de dégradation du *p-cymene* (cumate) chez *Pseudomonas putida* F1 (Mullick et Massie, 2001). Lorsque le répresseur CymR est présent, sa liaison avec les éléments de l'opérateur CuO inhibe la transcription du transgène, alors que la transcription s'effectue normalement lorsque le CymR est absent. Il est aussi possible de bloquer l'action inhibitrice du CymR, en ajoutant du cumate qui se fixera sur le CymR pour l'empêcher d'agir (Figure III). La production d'AdV contenant un transgène toxique sera possible en produisant cet AdV, contenant ledit transgène sous le contrôle du promoteur CMV5CuO, dans une lignée dite «répressive» qui exprimera le CymR de façon constitutive (Figure III) (Mullick et Massie, 2001).

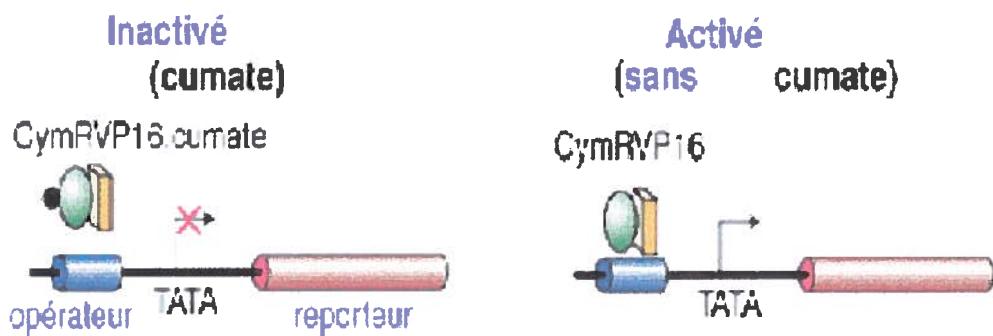
Une autre solution consiste à incorporer de façon stable un gène anti-apoptotique dans la lignée cellulaire complémentaire chargée de produire le virus. Des résultats encourageants furent obtenus avec une lignée exprimant la protéine anti-apoptotique CrmA du poxvirus afin de produire un AdV exprimant le ligand de Fas (Bruder, Appiah et al., 2000). Le chapitre 4 du présent mémoire traite de la mise au point d'une lignée cellulaire permettant de restreindre l'expression du transgène lors de la production et de l'amplification d'un virus codant pour un transgène toxique.

1.4-L'Apoptose ou mort cellulaire programmée

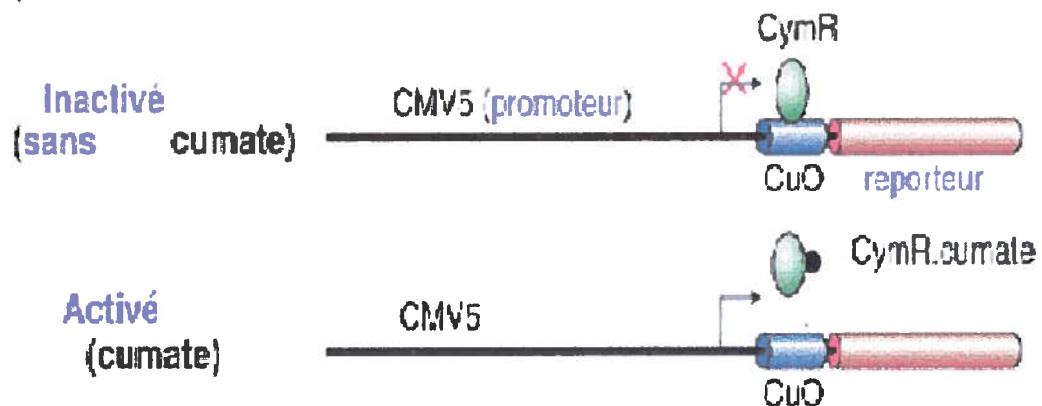
L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est un phénomène permettant le déclenchement d'un mécanisme de destruction ordonné menant au suicide cellulaire. Ce processus naturel participe à l'homéostasie cellulaire en contrôlant le nombre de cellules et la taille des tissus en supprimant les cellules endommagées. L'apoptose se distingue de la nécrose cellulaire par une fragmentation internucléosomale de l'ADN (Wyllie, Kerr et al., 1980), et morphologiquement par une marginalisation de la chromatine, une condensation du cytoplasme, pour se terminer par la fragmentation du noyau et du cytoplasme, pour former des corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules environnantes (*revue dans* Kerr, Winterford et al., 1994), afin d'empêcher une réponse inflammatoire (Arends et Wyllie, 1991).

Figure III. Fonctionnement de l'interrupteur (switch) sensible au cumate. (A) Promoteur inductible au cumate, où la présence de cumate empêche le complexe CymRVP16 de se lier sur l'opérateur et d'amorcer la transcription à partir de la boîte TATA. (B) Pour le promoteur inverse au cumate, la transcription est inhibée lorsque le répresseur CymR lie l'opérateur sensible au cumate (CuO), alors que la présence de cumate lie et empêche la liaison du CymR sur le CuO, menant à l'initiation de la transcription par le promoteur CMV5, pour cytomégalovirus (Mullick et Massie, 2001).

A) Promoteur inductible au cumate



B) Promoteur inverse du cumate



1.4.1-Les caspases : enzyme tueuses

Au centre de la cascade apoptotique se trouve la famille d'enzymes appelées caspases («cysteine-containing, aspartate-specific protease »). Des 14 membres connus de cette famille de protéases, certains membres peuvent être regroupés en caspases inflammatoires (caspase-1, -4, -5, et -11), caspases initiatrices (caspase-2, -8, -9, et -10) ou bien parmi les caspases effectrices (caspase-3, -6, et -7) (Nicholson et Thornberry, 1997). Les caspases sont inactives à l'état de zymogène et leur activation requiert le clivage de leur pro-domaine situé en N-terminal. Une fois libéré de ce pro-domaine, l'activation de l'enzyme sera accomplie suite à la formation d'un homodimère, où chacun des monomères comprend une grande (20kDa) et une petite (10kDa) sous-unité (Figure IV). D'après des études de caractérisation structurales menées sur la caspase-1, l'homodimérisation entre ces 2 sous-unités est médiée par des interactions hydrophobiques entre les 6 brins β anti-parallèles de chacunes des sous-unités (Walker, Talanian et al., 1994). L'homodimère ainsi formé (Figure IV), expose maintenant deux sites actifs situés aux extrémités opposées de l'hétérodimère. Les caspases étant des protéases spécifiques, chacun des sites actifs reconnaîtra une séquence spécifique de quatre aa contigus, nommés P4-P3-P2-P1, pour cliver après le résidu P1. Le résidu P1 est généralement un acide aspartique (Asp), tandis que le P3 est une glutamine (Glu), chez la majorité des caspases de mammifères étudiées (Nicholson et Thornberry, 1997). La séquence de clivage spécifique des caspases est donc X-Glu-X-Asp. Par contre, le fait que les résidus des positions P2-P4 ne soient pas conservés suggère qu'ils puissent déterminer la spécificité des différentes caspases pour le substrat. Bien que spécifique, cette courte séquence reconnue par le site actif peut expliquer la variété des substrats impliqués dans le maintien de l'intégrité de la machinerie cellulaire qui sont clivés par les caspases, ainsi que l'activation croisée inter-caspases, pour amplifier le signal jusqu'à l'hécatombe finale (Nicholson et Thornberry, 1997; Cohen, 1997).

Alors que les caspases effectrices possèdent un court pro-domaine (caspase-3, -6, et -7), les autres caspases (caspase-1, -2, -4, -5, -8 à -13) ont un long pro-domaine qui contient soit un tandem de motif DED (domaine effecteur de mort), ou un motif CARD (domaine de recrutement des caspases) (Cohen, 1997). La voie apoptotique membranaire nécessite les caspases apicales -8 et -10, qui s'associent par leurs domaines DED à la protéine adaptatrice FADD (pour «Fas-associated death domain»), recrutée par la trimérisation des récepteur de mort (TNFR, Fas/CD95), suite à leur liaison avec le ligand

(TNF, FasL) (Muzio, Stockwell et al., 1998; Nagata, 1997). Une fois recrutées, les pro-caspases apicales seront activées en caspases actives et pourront aller cliver et activer les caspases situées en aval, telle la pro-caspase-3 (Figure IV). La caspase-8 peut aussi cliver la protéine Bid en une forme tronquée (tBid) qui permettra de forcer le relargage du cytochrome C des mitochondries (Li, Zhu et al., 1998) (voir sections suivantes et Figure IV). Le motif CARD retrouvé sur le pro-domaine des caspases inflammatoires et de certaines caspases initiatrices sert aussi à recruter et activer les caspases. L'exemple du recrutement de la caspase-9 par son domaine CARD est bien documenté. En présence du cytochrome C et d'ATP (ou dATP), la molécule cytoplasmique Apaf-1 (facteur d'activation de l'apoptose 1) subira un changement conformationnel lui permettant d'exposer son domaine CARD et ainsi recruter la pro-caspase-9. L'apoptosome, nom de la structure oligomérique composée de huit unités ATP-Apaf-1-cytochrome C, recruterà huit pro-caspase-9 et permettra leur activation en caspase-9, pouvant par la suite aller cliver et activer les caspases effectrices, tel les pro-caspase-3 et -7 (Cain, Brown et al., 1999; Zou, Li et al., 1999) (Figure IV).

Ces voies, longtemps considérées exclusives l'une de l'autre, se recoupent et interagissent à plusieurs niveaux (*revue dans* Hengartner, 2000) (Figure IV). Toutefois, l'apoptose n'étant que le résultat d'un déséquilibre en faveur des stimuli pro-apoptotiques, il importe d'étudier de façon détaillée la cinétique d'activation des différents acteurs afin de voir lequel ou lesquels entraîne(nt) les autres dans son ou leurs créneau(x) avant de conclure sur l'implication majeure d'une voie plutôt que l'autre.

1.4.2-Les mitochondries au centre de la cascade apoptotique

En plus de pouvoir être indirectement activé par la voie apicale, l'apoptose impliquant la voie mitochondriale peut survenir suite à une insulte interne, tel le dérèglement du cycle cellulaire et/ou une accumulation de dommages irrémédiables à l'ADN. Par le biais de la protéine p53, ceci induit la transcription du gène de *Bax*, membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, qui, lorsque inséré aux membranes externes des mitochondries, peut favoriser le relargage du cytochrome C (*revue dans* Harbour et Dean, 2000 et Rich, Allen et al., 2000).

Par la libération de facteurs pro- ou anti-apoptotiques, tel le cytochrome C, AIF (facteur induisant l'apoptose), SMAC (second activateur des caspases dérivé des mitochondries) et HtrA2/Omi, les mitochondries jouent un rôle essentiel dans la

régulation de l'apoptose. Le relargage de ces diverses protéines est possible suite à l'ouverture d'une brèche dans l'intégrité de la membrane externe des mitochondries, ce qui s'observe par un changement du potentiel membranaire mitochondrial $\Psi\Delta m$ (Martinou et Green, 2001). Les mitochondries contiennent un cocktail de protéines pro- et anti-apoptotiques appartenant à la famille des protéines Bcl-2. Ces dernières peuvent s'apparier pour former différentes combinaisons d'hétérodimères, dont la résultante déterminera la destinée de la cellule (Antonsson et Martinou, 2000; Reed, 1997), en permettant ou non l'ouverture d'un pore dans la membrane externe permettant le relargage de facteurs pro-apoptotiques.

1.4.2.1-LES PROTEINES APPARENTÉES A BCL-2

La famille de protéines apparentée à Bcl-2 regroupe des membres régulant soit positivement (Bcl-2, Bcl-x_I, Bcl-w) soit négativement (Bax, Bak, Bid, Bim, Bik) l'apoptose. Les divers membres de cette famille se divisent en trois groupes distincts, dépendamment du nombre de domaines d'homologie à Bcl-2 (BH) qu'ils possèdent. Les membres anti-apoptotiques possèdent quatres domaines BH (BH1 à BH4) et généralement un segment hydrophobe à l'extrémité C-terminale, afin de faciliter leur interaction avec les membranes du réticulum endoplasmique, du noyau, ou des mitochondries. Certains membres de la famille des Bcl-2, tels Bax et Bak, ne possèdent pas le domaine BH4, alors que le troisième groupe comprend des protéines ayant uniquement le domaine BH3, tels Bik, Bik, Bim. Les membres des différents groupes interagissent ensemble pour former des hétérodimères : le domaine hydrophobe BH3 des protéines pro-apoptotiques peut se lier aux membres favorisant la survie au niveau du sillon formé par les hélices α des domaines BH1, BH2 et BH3 (Sattler, Liang et al., 1997). La formation d'un hétérodimère pourrait induire un changement de conformation des membres anti-apoptotiques, et ainsi les inactiver. De plus, les protéines du deuxième groupe peuvent, suite à un changement conformationnel lors de leur activation, former un hétérodimère via leurs domaines BH3 (*revue dans* Adams et Cory, 2001). Selon le moyen qu'ils ont de promouvoir l'apoptose, les protéines ne contenant que le domaine BH3 peuvent se subdiviser en deux catégories. D'une part, la protéine type Bid peut lier (sous forme tBid) et activer les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, alors que les membres tels Bim, Bad et Noxa vont préférentiellement se lier aux membres Bcl-2 et Bcl-X_L favorisant la survie cellulaire, afin de les inactiver (Huang et Strasser, 2000). À travers ce réseau complexe d'interactions homodimériques et hétérodimériques, l'équilibre relatif entre les protéines pro- ou anti-

apoptotiques détermineront ultimement la sensibilité d'une cellule à un stimulus de nature apoptotique.

1.4.2.2-COMMENT PERMEABILISER LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES

Il a été démontré que les protéines VDAC (canal à anion voltage-dépendant) et ANT (adénine nucléotide transférase), deux des plus abondantes protéines de la membrane externe et interne des mitochondries, peuvent interagir avec les protéines de la famille Bcl-2 et médier l'exécution de l'apoptose (Narita, Shimizu et al. 1998). En effet, Bax peut se lier à VDAC pour induire le relargage du cytochrome C, de façon Bcl-2 dépendante (Narita, Shimizu et al. 1998). Ce type de pore non-spécifique peut aussi être formé entre Bax et ANT (Marzo, Brenner et al., 1998). Puisque Bcl-2, Bcl-X_L, et Bax peuvent former un pore dans les membranes biologiques (Minn, Velez et al., 1997; Schendel, Xie et al., 1997; Narita, Shimizu et al., 1998), il fut suggéré qu'ils puissent être responsables du relargage des protéines mitochondrielles. Par contre, ces mécanismes proposés pour expliquer l'ouverture d'un pore, qui serait tout de même relativement petit considérant la taille des protéines apparentées à Bcl-2, n'expliquent pas comment les grosses molécules telles AIF et SMAC puissent être relarguées de la mitochondrie. Une récente étude effectuée sur des mitochondries isolées, des vésicules de membrane mitochondriale externe, ou sur des liposomes obtenus chimiquement, a démontrée de façon non équivoque que l'ouverture d'un large pore pouvant permettre le relargage de dextran fluorescent (jusqu'à 2 000 kDa) était possible et ne nécessitait que la présence de tBid, Bax activé et le lipide cardiolipine, uniquement retrouvé sur les membranes internes ainsi qu'aux jonctions entre la membrane interne et externe des mitochondries (Kuwana, Mackey et al. 2002). Par contre, cette étude ne répond pas à toutes les questions concernant l'ouverture d'un pore dans la membrane de la mitochondrie, puisque par exemple, leur modèle n'explique pas pourquoi la membrane interne de la mitochondrie n'est pas perméabilisée par t-Bid/Bax malgré la présence de cardiolipine. De plus, les mitochondries entières doivent se comporter de façon beaucoup plus complexe que des liposomes, puisqu'elles possèdent plusieurs protéines pouvant inhiber l'ouverture du pore au niveau de la membrane interne. Il serait donc possible que l'ouverture du pore puisse se produire de façon indépendante, et/ou avec les protéines VDAC et ANT du pore de perméabilité de transition PTP, pour expliquer pleinement le relargage des protéines apoptotiques des mitochondries (Zamzami et Kroemer, 2003).

1.4.3-Inhibition des caspases par IAP

En plus de leur régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelles (Earnshaw, Martins et al., 1999), et de leur élimination par le protéasome une fois ubiquitiné (Huang, Joazeiro et al., 2000), les caspases sont sensibles à la famille d'inhibiteurs d'apoptose IAP. Ces protéines, originalement identifiées chez le baculovirus, bloquent l'apoptose en interagissant et en inhibant directement les caspases activées. Huit membres de la famille IAP furent identifiés chez les mammifères, incluant XIAP, c-IAP1 et c-IAP2, (Ashhab, Alian et al., 2001), qui ciblent la caspase initiatrice -9, et les caspases effectrices -3 et -7, sans affecter les autres caspases (Deveraux et Reed, 1999). Le motif BIR (répétition IAP baculoviral), comprenant environ 80 aa enroulés autour d'un atome de zinc, constitue l'unité fonctionnelle des IAPs. Les inhibiteurs d'apoptose XIAP, c-IAP1 et c-IAP2 contiennent tous trois motifs BIR (BIR1, BIR3 et BIR3), ayant chacun des fonctions différentes, alors que BIR3 bloque l'activité de la caspase-9, BIR1 et BIR2 ciblent et inhibent les caspase-3 et caspase-7 (Shi, 2001).

Durant l'apoptose, la protéine mitochondriale SMAC est libérée de l'espace inter-membranaire au cytoplasme pour interagir avec, et inactiver les divers IAPs, et ainsi lever l'inhibition des caspases initiatrices et effectrices (Chai, Du et al. 2000; Srinivasula, Datta et al., 2000). La protéine SMAC forme un très large homodimère qui peut lier fortement les domaines BIR2 et BIR3 de XIAP (Chai, Du et al., 2000). Nouvellement découverte, HtrA2/Omi, une autre protéine relarguée au cytosol à partir de l'espace inter-membranaire des mitochondries lors de l'apoptose, contient un domaine capable de lier IAP, un domaine central pourvu d'une activité sérine protéase et un domaine PDZ en C-terminal. L'activité pro-apoptotique associée à HtrA2/Omi semble indépendante de la portion liant IAP, alors que le segment central semble essentiel (Gray, Ward et al., 2000).

1.4.4-Manipulation virale de l'apoptose

Au cours de l'évolution, les agents infectieux ont développés des stratégies complexes afin de s'adapter à la biologie de leur hôte. Pour les terroristes cellulaires que sont les virus, l'apoptose représente un bon moyen d'engendrer leur dissémination aux autres cellules par le biais des corps apoptotiques, sans pour cela stimuler une réponse immunitaire chez l'hôte (Teodoro et Branton, 1997). Cependant, pour employer

judicieusement l'apoptose, ces derniers ne doivent pas induire ce mécanisme à un stade trop précoce, ni laisser la cellule se suicider trop tôt, pour leur laisser le temps de se répliquer suffisamment. La plupart des virus à ARN se répliquent très rapidement pour produire le maximum de virion avant l'établissement d'une réponse immunitaire (Kurokawa, Koyama et al., 1999). Inhiber l'apoptose de l'hôte peut aussi permettre aux virus de restreindre la réponse immune (Restifo, 2000). Pour manipuler l'apoptose, les virus ont développés une panoplie de protéines agissant spécifiquement sur plusieurs protéines pro- ou anti-apoptotiques, afin d'exploiter à son avantage les mécanismes de défense de la cellule. L'apoptose étant un engrenage séquentiel hautement régulé, pouvant être inhibée par l'intervention spécifique d'une seule protéine virale sur une protéine clé du processus apoptotique.

1.4.4.1-SUPPRESSION DES CASPASES PAR LES VIRUS

En plus de la protéine baculovirale IAP, dont la structure et la fonction sont très conservées chez les différents membres de la famille des IAPs, le baculovirus code aussi pour la protéine p35. Cette dernière est un inhibiteur de caspases à large spectre d'action, puisqu'elle peut bloquer les caspases-1, -3, -6 à -8 et -10 suite à l'induction de l'apoptose par plusieurs facteurs (Bump, Hackett et al., 1995; Miller, 1997) (Table 4). La protéine CrmA du virus de la variole possède aussi la faculté d'inhiber un grand nombre de caspase (caspase-1, -4, -5 et -11) lorsque l'apoptose est induite par la voie apicale (Dbaibo et Hannum, 1998; Hay et Kannourakis, 2002) (Table 4). Toutefois, il fut rapporté que son action inhibitrice ne soit pas très efficace (Kamada, Funahasi et al., 1997). Finalement, le gène *A224L* du virus de la fièvre Africaine (ASFV) produit aussi une protéine apparentée aux IAPs, inhibant spécifiquement l'activité de la caspase 3 (Nogal, Gonzalez et al., 2001).

1.4.4.2-LES VIRUS PEUVENT AGIR SUR LES ANALOGUES PRO-APOPTOTIQUES DE BCL-2

Les virus ont développés plusieurs protéines apparentées à la famille des Bcl-2, qui ont toutes au moins un domaine BH. La protéine anti-apoptotique Bcl-2 possède plusieurs imitations virales. Un de ces équivalents les plus étudiés est la protéine précoce de l'adénovirus E1B-19K. Il fut démontré que cette protéine pouvait inhiber l'apoptose induite par les membres pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2, tel Bak, Bik et Bax (Granville, Carthy et al., 1998; Rao, Modha et al., 1997). E1B-19K bloque aussi la forme activée de Bax pour inhiber l'apoptose induit par le TNF- α en amont de la caspase-9,

mais en aval de la caspase-8 (Perez et White, 2000). De plus, E1B-19K interagit avec les lamines nucléaires, afin de prévenir la mort cellulaire programmée (Rao, Modha et al., 1997) (Table 4). BHRF1, protéine du virus Epstein Barr (EBV), partage aussi des similarités structurales (38% d'homologie à la portion C-terminale de la protéine Bcl-2) et fonctionnelles avec Bcl-2 (Table 4). Cette protéine peut inhiber l'apoptose induite par c-Myc (Fanidi, Hancock et al., 1998; Hickish, Robertson et al., 1994). La protéine codée par *BALF1*, un autre gène d'EBV récemment découvert, permet de s'associer avec Bax et Bak pour bloquer l'apoptose. Curieusement, cette protéine révèle plus de similarités avec les protéines Bcl-2 et Bcl-x_L, par la présence de domaines apparentés aux quatre types de BH, qu'avec BHRF1 (Marshall, Yim et al., 1999).

1.4.4.3-LES VIRUS PEUVENT BLOQUER L'APOPTOSE INDUIITE PAR LA VOIE APICALE

Les protéines codées par la région E3 de l'adénovirus permettent au virus de se soustraire au système immunitaire de l'hôte. Les protéines précoces E3-10.4K et E3-14.5 réduisent la présentation des récepteurs apoptotiques Fas en périphérie des cellules, en induisant leur internalisation, suivie de leur dégradation dans les lysosomes par un phénomène qui reste à éclaircir (Elsing and Burgert, 1998). L'hétérodimère E3-10.4/14.5K assure aussi une protection contre l'apoptose médiée par TNF, sans qu'il y ait de diminution des TNFR en surface, ce qui illustre les multiples voies d'action de ce complexe protéique (Dimitrov, Krajski et al., 1997; Shisler, Yang et al., 1997; Wold, Doronin et al., 1999) (Table 4). Il fut aussi démontré que l'hétérodimère induisait une diminution du récepteur EGF (Tollefson, Stewart et al., 1991). Puis, il fut dernièrement rapporté que le complexe E3-10.4/14.5K inhibe la signalisation de TNF- α ou de IL-1, en prévenant l'activation de NF- κ B (Friedman and Horwitz, 2002). E3-14.7K, une autre protéine de la région E3 de l'adénovirus, agit aux niveaux des récepteurs en bloquant la signalisation provenant de CD95 en inhibant l'activation de la pro-caspase-8 (Chen, Tian et al., 1998) (Table 4). La protéine de latence 1 (LMP-1) de EBV s'accumule sur la membrane plasmique de l'hôte. Il fut démontré que LMP-1 peux interagir avec les facteurs associés au (TRAF-1 à -3), ainsi qu'à la molécule TRADD de façon similaire à TNFR1, afin d'augmenter la signalisation par la voie NF- κ B (Devergene, Hatzivassiliou et al., 1996 ; Mosialos, Birkenbach et al., 1995). Le virus de la variole (CPV) possède aussi trois analogues apparentés au récepteur TNF, soit les protéines modifiant la réponse aux cytokines (CrmB, -C et -D) (Cunnion, 1999). Ces homologues des récepteurs agissent en leurre afin de lier le ligand apoptotique sans poursuivre sa transduction. L'ajout de

récepteur «leurre» en périphérie dilue donc l'impact de la signalisation en partance des récepteurs natifs, et minimise le signal de mort.

1.4.4.4-LE PORE DE PERMÉABILITÉ DE TRANSITION COMME CIBLE VIRALE

La protéine X du virus de l'hépatite B (HBV-X) interagit avec HVDAC3, un isoforme de VDAC, pour induire l'apoptose (Rahmani, Huh et al., 2000). Puisque ces protéines partagent une similarité de 31% en aa, certains auteurs suggèrent que la protéine HBV-X puisse s'insérer dans les membranes externes des mitochondries d'où elle pourrait induire l'apoptose (Shimizu, Ide et al., 2000), indépendamment de Bcl-2 (Schuster, Gerlish et al., 2000) (Figure 3). L'exon UL37-1 du cytomégalovirus code pour la protéine vMIA (inhibiteur viral de l'apoptose des mitochondries). Cette protéine anti-apoptotique se rend aux mitochondries, où elle lie spécifiquement ANT. Cette association prévient l'apoptose induite par les stimuli en provenance des récepteurs de mort (CD95 et TNFR1), et ceux induits par les agents cytotoxiques staurosporine et maytanisine (Goldmacher, Bartle et al., 1999; Vieira, Belzack et al., 2001) (Figure 4). Comme vMIA, la protéine virale R (Vpr) de virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) interagit avec ANT, mais pour induire l'apoptose par la formation d'un pore non-spécifique (Table 3). La formation de ce pore est inhibée par Bcl-2, alors que sa conductance est augmentée par Bax (Brenner, Cadiou et al., 2000; Jacotot, Ferri et al., 2001). Il fut dernièrement démontré que la protéine M11L du myxoma virus (MYXV) a des propriétés anti-apoptotiques, puisque l'apoptose des lymphocytes T et des monocytes de lapin infectés par un virus délété pour ce gène est accélérée (Macen, Graham et al., 1996; Everett, Barry et al., 2000). *In vivo*, les lapins infectés par les souches de MYXV délétés pour le gène M11L affichent une meilleure réponse inflammatoire et une virulence réduite, en comparaison avec le virus natif. La protéine M11L se lie aux mitochondries par une portion de 25 aa en C-terminal, ressemblant à une séquence consensus présente chez les membres de la famille des Bcl-2 (Everett, Barry et al., 2000). Il fut récemment découvert que la protéine M11L exerçait ses propriétés anti-apoptotiques en agissant avec la protéine PBR (récepteur benzodiazépine périphérique) (Everett, Barry et al., 2002), protéine voisine de VDAC sur la membrane externe des mitochondries possiblement impliquée dans la régulation du PTP.

Figure IV. Représentation des principales voies menant à l'apoptose. L'apoptose peut se déclencher de façon exogène, via le recrutement et l'activation de la caspase apicale 8 suite à la liaison d'un ligand pro-apoptotique à son récepteur de mort, ou de façon endogène, par l'activation de la caspase-9 par la formation de l'apoptosome suite au relargage du cytochrome C, induit par p53 après que l'ADN ait été endommagé. Ces caspases apicales vont activer la caspase-3 effectrice, qui à son tour sera responsable du clivage de plusieurs substrats cellulaires, menant à l'apoptose. La voie apicale (exogène) peut enclencher la voie intrinsèque (endogène) via le clivage de la protéine Bid, membre contenant uniquement le domaine BH3 (pour Bcl-2 homologue) de la famille des analogues de Bcl-2, en provoquant le relargage du cytochrome C. La perte de potentiel membranaire des mitochondries, et donc le relargage du cytochrome C, dépend du rapport quantitatif entre les protéines de la famille des analogues de Bcl-2, comprenant des membres pro-apoptotiques, tel Bid et Bax, et d'autres anti-apoptotiques, tel Bcl-2 et Bcl-xL pouvant se neutraliser mutuellement. Les parenthèses encadrant l'apoptosome visent à souligner le fait que ce qui est schématisé ne représente qu'une partie de l'oligomère qu'est l'apoptosome, qui forme un grand complexe octamérique composé de huit molécules de cytochrome C et d'Apaf-1 en présence d'ATP pour recruter la pro-caspase-9 .

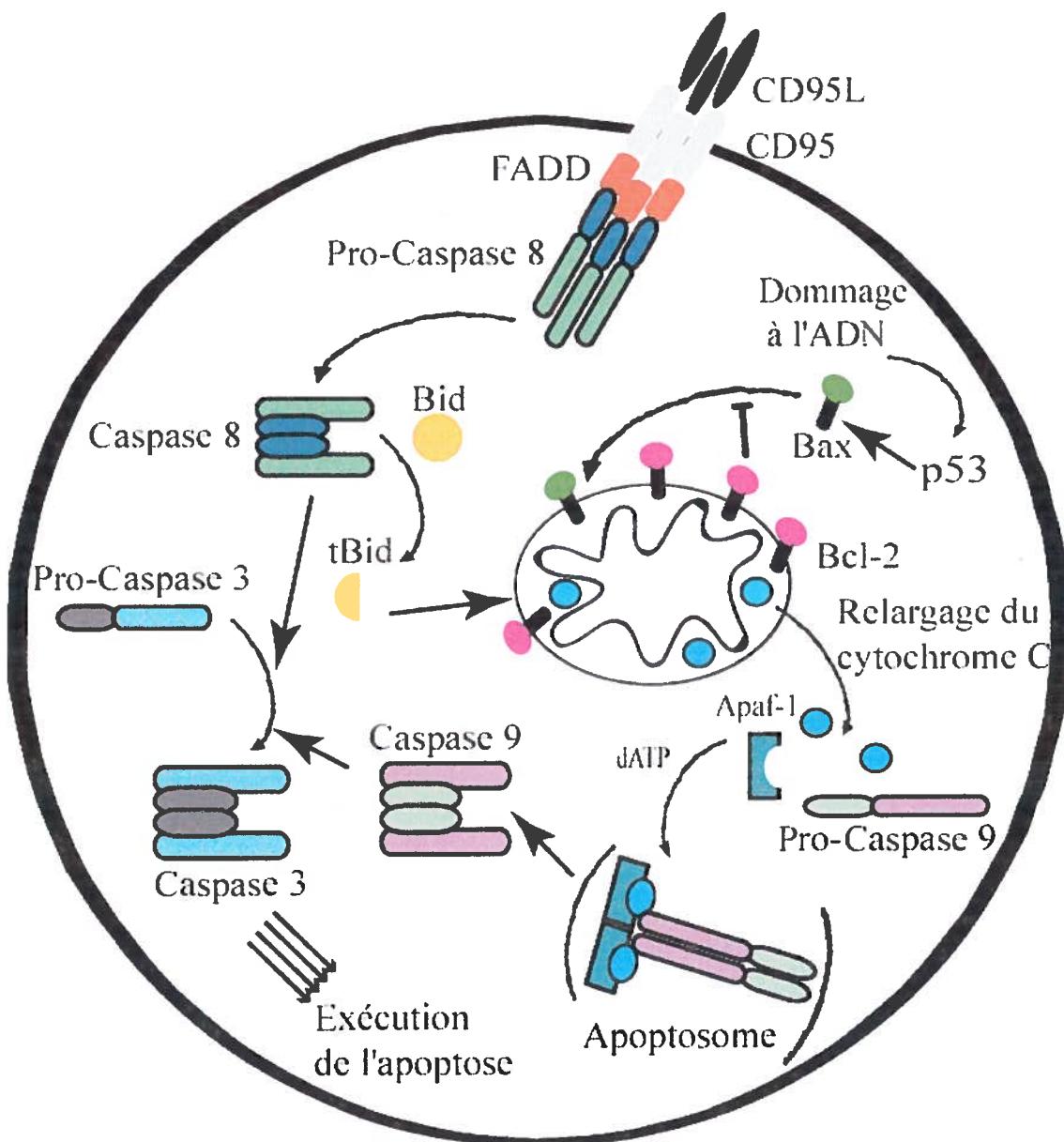


Table 3. Plusieurs virus codent pour des protéines pro-apoptotiques, agissant sur diverses cibles cellulaires.

Virus	Protéine	Mécanisme d'action	Type de cellule	Référence
<i>Adenoviridae</i> Adénovirus	E1A	S'associe à la protéine RB/p300 et induit l'apoptose de manière p53 dépendante	Plusieurs lignées cancéreuses	Heise et al. (2000); Lowe et Ruley (1993)
	E4orf4	Coopère avec E1A pour induire l'apoptose en l'absence de p53		Marcellus et al. (1996b)
		Interagit avec la protéine phosphatase 2A (PP2A) pour induire l'apoptose	H1299	Sltirichman et Kleinberger (1998); Sltirichman et al. (1999)
		Par la voie caspase-8/FADD (spécifique à certaines cellules)	293T	Livne et al. (2001)
<i>Flaviviridae</i> HCV Pestivirus	Nucléocap-side E ^{ms}	Les protéines de la nucléocapside lient le domaine cytoplasmique de TNF	BC10Me, HepG2 et HeLa	Zhu et al. (1998)
		Inhibe la synthèse des protéines par ses propriétés de RNase	Lymphocytes de plusieurs espèces	Bruschke et al. (1997); Meyers et al. (1999); Su et al. (2001); Wang et al. (1995)
<i>Hepadnaviridae</i> HBV	HBV-X	S'associe avec VDAC pour induire l'apoptose, indépendamment de Bcl-2	Fibroblastes d'embryon de rat	Rahmani et al., (2000); Schuster et al., (2000); Shimizu et al., (2000)
<i>Papovaviridae</i> Papillomavirus humain	E2	Régule la transcription de E6/E7 et facilite l'apoptose de manière p53 dépendante	HeLa	Desaintes et al. (1997, 1999); Webster et al. (2000)
	E7	Régule le cycle cellulaire et interagit avec la famille des pRb pour induire l'apoptose	Kératinocytes humains	Pan et Griep (1995); Zwierschke et Jansen-Durr (2000); Iglesias et al. (1998)
<i>Papovaviridae</i> SV40	Large T	Inhibe les fonctions de pRb et p53 L'apoptose dépend de la liaison à pRb	Fibroblaste d'embryon de rat	Fromm et al. (1994); Kolzau et al. (1999); McCarthy et al. (1994)
<i>Retroviridae</i> HTV	Tat	Stimule l'activation de la caspase 8 Amélioration de la signalisation de CD95 via un mécanisme impliquant TNF- α	Jurkat Neurones humaines et de rat	Bartz et Emerman (1999); Kolesnichenko et al. (1997); New et al. (1998)
	gp120/ gp41	Formation de syncytium et liaison croisée avec CD4	MOLT4-T4 et H9	Laurent-Crawford et al. (1993, 1995); Maldarelli et al. (1995); Sylvester et al. (1997)
Vpr		Par la voie de la caspase-8 et peut être inhibée par Bcl-2 Agit avec ANT pour induire la perméabilisation des membranes mitochondrielles (MMP)	SupT1 et HeLa	Chang et al. (2000); Conti et al. (2000); Patel et al. (2000); Stewart et al. (1997); Jacotot et al. (2000)
Nef		Augmente l'expression de TNF à la surface cellulaire	II-23.D7	Lana et Ware (2000)

HCV : virus de l'hépatite C; HBV : virus de l'hépatite B; SV40 : virus simien 40; HIV : virus de l'immunodéficience humaine; FADD : «Fas-associated-death-domain»;

pRb : protéine du rétinoblastome.

Tableau traduit et adapté de Hay et Kannourakis (2002) et complété à partir de Boya et al. (2001).

Table 4. Plusieurs protéines virales possèdent des propriétés anti-apoptotiques.

Virus	Protéine	Mécanisme d'action	Stimulus apoptotique	Référence
<i>Adenoviridae</i> Adénovirus	E1B-19K	Anologue de Bcl-2. Bloque l'apoptose avant l'activation de la caspase-9, et après celle de la caspase-8. Lie les lamines nucléaires	TNF- α E1A induit p53	Farrow et al. (1995); Marcellus et al. (1996a); Perez et White (2000); Rao et al. (1997)
	E1B-55K	Lie p53 pour l'inactiver	E1A induit p53	Theodoro et Branton (1997); White et al. (1994)
	E3-10.4	Bloque l'apoptose induit par E1A ou TNF Inhibe le relargage d'acide arachidonique par TNF Inhibe le transfert de PLA2 aux membranes cellulaires médié par TNF, Diminue la présentation de CD95, TNFR et EGFR en surface	TNF- α Anti-CD95 (Fas)	Gooding et al. (1988 et 1991); Krajcsi et al. (1996); Dimitrov et al. (1997); Shisler et al. (1997)
	E3-14.5	Inhibe l'apoptose induit par E1A ou TNF Inhibe le relargage d'acide arachidonique par TNF Inhibe le transfert de PLA2 aux membranes cellulaires médié par TNF, Diminue la présentation de CD95, TNFR et EGFR en surface	TNF- α Anti-CD95 (Fas)	Gooding et al. (1991); Krajcsi et al. (1996); Dimitrov et al. (1997); Shisler et al. (1997)
	E3-14.7K	Inhibe l'apoptose induit par E1A ou TNF Par la voie des caspases (2 et -8) Inhibe le relargage d'acide arachidonique par TNF	TNF- α	Gooding et al. (1998) ; Li et al. (1998); Krajcsi et al (1996)
<i>Baculoviridae</i> Baculovirus	P35	Inhibiteur des caspases-1, -3, -6, -8 et -10 Inhibe l'apoptose induit par le stress oxydatif	Staurosporine H_2O_2	Berlin et al. (1996); Clem et al. (1998); Viswanath et al. (2000); Zhou et al. (1998); Sait et al. (1999)
	IAP	Inhibiteur des caspases-3, -6 et -7	Actinomycine D	Crook et al. (1993); Devereaux et al. (1997)
<i>Herpesviridae</i> EBV CMV humain	BHRF1 vMIA	Protéine apparentée à Bcl-2 lie ANT pour inhiber la perméabilisation des membranes mitochondrielles (MMP)	Faible niveaux de sérum, cisplatin, VP16 CD95, TNFR1	Henderson et al. (1993) ; Tarodi et al. (1994) ; Young et al. (1999). Goddmacher et al., (1999) ; Vieira et al., (2001)
<i>Papovaviridae</i> SV40	Large T	Mécanisme indépendant de p53 Bloque l'apoptose induit par la caspase-1	Faible niveaux de sérum, Caspase 1	Conzen et al. (1997); Fromm et al. (1994); Jung et Yuan (1997)
<i>Pooviridae</i> CPV	CrmA	Inhibe les caspases-1, -4, -5 et -11	TNF- α et anti-Fas	Dbaibo et Hannum (1998); Zhou et al. (1997)
<i>Retroviridae</i> HTV	Tat	Par la voie de PIP ₃ et AKT/PKB kinase	Faible niveaux de sérum	Borgatti et al. (1997) ; Gibellini et al. (1995)
	Vpr	Bloque l'apoptose médierée par le TCR, régule NF- κ B	Sorbitol	Ayyavoo et al. (1997) ; Fukumori et al.(1998)

EBV : Epstein Barr virus; CMV : cytomégavirus; SV40 : virus simien 40; CPV : virus de la variole; HIV : virus de l'immunodéficience humaine; PiP₃ : phosphatidylinositol (3, 4, 5) triphosphate; PKB : protéine kinase B; VP16 : étosipide. Tableau traduit et adapté de Hay et Kannourakis (2002) et complété à partir de Boya et al. (2001).

1.5-Objectifs

Les nombreuses fonctions biologiques de la glycoprotéine majeure du VSRRP, codée par le cinquième cadre de lecture, sont souvent associées à la virulence du virus, sa capacité à induire les cellules du système réticulo-endothélial et à produire des anticorps neutralisants, en font une cible de choix pour l'élaboration d'un vaccin sous-unitaire. Cependant, la toxicité cellulaire dont elle est aussi responsable, qui fut associée au phénomène d'apoptose, pose un problème pour la production d'un vecteur adénoviral recombinant dans un but de vaccination.

L'objectif de ce mémoire consiste à identifier par quel mécanisme la GP5 induit l'apoptose, dans le but de parvenir à obtenir des titres infectieux suffisants pour permettre le développement de vaccins génétiques, efficaces et peu onéreux, employant la technologie des adénovirus recombinants réplicatifs non-disséminatifs, capables d'induire une réponse immunitaire protectrice contre le VSRRP chez les porcs suite à une simple et unique injection oro-nasale.

Le déclenchement de la mort cellulaire programmée par la GP5 soulève plusieurs interrogations fondamentales, vu le rôle intime de cette protéine avec d'éventuels récepteurs du VSRRP, qui pourraient contribuer à expliquer l'étrange phénomène de l'apoptose collatérale. La connaissance de la voie apoptotique impliquée pourra permettre de travailler sur les modèles de cellules complémentaires anti-apoptotiques pour produire des AdVs exprimant un transgène pro-apoptotique.

Alors que les avantageuses propriétés antigéniques de la protéine GP5 en font un candidat hors pair à des fins de vaccination génique contre le VSRRP, ses propriétés pro-apoptotiques soulèvent de sérieux problèmes techniques quant à la production d'un adénovirus recombinant. Ces travaux de recherche s'inscrivent dans une perspective visant dans un premier temps l'identification des domaines physiques responsables des activités immunogéniques et pro-apoptotiques de cette protéine, pour ensuite tenter la scission de ces domaines afin de pouvoir produire un vaccin recombinant plus efficace à lutter contre l'infection par le VSRRP.

CHAPITRE 2

MATURATION DE LA GP5 DU VSRRP

2.1-Résumé

Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin est un agent infectieux endémique dans les pays producteurs de porcs, causant de sévères déficiences reproductrices associées à une composante respiratoire. Les modifications post-traductionnelles des protéines structurales majeures GP5, M et N du VSRRP semblent jouer un rôle important dans leur capacité à induire une réponse immunitaire. L'emploi de ces protéines à des fins de vaccination sous-unitaire implique une connaissance approfondie du mode de maturation des protéines recombinantes (rec) lors de leur expression par un vecteur adénoviral humain (AdV). Des AdV non-répliquatifs furent générés pour exprimer les protéines recGP5, recM et recN de la souche IAF-Klop du VSRRP. Les protéines recombinantes exhibent un profil de migration électrophorétique similaire à celui des protéines natives du PRRSV. De fait, les principaux déterminants antigéniques natifs semblent aussi conservés, tel que démontré par radioimmunoprécipitation. Par contre, l'obtention d'une protéine additionnelle d'une masse moléculaire autour de 22 kDa suite au traitement à la endo- β -galactosidase de la recGP5, révèle la présence de chaînes oligosaccharidiques latérales riches en résidus N-acétyllactosamine, qui n'est pas retrouvé dans la protéine GP5 native. De plus, des expériences de marquage métabolique court (Pulse-Chase) suite au traitement à l'endo- β -N-acetylglucosaminidase H sur les deux types de GP5 révèlent que la recGP5 possède uniquement des chaînes d'oligosaccharides N-ramifiés riches en mannose, alors que celles de la forme virale de la GP5 sont aussi de type complexes. De plus, la co-expression dans les cellules 293 des protéines recGP5 et recM ne permet pas de former l'hétérodimère observé chez les cellules infectées par le VSRRP. Il fut aussi démontré, que l'expression du gène de l'ORF 5 de la souche IAF-Klop du VSRRP par un AdV est pro-apoptotique. Finalement, des porcs immunisés de façon intradermale avec un AdV exprimant l'ORF5 développèrent des titres en anticorps neutralisants contre la GP5 native dès 10 jours suite à une infection-défi avec la souche homologue virulente du VSRRP. Malgré les différences observées entre les protéines GP5 recombinante ou native, les épitopes antigéniques de la recGP5 ont permis d'établir une mémoire immunologique contre les épitopes neutralisants de la protéine GP5 virale authentique.

2.2-Contribution des auteurs

Le Dr. Gagnon a construit, amplifié et purifié les adénovirus recombinants exprimant les ORFs 5, 6 et 7 de la souche de référence nord américaine IAF-Klop du VSRRP de façon constitutive ou inductible (AdCMV5-ORF5, ORF 6 ou ORF 7 et AdVTR5-ORF5 ou ORF7). Afin de vérifier si l'hétérodimère M-GP5 du SRRP se formait *in vitro* à des fins d'immunisation protectrice, comme l'ont démontré certains auteurs avec une autre virus de la famille des *Arteriviridae*, Guillaume Lachapelle a construit, amplifié et purifié l'adénovirus recombinant exprimant l'ORF6 de la souche de référence nord américaine IAF-Klop du VSRRP (AdV/TR5/DC/GFPq/ORF6). Le Dr. Massie a fourni l'expertise pour la construction des adénovirus recombinants et a contribué aux études d'apoptose. Suite à l'infection de cellules 293 ou MARC-145 par les divers adénovirus recombinants obtenus, le Dr. Gagnon a effectué les tests de migration sur gel de SDS-polyacrylamide après digestion des lysats cellulaires en présence ou non l'endo H ou endo β . Les expériences de radioimmunoprecipitations (RIPA) furent effectuées par le Dr. Gagnon et par Guillaume Lachapelle. La RIPA effectué par Guillaume Lachapelle à l'aide de l'adénovirus inductible exprimant l'ORF6 et la protéine fluorescente verte GFPq a permis de déterminer l'absence de formation d'hétérodimères suite à l'expression des protéines recGP5 et recM, contrairement à ce qui est observé chez le virion. Les essais de marquage métabolique court (Pulse-Chase) furent effectués par le Dr. Gagnon. Les tests ayant trait à l'apoptose furent réalisés par le Dr. Gagnon. La vaccination des porcs fut réalisée par le Dr. Gagnon et le Dr. Dea. Guillaume Lachapelle a été impliqué dans les expériences du phénomène d'apoptose. Le Dr Langelier a fourni son expertise pour les études d'apoptose.

2.3-Premier Article**Adenoviral-expressed GP₅ is distinct from the authentic protein that is included
in the porcine reproductive and respiratory syndrome virions**

**Carl A. Gagnon^{1,2}, Guillaume Lachapelle^{1,2}, Yves Langelier^{3,4},
Bernard Massie^{1,2,4}, and Serge Dea^{1*}**

Archives of Virology. 2003 (sous presse)

¹INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, P.Q., Canada, H7V 1B7.

²Biotechnology Research Institute, CNRC, Montreal, P.Q., Canada. ³Centre de recherches du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada. ⁴Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

Running title: Recombinant adenoviral vectors expressing the PRRSV major structural proteins.

*Corresponding author.

Mailing address:

Dr Serge Dea, professor
INRS-Institut Armand-Frappier,
Université du Québec,
531 boul. des Prairies, Laval,
Québec, Canada, H7V 1B7
Phone: (450) 687-5010, extension 4219.
Fax: (450) 686-5627.
Email: Serge.Dea@INRS-IAF.UQUEBEC.CA

Summary

The ORFs 5, 6 and 7, encoding for the three major structural proteins, GP_s, M and N, of the IAF-Klop strain of PRRSV were cloned and expressed in 293 cells using replication-defective human type 5 adenoviral vectors (hAdVs). Although the M protein gene could be cloned into hAdVs and expressed constitutively in 293 cells under the control of the hCMV immediate early promoter/enhancer, hAdVs expressing N and GP_s proteins, which appeared to be toxic or interfered with adenovirus replication, could only be generated by inclusion of a tetracycline-regulatable promoter in the transfer vector pAdTR5. The recombinant (rec) proteins appeared similar to the authentic viral proteins in regards to their *M₁s* and antigenicities. However, the recGP_s apparently possesses different N-linked oligosaccharides residues. Its sensitivity to endo-β-galactosidase digestion indicates that poly-N-acetyllactosamine is present on the individually-expressed protein, but not on the authentic GP_s anchored into the virion envelope. The recGP_s apparently accumulates within the ER compartment as a glycoprotein that possesses high-mannose N-linked oligosaccharide side chains sensitive to endo-β-N-acetylglucosaminidase H treatment, by contrast to its viral counterpart for which N-linked oligosaccharide side chains are of both high-mannose and complex types. Coinfection of 293 cells with hAdVs expressing the M and GP_s did not lead to M-GP_s heterodimers formation, as demonstrated in PRRSV-infected cells. Moreover, cells infected with inducible hAdV/ORF5 showed that GP_s of the North American strain is proapoptotic. Indeed, when the expression cassette was turned-on, caspase 3 activity in hAdV/ORF5 infected cells was enhanced and DNA fragmentation could be detected by TUNEL assays. Pigs intradermally injected twice with hAdV/ORF5 develop antibody titers to the authentic viral GP_s as soon as 10 days following challenge with the homologous virulent PRRSV strain, as revealed by Western blot and virus neutralization tests, suggesting the establishment of a specific immune memory.

Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the causative agent of an economically important pig disease, with a worldwide distribution, characterized by reproductive failure in sows of any parities and respiratory problems in unweaned and growing pigs [10, 16]. The virus is morphologically, structurally and genomically similar to members of the *Arterivirus* genus, which further includes equine arteritis virus (EAV), murine lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) and simian hemorrhagic fever virus (SHFV) [10, 29, 39]. These viruses, as well as PRRSV, were recently classified in the order *Nidovirales*, which includes members of the *Arteriviridae* and *Coronaviridae* families [4]. The viral genome consists in a positive single-stranded polyadenylated RNA molecule of approximately 15 kb in length and is composed of nine open reading frames (ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, and ORF3-7) which are expressed as a nested set of sub-genomic mRNAs [29, 30, 39, 46]. Sequence analysis reveals that European and North American strains represent two distinct genotypes, with less than 55% amino acid (aa) identities for proteins encoded by ORFs 2, 4, and 5 [10]. The ORF1, representing nearly 75% of the viral genome, encodes for proteins with replicase and polymerase activities [39]. The ORFs 5 to 7 encode for the three major structural proteins of the virion: the envelope glycoprotein GP₅ (25-26 kDa), the non-glycosylated membrane protein M (18-19 kDa) and the nucleocapsid protein N (14-15 kDa) [23, 24, 30]. These structural proteins are closely associated both in the infected-cells and in the virion, the association of GP₅ and M into disulfide-linked heterodimers being essential for authentic maturation and post-translational modification of GP₅ [24], as previously demonstrated for the homologous G_L and M envelope proteins of EAV [9].

Circulating antibodies in PRRSV-infected pigs responsible for viral neutralization (VN) in cell cultures are mainly directed against GP₅ [15], and neutralizing monoclonal

antibodies have been obtained following immunization of Balb/c mice with *E. coli*-expressed GST-ORF5 recombinant (rec) fusion protein [33]. More recently, genetic immunization of pigs with plasmidic DNA encoding the ORF5 gene not only triggered the immune system for the production of anti-PRRSV neutralizing antibodies, but also conferred protection against development of clinical disease and lung lesions following intratracheal challenge with the homologous virulent strain [34]. However, DNA immunization was apparently not sufficient to inhibit virus persistence and shedding in the respiratory tract of challenged pigs. On the other hand, when *E. coli*-expressed GST-ORF5 rec fusion protein was used as an immunogen prior to a challenge with pathogenic virus, the disease was more severe despite the development of high titers (> 2048) of non-neutralizing antibodies to GP₅ [34]. Data obtained suggest that the immune response to unglycosylated linear epitopes of *E. coli*-expressed ORF5 product is not sufficient to protect pigs [34], and, that the establishment of an effective mucosal immunity against glycosylated and conformational dependent epitopes is probably crucial, particularly to control virus persistence and shedding, but this aspect of immunity against PRRSV has not been investigated so far. Consequently, the use of viral vectors with the ability to infect pig cells of the intestinal or respiratory tract, such as adenoviral and poxviral vectors, could be preferable to produce large amounts of recGP₅ that have conserved the major characteristics of the authentic viral glycoprotein [45].

Live human adenovirus type 5 (hAd5) has been shown to be an excellent delivery system for vaccine immunogens [17, 45, 47]. Both replication-defective and replication-competent hAd5 vectors (hAdV) have been used for insertion of foreign genes [17]. However, replication-defective viruses, which have been deleted for the E1 genomic region (Δ E1) that is known to be crucial for virus replication, are often preferred to replication-competent vectors for their biosafety. Indeed, under those conditions, the vaccinated animals are expected to be unable to shed an infectious virus that could

dissiminate to unvaccinated pigs kept in the same building and it represents no risk to humans to be infected by replicative hAdV contaminating meat or other animal by-products. Although unable to replicate *in vivo*, ΔE1 hAdVs can induce an immune response to inserted gene products after systemic or intranasal administration [12, 14, 31]. More specifically, the efficacy in swine of hAdV as recombinant vaccine carrying genes of a variety of swine pathogens was demonstrated [3, 43, 44]. The main objectives of the present study were to construct replication-defective hAdVs expressing the three major structural proteins of PRRSV in a vaccine strategy overview and to compare the adenoviral-expressed recGP_s protein to the authentic PRRSV protein in terms of cellular processing and final maturation, antigenicity, immunogenicity and proapoptotic activity.

Materials and methods

Viruses, cells and antisera

The Québec cytopathogenic IAF-Klop strain of PRRSV was propagated in MARC-145 cells, as previously described [23]. Ad/CMVlacZ [1], a replication-defective E1- and E3-deleted hAd5, as well as rec hAdVs, were propagated in 293 cells (ATCC CRL-1573). Infectivity titers of hAdVs stocks were determined by calculation of plaque forming units (PFU) per ml on 293 cell monolayers [18]. AdCMV/tTA, which permits the constitutive expression of the tetracycline transactivator (tTA) under the control of the constitutive human CMV immediate-early promoter/enhancer was used in co-infection to allow expression of rec proteins in cells infected with hAdVs expressing the transgenes under the control of the TR5 promoter. Doxycycline (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, Ontario, Canada) (1 µg/ml) was used to inhibit expression of the transgenes in hAdV-infected cells [26]. The 293 TetOn cells (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, California, USA), that constitutively express the reverse tetracycline transactivator (rtTA), were cultivated in the presence of 1 µg/ml of doxycycline to induce the expression of the transgenes driven by the tetracycline-regulatable promoter (TR5) [26]. BMAdE1 cells, an A549 cell line expressing AdE1 proteins from a vector designed to eliminate the generation of replication competent adenoviruses [25], were propagated in similar conditions than 293 cells [1]. Hyperimmune rabbit monospecific antisera α5, α6 and α7, directed respectively against GP₅, M and N proteins of the homologous IAF-Klop PRRSV strain expressed in *E. coli*, were obtained from previous studies [24].

Generation of replication-defective hAdVs expressing PRRSV N, M and GP₅ proteins

The ORF5, 6 and 7 coding sequences of the IAF-Klop strain of PRRSV were amplified by RT-PCR using specific sets of oligonucleotide primers, which were designed from the nt

sequence determined in a previous study (EMBL/Genbank accession No. U64928) [15]. All primers contained two *Bam*HI restriction sites at their 5' end, and in the case of sense primers, the ATG initiator codon was preceded by a triple GCC motif in order to provide an optimal Kozak consensus sequence for efficient translation [20]. For each reaction, the amplified product was inserted into the unique *Bam*HI site of the pAdCMV5 or pAdTR5 transfer vectors [26], to ensure that the transgenes would be under the control of the constitutive hCMV immediate-early promoter/enhancer (pAdCMV5) or the tetracycline-regulatable promotor (pAdTR5). The rec plasmids were rescued into the genome of Ad/CMVlacZ by homologous recombination in 293 cells, as described elsewhere [18]. Upon cotransfection, virus plaques were isolated, amplified in 293 cells, and analyzed for the expression of the rec proteins (recN, recM and recGP₅) either by Western blot or by radioimmunoprecipitation assays (RIPA). The hAdVs AdTR5/ORF5, AdCMV5/ORF6 and AdTR5/ORF7, which expressed the recombinant GP₅, M and N proteins, respectively, were subjected to three consecutive rounds of plaque purification on BMAdE1 clone 78 cells. Subsequently, selected viral clones were amplified on BMAdE1 clone 220 cells, as described elsewhere [27].

Western blot

Extracellular PRRSV virions produced in MARC-145 cells were concentrated by ultra-centrifugation at 100,000 g (rotor SW40Ti, Beckman) for 3 h through a 30% (W/V) sucrose cushion in 50mM Tris-buffered saline (TBS), pH 8.0. After denaturation by boiling in the presence of 5% (V/V) β-mercaptoethanol, viral proteins were subjected to 12% SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (45 μm pore size, Schleicher and Schüll, Xymotech Biosystems, Mount Royal, Quebec, Canada) [22]. Immunological detection of the authentic GP₅ protein was performed following incubation of the saturated nitrocellulose membranes in the presence of 1:500 dilution of the rabbit

$\alpha 5$ monospecific antiserum (positive control) or 1:50 dilution of pig sera immunized with recombinant adenoviruses, as previously described [23, 24].

Metabolic labelling, immunoprecipitation and endoglycosidases treatment of PRRSV authentic or recombinant proteins

Radiolabelling with [^{35}S]-methionine (specific activity 1,120 Ci/mmol, Amersham Searle Co., Oakville, Ontario) of viral proteins synthesized in PRRSV-infected MARC-145 cells, as well as rec proteins synthesized in 293 or 293 TetOn cells infected with hAdVs, was carried out essentially as described elsewhere [23, 24]. The precipitated immune complexes were adsorbed for 2 h to protein A-sepharose CL4B beads (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec, Canada) and dissolved directly in electrophoresis sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol. Overnight treatments at 37°C of eluted immunoprecipitated proteins with 4, 200 and 3 mU of endoglycosidase (endo- β -N-acetylglucosaminidase H or endo H, endoglycosidase F/N-Glycosidase F or Glyco F, endo- β -Galactosidase or endo β) were done, as previously described [24]. Thereafter, immunoprecipitates were analyzed by 12% SDS-PAGE and fluorography [23].

In vitro inhibition of N-linked glycosylation and protein transport

For N-linked glycosylation and protein transport inhibition experiments, infected 293 cells were pretreated for 1 h with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of brefeldin A (BFA; Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, Ontario Canada), in methionine-deprived DMEM prior to labelling with [^{35}S]-methionine in the presence of the aforementioned drugs. When labelling was carried out overnight in the presence of BFA, the latter was added freshly every 4 h, since BFA is unstable during incubation [24].

Evaluation of the cytotoxicity and proapoptotic activity of recombinant proteins

Monolayers of MARC-145 cells were infected with PRRSV IAF-Klop strain at a MOI of 0.4 TCID₅₀ per cell or coinfecte with AdTR5/ORF5 and AdCMV/tTA at a MOI of 100 PFU per cell of both viruses, in the presence or absence of 1 µg/ml of doxycycline. Cellular changes associated with intracellular synthesis of the recGP₅ were visualized at 70 h pi under a light microscope (Leitz, Leica Microsystems Inc., Richmond Hill, Canada). A commercial TUNEL assay (*In Situ* cell death detection kit, fluorescein, Roche, Laval, Quebec, Canada) was used for the detection of DNA fragmentation in PRRSV and hAdVs-infected cells. Apoptosis was also assessed by detecting the activation of procaspase 3. At 72 h pi, MARC-145 cells that have been coinfecte with AdTR5/ORF5 and AdCMV/tTA or infected with IAF-Klop virus (MOI: 0.04 TCID₅₀/cell) were disrupted in a lysis solution from the ApoAlert Caspase® Fluorescent Assay Kit (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, California, USA). Five µl (corresponding to 60 to 75 µg of protein) of the cell lysates were added to 90 µl of a solution containing 50 mM HEPES, pH 7.0, 10% glycerol, 0.1% CHAPS, 2mM EDTA and 5 mM DTT. Then, 10 µM of a specific substrate for caspase 3, the DEVD-AMC fluorogenic substrate (Biomol Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting, PA, USA), was added and the rate of fluorescence released was monitored with a 96-well plate fluorometer (Cytofluor, Perseptive Biosystems, Foster City, CA, USA). The results were expressed as fluorescence released (fluorescence units or FU) per second per µg of cell lysates.

Pig immunization

Nine crossbred F1 (Landrace x Yorkshire) castrated specific pathogen-free (SPF) piglets, four to five weeks of age, were obtained from a breeding farm located in Southern Quebec. The breeding stock and piglets were tested and proven to be seronegative for PRRSV,

encephalomyocarditis virus (EMCV), porcine parvovirus (PPV), haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV), swine influenza viruses H1N1 and H3N2, transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. The piglets used in this study were from two different litters and were randomly divided into one control group of three pigs and one experimental group of six pigs kept in facilities equipped with a microorganism-free, filtered in-flowing and out-flowing air system. The animals were fed commercial feed and water *ad libitum*. The six experimental pigs were inoculated with 1×10^9 PFU of the hAdV AdTR5/ORF5 and 5×10^9 PFU of the hAdV AdCMV/tTA in a mixture containing 100 μL of PBS and 100 μL of the poloxamer SP1017 0,02% (Suprateck Pharma Inc., Laval, Qc, Canada) [21]. The viral mixture was administered intradermally under the right ear using a 30 gauge needle. The three control pigs received by the same route of immunization a mixture of 100 μL of the hAdV AdCMV/tTA in PBS and 100 μL of the SP1017 poloxamer. The animals received a booster of the appropriate antigenic mixture at day 32, and were challenged intranasally at day 60 with 10^5 TCID₅₀ of the IAF-Klop strain in 5 ml of clarified cell culture supernatant fluid. Pigs were bled at post-challenge days 0, 10 and 21.

Results

Generation of the hAdVs

Preliminary attempts to generate replication-defective hAdVs expressing in mammalian cells the products of ORFs 5 and 7 genes of the North American IAF-Klop strain of PRRSV were unsuccessful. Apparently, high level of intracellular synthesis of the GP₅ and N proteins interfered with replication or assembly of the hAdVs. Indeed, replication-defective hAdVs could be generated by substitution of the constitutive expression cassette of the pAdCMV5 transfer vector by an inducible vector in which the tetracycline-regulatable promoter was used to control the level of transcription of the transgenes in the cells. On the other hand, hAdVs expressing constitutively the recM protein could be obtained, but viral stocks had only infectivity titers of 10⁷ PFU per ml. Usually, infectivity titers of recombinant hAdV viral stocks vary between 10⁸-10¹⁰ PFU/ml and even more following virus purification by isopycnic ultracentrifugation. RIPA experiments, in which lysates of hAdVs-infected 293 cells were incubated with specific rabbit hyperimmune sera raised to GST-ORF5 (α 5), -ORF6 (α 6) and -ORF7 (α 7) rec fusion proteins of the homologous virus, permitted visualization of immunoprecipitated polypeptides co-migrating with the authentic major viral structural proteins, GP₅, M and N (Fig. 1). Data suggested that hAdV-expressed rec proteins conserved some or most antigenic determinants of the authentic viral structural proteins. The recGP₅ of the IAF-Klop strain was also recognized by heterologous monospecific rabbit hyperimmune serum raised toward GST-ORF5 recombinant fusion proteins generated for five other prototype PRRSV strains, either from North America or Europe, a further evidence that antigenicity of the recGP₅ was most entirely conserved [35]. As previously reported by Mardassi et al. (1996), in RIPA experiments the three major structural proteins synthesized in PRRSV-

infected MARC-145 cells coprecipitated (Fig. 1) because of their proteinic interactions, such as the presence of disulfide bonds.

Glycosylated nature of the recGP₅

The reactivity profiles of the monospecific rabbit $\alpha 6$ and $\alpha 7$ hyperimmune sera, when tested by RIPA with lysates of 293 cells infected with either AdCMV5/ORF6 or AdTR5/ORF7, and deduced M_r s of the recM and recN proteins, were indistinguishable from those obtained with the authentic viral M and N proteins. However, reactivity profiles obtained with monospecific rabbit $\alpha 5$ hyperimmune serum, when tested with lysates of PRRSV-infected MARC-145 and 293 cells, or infected with AdTR5/ORF5 after treatment with various endoglycosidases, suggested that the oligosaccharide residues of the recGP₅ differ from those of the authentic major envelope GP₅ glycoprotein. Consistent with previous findings [24], the monospecific $\alpha 5$ antiserum coprecipitated the M protein being associated with the GP₅ as disulfide-linked heterodimers in PRRSV-infected cells (Fig. 2a). Also, the authentic GP₅ synthesized in PRRSV-infected MARC-145 cells appeared as a highly glycosylated protein with estimated M_r of 25 kDa that was converted to a single species of 16,5 kDa (P₅) following treatment with Glyco F, an endoglycosidase known to cleave all N-linked oligosaccharides side chains [24]. However, it was totally resistant to endo β (Fig. 2a), indicating that it lacks N-linked glycans modified by poly-N-acetyllactosamine [24]. On the other hand, treatment with endo H (Fig. 2a), which cleaves high-mannose and hybrid oligosaccharides [24], demonstrated that the authentic viral GP₅ is partially sensitive to this glycosidase giving rise to at least two protein species of 16,5 kDa (P₅) and 21-22 kDa (named GP₅H for sensitivity to endo H), suggestive of the presence of N-linked oligosaccharides of the complex type. Consequently, data indicated that recGP₅ lacks N-linked oligosaccharides of the complex type since it was totally sensitive to endo H (Fig. 2b). The recGP₅ was rather partially sensitive to digestion

with endo β , giving rise to two protein species of 20-22 kDa (named recGP₅ β for sensitivity to endo β) and 25 kDa (recGP₅), respectively. In order to certify that differences in the glycosylation nature of recGP₅ were independant of the cell type used to propagate the hAVds, MARC-145 cells were coinfecte with AdCMV5/tTA and AdTR5/ORF5. Upon individual expression in these cells, the recGP₅ appeared to be similarly glycosylated than after propagation of the hAdVs in 293 cells (Fig. 2c).

Processing of recGP₅ individually expressed in 293 cells

Pulse-chase experiments were performed to examine in greater detail the fate of recGP₅ upon expression in 293 cells (Fig. 3). Sensitivity to endo H and partial resistance to endo β glycosidases were maintained during the 240 min chase period (Fig. 3c,d), suggesting that individually expressed recGP₅ in 293 cells probably accumulated in the ER, being subjected to partial modification by poly-N-acetyllactosamine. In further experiments, the transport of GP₅ in PRRSV-infected MARC-145 cells was shown to be blocked by the addition of BFA in the culture medium (Fig. 4), a chemical which inhibits translocation of proteins from the ER to the Golgi compartment [19]. In the presence of this inhibitor, GP₅ synthesized in the context of a PRRSV-infection did not acquire any endo H resistance (Fig. 4). The results obtained indicate that during maturation cycle of PRRSV, GP₅ first accumulated in the ER in the form of P₅, as demonstrated with the individually expressed recGP₅ (Fig. 2b). Neither the three major viral structural proteins (Fig. 4), nor assembled viral particles (data not shown), could be found in the supernatant fluids of PRRSV-infected cells in the presence of BFA, contrarily to the situation observed in the absence of BFA (Fig. 4). Therefore, through its transport from the ER to the Golgi apparatus, the GP₅ apparently acquires oligosaccharide side chains of the complex type, giving rise to a 21-22 kDa protein species (GP₅H) (Fig. 4). As previously described [24],

GP_SH was the protein species incorporated in the mature virions. Contrarily to the modifications of recGP_S observed in cells that have been infected with AdTR5/ORF5, the authentic GP_S synthesized following PRRSV infection remained resistant to endo β glycosidase even if its transport was blocked in the ER (Fig 2b and 4). As a constituent of the envelope of mature virions, GP_S has been previously found to be associated with M in the form of disulfide-linked heterodimers [24]. However, coinfection of 293 cells with hAdVs expressing individually the recN, recM or recGP_S protein did not change the fate of the recGP_S (Fig. 4). Although the simultaneous expression of the recM and recGP_S could be detected in the infected 293 cells (Fig. 5), no heterodimer recM-recGP_S formation could be demonstrated (data not shown). Furthermore, no coprecipitation of the recGP_S and recM was demonstrated following incubation of the monospecific rabbit α6 hyperimmune serum with hAdV/ORF5 and hAdV/ORF6-coinfected cell lysates (data not shown), contrarily to the situation observed with lysates of PRRSV-infected cell cultures wherein the formation of GP_S-M heterodimers was previously found to occur [24].

Proapoptotic activity of hAdV-expressed recGP_S protein in MARC-145 cells

Coinfection of MARC-145 cells with AdCMV/tTA and AdTR5/ORF5 permitted the expression of recGP_S which was rather completely inhibited in the presence of doxycycline (Fig. 6a). Interestingly, when recGP_S was expressed individually in MARC-145 cells, cellular degenerescence was observed (Fig. 6b). These degenerative changes were neither observed when doxycycline was added to the medium (Fig. 6b, left panel) nor in cells expressing the recN protein alone (data not shown). The cellular changes observed with recGP_S appeared almost identical to those observed in the PRRSV-infected cell cultures [23]. Indeed, scattered and enlarged cells with very small granular inclusions in their cytoplasm usually started to be detectable by 24 h pi, then infected cells showed a tendency to clump into foci that could be well delineated from the unaffected monolayer

by 36 to 48 h pi. Many of the infected cells eventually detached from the surface of the culture flask, more than 75% of the cell monolayer being severely damaged by 72 h pi. To test whether the observed cytotoxicity was due to apoptosis, cells were assayed for the presence of DNA fragmentation by a TUNEL fluorescent assay, 3 days after infection. As illustrated in Fig. 6b, positive fluorescent cells were detected only when GP₅ expression was turned on and only in areas affected by degenerative damages. DNA fragmentation was also detected in PRRSV-infected cells (Fig. 6b). Additional evidence that apoptosis was occurring in AdTR5/ORF5-infected cells was obtained by the demonstration of procaspase 3 activation. As depicted in Fig. 7, an important increase in caspase 3 activity was detected only in cells expressing the recGP₅. Addition of doxycycline to inhibit recGP₅ expression did repress the procaspase 3 activation which was detected at the same level as in control cell cultures which have been infected with AdCMV/tTA alone. The levels of caspase 3 activity specifically induced by recGP₅, that were evaluated from three separate experiments, were at least 39 and 10 fold higher than those detected in the control uninfected cell monolayers and AdCMV/tTA infected cells, respectively. By comparison, PRRSV infection also resulted in procaspase 3 activation, but to a lower extent than AdTR5/ORF5 infection where recGP₅ was individually expressed. This was probably due to the lower number of cells expressing the GP₅ protein, since an MOI of only 0,04 TCID₅₀ per cell could be used for PRRSV, as compared to 50 PFU per cell for the hAdV AdTR5/ORF5.

Immune response induced in pigs by hAdV AdTR5/ORF5

Following two intradermal injections of the mixture AdCMV/tTA and AdTR5/ORF5, none of the immunized piglets developed significant antibody titers (> 16), as demonstrated either by indirect immunofluorescence (IIF) on PRRSV-infected MARC-145

cells or virus neutralization (VN) [22, 32]. Furthermore, none of the hyperimmunized pigs reacted positively to the authentic GP₅ viral protein by Western blot. However, following a challenge with a low dose of virulent virus given intranasally 14 days after the booster, the six AdTR5/ORF5-immunized pigs produced high antibody titers to the authentic viral GP₅ protein, a clear signal being obtained by Western blot as soon as 10 days post-challenge (Fig. 8). In comparison, pigs that were vaccinated with the AdCMV/tTA vector alone were still negative by Western blot at day 10 and day 21 post-challenge. Only the pigs that were vaccinated with the AdTR5/ORF5 developed VN antibody titers. Indeed, at day 10 post-challenge, two of the pre-immunized pigs had VN antibody titers of 128-256, and one had a VN antibody titer of 16. The control pigs were still negative by VN at day 21 post-challenge.

Discussion

In the present study, generation of replication-defective hAdVs expressing constitutively ORF5 and 7 of a North American strain of PRRSV under the control of the hCMV immediate-early promoter/enhancer was unsuccessful, despite that such chimeric hAdVs was obtained for the ORF6. However, infectivity titers of the replication-defective hAdV/ORF6 propagated in 293 cells, complementing the E1 functions of the hAd5, were at least 10 to 100 fold lower than those usually expected for such recombinant adenoviruses [18]. Further characterization of the authentic GP_s of IAF-Klop strain of PRRSV demonstrates that, as the homologous protein of European strains [40], it induces cell death by apoptosis (Fig. 6b and 7) and appear to be toxic for 293 cells. Both characteristics could explain the failure to generate hAdVs that constitutively express this major envelope glycoprotein of PRRSV. Whether similar phenomena can also interfere with generation of hAdVs that constitutively express the N protein should be further investigated, as no cytotoxicity in 293 cells transfected with pAdCMV5/ORF7 could be observed (data not shown). Accordingly, previous investigators [36] identified the nucleolus of PRRSV-infected cells as the primary site for N protein localization within the nucleus. Even if cell death did not appear to correlate with this early localization of the N protein during PRRSV replication cycle, it may interfere with some cellular functions required for the generation of hAdVs. Consequently, to generate hAdVs that could express the GP_s and N proteins, an inducible system was required to be able to control the synthesis of both proteins to a threshold level above which they become toxic for the cells and interfere with replication and assembly of hAdVs. This was done by using the tetracycline-regulated promoter contained in the pAdTR5 transfer vector which has been already reported to permit the construction of hAdVs expressing toxic proteins [26, 27]. In MARC-145 cells, coinfection of hAdVs expressing the tTA transactivator

(AdCMV/tTA) with hAdVs expressing the PRRSV structural genes under the control of the tetracycline-regulated promoter (AdTR5/ORF5 and AdTR5/ORF7) was essential to allow efficient expression of recombinant PRRSV proteins. Addition of doxycycline in the culture medium also completely suppressed expression of the transgenes (Fig. 6a), thus confirming that the tetracycline-regulated expression system was very efficient for controlling the expression levels of both viral proteins, to allow generation of hAdVs carrying the ORFs 5 and 7.

The antigenicity of the recN, recM and recGP₅ expressed by hAdVs (AdTR5/ORF7, AdCMV5/ORF6 and AdTR5/ORF5) was conserved since the recombinant proteins could be detected by the homologous monospecific rabbit antiserum raised against the corresponding viral protein expressed in *E. coli*. [24], by the homologous porcine anti-PRRSV hyperimmune serum, as well as heterologous monospecific rabbit hyperimmune sera raised toward GST-ORF5 recombinant fusion proteins of five other prototype PRRSV strains, either from North America or Europe [35]. Data also suggested that both linear and conformational epitopes of PRRSV major structural proteins were conserved following expression by the rec hAdVs, despite that glycosylation of the recGP₅ protein was found to be different from that of the authentic GP₅. Indeed, whereas the authentic viral GP₅ of the IAF-Klop strain was resistant to treatment with endo β glycosidase [24], the individually expressed recGP₅ was partially sensitive to this digestion (Fig. 2). Consequently, contrarily to the authentic viral GP₅, the rec GP₅ expressed individually by hAdVs possessed N-acetyllactosamine side chain oligosaccharides. Several structural features on the authentic protein (fucose, branching, galactose sulfate residues) may be responsible for its resistance to endo β glycosidase [37]. The presence of such oligosaccharide residues (N-acetyllactosamine side chains) have been previously reported in the case of the G_L protein of EAV, the counterpart of the GP₅ of PRRSV [8]. The sensitivity of the recGP₅ protein to endo H glycosidase is an indication that the

individually expressed protein is associated with intracellular membranes or accumulates within the ER. This correlates with the fact that in PRRSV-infected MARC-145 cells incubated with BFA, which inhibits translocation of the proteins to the Golgi apparatus [19], the authentic GP₅ remained sensitive to endo H, as in case of the recGP₅ (Fig. 4). However, even after treatment with BFA, the authentic GP₅ still differs from the recGP₅ in regards to their distinct reactivity to endo β digestion. Further studies are required to identify whether this difference can be attributed to interactions with proteins synthesized during the replication of hAdVs or if interactions with other unidentified PRRSV proteins is required for final maturation of GP₅ occurring in the Golgi apparatus. The glycosylation state of the GP₅ may have an important role to play in its biological activity, as previously demonstrated for LDV in mice for which the glycosylation state of the major envelope structural protein is implicated in the neuropathogenicity of the various strains, as well as inactivation by neutralizing antibodies [5].

As for the autologous proteins of EAV, the GP₅ and M proteins of PRRSV form heterodimers prior to the final processing of the N-oligosaccharide side chains of GP₅ [9, 24]. The formation of these heterodimers play a key role in the maturation and infectivity of the PRRSV virions [9, 13, 24]. However, in the present study, such heterodimers could not be demonstrated by co-infection experiments with hAdVs-expressed recGP₅, recM and/or recN proteins (Fig. 5), done in two different cell lines (data not shown). Also, no virion-like particles could be observed in the supernatant medium by negatively stained electron microscopy. Since such heterodimers could not be obtained after transient expression assays of the M and GP₅ proteins in 293 cells co-transfected with the corresponding recombinant transfer vectors (data not shown), it seems unlikely that the hAdVs interfered with the heterodimers formation. It is plausible that other PRRSV proteins are essential for the appropriate folding and glycosylation of the GP₅.

Recently, expression of the two major envelope proteins of EAV as heterodimers has been reported to be necessary for induction of neutralizing antibodies in mice immunized with recombinant Venezuelan equine encephalitis (VEE) virus replicon particles [2]. Data obtained in this study can not be generalized for arteriviruses infecting other animal species. Indeed, in previous studies, the production of VN antibodies could also be recovered in pigs, but not in mice, following genetic immunization with plasmid DNA carrying the PRRSV ORF5 in the absence of M protein [34]. In contrast, VN antibodies to PRRSV could be recovered from the serum of mice following their immunization with *E. coli*-expressed ORF5 protein [33]. Similarly, in the case of EAV, the presence of VN antibodies could be demonstrated in the sera from horses and mice immunized with synthetic peptides deduced from the aa sequence of the G_L protein, or with a bacterial fusion protein [6]. Consequently, the ability of the individually-expressed PRRSV GP_S protein to induce neutralizing antibodies in pigs was not surprising, contrarily to the humoral immune response established in mice following immunization with the EAV G_L protein expressed by recombinant VEE virus replicon particles [2]. The fact that neutralizing antibodies were induced only in mice immunized with the G_L/M heterodimers of EAV expressed by recombinant VEE indicates that in the context of the recombinant viral infection, the presence of the M protein is critical to the expression of neutralizing epitopes, which are apparently conformation-dependent. In the case of the PRRSV recombinant GP_S protein individually expressed by hAdVs, data obtained indicate that at least some of the epitopes involved in VN are available to the antigen presenting cells, and probably that other neutralizing conformation-dependent epitopes may require the interaction with the M protein to become available to cells involved in the immune response.

In the present study, it has been further demonstrated that immunization (vaccination) of pigs with adenovirus that are able to express the GP_S of PRRSV in the

absence of M protein triggers their immune system for the production of VN antibodies, which however could only be detected 10 days after the pigs were challenged with a low dose of the virulent homologous virus. These serological data differ significantly from those obtained following natural infection with PRRSV, since infected pigs usually do not produce VN until 3 to 4 weeks post-infection [22, 32]. However, two weeks after the first injection of the rec hAdVs, pigs had developed high specific indirect immunofluorescence (IIF) antibody titers (>160) to adenovirus structural proteins (data not shown), which may have interfered with an efficient expression of the recGP₅ and subsequently delayed the establishment of a specific immune response against the GP₅. To demonstrate the effectiveness of PRRSV challenge, collected sera were tested for the presence of anti-PRRSV antibodies by IIF, by using a commercial ELISA (IDEXX) and by using a blocking ELISA [11]. At the day of challenge, all tested sera were negative for antibodies to PRRSV, whereas at 10 days post-challenge, all sera tested positively using those three diagnostic tests, thus confirming the seroconversion to PRRSV (data not shown). Since the latter serological tests were reported to permit detection of antibodies directed only (blocking ELISA) or mainly (IIF and IDEXX ELISA) to the N protein of PRRSV [11], they were expected to be negative or only weakly positive before challenge, since the vaccination was against the GP₅ only. Despite the fact that authentic GP₅ specific antibodies in experimentally infected pigs sera are only detected earlier than 28 days post-infection by western blot [22], GP₅ specific antibodies could be detected earlier than 10 days post-challenge in AdTR5/ORF5 vaccinated pigs. Data obtained suggest that vaccination of pigs with adenovirus expressing recGP₅ at least pre-sensitized cells from the lymphoid organs and established an immune memory, which, following a subsequent PRRSV infection, results in a rapid clonal expansion of memory cells to the neutralizing epitopes of the authentic viral GP₅ protein. Since AdCMV/tTA, which permits the constitutive expression of the tetracycline transactivator (tTA), had to be co-inoculated

to the pigs with AdTR5/ORF5 to obtain expression of recGP₅, the *in vivo* expression of the GP₅ may have been less efficient than in cell cultures. Indeed, the cells had to be infected by both rec hAdVs to express the recGP₅. Therefore, the vaccinated animals probably did not produce enough antibodies to reach the threshold required to be detected by the serological tests used in the present study. With the type of inducible vector used in this study to control the expression level of recGP₅, the hAdV strategy was less successful than a previously described DNA vaccine [34], since *in vivo* co-infection of the same cells by AdCMV/tTA and AdTR5/ORF5 could not be controlled. This may explain why only a specific memory immune response was established in vaccinated pigs (Fig. 8).

Recently, an adenovirus expressing both the gene of interest and the tetracycline transactivator (tTA) has been constructed and proven to be efficient for *in vivo* expression of the transgene [7]. Other promoters can also be used to repress the expression of a toxic transgene in cells constitutively expressing a repressor protein (like the lac repressor protein). Such promoters allow the generation of hAdVs carrying foreign genes encoding toxic proteins and are efficient to permit high expression of a transgene in other cell lines [28]. In the context of vaccine development using recombinant adenoviruses, those strategies and other alternatives are being studied.

European, as well as North American, strains of PRRSV were reported to induce apoptosis in the infected cells both *in vitro* and *in vivo* [40-42]. The use of recombinant vaccinia virus expressing the GP₅ of the European genotype demonstrated that the major envelope glycoprotein is involved in this pathological phenomenon [40]. In the present study, the proapoptotic phenotype of the IAF-Klop GP₅ was demonstrated in cells infected with the replication-defective hAdVs using two different approaches: firstly, the demonstration of DNA fragmentation by TUNEL assays (Fig. 6), and secondly, the demonstration of procaspase 3 activation (Fig. 7). Despite only 52% aa identity between the GP₅ of North American and European strains [35], both GP₅ display proapoptotic

activity. Further studies should permit to identify the GP₅ region or aa residues involved and conserved amongst strains from both genotypes. Recently, it has been demonstrated, *in vivo* and *in vitro*, that apoptosis occurred in PRRSV-uninfected bystander cells [38]. This phenomenon could not be demonstrated in the present study since a moi of 100 PFU was necessary to obtain sufficient expression of the recGP₅ by the replication-defective adenovirus vectors. Studies are in progress to further characterize the proapoptotic activity of the GP₅ of the IAF-Klop strain and determine which caspase(s) cascade(s) is activated. Previous studies with the Spanish OLOT strain of PRRSV demonstrated that the GP₅-induced apoptotic activity could not be prevented by using a cell line permanently expressing the anti-apoptotic bcl-2 gene, suggesting the use of an alternative and/or unknown apoptotic pathway [40].

Acknowledgements

The authors wish to thank Louise Wilson, Marcel Desrosiers, and François Bouthillier for their excellent technical assistance. This report was taken in part from a dissertation submitted by C.A. Gagnon to the INRS-Institut Armand-Frappier, in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Strategic grant STP02002083) and Biovet Inc., St-Hyacinthe, Quebec, Canada. C.A. Gagnon was a recipient of a fellowship from the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

1. Acsadi G, Jani A, Massie B, Simoneau M, Holland P, Blaschuk K, Karpati G (1994) A differential efficiency of adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum Mol Genet* 3: 579-84
2. 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.
3. Callebaut P, Enjuanes L, Pensaert M (1996) An adenovirus recombinant expressing the spike glycoprotein of porcine respiratory coronavirus is immunogenic in swine. *J Gen Virol* 77 (Pt 2): 309-13
4. Cavanagh D (1997) Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142: 629-33
5. Chen Z, Li K, Plagemann PG (2000) Neuropathogenicity and sensitivity to antibody neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus are determined by polygalactosaminoglycan chains on the primary envelope glycoprotein. *Virology* 266: 88-98
6. Chimside ED, de Vries AA, Mumford JA, Rottier PJ (1995) Equine arteritis virus-neutralizing antibody in the horse is induced by a determinant on the large envelope glycoprotein GL. *J Gen Virol* 76: 1989-98
7. Corti O, Sabate O, Horellou P, Colin P, Dumas S, Buchet D, Buc-Caron MH, Mallet J (1999) A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nat Biotechnol* 17: 349-54.
8. de Vries AA, Chimside ED, Horzinek MC, Rottier PJ (1992) Structural proteins of equine arteritis virus. *J Virol* 66: 6294-303
9. de Vries AA, Post SM, Raamsman MJ, Horzinek MC, Rottier PJ (1995) The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. *J Virol* 69: 4668-74
10. Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D (2000) 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
11. Dea S, Wilson L, Therrien D, Cornaglia E (2000) 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
12. Eloit M, Gilardi-Hebenstreit P, Toma B, Perricaudet M (1990) Construction of a defective adenovirus vector expressing the pseudorabies virus glycoprotein gp50 and its use as a live vaccine. *J Gen Virol* 71: 2425-31
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. Gonin P, Oualikene W, Fournier A, Eloit M (1996) Comparison of the efficacy of replication-defective adenovirus and Nyvac poxvirus as vaccine vectors in mice. *Vaccine* 14: 1083-7.
15. 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
16. Goyal SM (1993) Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 5: 656-64
17. Graham FL, Prevec L (1992) Adenovirus-based expression vectors and recombinant

- vaccines. *Biotechnology* 20: 363-90.
18. Jani A, Lochmuller H, Acsadi G, Simoneau M, Huard J, Garnier A, Karpati G, Massie B (1997) Generation, validation, and large scale production of adenoviral recombinants with large size inserts such as a 6.3 kb human dystrophin cDNA. *J Virol Methods* 64: 111-24
 19. Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116: 1071-80
 20. Kozak M (1987) At least six nucleotides preceding the AUGinitiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196: 947-50
 21. 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
 22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. Massie B (1998) BMAdE1, a new complementing cell line for the large scale production of E1-deleted Adenovirus (Ad) vectors devoid of RCA (replication competent Ad). patent 5,891,6690, U.S.
 26. Massie B, Couture F, Lamoureux L, Mosser DD, Guilbault C, Jolicoeur P, Belanger F, Langelier Y (1998) Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol* 72: 2289-96
 27. Massie B, Mosser DD, Koutroumanis M, Vitté-Mony I, Lamoureux L, Couture F, Paquet L, Guilbault C, Dionne J, Chala D, Jolicoeur P, Langelier Y (1998) Newadenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology* 28: 53-64
 28. Matthews DA, Cummings D, Evelegh C, Graham FL, Prevec L (1999) Development and use of a 293 cell line expressing lac repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol* 80: 345-53.
 29. Meulenberge JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PL, den Besten A, de Kluyver EP, Wensvoort G, Moormann RJ (1993) Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192: 62-72
 30. Meulenberge 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
 31. Mittal SK, Papp Z, Tikoo SK, Baca-Estrada ME, Yoo D, Benko M, Babiuk LA (1996) Induction of systemic and mucosal immune responses in cotton rats immunized with human adenovirus type 5 recombinants expressing the full and truncated forms of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology* 222: 299-309
 32. Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA (1994) Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest* 6: 410-5
 33. 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: 1867-73
 34. 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: 989-

99

35. Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S (1998) Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. *Can J Vet Res* 62: 170-7
36. Rowland RR, Kervin R, Kuckleburg C, Sperlich A, Benfield DA (1999) The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Res* 64: 1-12
37. Scudder P, Hanfland P, Uemura K, Feizi T (1984) Endo-beta-D-galactosidases of *Bacteroides fragilis* and *Escherichia freundii* hydrolyze linear but not branched oligosaccharide domains of glycolipids of the neolacto series. *J Biol Chem* 259: 6586-92
38. Sirinarumitr T, Zhang Y, Kluge JP, Halbur PG, Paul PS (1998) A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 79: 2989-95
39. Snijder EJ, Meulenbergh JJ (1998) The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 79: 961-79
40. Suarez P, Diaz-Guerra M, Prieto C, Esteban M, Castro JM, Nieto A, Ortín J (1996) Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol* 70: 2876-82
41. Sur JH, Doster AR, Christian JS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ, Osorio FA (1997) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 71: 9170-9
42. Sur JH, Doster AR, Osorio FA (1998) Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 35: 506-14
43. Torres JM, Sanchez C, Sune C, Smerdou C, Prevec L, Graham F, Enjuanes L (1995) Induction of antibodies protecting against transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) by recombinant adenovirus expressing TGEV spike protein. *Virology* 213: 503-16
44. Torres JM, Alonso C, Ortega A, Mittal S, Graham F, Enjuanes L (1996) Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol* 70: 3770-80
45. Tuboly T, Nagy E, Derbyshire JB (1993) Potential viral vectors for the stimulation of mucosal antibody responses against enteric viral antigens in pigs. *Res Vet Sci* 54: 345-50
46. 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.
47. Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC (1996) A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 219: 220-7

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Expression in 293 cells of the PRRSV recombinant major structural proteins (N, M and GP₅) by hAdVs. Radio-immunoprecipitation profiles obtained using lysates of MARC-145 cells infected with PRRSV (lane 1) and lysates of 293 cells infected with hAdVs: AdTR5/ORF5 (lane 3), AdCMV5/ORF6 (lane 4) and AdTR5/ORF7 (lane 5) or mock-infected MARC-145 and 293 cells (lanes 2 and 6). A) Reactivity of α 7 monospecific anti-N serum; B) Reactivity of α 6 monospecific anti-M serum; C) Reactivity of α 5 monospecific anti-GP₅ serum. In panel B and C, the arrows indicate the recM and recGP₅ respectively.

Figure 2. Glycosylation nature of the recGP₅ in 293 and MARC-145 cells. A) Immunoprecipitation profiles obtained with lysates of PRRSV-infected MARC-145 cells. B) Immunoprecipitation profiles obtained with lysates of AdTR5/ORF5-infected 293 cells. C) Immunoprecipitation profiles obtained with lysates of AdTR5/ORF5-infected MARC-145 cells. Authentic and recombinant proteins were immunoprecipitated using α 5 monospecific rabbit antiserum. Immunoprecipitated proteins were untreated (lane U) or treated with endoglycosidases endo H (lane H), Glyco F (lane F) and endo β (lane B).

Figure 3. Processing of the recGP₅ in AdTR5/ORF5-infected 293 cells. AdTR5/ORF5-infected 293 cells were pulse-labelled with [³⁵S] methionine for 30 min, then washed and chased with DMEM containing 5 mM of cold L-methionine. RIPA were performed with cell lysates prepared after the indicated chase period and the immunoprecipitated proteins were untreated (A) or treated with endoglycosidases; Glyco F (B), endo H (C) and endo β (D).

Figure 4. Transport inhibition of the GP₅ major envelope-associated glycoprotein. PRRSV-infected MARC-145 cells were incubated with or without 5 μ g/ml of BFA and RIPA were done on cell lysates and supernatant of infected cells using the monospecific α 5 antiserum. Immunoprecipitated proteins were untreated (U) or treated with endoglycosidases: endo H (lane H) and endo β (lane B).

Figure 5. Glycosylation nature of the coexpressed recN, recM and recGP₅ proteins in 293 cells. Radiolabelled recombinant proteins were immunoprecipitated with

$\alpha 5$, $\alpha 6$ and $\alpha 7$ antisera and untreated (lane U) or treated with endoglycosidases; endo H (lane H), Glyco F (lane F) and endo β (lane B).

Figure 6. Induction of apoptosis in MARC-145 cells by regulatable expression of the recGP₅ protein. (A) Detection of the recGP₅ by Western blot in lysates of MARC-145 cells infected with PRRSV IAF-Klop strain or with both AdCMV/tTA and AdTR5/ORF5 in presence or absence of doxycycline using the anti-GP₅ rabbit monospecific antisera ($\alpha 5$). (B) Visualization with a light microscope of the cytopathic effect (CPE) of MARC-145 cells infected with PRRSV IAF-Klop strain and with AdCMV/tTA alone or in combination with AdTR5/ORF5, in presence or absence of doxycycline at 70 h pi. Visualization of the same hAdV infected-cells with a fluorescence microscope after treatment with a fluorescein TUNEL assay for the detection of DNA fragmentation.

Figure 7. Procaspsase 3 activation. Confluent monolayers of MARC-145 cells were infected with either AdCMV/tTA (tTA) alone or with both AdCMV/tTA and AdTR5/ORF5 (ORF5) at a MOI of 50 PFU/cell, in the presence or absence of doxycycline. Control MARC-145 cells were mock-infected or infected with IAF-Klop PRRSV strain. Measurement of the procaspsase 3 activation was done by quantifying the release of fluorescence and the results were expressed as FU/(sec x μ g). The amplification indexes represent the level of procaspsase 3 activation in infected cells divided by the level of procaspsase 3 activation in uninfected cells.

Figure 8. Serological reactivities of AdTR5/ORF5-immunized pigs toward the authentic viral GP₅ protein. Lysates of IAF-Klop PRRSV-infected MARC-145 cells were prepared in RIPA buffer, clarified and electrophoresed on 12% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane and individual strips were incubated in the presence of serum from the pigs (diluted 1/50) that have been injected twice with AdTR5/ORF5 + AdCMV/tTA (immunized pigs) or AdCMV/tTA (control pigs) alone, and collected at day 10 (A) and day 21 (B) after intranasal challenge with virulent homologous PRRSV strain. tTA: sera of control pigs; AdTR5/ORF5: sera of pigs pre-immunized with AdCMV/tTA plus AdTR5/ORF5; +: reactivity of anti-GP₅ rabbit monospecific antisera (α 5).

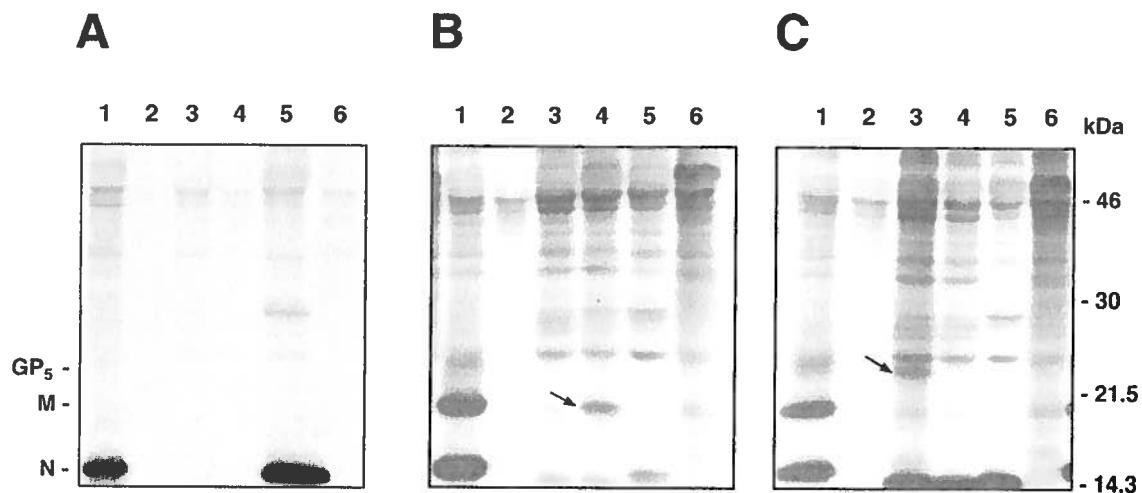
Figure 1.

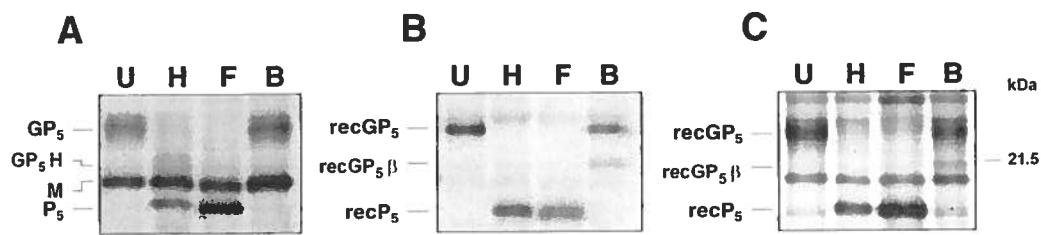
Figure 2.

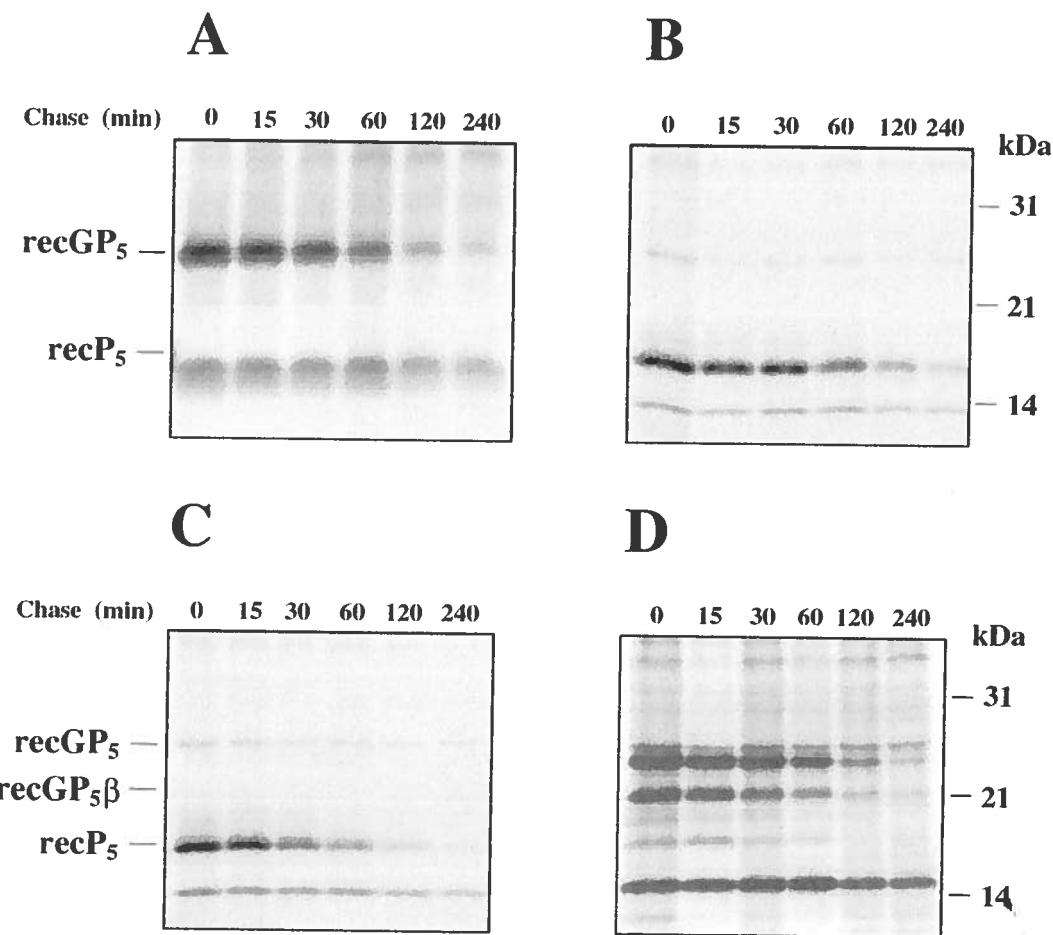
Figure 3.

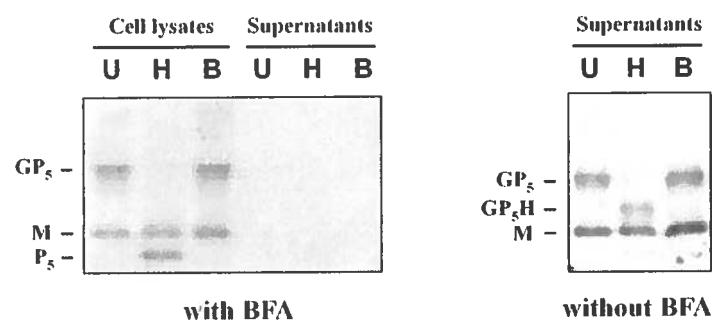
Figure 4.

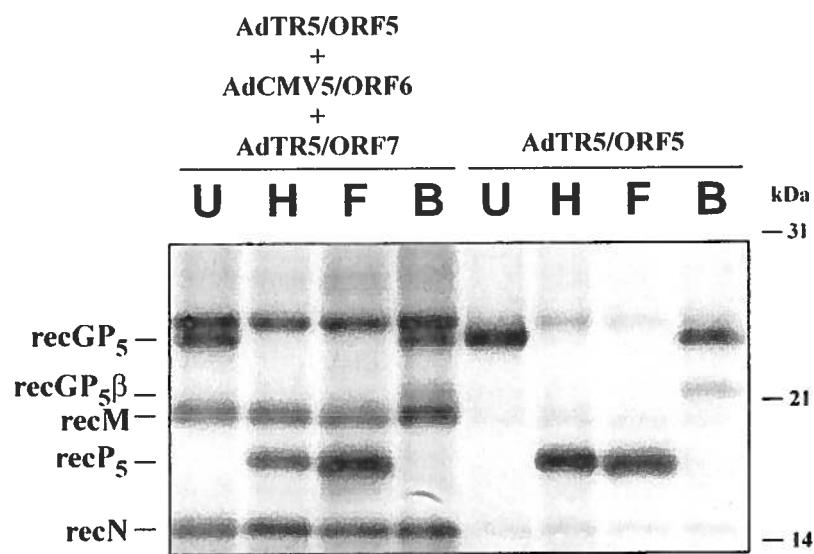
Figure 5.

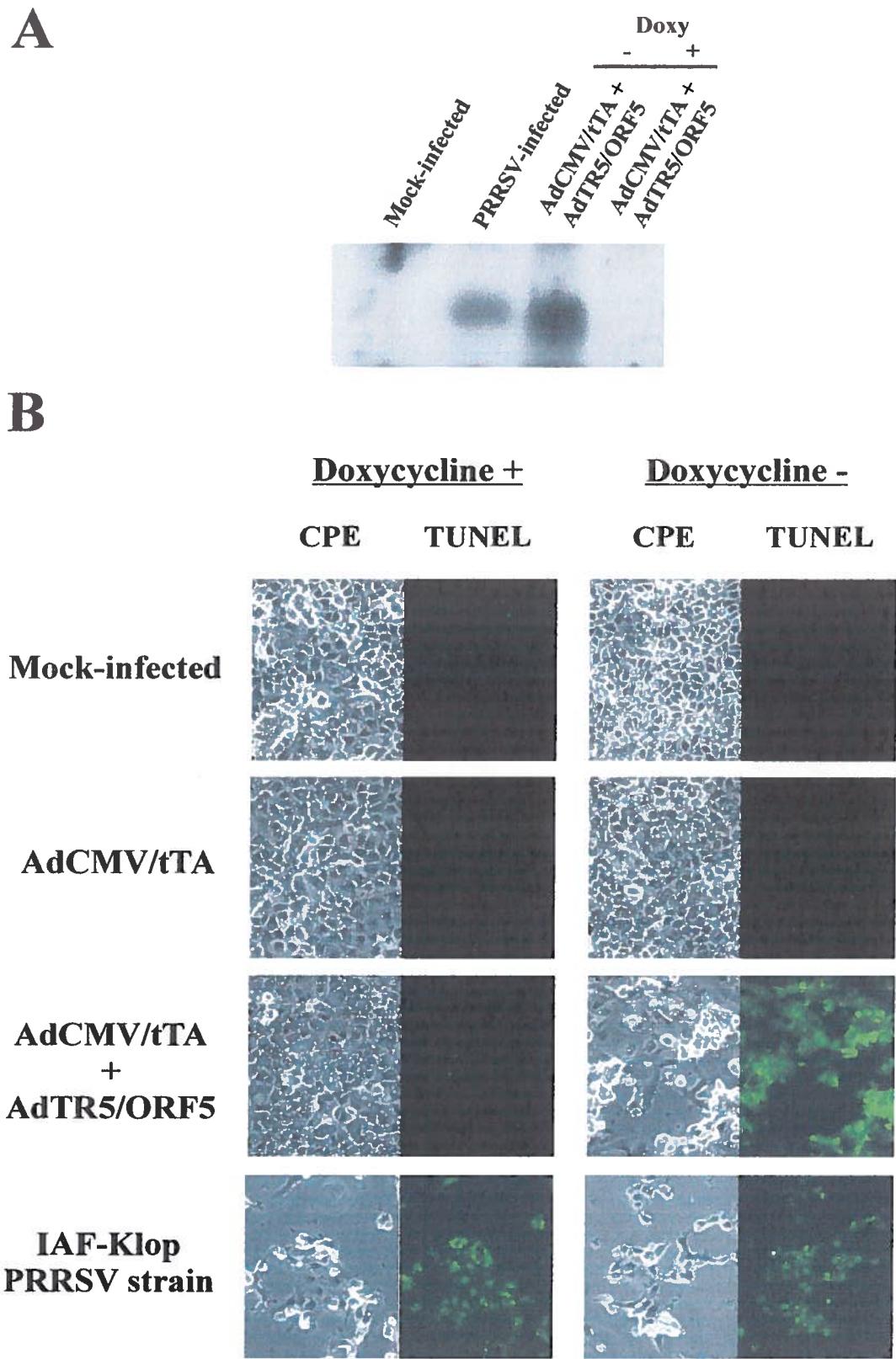
Figure 6.

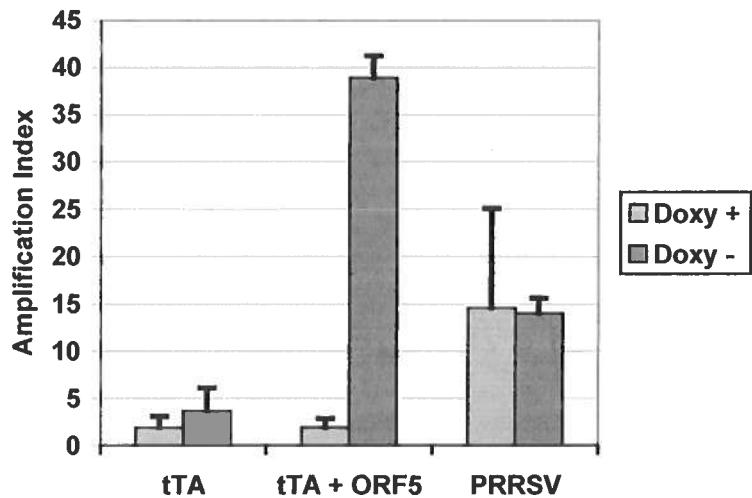
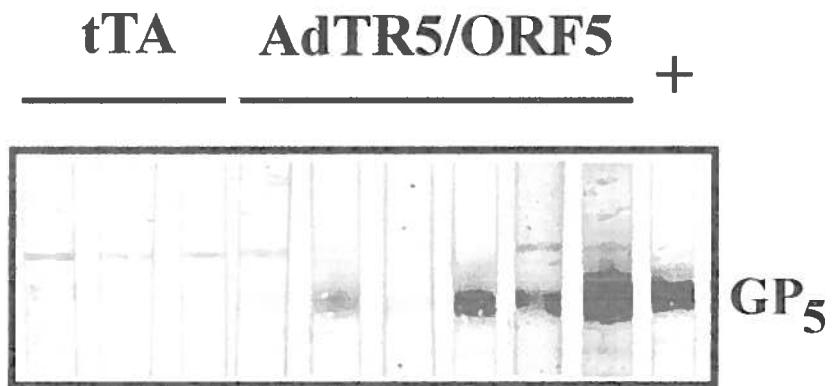
Figure 7.**Figure 7. Procaspsase 3 activation**

Figure 8.**A****B**

CHAPITRE 3**ÉTUDE DE LA VOIE APOPTOTIQUE DE LA GP5**

3.1-Résumé

Il fut démontré en 1996 que le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) peut causer la mort cellulaire par apoptose. Ce phénomène semblait attribuable à la glycoprotéine GP₅ d'une souche Européenne (EU) du VSRRP. Malgré les 52% d'identité en acide aminé (aa) retrouvés entre cette souche et la souche Nord Américaine (NA), il fut dernièrement confirmé que la protéine GP₅ de la souche NA IAF-Klop pouvait aussi induire l'apoptose. Outre le fait qu'il semble que seulement les 119 premiers aa de la protéine GP₅ soient impliqués dans l'apoptose, et que le processus semble indépendant de *Bcl-2* chez la souche EU, on connaît peu de choses sur le mécanisme apoptotique déclenché par le VSRRP et plus particulièrement par la protéine GP₅. Cette présente étude vise la caractérisation de la voie apoptotique induite par la protéine GP₅ du VSRRP. Pour ce faire, le gène ORF5 de la protéine GP₅ de la souche NA IAF-Klop du VSRRP fut inséré avec un gène rapporteur (GFP) dans la région E1 d'un adénovirus recombinant (AdV), sous le contrôle d'un promoteur sensible à la tétracycline (TR5) afin d'obtenir l'AdV inducible et non-réPLICATIF AdTR5-ORF5-DC-GFPq. Les cellules MARC-145 permissives au VSRRP, furent infectées par AdTR5-ORF5-DC-GFPq, ou co-infectées avec différents AdV exprimant des protéines anti-apoptotiques humaine ou virales (hsp70, p35, E1B-19K, E3-14.7K et E3-10.4/14.5K). Après infection, l'analyse des extraits cellulaires fut réalisée par immunobuvardage de type Western, de même que par des essais enzymatiques spécifiques à l'activation des caspases 3, et 9. Les résultats montrent que la présence de la protéine GP₅ du VSRRP induit le relargage du cytochrome C des mitochondries, suivie de l'activation de la caspase 9 et de la caspase 3. Les inhibiteurs utilisés bloquent tous l'activation de la caspase 3, sauf la protéine de l'adénovirus E3-14.7K. L'ensemble des résultats obtenus montrent que l'apoptose induite par la protéine GP₅ de la souche IAF-Klop du VSRRP agit par la voie mitochondriale.

3.2-Participation des auteurs

Le Dr. Gagnon a construit, amplifié et purifié les adénovirus recombinants exprimant l'ORF5 de la souche de référence nord américaine IAF-Klop du VSRRP, fournie par le Dr. Dea, de façon inducible AdTR5-ORF5 et AdTR5- ORF5-DC-GFPq. Les autres adénovirus furent fournis par le Dr. Massie. Le Dr. Massie a aussi fourni l'expertise pour la construction des adénovirus recombinants et pour les études d'apoptose. Isabelle Vitté-Mony a construit et caractérisé les AdVs exprimant les gènes anti-apoptotiques de la région E3 de l'adénovirus. Guillaume Lachapelle a réalisé les co-infections sur les cellules MARC-145. Le Dr. Gagnon a contribué aux expériences de co-infections avec les inhibiteurs apoptotiques, ainsi qu'aux essais enzymatiques pour la caspase 3 et confirmé par Guillaume Lachapelle, qui en plus réalisa les immunobuvardages de type Western. Les tests d'immunofluorescence furent effectués par Guillaume Lachapelle, de même que les essais enzymatiques pour les caspases-3, -8 et -9. Les expériences sur les cellules MARC-145 avec le virus SRRP complet furent effectuées par le Dr. Gagnon. Guillaume Lachapelle rédigea l'article rapportant ces résultats.

3.3-Deuxième publication

The major glycosylated GP₅ envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis using the mitochondrial pathway through cytochrome c release and caspase-9 activation

Guillaume Lachapelle^{1,2}, Carl A. Gagnon¹, Isabelle Vitté-Mony^{1,4}, Serge Dea¹ and Bernard Massie^{1,2,3*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Centre de Microbiologie et Biotechnologie, 531 boul. des Prairies, Laval, P.Q., Canada, H7V 1B7. ²Biotechnology Research Institute, CNRC, Montreal, P.Q., Canada. ³Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, P.Q., Canada, H3C 3J7. ⁴Diagnocure Inc., Québec, Québec Canada

*Corresponding author. Mailing address:

Dr Bernard Massie, Ph.D.
Institut de Recherches en Biotechnologie,
6100 Royalmount Avenue, Montréal,
Québec, Canada H4P 2R2
Phone: (514) 496-6131.
Fax: (514) 496-5143.
Email: bernard.massie@nrc.ca

ABSTRACT

It has been known for some time that PRRSV induces cell death by apoptosis. More specifically, the major envelope-associated glycoprotein GP5 of a PRRSV European (EU) strain was shown to play a major role in the induction of apoptosis. Recently, a similar finding was also reported for the GP5 of the North American (NA) IAF-Klop strain even though there is only 52% aa identity between NA and EU strains. Despite the latest studies showing the implication in apoptosis of the GP5 N-terminal 119 first amino acids of an EU strain, nothing is known about the mechanism involved in the induction of apoptosis by GP5. The objective of the present study was to characterize the apoptotic pathway induced by the GP5 protein of PRRSV. For this, the ORF5 gene of the NA IAF-Klop strain of PRRSV (with a GFP reporter gene) was inserted in the E1 region of adenovirus, under the control of tetracycline regulated promoter for the construction of inducible non-replicative recombinant adenovirus (AdV) AdTR5-ORF5-DC-GFPq. The PRRSV permissive cell line, MARC-145, was infected with AdTR5-ORF5-DC-GFPq or in combination with different AdVs expressing human or viral anti-apoptotic proteins (hsp70, p35, E1B-19K, E3-14.7K and E3-10.4/14.5K). By Western blot and enzymatic assays using specific fluorogenic substrates, only the activation of caspase-9 and -3 could be demonstrated. Also, release of cytochrome *c* in the cytosol was revealed following expression of GP5 in infected-cells. Interestingly, all the apoptotic inhibitors used, except for the E3-14.7K protein, were able to block activation of caspase-3 and protect cells against induction of GP5 mediated apoptosis. The bulk of our data indicates that the apoptotic pathway induced by the GP5 protein is brought about through activation of the mitochondrial apoptotic pathway.

INTRODUCTION

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), a member of the *Arteriviridae* family of the order *Nidovirales* (Cavanagh, 1997) is responsible for an important infectious disease of pigs mainly causing reproductive failure associated with respiratory problems (reviewed in Dea et al., 2000). The positive single strand RNA 15 Kb genome of PRRSV is divided into 9 open reading frames (ORFs) named ORF 1a, ORF 1b and ORF 2-7 (Snijder and Meulenberg, and 1998; Conzelmann et al., 1993). The ORF 1 genes represent 75% of the genome and are mostly associated with viral replication. ORF 2-4 encode minor structural proteins while the ORF 5-7 gene products, which include the major glycosylated envelope (GP5), membrane (M) and nucleocapsid (N) proteins, respectively, represent the major constituents (90-95%) of the viral particle (Dea et al., 2000; Mardassi, Mounir, and Dea, 1995; Meulenberg et al., 1998; Meulenberg et al., 1993; Snijder and Meulenberg, 1998). Recent studies suggest a role for the GP5 protein in attachment to a cellular receptor (Delputte et al., 2002; Jusa et al., 1997; Therrien, St-Pierre, and Dea, 2000), that is possibly stabilized by creating a heterodimer with the viral M protein (Faaberg et al., 1995). So far, GP5 represents the best candidate for vaccination due to its potential to induce neutralizing antibodies (Pirzadeh and Dea, 1997; Pirzadeh and Dea, 1998; Pirzadeh, Gagnon, and Dea, 1998).

Mechanisms that control apoptosis have played a key role in the evolution of many viruses (Hay and Kannourakis, 2002), including PRRSV. In 1996, the group of Suarez (Suarez et al., 1996) demonstrated the presence of apoptosis in cultured cells infected either by an European (EU) strain of PRRSV, or by a vaccinia virus expressing the major glycosylated envelope protein GP5 of PRRSV. In both circumstances, infection led to nucleosome ladder formation, chromatin condensation and rRNA degradation (Suarez et al., 1996). This apoptotic effect was also observed in cultured cells infected

with the American strains of PRRSV, as well as in the testis, lung and lymph nodes of infected pigs (Sirinarumitr et al., 1998; Sur et al., 1997; Sur, Doster, and Osorio, 1998). Interestingly, cells other than those infected with PRRSV can enter in apoptosis by an unknown bystander mechanism (Sirinarumitr et al., 1998; Sur, Doster, and Osorio, 1998; Kim et al., 2002). This bystander effect may be responsible for the decreased number of circulating lymphocytes and monocytes in PRRSV infected pigs (Sirinarumitr et al., 1998). Recently, it was demonstrated that the GP5 of the North American (NA) IAF-Klop strain can also induce apoptosis in MARC-145 cells (Gagnon et al., 2001; 2003) even though there is only a 52% amino acids (aa) identity between the NA and EU strains (Dea et al., 2000; Pirzadeh, Gagnon, and Dea, 1998). This was demonstrated in MARC-145 cells infected with a recombinant adenovirus expressing the GP5 protein. GP5-mediated cell death was associated with DNA fragmentation (TUNEL assay; terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling) and caspase-3 activation (Gagnon et al., 2001; 2003). The equine arteritis virus (EAV), which is the prototype of the viral family *Arteriviridae* (Cavanagh, 1997), is also known to induce cell death by apoptosis (Archambault and St-Laurent, 2000). The observation that GP5 can induce apoptosis in cells over-expressing the Bcl-2 protein (Suarez et al., 1996), suggests that GP5 may either antagonize the anti-apoptotic activity of Bcl-2 or acts downstream of Bcl-2 in apoptosis induction. A recent study, using C- or N-terminal truncated polypeptides derived from the GP5 protein of the EU strain of PRRSV, showed that the first 119 aa, and more probably amino acids 90-119, can promote apoptosis in cultured cells (Fernandez et al., 2002). This report also proposes that post-translational N-glycosylation and the putative N-terminal signal sequence are not required for apoptosis induction by the GP5 protein of the European strain. However, not much is known about the mechanism by which GP5 induces apoptosis.

Homeostasis is maintained by the interplay of pro-apoptotic and anti-apoptotic

factors that determine the destiny of individual cells. This regulated process of cell suicide removes abnormal or damaged cells. Apoptosis can be achieved by two general pathways that lead ultimately to the activation of a group of specific cysteine proteases called caspases. The intrinsic pathway is triggered by the release of cytochrome *c* from mitochondria, which facilitates the formation of the caspase-activating complex known as the apoptosome. The apoptosome is composed of the initiator caspase, caspase-9, together with the Apaf-1 adaptor molecule and cytochrome *c* (Cain et al., 1999; Li et al., 1997; Zou et al., 1997). Release of cytochrome *c* is thought to occur as a consequence of a disruption of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) (Martinou and Green, 2001) in response to toxic insults or through the formation of channels composed of pro-apoptotic Bcl-2 family proteins (Beere et al., 2000; Cain et al., 1999; Li et al., 1997; Zou et al., 1997). The extrinsic pathway is triggered by pro-apoptotic signals at the cell surface that activate CD95 (Apo-1/FasL) or TNFR1 death receptors leading to the formation of the caspase-8 activating death-inducing signaling complex or DISC (Muzio et al., 1998; Nagata, 1997). Cross-talk can occur such that in certain situations activation of procaspase-8 can feed into the mitochondrial pathway as a way to amplify the death signal (*reviewed in* Hengartner, 2000). Which of these pathways is responsible for the apoptotic death of PRRSV-infected cells is currently unknown.

To further study the infectious cycle of PRRSV, we have characterized the pathway used by the GP5 of PRRSV in the induction of apoptosis. This was done using a non-replicative recombinant adenovirus vector (AdV) expressing the ORF5 gene of the NA IAF-Klop strain of PRRSV with a tetracycline regulable promoter (Gagnon et al., 2001; 2003). Infection with AdV driving the expression of ORF5 was conducted in the PRRSV permissive cell line, MARC-145 (Kim et al., 1993). Co-infection experiments with different AdVs expressing human or viral anti-apoptotic proteins (hsp70, baculovirus p35, adenovirus E1B-19K, E3-14.7K and the E3-10.4/14.5K heterodimer) were also carried

out to characterize the apoptotic pathway induced by recGP₅. Using specific fluorogenic caspase substrates and antibodies to show the activation or modification in proteins linked to apoptotic features, we demonstrate that the GP₅ protein of PRRSV triggers apoptosis through the mitochondrial pathway by the release of cytochrome *c* and activation of caspase-9.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. The Québec cytopathogenic IAF-Klop strain of PRRSV was propagated in MARC-145 cells, a clone of MA-104 cells highly permissive to PRRSV (Kim et al., 1993), as previously described (Mardassi et al., 1994). AdCMV-lacZ (Acsadi et al., 1994), a replication-defective E1- and E3-deleted human type 5 adenovirus, as well as non-replicative recombinant AdVs were propagated in 293 cells, to complement the functions of the E1-deleted genomic region of AdCMV-lacZ and thereby to permit propagation of replication-defective AdVs. Titers of AdVs were determined by calculation of the plaque forming units (PFU/ml) on 293 cell monolayers, as detailed in Massie et al. (1998b). AdCMV-tTA, which permits the constitutive expression of the tetracycline transactivator (tTA) under the control of the constitutive human CMV immediate-early promoter/enhancer was used to allow expression of recombinant proteins in cells infected with AdV expressing transgenes under the control of the TR5 promoter (Massie et al., 1998a). Doxycycline (Sigma-Aldrich) (1 µg/ml) was used to inhibit the expression of the transgene in AdV-infected cells (Massie et al., 1998a). BMAdE1 cells, an A549 cell line expressing AdE1 proteins from a vector designed to eliminate the generation of replication competent adenoviruses (Massie, 1996), were propagated as described in Massie et al (1998b).

Generation of recombinant replication-defective AdVs and apoptosis studies. The ORF5 coding sequence of the IAF-Klop strain of PRRSV (GenBank accession number U64928) was amplified by RT-PCR (Gonin et al., 1999) and cloned into a dicistronic mRNA encoding transfer vector pAdTR5-DC-GFPq, expressing the Q-Biogene green fluorescent protein as described previously (Massie et al., 1998b). The resulting ORF5 gene is under the control of the tetracycline-regulable promoter (TR5) as

reported (Gagnon et al., 2003). Recombinant AdVs were generated as described previously (Jani et al., 1997; Massie et al 1998b). Briefly, upon cotransfection, viral plaques were isolated, amplified in 293 cells, and analyzed for the expression of the recombinant protein GP5 either by Western blotting or by radioimmunoprecipitation assays (RIPA). The construction of AdTR5-E1B-19K, and AdTR5-hsp70-DC-GFP was detailed elsewhere (Massie et al 1998b). Other AdVs recombinants expressing anti-apoptotic genes were generated by cloning the relevant genes (listed below) flanked by *Bgl* II and *Pme* I sites, using a PCR strategy, into a tetracycline-regulated transfer vector pAdTR5-K7-GFPq, that co-expresses GFPq from an independent cassette under the CMV promoter, followed by *in vivo* recombination. The inserts amplified by PCR were sequenced after subcloning in the transfer vector. These non-replicative AdVs expressed the baculovirus p35 protein (AdTR5-p35-K7-GFPq), and the adenoviral E3-14.7K protein (AdTR5-E3-14.7K-K7-GFPq) and E3-10.4/14.5K heterodimer (AdTR5-E3-10.4/14.5K-K7-GFPq). All recombinant AdVs were subjected to three consecutive rounds of plaque purification on BMAdE1 clone 78 cells. Subsequently, selected viral clones were amplified on BMAdE1 clone 220 cells, as previously described (Massie et al., 1998b). Each AdV was analyzed for the production of the recombinant protein by Western blotting (hsp70, E1B-19K), or by a functional test of their ability to prevent apoptosis induced by overexpression of Bax (hsp70, E1B-19K, p35), FasL and TNF (p35, E1B-19K, E3-14.7K and E3-10.4/14.5K) as described in Langelier et al (2002).

For apoptosis studies in MARC-145 cells, infections were carried out on 70% confluent monolayers with AdTR5-ORF5-DC-GFPq and AdCMV-tTA at a MOI of 100 PFU per cell for each virus, and an increasing MOI from 10 to 100 PFU for AdTR5-ORF5 (Gagnon et al., 2003), in the presence or absence of 1 μ g/ml of doxycycline. After an adsorption period of 6 hrs, the virus-containing media was removed. To study apoptosis inhibition, MARC-145 cells were also infected at the same time with AdVs

expressing proteins known to inhibit apoptosis. The MARC-145 cells were infected at a MOI of 100 PFU/ml for AdTR5-p35-K7-DC-GFPq, a MOI of 10 PFU/ml for AdTR5-E1B-19K, and a MOI of 30 PFU/ml for AdTR5-hsp70-DC-GFP, AdTR5- E3-14.7K -K7-GFPq, and AdTR5-E3-10.4/14.5K-K7-GFPq.

Measurement of caspase activity and induction/inhibition of apoptosis.

Apoptosis was assessed by detecting the activation of procaspase-3 in infected cells. MARC-145 cells that were co-infected with AdTR5-ORF5-DC-GFPq and AdCMV-tTA were disrupted at different times post-infection (p.i.) in the lysis solution provided in the ApoAlert Caspase Fluorescent Assay Kit (BD Biosciences Clonetech, Palo Alto, CA). Five μ l (corresponding to 60 to 75 μ g of protein) of the cell lysates were added to 90 μ l of a solution containing 50 mM HEPES, pH 7.0, 10% glycerol, 0.1% CHAPS, 2mM EDTA and 5mM dithiothreitol (DTT). Then, 10 μ M of the DEVD-AFC fluorogenic substrate specific for caspase-3, (Biomol Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting, PA), was added and the rate of fluorescence released was monitored using a 96-well plate fluorometer (Cytofluor, Perseptive Biosystems, Foster City, CA). The results were expressed as fluorescence release (fluorescence unit or FU) per sec per μ g of cell lysate. For the detection of caspase-6/9 and -8, the following commercial kits have been used as recommended by the manufacturer: ApoAlert Caspases-9/6 Fluorescent Assay Kit and ApoAlert Caspase-8 Fluorescent Assay Kit (BD Biosciences Clonetech). For each experiment, at least three independent assays were performed with different cell lysates.

Western blot analysis. Samples of cell lysates were mixed with a mild immunoprecipitation (IP) buffer (30 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA) supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche, Laval, Canada) boiled for 5 min, and subjected to 4-20% SDS-PAGE (Novex, Invitrogen) at 150 V followed by electroblotting to nitrocellulose membranes (Hybond ECL , Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) for 1 h at 120 V. Membranes were blocked for 1h with 10%

nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS) at room temperature and subsequently probed in 5% nonfat milk in TBS-0.1% Tween-20 for 1 h with mouse anti-caspase-9 (Ab-1, Oncogene Research Products), mouse anti-caspase-8 (clone 5F7, Medical and Biological Laboratories Co.), mouse anti-actin (C4, ICN), or the α 5 rabbit monospecific anti-GP₅ serum (Mardassi et al., 1996). The membranes were washed in TBS-0.1% Tween-20 and incubated with a horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody. After the secondary antibody incubation, the membranes were washed and bound antibodies were detected using enhanced chemiluminescence according the manufacturer's instructions (Western Lightning, Perkin Elmer Life Bioscience).

Immunofluorescence microscopy. At 48 hrs post-infection (p.i), cells (2×10^4) were collected onto glass slides in a cytocentrifuge (Cytospin, Shandon Products Inc., Runcorn, Cheshire, UK), air dried, and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Slides were then rinsed in PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100, washed in PBS and blocked overnight in 3% BSA in PBS at 4 °C. Cells were incubated with a cytochrome *c* antibody (Pharmingen, San Jose, CA) (1:200 in 3% BSA) for 2 h at room temperature, washed with PBS, and incubated with a 1:200 dilution of a Texas-red conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Bar Harbor, MA) for 1 h at room temperature. Images were acquired with a Sensys charge-coupled device camera (Roper Scientific, Tuscon, Ariz.) using OpenLab software (Improvision, Coventry England).

RESULTS

Caspase-3 activation promoted by the IAF-Klop strain of PRRSV can be prevented by viral proteins p35 and E1B-19K. Previously, Gagnon *et al.* (2003) have shown that infection of MARC-145 cells with the NA strain of PRRSV or with AdV expressing the GP₅ protein of PRRSV resulted in apoptotic cell death that was coincident with the activation of procaspase-3. The activation of procaspase-3 could be fully prevented by co-infecting cells with PRRSV together with an AdV expressing the baculovirus p35 protein, which is a broad-spectrum inhibitor of caspases (Hay and Kannourakis, 2002). As shown in Fig. 1, expression of p35 using AdTR5-p35-DC-GFPq together with another AdV encoding the tetracycline-regulated transactivator protein (AdCMV-tTA) fully blocked caspase-3 activation induced by PRRSV infection. However, expression of p35 on its own did not cause any cell toxicity or cytopathic effect (CPE), as displayed following PRRSV infection (data not shown). This suggests that replication of PRRSV leads to cell death in a caspase-independent way. Consistent with this interpretation, we observed that expression of p35 did not appear to influence the replication of PRRSV in MARC-145 cells, since the amount of infectious PRRSV particles produced at 120 hrs p.i. was the same in the presence or absence of p35 (data not shown).

Since N2A cells constitutively expressing the Bcl-2 protein were not protected from apoptosis induced by the GP₅ protein of an EU strain of PRRSV (Suarez *et al.*, 1996), it was suggested that the mitochondrial pathway may not be involved in apoptosis induction by PRRSV. To confirm this we examined whether an AdV inducibly expressing the adenoviral E1B-19K, which is known to mimic the Bcl-2 protein (Hay and Kannourakis, 2002), could protect cells against apoptosis induced by NA strain of PRRSV. As shown in Fig. 1, infection of MARC-1 cells with AdCMV-tTA alone, or co-infection

with either p35 or E1B-19K resulted in only a modest increase in caspase-3 activity, as compared to the mock control, probably due to the adenoviral infection. In contrast, co-infection of MARC-145 cells with PRRSV and AdTR5-E1B-19K, together with AdCMV-tTA, prevented most of the caspase-3 activation that was observed when cells were infected with PRRSV alone (Fig. 1). This surprising result, somewhat discordant with the previous observation obtained with an EU strain of PRRSV (Suarez et al., 1996), suggested that activation of procaspase-3 and subsequently the induction of apoptosis by the IAF-Klop strain of PRRSV may be mediated through the mitochondrial pathway.

The extent of caspase-3 activation induced following expression of recGP₅ in MARC-145 cells is dose and time dependent. Since the GP₅ of the EU and NA strains of PRRSV can trigger DNA fragmentation and activation of procaspase-3 *in vitro* (Fernandez et al., 2002; Gagnon et al. 2003; Suarez et al., 1996), an AdV expressing the GP₅ protein of the IAF-Klop strain was used to further investigate the apoptotic process, and more specifically the activation of caspase-3. MARC-145 cells were co-infected with the transactivator-expressing AdCMV-tTA and with increasing multiplicities of infection (MOIs) of AdTR5-ORF5, which encodes the GP₅ protein (Gagnon et al., 2003). Increasing MOIs of 10, 50 and 100 PFU/ml for the AdTR5-ORF5 virus led to a 3, 5 and 7 fold increase in procaspase-3 activation compared to delivery of AdCMV-tTA alone (Fig. 2a). Activation of caspase-3 is directly related to the presence of the GP₅ protein, since down-regulation of its expression in the presence of doxycycline eliminated the DEVDase activity (Fig. 2a). Clearly, the relationship between the magnitude of caspase-3 activation and the amount of GP₅ protein expressed in the MARC-145 infected cells reflects a dose-dependent pattern. The effect of varying the length of time over which the GP₅ protein of the IAF-Klop of PRRSV was expressed in MARC-145 cells was also explored. The cells were infected at a MOI of 100 using an inducible AdV, that co-expresses the green fluorescent protein (GFP) and the GP₅ protein of the IAF-Klop of PRRSV in a dicistronic

configuration (AdTR5-ORF5-DC-GFPq), under the control of the tet-regulated transactivator protein. Cells were collected at 24 hrs intervals, over a period of 4 days, and analyzed for activation of procaspase-3. This time course experiment revealed that, while no DEVDase activity could be detected before 48 hrs, most of the caspase-3 activation occurred between 48 and 72 hrs p.i. with an increase of more than 50 fold (Fig. 2b). This effect is exclusively due to the expression of GP5 since infection with AdTR5-DC-GFPq alone did not result in any increase in DEVDase activity (Fig. 2b). The increase in caspase-3 activity over time correlated with the accumulation of the GP5 protein, as measured by immunoblotting (Fig. 3b). Caspase-3 activation being a late event in apoptosis, we sought to investigate the upstream events.

The expression of GP5 is sufficient to induce the activation of caspase-9.

Since the E1B-19K protein can efficiently prevent the cleavage of the procaspase-3 induced by the IAF-Klop PRRSV strain, we decided to examine whether caspases-9 or -8 were the upstream activators. This was first assessed by monitoring LEHDase (caspases-6/9) and the IETDase (caspase-8) activity in extracts from infected cells. Caspases-6/9 activation increased approximately 10 fold between 48 and 72 hrs p.i. in MARC-145 cells that were co-infected with AdCMV-tTA and AdTR5-ORF5-DC-GFPq (Fig. 3a), while no detectable caspase-8 activity was evident (data not shown). The activation of caspase-6/9 was first apparent at 48 hrs, with a level that was 3 times that of cells infected with the control virus AdTR5-DC-GFPq at 72 hrs p.i., and more than 30 times at the same time point (Fig. 3a).

The relationship between the level of GP5 protein and the extent of caspases-9 activity was examined by Western blot analysis. No detectable GP5 protein or caspase-9 activity was evident at 24 hrs. Then, at 48 and 72 hrs p.i. a concomitant increase in the level of GP5 and caspase-9 activity was seen. (Fig. 3b). In contrast to the clear activation of procaspase-9 in GP5-expressing cells, caspase-8 processing can only be seen in

activated MARC-145 cells following exposure to U.V. (Fig. 3b). Activation of caspase-9 has been shown to occur as a consequence of the formation of an oligomeric structure called the apoptosome that is composed of Apaf-1 and cytochrome *c* (Cain et al. 1999). Cytoplasmic cytochrome *c* becomes available to interact with Apaf-1 following its release from mitochondria as a result of permeabilization of the mitochondrial outer membrane (MOMP) (Martinou and Green, 2001). Disappearance of procaspase-9, as a result of proteolytic processing in GP5 expressing cells is consistent with the results presented in Fig 3a and implicates mitochondria in GP5 induced cell death.

Cytochrome *c* is released in MARC-145 cells expressing GP5. To explore events upstream of procaspase-9 processing, and confirm the involvement of mitochondria, we investigated the release of cytochrome *c* in MARC-145 cells expressing the GP5 protein of the IAF-Klop of PRRSV. The release of cytochrome *c* from mitochondria is an early event in the apoptosis cascade, prior to the recruitment/activation of procaspase-9 and procaspase-3 (Cain et al., 1999). To first investigate if cytochrome *c* was retained or released from mitochondria after expression of GP5, an immunofluorescence analysis using cytochrome *c* specific antibodies was performed. MARC-145 cells were infected with AdCMV-tTA plus either AdTR5-ORF5-DC-GFPq or AdTR5-DC-GFPq and examined after 48hrs p.i. Fig. 4 shows the localization of cytochrome *c* (red) and GFP (green) visualized separately and as a merge of the two fluorescence images. For cells infected with the control AdTR5-DC-GFPq virus (upper panel), cytochrome *c* is localized in the mitochondria and displays a punctate pattern (Fig. 4a) in all the cells, regardless of whether they express high levels of GFP or low levels of GFP (Fig. 4b). The cell labeled '1' clearly has high levels GFP and distinct punctate staining for cytochrome *c* (Fig. 4a to c). In contrast, the pattern observed in cells infected with AdTR5-ORF5-DC-GFPq is the reverse, since cytochrome *c* can only be observed in the non-infected cells, or in cells that display only a faint level of green

fluorescence, indicative of low levels of GP5 expression. The cell labeled '4' expresses high levels of GP5, based on the high level of GFP fluorescence, and does not show any detectable cytochrome *c*. The cell labeled '2' on the other hand contains less GP5, based on the lower level of GFP fluorescence, and exhibits a punctate mitochondrial localization of cytochrome *c* (Fig. 4d to f). In this dicistronic (DC) expression vector, the level of expression of GFP from the second cistron is related to the level of expression of the gene encoded by the first cistron. The decrease in the red fluorescence, observed in the darker green cells, corresponding to cytochrome *c* release from mitochondria, would result in a faint diffuse signal that could not be detected over background by microscopy (Fig. 4d-f). This effect was observed in several different fields and the absence of the cytochrome *c* signal was always correlated with high levels of expression of the GP5 protein at 48 hrs p.i. with AdTR5-ORF5-DC-GFPq in MARC-145 cells, whereas no release of cytochrome *c* was observed in the AdTR5-DC-GFPq infected cells.

Mitochondrial inhibitors of apoptosis and the adenovirus E3-10.4/14.5K heterodimeric protein complex prevent the activation of caspases-3 induced by GP5. The bulk of our results suggest that expression of the GP5 induces apoptosis through a mechanism that involves the mitochondrial pathway. This observation was further explored by examining whether anti-apoptotic proteins, that are known to exert their effects through inhibition of the mitochondrial pathway, were capable of suppressing GP5-induced apoptosis. This was tested by co-infection of MARC-145 cells with AdVs expressing different viral anti-apoptotic proteins together with an AdV expressing GP5 of the PRRSV IAF-Klop virus. The effectiveness of these proteins at inhibiting apoptosis was measured by assaying procaspase-3 activation. As was observed for the entire PRRSV IAF-Klop virus (Fig. 1), the p35 baculoviral inhibitor of apoptosis was able to inhibit the increased DEVDase activity induced by GP5 (Fig. 5). Interestingly, by contrast to what was observed with the entire PRRSV IAF-Klop virus, p35 was also able to suppress cell

death promoted by the GP5 (data not shown). A similar result was obtained with the chemical pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk, confirming that GP5 expression in MARC-145 cells results in a caspase-dependent death process. Co-infection with AdTR5-E1B19K also prevented cell death (data not shown) and more than 95% of the caspase-3 activation induced by GP5 expression (Fig. 5). Thus, apoptosis induced by either the entire PRRSV or by GP5 can be efficiently prevented by E1B-19K, a functional homolog of Bcl-2, that has been shown to block the mitochondrial pathway of apoptosis. The inhibitory effect of E1B-19K on GP5-induced apoptosis implicates caspase-9 as a principal activator of procaspase-3, since it was shown that E1B-19K could block upstream of caspase-9 activation (Hay and Kannourakis, 2002). The expression of the heat shock protein 70 (hsp70), which is known to block the activation of caspases-3 and -9 (Beere et al., 2000; Mosser et al., 1997; Mosser et al., 2000), was also effective in preventing cell death (data not shown) and the activation of procaspase-3 (~95% inhibition) in GP5-expressing cells (Fig. 5). Hsp70 has also been shown to inhibit apoptosis upstream of procaspase-9 activation by preventing the release of cytochrome c from mitochondria in stressed cells (Mosser et al., 2000). To exclude an involvement of caspase-8 activation in the induction of apoptosis by the GP5 protein, MARC-145 cells were co-infected with an AdV coding for the adenoviral E3-14.7K protein or the E3-10.4/14.5K. Both of these adenoviral E3 early expressed proteins are known to inhibit Fas and TNF induced apoptosis, related to the activation of procaspase-8 (Hay and Kannourakis, 2002). As expected, the E3-14.7K protein could not efficiently block procaspase-3 processing with around 80% of the activity remaining in the AdCMV-tTA and AdTR5-ORF5-DC-GFPq co-infected MARC-145 cells (Fig. 5). Surprisingly however, the adenovirus E3 heterodimer prevented cell death (data not shown) and around 90% of the GP5-induced procaspase-3 activation (Fig. 5). Although E3-10.4/14.5K and E3-14.7K are each able to prevent the extrinsic (death-receptor) apoptotic pathway, they do so by

affecting different targets. The E3-14.7K protein is known to bind to and inactivate caspase-8 (Chen et al., 1998). On the other hand, the E3-10.4/14.5K heterodimer prevents apoptosis by mediating the internalization and degradation of the Fas/Apo-1 (Elsing and Burgert, 1998) and also interrupt the death signalization of TNF receptor by acting through NF- κ B (Friedman and Horwitz, 2002). The results shown in Fig. 5 clearly support the contention that apoptosis triggered by GP5 is caspase-dependent and proceeds through the mitochondrial pathway. This would seem to be in disagreement with the results reported by the group of Suarez (Suarez et al., 1996) in which it was suggested that the mode of apoptosis induction by GP5 was *Bcl-2* independent. However, protection obtained with the adenoviral E3-10.4/14.5K heterodimer can support the possibility that receptors others than thoses related with caspase-8 activation could be involved in GP5 mediated cell death.

DISCUSSION

This is the first report showing that the pro-apoptotic activity of the GP5 protein from a NA strain of PRRSV is mitochondrial-dependent. Experiments were performed using inducible recombinant adenoviruses, which are highly efficient at expressing transgenes in practically all cells. Infection of cells with AdTR5-ORF5-DC-GFPq confirmed the GP5-specific caspase-3 activation demonstrated previously (Gagnon et. al. 2003) by the use of the doxycycline sensitive TR5 promoter to impede ORF5 transcription and pro-caspase-3 cleavage (Figs. 1 and 2). Analyzing upstream of caspase-3 activation, we showed that procaspase-9 cleavage and cytochrome *c* release coincide with the synthesis of GP5 within the cell, suggesting and that both events are related to the mitochondrial involvement (Figs. 3 and 4). We further investigated the apoptotic pathway using a series of genes known to inhibit apoptosis at specific points in the apoptotic cascade (Fig. 5). The full inhibition on the induction of DEVDase activity following co-infection with an AdV expressing E1B-19K, which is a functional homologue of *Bcl-2*, reflects the involvement of mitochondria in the apoptotic process triggered by the GP5 protein. Indeed, E1B-19K being known to prevent the *Bax* conformational change and/or its insertion in the outer mitochondrial membrane (OMM) leading to the release of pro-apoptotic protein from the mitochondria (Martinou and Green, 2001; Perez and White, 2000), we can hypothesize that GP5 expression triggered, through an unknown mechanism inhibitable by E1B-19K, cytochrome *c* release. Likewise, the expression of hsp70, that prevented the DEVDase activity induced by GP5, is another indication that GP5-induced apoptosis proceeds through the mitochondrial apoptotic pathway since the ability of hsp70 to block activation of caspase-3 and caspase-9 (Mosser et al., 1997, Beere et al., 2000; Mosser et al., 2000) is related to its ability to prevent the

release of cytochrome *c* from mitochondria (Mosser et al., 2000). On the other hand, the weak inhibition of caspase-3 activation by the adenoviral E3-14.7 K protein, which is known to inhibit CD95/APO-1 induced apoptosis by interacting with procaspase-8 (Chen et al., 1998), permits us to exclude the postulate that GP5 stimulates apoptosis by triggering death receptors such as Fas and TNFR1. This result is consistent with the absence of caspase-8 activation in GP5-infected cells (data not shown). Surprisingly however, the adenoviral E3-10.4/14.5K, which is known to act mainly through the death receptors mediated induction of apoptosis, also suppressed the activation of DEVDase activity in GP5 expressing cells. The fact that the E3-10.4/14.5K complex can exert its anti-apoptotic properties by acting at different levels of the apical step of apoptosis lead us to propose an alternative mechanism by which this heteroduplex could interfere with the GP5 apoptosis signaling pathway (see below). Therefore, the bulk of our results suggest that the GP5 protein induces apoptosis through a mitochondrial process involving caspase-9 activation without involving the known death receptors associated to caspase-8 activation.

The CPE observed in IAF-Klop PRRSV-infected MARC-145 cells was also seen following infection of these cells with an AdV expressing of the ORF5 gene from the same PRRSV strain. In both cases, baculoviral p35 and the adenoviral E1B-19K protein can together slightly decrease the DEVDase activity associated with the CPE, which indicates the caspase- and mitochondrial-dependence of PRRSV induced apoptosis. However, although DEVDase activity was inhibited by the baculoviral p35 protein, this protein did not prevent the CPE associated with PRRSV infection or result in an increased titer of viral progeny in the infected MARC-145 cells. This might suggest the involvement of caspases that are not efficiently inhibited by p35 in the CPE or that the cytotoxicity results from the activation of a non-caspase mediated death process. The

CPE, despite the presence of p35, cannot be attributed to a viral overload since titers obtained in the MARC-145 cell line are generally below 10^7 PFU/ml (data not shown). Experiments conducted in triplicate showed that AdV-expressed GP5 is around 40% more efficient in promoting DEVDase activation than the whole virus. This can be explained by a more efficient expression of the GP5 by AdV, since most of the cells can be infected at the same time using a high MOI. Also, it must be considered that other less well characterized PRRSV proteins could regulate the expression and/or the effect of GP5 and contribute to the CPE and cell death process, or also participate in the bystander apoptosis phenomenon described elsewhere (Sirinarumitr et al., 1998; Sur, Doster, and Osorio, 1998). Since the expression of GP5 led to caspase-3 activation through the mitochondrial pathway, which seems to be also common to the PRRSV infection, it can be assumed that GP5 is implicated in the apoptotic activity observed with the EU and NA strains of PRRSV (Gagnon et al., 2001; 2003; Sirinarumitr et al., 1998; Sur et al., 1997; Sur, Doster, and Osorio, 1998).

In contrast to previous results showing that GP5 of the EU strain of PRRSV induces apoptosis in a Bcl-2 independent manner (Suarez et al., 1996), the present results suggest that mitochondria are central to this process. Considering that the viral manipulation of apoptosis is a highly conserved process among evolution between the host and the virus (Hay and Kannourakis, 2002), we do not think that the discrepancy between our data and the report of Suarez et al. (1996) is due to variation among these two genogroups of PRRSV. We thus believe that, even with an identity of only a 52% in the aa composition, the pro-apoptotic region should be conserved within those two genomes. Instead, we propose that the level of *Bcl-2* expressed in the N2A-*Bcl-2* cell line (Suarez et al., 1996) was probably insufficient to prevent apoptosis. Indeed, it has been reported that anti-apoptotic proteins have to be expressed at a threshold level in order to

be effective whether they are expressed from stable cell lines (Mercille et al 1999; Mosser et al, 1997) or following transduction with AdV (Langelier et al 2002). Although our data were obtained using AdV mediated gene transfer, the putative contribution of other adenoviral genes in apoptosis inhibition can be discarded since AdV expressing only GFP (data not shown) or the E3 adenoviral 14.7K gene, were ineffective at suppressing GP5-induced apoptosis (Fig 5). A similar observation concerning the use of inducible AdVs in apoptosis studies was recently reported by Langelier et al (2002).

Considering the highly glycosylated pattern of the GP5 of PRRSV (Dea et al., 2000), and since the GP₅ expressed by recombinant AdV accumulate in the ER (Gagnon et al., 2003), it could trigger an apoptotic stimuli by saturating the anti-apoptotic ER proteins such as Bcl-2 or some molecular chaperones (Krajewski et al., 1993) and result in the release of cytochrome *c* from the mitochondria. To assess this hypothesis, the role of the recently discovered caspase-12 (Nakagawa et al., 2000), which was found to participate in ER stress-induced apoptosis could thus be considered. This initiator caspase was shown to be implicated in apoptosis caused by the infection of A549 cells with the respiratory syncytial virus (RSV), a *Paramyxoviridae* shown to induce ER stress (Bitko and Barik, 2001). However, the latest result of Fernandez et al. (2002) suggested that post-translational modification of the GP5 protein are not needed for the induction of apoptosis, since expression of a GP5 with a recombinant vaccinia virus did not lead to GP5 *N*-glycosylation yet the cells died by apoptosis. Furthermore, the analysis of the GP5 domain necessary for apoptosis induction delineated a region devoid of any glycosylation sites (Fernandez et al., 2002).

Proteins encoded in the adenovirus E3 region are partly responsible for allowing the virus to evade the host immune system. Besides the E3-14.7K protein, the E3-10.4/14.5K complex is known to promote a decrease in Fas levels resulting from the

internalization and degradation of the receptor in lysosomes (Elsing and Burgert, 1998). This heterodimer has been demonstrated to also down-regulate EGFR (Tollefson et al., 1991), and receptors from the TNFRI family (Wold et al., 1999). Recently, Friedman and Horwitz showed that the E3-10.4/14.5K heterodimer inhibited signaling from TNF- α or IL-1 by preventing the activation of NF- κ B (Friedman and Horwitz, 2002). According to these data, we suggest that the unexpected effect of this E3-10.4/14.5K complex on prevention of apoptosis induced by the GP5 protein could be a result of a direct effect of the E3-10.4/14.5K complex on the processing or the signaling of GP5 (Fig. 6-A.). It is plausible that the E3-10.4/14.5K complex acts at one of the upstream steps of the apoptotic process induced by the GP5 protein, while E1B-19K and hsp70 act downstream of this step, by preventing pro-apoptotic members of the Bcl-2 family from affecting mitochondrial integrity (Fig. 6). It is not unusual that anti-apoptotic proteins exert their effects at more than one point of the apoptotic cascade. Thus, hsp70 that was shown to block stress-induced apoptosis by preventing the release of cytochrome *c* from mitochondria as well as preventing apoptosome formation downstream of cytochrome *c* release (Beere et al., 2000; Mosser et al., 2000) could block GP5 induced apoptosis at either steps, but most likely upstream of cytochrome *c* release like E1B-19K (Fig. 6). What remains to be determined is how GP5 promotes the release of cytochrome *c* and whether E1B-19K and hsp70 act on the same putative target.

Until now, the mechanism by which PRRSV induced apoptosis was unknown (Sirinarumitr et al., 1998; Sur et al., 1997; Sur, Doster, and Osorio, 1998). Here we showed that expression of the GP5 protein triggered the release of cytochrome *c* from mitochondria, supporting the endogenous theory, where internal expression of the GP5 protein leads to cell death. On the other hand, the receptor related function of GP5 protein, i.e. its capacity to induce the production of neutralizing antibodies that protect

from a further challenge (Pirzadeh and Dea, 1998) and its implication in attachment through a heparin receptor (Delputte et al., 2002; Jusa et al., 1997; Therrien, St-Pierre, and Dea, 2000), led to the hypothesis that the GP5 protein could also promote bystander apoptosis through specific receptors, possibly related to the entry of PRRSV. Since fragments derived from the ORF5 gene sequence that lack the putative *N*-terminal signal sequence, are still able to induce apoptosis (Fernandez et al., 2002), the proposed model postulates that localization of the GP5 protein to the outer plasma membrane is not required to trigger apoptosis (Fig. 6) and is consistent with the fact that GP5, expressed by AdV, is localized in the ER (Gagnon et al., 2003). This can also be supported by the model of membrane topology of the GP5 protein proposed elsewhere (Fernandez et al., 2002). Effectively, this model proposes that the pro-apoptotic domains of GP5 (amino acids 90-119) are situated on the cytoplasmic side of the plasma membrane, and therefore do not involve the glycolysation sites (Fernandez et al., 2002). Despite the link between the intracellular presence of the GP5 protein and apoptosis triggering within these cells, our results do not permit us to exclude the possibility that apoptosis induced by the GP5 also occurs through a bystander effect.

In conclusion, we went deeper into the apoptotic process induced by the GP5 protein by showing the implication of mitochondria in this specific DEVDase activation. Nevertheless, the mechanism by which the GP5 protein triggers the release of cytochrome *c* from mitochondria is not fully understood. In this regard, studies are under way to elucidate how the heterodimer E3-10.4/14.5K blocks this GP5 induced DEVDase activation, and where this action is situated upstream of cytochrome *c* release. While the results support the idea that GP5 protein is solely responsible for the apoptotic effects of PRRSV infection, we cannot exclude the implication of other viral proteins in that phenomenon. An understanding of this process would not only clarify the mechanism of PRRSV replication

and pathogenicity but also provide rational approaches to improve vaccine production.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Antoine W. Caron for his help with the microscopic analysis. Karine Sellin for the construction of AdTR5-p35-K7-GFPq, Hortense Coffi for the construction of AdTR5-14.7-K7-GFPq and AdTR5-10.4/14.5-K7-GFPq, and Claire Guilbault and Maria Koutroumanis for the production of adenoviral stocks. We are grateful to Dr. Mosser for critically reviewing the manuscript. G. Lachapelle was a recipient of a scholarship from Le Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies. Dr. C.A. Gagnon was a recipient of a fellowship, as a Ph.D. student, from the Medical Research Council of Canada. This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (Strategic grant STP02002083) and Biovet Inc., St-Hyacinthe, Québec, Canada.

References

- Acsadi, G., Jani, A., Massie, B., Simoneau, M., Holland, P., Blaschuk, K., and Karpati, G. (1994). A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum Mol Genet* 3(4), 579-84.
- Archambault, D., and St-Laurent, G. (2000). Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection. *Virus Genes* 20(2), 143-7.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M., and Green, D. R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2(8), 469-75.
- Bitko, V., and Barik, S. (2001). An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. *J Cell Biochem* 80(3), 441-54.
- Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C., and Cohen, G. M. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 274(32), 22686-92.
- Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142(3), 629-33.
- Chen, P., Tian, J., Kovesdi, I., and Bruder, J. T. (1998). Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273(10), 5815-20.
- Conzelmann, K. K., Visser, N., Van Woensel, P., and Thiel, H. J. (1993). Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 193(1), 329-39.
- Dea, S., Gagnon, C. A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., and Rogan, D. (2000). 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(4), 659-88.
- Delputte, P. L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H. J., and Pensaert, M. B. (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(9), 4312-20.
- Elsing, A., and Burgert, H. G. (1998). The adenovirus E3/10.4K-14.5K proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17), 10072-7.
- Faaberg, K. S., Even, C., Palmer, G. A., and Plagemann, P. G. (1995). Disulfide bonds between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for viral infectivity. *J Virol* 69(1), 613-7.
- Fernandez, A., Suarez, P., Castro, J. M., Tabares, E., and Diaz-Guerra, M. (2002). Characterization of regions in the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus required to induce apoptotic cell death. *Virus Res* 83(1-2), 103-18.
- Friedman, J. M., and Horwitz, M. S. (2002). Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation by the adenovirus E3-10.4/14.5K complex. *J Virol* 76(11), 5515-21.
- Gagnon, C. A., Lachapelle, G., Langelier, Y., Massie, B. and Dea, S. (2003) Adenoviral-expressed GP5 is distinct from the authentic protein that is included in the porcine reproductive and respiratory syndrome virions. *Arch. Virol. In press.*
- Gagnon, C. A., Langelier, Y., Massie, B., and Dea, S. (2001). Biochemical properties and processing of the three major structural proteins of PRRS virus expressed by

- recombinant adenoviruses. Structural, functional and community aspects. *Adv Exp Med Biol* 494, 225-31.
- Germain, M., Mathai, J. P., and Shore, G. C. (2002). BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria. *J Biol Chem* 277(20), 18053-60.
- Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, C. A., and 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(1), 20-6.
- Hay, S., and Kannourakis, G. (2002). A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* 83(7), 1547-64.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805), 770-6.
- Jani, A., Lochmuller, H., Acsadi, G., Simoneau, M., Huard, J., Garnier, A., Karpati, G. and Massie, B. (1997). Generation, validation, and large scale production of adenoviral recombinants with large size inserts such as a 6.3 kb human dystrophin cDNA. *J Virol Methods* 64, 111-124.
- Jusa, E. R., Inaba, Y., Kouno, M., and Hirose, O. (1997). Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res* 58(5), 488-91.
- Kim, H. S., Kwang, J., Yoon, I. J., Joo, H. S., and Frey, M. L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 133(3-4), 477-83.
- Kim, T. S., D. A. Benfield, and R. R. Rowland. 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. *Virus Res* 85:133-40.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., and Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53(19), 4701-14.
- Langelier, Y., Bergeron, S., Chabaud, S., Lippens, J., Guilbault, C., Saserville, A.M., Denis, S., Mosser, D.D. et Massie, B. 2002. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J Gen Virol* 83(11): 2779-89.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4), 479-89.
- Mardassi, H., Athanassious, R., Mounir, S., and 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(1), 55-64.
- Mardassi, H., Mounir, S., and Dea, S. (1995). Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Arch Virol* 140(8), 1405-18.
- Martinou, J. C., and Green, D. R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1), 63-7.
- Massie B (1998a) BMAdE1, a new complementing cell line for the large scale production of E1-deleted Adenovirus (Ad) vectors devoid of RCA (replication competent Ad). patent 5,891,6690, U.S.
- Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D. D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Belanger, F., and Langelier, Y. (1998b). Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol* 72(3), 2289-96.

- Massie, B., Mosser, D. D., Koutromatis, M., Vitté-Mony, I., Lamoureux, L., Couture, F., Paquet, L., Guilbault, C., Dionne, J., Chahla, D., Jolicoeur, P., and Langelier, Y. (1998c). New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology* **28**, 53-64.
- Mercille, S., Jolicoeur, P., Gervais, C., Paquette, D., Mosser, D. D. and Massie, B. (1999). Dose-dependent reduction of apoptosis in nutrient-limited cultures of NS/0 myeloma cells transfected with the E1B-19K adenoviral gene. *Biotechnol. Bioeng.* **5(5)**, 516-28.
- Meulenbergh, J. J., Bos-de Ruijter, J. N., van de Graaf, R., Wensvoort, G., and Moormann, R. J. (1998). Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* **72**(1), 380-7.
- Meulenbergh, J. J., Hulst, M. M., de Meijer, E. J., Moonen, P. L., den Besten, A., de Kluyver, E. P., Wensvoort, G., and Moormann, R. J. (1993). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* **192**(1), 62-72.
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Denis-Larose, C., and Massie, B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**(9), 5317-27.
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Meriin, A.B., Sherman, M.Y., Morimoto, R.I. et Massie, B. 2000. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**(19): 7146-59.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**(5), 2926-30.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**(3), 355-65.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**(6765), 98-103.
- Perez, D., and White, E. (2000). TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. *Mol Cell* **6**(1), 53-63.
- Pirzadeh, B., and Dea, S. (1997). Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* **78** (8), 1867-73.
- Pirzadeh, B., and Dea, S. (1998). Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* **79** (5), 989-99.
- Pirzadeh, B., Gagnon, C. A., and Dea, S. (1998). Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. *Can J Vet Res* **62**(3), 170-7.
- Sirinarumitr, T., Zhang, Y., Kluge, J. P., Halbur, P. G., and Paul, P. S. (1998). A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. *J Gen Virol* **79** (12), 2989-95.
- Snijder, E. J., and Meulenbergh, J. J. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* **79** (5), 961-79.
- Suarez, P., Diaz-Guerra, M., Prieto, C., Esteban, M., Castro, J. M., Nieto, A., and Ortín, J. (1996). Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol* **70**(5), 2876-82.
- Sur, J. H., Doster, A. R., Christian, J. S., Galeota, J. A., Wills, R. W., Zimmerman, J. J., and Osorio, F. A. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* **71**(12), 9170-9.

- Sur, J. H., Doster, A. R., and Osorio, F. A. (1998). Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 35(6), 506-14.
- Therrien, D., St-Pierre, Y., and Dea, S. (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(6), 1099-116.
- Tollefson, A. E., Stewart, A. R., Yei, S. P., Saha, S. K., and Wold, W. S. (1991). The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus form a complex and function together to down-regulate the epidermal growth factor receptor. *J Virol* 65(6), 3095-105.
- Wold, W. S., Doronin, K., Toth, K., Kuppuswamy, M., Lichtenstein, D. L., and Tollefson, A. E. (1999). Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr Opin Immunol* 11(4), 380-6.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90(3), 405-13.

Figures legends

Figure 1. The DEVDase (caspase-3) activity promoted by an IAF-Klop strain of PRRSV infection on MARC-145 cells can be prevented by the baculoviral p35 and the adenovirus E1B-19K protein. MARC-145 cells were either infected with the IAF-Klop strain of PRRSV (MOI of 0.02 TCID₅₀), or with an AdV expressing the transactivator AdCMV-tTA [+] (MOI of 100 PFU/ml), the baculoviral p35 protein AdTR5-p35-DC-GFPq (MOI of 100 PFU/ml) and the adenoviral E1B-19K protein AdTR5-E1B-19K (MOI of 10 PFU). Infections were performed with each virus alone, or in combination with the transactivator and the PRRSV to evaluate their anti-apoptotic potential. All the cell samples were collected at 96 hrs p.i., and assayed as recommended by the manufacturer (ApoAlert Caspase Fluorescent Assay Kit, BD Biosciences Clonetech, Palo Alto, CA). The DEVDase activities were expressed as fluorescent units (FU/ sec x µg) of each sample compared to the AdCMV-tTA infected control cells harvested at 72 hrs.

Figure 2. Expression of the IAF-Klop PRRSV recGP5 protein in MARC-145 cells results in time and dose-dependent activation of caspase-3. (A) DEVD-AFC cleavage assay in cellular lysates collected at 72 hrs p.i. from MARC-145 cells infected with AdCMV-tTA [+] at an MOI of 100 PFU ([+]) and with variable amounts of AdTR5-ORF5 [+] at an MOI of 10, 50 and 100 PFU, with or without doxycycline. (B) DEVD-AFC cleavage assay in cellular lysates from MARC-145 cells co-infected at a MOI of 100 PFU with AdVs expressing the transactivator (AdCMV-tTA [+]), and the green fluorescent protein (AdTR5-DC-GFPq) or the GP5 from PRRSV (AdTR5-ORF5-DC-GFPq [+]), at the indicated post-infected time-points. Collected cell samples were treated as described in Fig. 1. DEVDase activity is expressed as fluorescent units (FU/ sec x µg) for each sample compared to the AdCMV-tTA infected control sample at 96 hrs (for A), or to the GFPq

infected control at 72 hrs (for B). MARC-145 were UV treated at $100 \text{ J} \times 1000 \text{ J/s cm}^2$. Independent experiments were performed in triplicate.

Figure 3. Expression of the NA IAF-Klop PRRSV recGP5 protein leads to caspase 9 activation in MARC-145 cells. (A) LEHD-AMC (caspase-6/9) cleavage was assayed in cellular lysates from MARC-145 cells co-infected at an MOI of 100 PFU with AdVs expressing the transactivator (AdCMV-tTA [+]), and the green fluorescent protein (AdTR5-DC-GFPq) or the IAF-Klop PRRSV recGP5 protein (AdTR5-ORF5-DC-GFPq [+]), at the indicated post-infected time-points. Collection of cell samples, DEVDase activity assays and UV treatment were performed as in Fig. 2b. Independent experiments were performed in triplicate. (B) The level of GP5 protein expression is correlated with processing of pro-caspase-9 in MARC-145 by immunoblot analysis. MARC-145 cells co-infected at an MOI of 100 PFU with AdVs expressing the transactivator (AdCMV-tTA [+]), and the green fluorescent protein (AdTR5-DC-GFPq) or the IAF-Klop PRRSV recGP5 protein (AdTR5-ORF5-DC-GFPq [+]), were collected in IP buffer at the indicated times post-infection and levels of caspase-8, caspase-9, GP5 and actin were assessed by western blotting with specific antibodies. While no caspase activation (3, 8 and 9) can be seen for AdTR5-DC-GFPq infected control cells, the accumulation of GP5 at 48 to 72 hrs p.i. correlates with caspase-3 activation and pro-caspase-9 processing. Lysates of uninfected MARC-145 cells (Mock) were used as the negative control, while MARC-145 cells induced to undergo apoptosis by UV treatment ($100 \text{ J} \times 1000 \text{ J/s cm}^2$) was used for the positive control.

Figure 4. The IAF-Klop PRRSV GP5 protein can promote the cytochrome *c* release in MARC-145 cells. (A) Immunofluorescence analysis showing the cellular localization of

cytochrome *c* in MARC-145 cells at 48 hrs post co-infected with AdVs expressing the transactivator (AdCMV-tTA) and the green fluorescent protein (AdTR5-DC-GFPq) (*panel a-c*) or the IAF-Klop PRRSV GP5 protein (AdTR5-ORF5-DC-GFPq) (*panel d-f*) at an MOI of 100 PFU for all viruses. Left panels (*a and d*) show cytochrome *c* localization, indicated by the red fluorescence emission of the Texas-red conjugated secondary antibody, while the middle panels (*b and e*) which correspond to the same fields as in *a* and *d*, indicate the GFP positive cells. The right panel (*c and f*) represents a merged image of the red and green channels of GFP infected cells (*panel c*), or GP5 protein infected cells (*panel f*). In the GFP infected cells (*panel a-c*), cell number 1 shows punctate cytochrome *c* staining in all cells. In the GP5 infected cells (*panel d-f*), cell numbers 2 to 4, which illustrate cells expressing low to high levels of GP5 based on their level of GFP expression, correspond respectively to cells with punctate to diffuse cytochrome *c* localization. In cells expressing a high quantity of GP5 (bright green; cell number 4) the release of cytochrome *c* from mitochondria is complete.

Figure 5. Some inhibitors of apoptosis prevent the DEVDase activity promoted by GP5 expression. MARC-145 cells were co-infected with AdVs expressing the transactivator AdCMV-tTA [+], an adenovirus expressing the recGP5 protein of IAF-Klop strain of PRRSV [+], and with various adenoviruses expressing antiapoptotic proteins including AdTR5-p35-DC-GFPq (MOI of 100 PFU), AdTR5-hsp70-DC-GFPq (MOI of 30 PFU), AdTR5-E1B-19K (MOI of 10 PFU), AdTR5-E3-14.7K-K7-GFPq (MOI of 30 PFU) and AdTR5-E3-10.4/14.5K-K7-GFPq (MOI of 30 PFU) and harvested at 72 hrs p.i.. The chemical pan-caspase inhibitor Z-VAD-fmk was also added to MARC-145 cells expressing the GP5 from PRRSV. The collection of cell samples, measurement of DEVDase activity and UV treatment was performed as in Fig. 2b. Independent experiments were performed

in triplicate.

Figure 6. Model for GP5 induced apoptosis. Through its processing in the ER, the GP5 protein can trigger cytochrome *c* release from the mitochondria by an unknown mechanism that can possibly be blocked in the apical step of apoptosis by the E3-10.4/14.5KDa protein. While the baculoviral inhibitor p35 can prevent activation of caspases-3, -8 and -9, the molecular chaperone hsp70 acts on the step leading to cytochrome *c* release and subsequent caspase-9 and -3 activation. The E1B-19K protein that mimic the anti-apoptotic *Bcl-2* prevent also the release of cytochrome *c* from mitochondria. The E3-14.7 protein, known to prevent activation of caspase-8 do not interfere with the induction of apoptosis. In A, once processed at the ER, the GP5 can directly, or indirectly through the collaboration of a membrane protein (protein X) in B, act on an intermediate protein (protein X) that will trigger the cytochrome *c* release. This release can be induced directly by an unknown mechanism as in C, or by through a *Bcl-2* homolog protein, like *Bax* as in D.

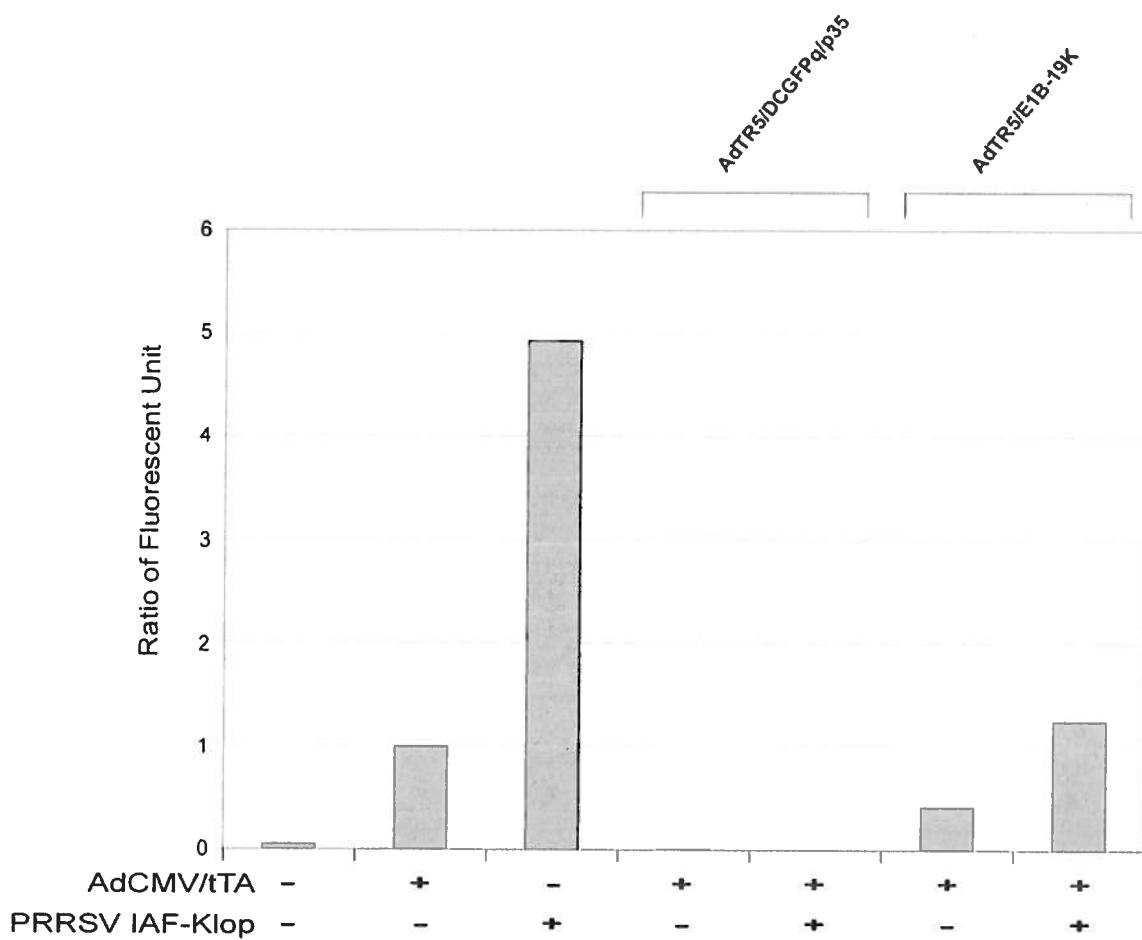
Figure 1.

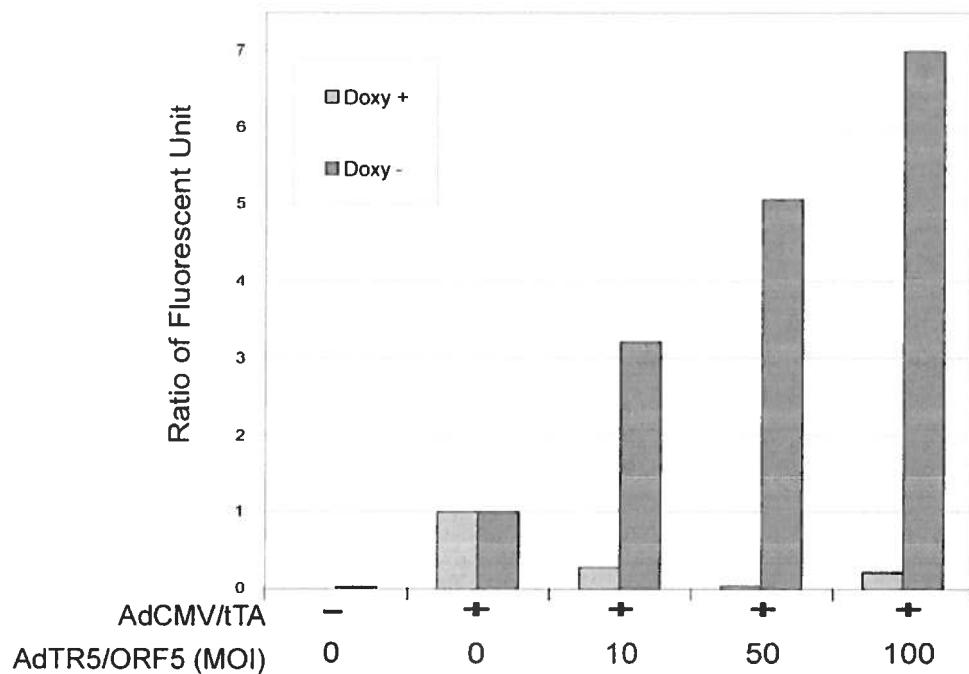
Figure 2a.

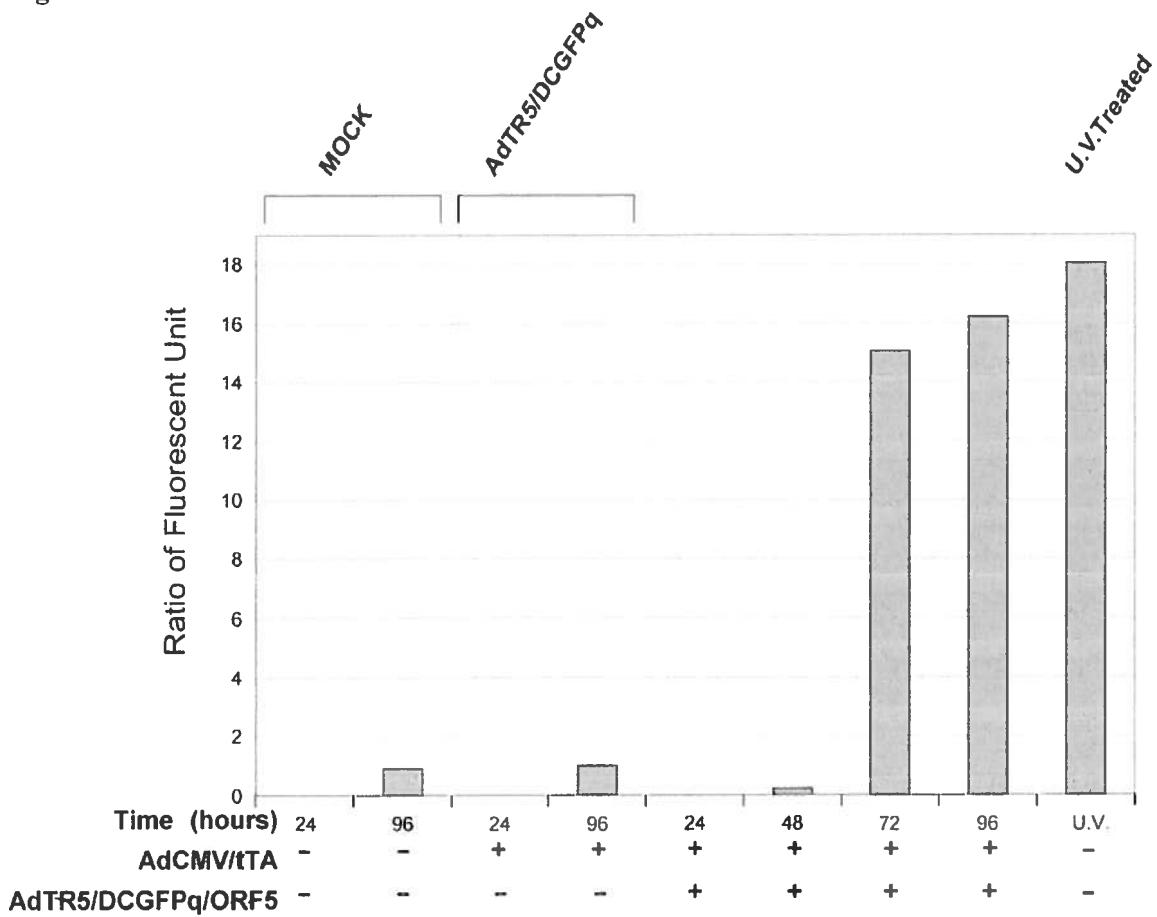
Figure 2b.

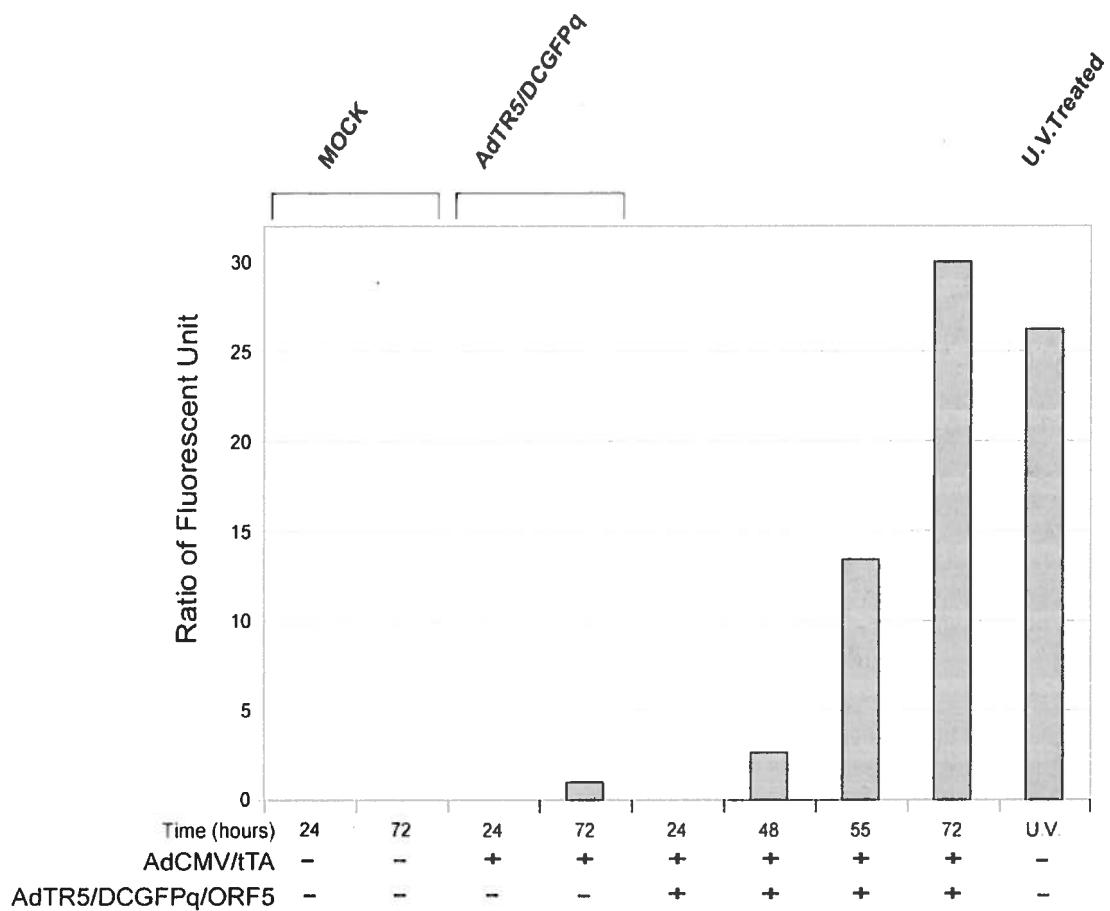
Figure 3a.

Figure 3b.

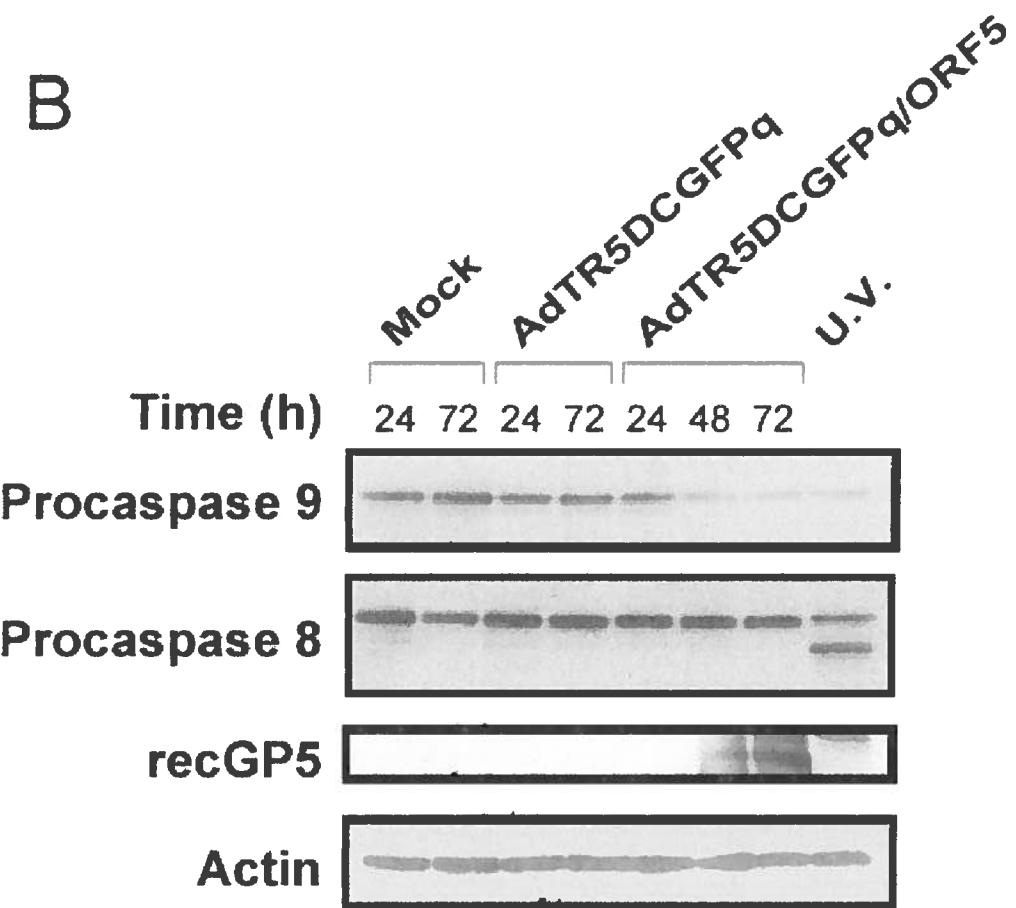


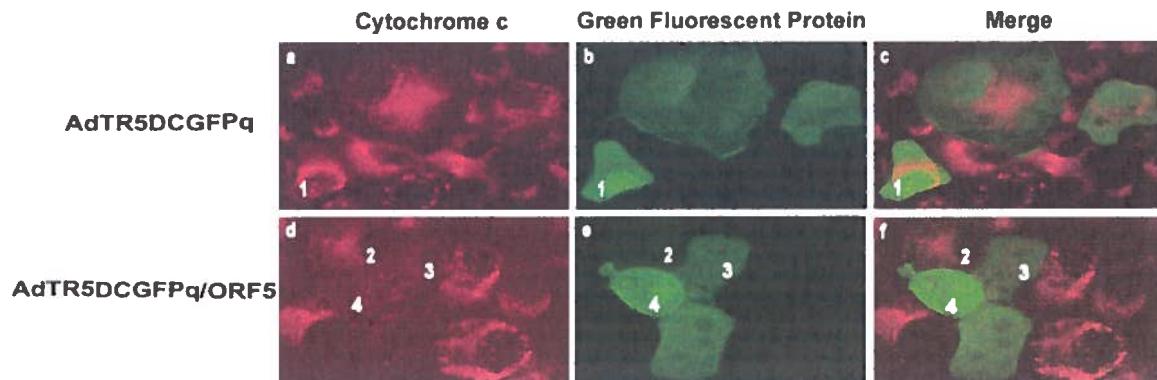
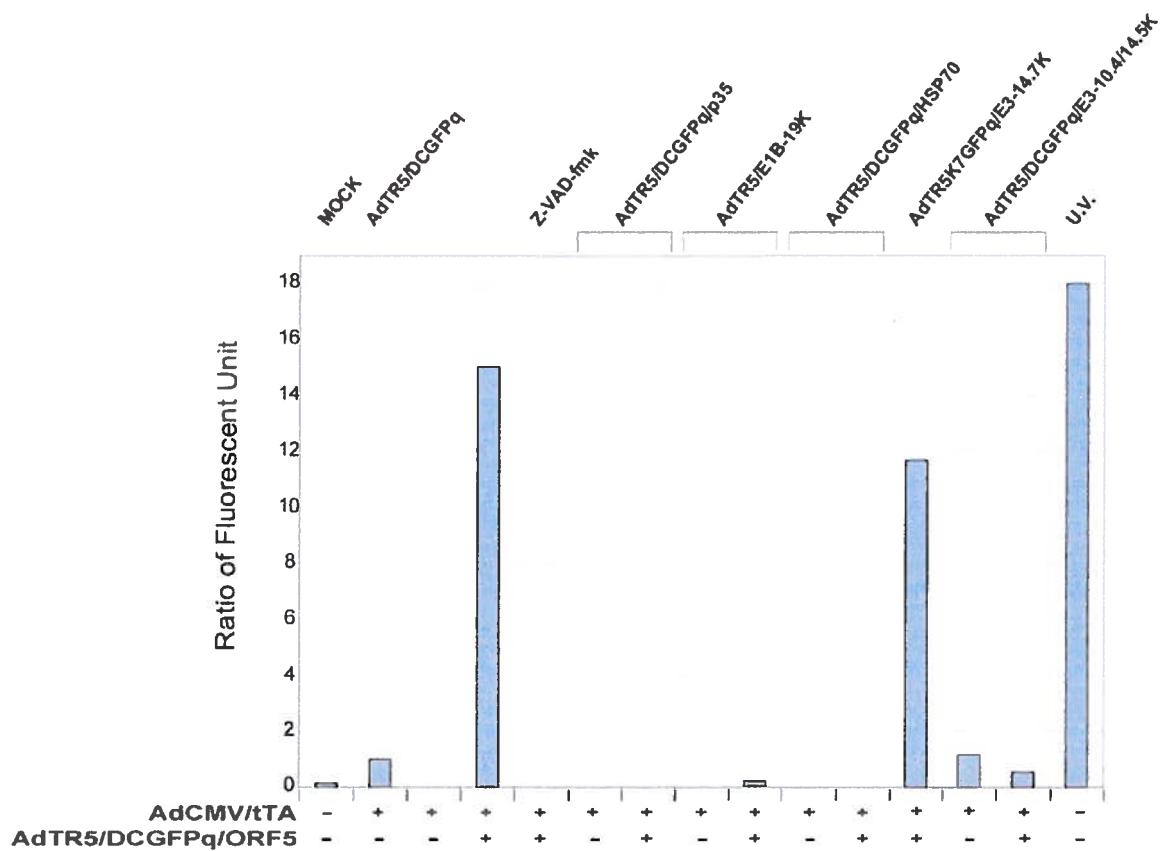
Figure 4.

Figure 5.



CHAPITRE 4

**PRODUCTION D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE 293 SF EXPRIMANT LE
RÉPRESSEUR CYMR ET LA PROTÉASE DE L'ADÉNOVIRUS TYPE 2 HUMAIN**

4.1-Résumé

Les adénovirus recombinants humains (AdV) sont d'excellents vecteurs pour l'expression d'un transgène, notamment par leur capacité à infecter plusieurs types cellulaires, mais aussi puisqu'ils s'obtiennent à des titres élevés. Il fut observé que la production d'un stock d'AdV codant pour un transgène toxique pouvait être compromise. De la toxicité identifiée comme de l'apoptose fut associée à la protéine GP₅ du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP). Cette toxicité est probablement responsable de l'incapacité de produire un AdV exprimant la protéine GP₅ sous le contrôle d'un promoteur constitutif (CMV). L'utilisation d'un promoteur répressible CMV5CuO permet la production de grande quantité d'AdV exprimant un transgène toxique. Dans ce système, le transgène n'est pas exprimé en présence du répresseur (CymR) qui se lie à l'opérateur du promoteur, mais abondamment exprimé lorsque le cumat est présent puisqu'il lie et inactive le CymR. La génération d'un stock concentré d'AdV exprimant la protéine GP₅ est souhaitable car cette protéine démontre des caractéristiques immunogéniques, mais aussi apoptotiques nécessaires à la compréhension des mécanismes pathologiques et de défense associés à cette infection importante chez les porcs. Les AdV présentement utilisés sont non-réplicatifs, car défectifs pour la région E1. Pour maximiser le pouvoir immunogénique de la GP₅ en vaccination, une rapide expression de cette protéine doit être atteinte chez l'hôte. Pour satisfaire ces conditions, un virus réplicatif non-disséminatif serait désirables afin d'optimiser la vaccination à l'aide de la protéine GP₅. Ce nouveau type de AdV fut généré suite à la délétion du gène de la protéase (PS), enzyme nécessaire à l'encapsidation du virion. Ici, une lignée cellulaire exprimant de façon constitutive la molécule CymR et la PS de l'adénovirus 2 fut établie à partir des cellules 293SF, cellules idéales pour la production de hauts titres en AdV puisque adaptées à la culture en suspension sans sérum. Cette lignée permettra d'obtenir des titres en AdV réplicatifs non-disséminatifs, donc plus sécuritaires, exprimant un ou des transgènes toxiques. Par la suite, le virus produit sera en mesure d'exprimer abondamment le transgène suite à l'infection de cellules n'exprimant pas le répresseur CymR.

4.2-Introduction

Les adénovirus recombinants humains (AdV) sont d'excellents vecteurs pour l'expression d'un transgène par leurs forts niveaux d'expression, l'obtention de hauts titres viraux et leur fort potentiel infectieux pour plusieurs types de cellules. Pour ces nombreux avantages, les AdV sont beaucoup utilisés pour exprimer des protéines recombinantes en génomique fonctionnelle, thérapie génique (TG) ainsi qu'en vaccination (Oualikene et Massie, 2000). Ces applications peuvent nécessiter la production d'AdV codant pour un transgène toxique. L'introduction d'un transgène toxique dans un AdV peut nuire à sa production et à l'obtention de hauts titres viraux par un mécanisme encore obscur. De la toxicité identifiée comme de l'apoptose fut associée à la protéine GP₅ du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) (Suarez, Diaz-Guerra et al., 1996). Cette toxicité est probablement responsable de l'incapacité de produire un AdV exprimant la protéine GP₅ sous le contrôle d'un promoteur constitutif (CMV). Plusieurs promoteurs comprenant un commutateur (switch) furent mis au point afin de contrôler l'expression de transgènes, dont le très populaire promoteur *tetO* pour les cellules de mammifères (Gossen, Bonin et al., 1993). Appliqué à la production d'AdV codant pour un transgène, ces commutateurs présentent plusieurs désavantages dont une étanchéité discutable, mais surtout la nécessité d'utiliser un trans-activateur qui initie la transcription par sa liaison au promoteur. Cette dernière caractéristique rend leur utilisation inapplicable *in vivo* en vue de vaccination. De plus, les promoteurs comprenant un commutateur dérivé de l'opérateur *tetO* peuvent être réprimés ou activés par la présence de doxycycline, analogue de la tétracycline. Ce dernier antibiotique peut se retrouver dans la nourriture des animaux d'élevages, rendant l'utilisation de ce type de promoteur inappropriée en vue de la vaccination des animaux de ferme.

Bien qu'un AdV exprimant la protéine GP₅ de façon inductible sous le contrôle du promoteur TR5 à pu être obtenue (Gagnon, Lachapelle et al. 2003), il est impératif de s'affranchir d'un second virus, condant pour le trans-activateur, pour toute éventuelle vaccination. Effectivement, en plus de présenter des coûts supplémentaires, l'efficacité d'une vaccination à l'aide de deux AdV est de beaucoup compromise, puisqu'elle nécessite la présence des deux virus dans la même cellule pour que la protéine GP₅ soit exprimée, et ainsi exercer son pouvoir immunogénique.

Le promoteur CMV5CuO, développé récemment par Mullick et Massie (2001), possède un opérateur (CuO) comprenant une série de répétition d'éléments sensibles au répresseur CymR. Ce système fut isolé à partir d'éléments responsables de la voie de

dégradation du *p-cymene* (cumate) chez *Pseudomonas putida F1* (Mullick et Massie, 2001). Lorsque le répresseur CymR est présent, sa liaison avec les éléments de l'opérateur CuO inhibe la poursuite de la transcription du transgène, alors que la transcription se poursuit normalement lorsque le CymR est absent. L'utilisation d'un promoteur répressible CMV5CuO permet la production de grande quantité d'AdV exprimant un transgène toxique sans que la croissance des cellules infectées en soit affectée, puisque le transgène n'est pas exprimé. L'utilisation d'un AdV possédant ce type de promoteur répressible serait souhaitable à des fins de vaccination puisque il permet de s'affranchir d'un second virus permettant de réguler le premier.

Les AdV de première génération habituellement utilisées sont non-répliquatifs, car défectifs pour la région E1. Une nouvelle gamme d'adénovirus capable d'effectuer un seul cycle de réplication, en présence de la protéine E1, fut dernièrement développée (Oualikene, Lamoureux et al., 2000). Pour ce faire la protéase (PS) de l'adénovirus, enzyme essentielle à plusieurs étapes de la maturation du virion, fut déletée du génome adénoviral. Pour exploiter le pouvoir immunogénique de la GP₅, un virus répliquatif possédant la région E1, mais non-disséminatif serait désirable à des fins de vaccination par les niveaux d'expression accentués du transgène qui seraient atteints. En effet, une fois introduit chez l'hôte, ce type d'AdV pourra répliquer son génome, entraînant ainsi une amplification du nombre de copies du génome viral, se traduisant par une expression accrue de la protéine immunogénique GP₅. De plus, l'utilisation d'AdV ayant conservés la région E1A constitue un avantage certain en vaccination puisque cette protéine peut agir comme un adjuvant naturel (*revue dans* Frischet Mymryk, 2002).

Ici, une lignée cellulaire exprimant de façon constitutive la molécule CymR et la PS de l'adénovirus 2 fut établie à partir des cellules 293SF, cellules idéales pour la production de hauts titres de stocks en AdV purs exempts de protéines sériques très immuno-génènes, puisque adaptées à la culture en suspension sans sérum (Côté, Garnier et al., 1998). Cette lignée permettra d'obtenir des titres en AdV répliquatifs non-disséminatifs, donc plus sécuritaires, exprimant un transgène toxique. Par la suite, le virus produit exprimera abondamment le transgène suite à l'infection de cellules n'exprimant pas le répresseur CymR.

4.3-Matériel et méthodes

Cellules Les cellules 293SF furent cultivées en conditions statiques ou dynamiques (agitateur) dans du milieu Hybridoma Serum Free Medium (Gibco Life technologies) à 37°C sous un atmosphère contenant 6% de CO₂.

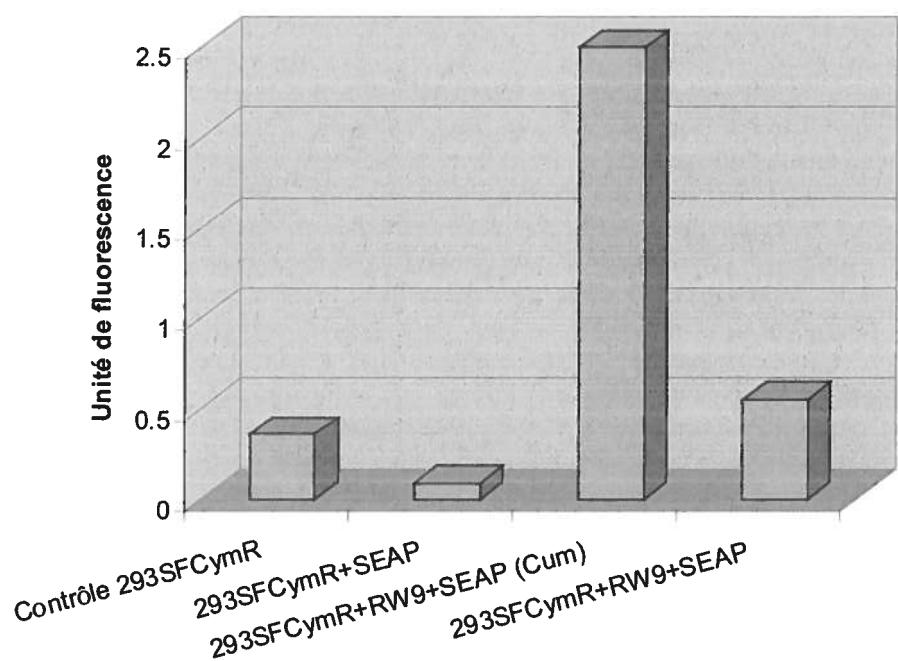
Transfection et Infection Les cellules 293SF furent transfectées de façon stable par la technique utilisant le poly(ethylenimine) comme agent de liaison, tel que décrit ailleurs (Durocher, Perret et al., 2002) par le plasmide pMPG-BFPq/tk*Néo/CymR linéarisé au site *BamH*1. Les cellules transfectées furent sélectionnées à la génétidine (25µg/ml). Des clones furent isolés suite au clonage par dilution limite sur plaques de 96 trous. Pour évaluer l'expression du répresseur, le pool de cellules 293SF CymR fut transfété au PEI de façon transitoire à l'aide de 3µg de chacun des plasmides pAdCuO/lacZ, où le gène de la β-galactosidase est sous le contrôle du promoteur sensible au cumate, et pDNASEAP, codant pour la séquence de la phosphatase alcaline sécrétée (obtenus du Dr Y. Durocher, IRB) à raison de 10µg total avec ou sans cumate (1µg/ml). Les cellules furent récoltées après 48 heures dans 0.25M Tris pH 8.0 et soumises à trois cycles de gel/dégel. Les clones 293SF CymR furent infectés par le virus AdCMV5CuO/lacZ (M.O.I. de 10) générés tel que décrit précédemment (Massie, Couture et al., 1998) avec ou sans cumate (1µg/µl). Les cellules furent récoltées comme ci-haut.

Test fonctionnel L'expression de la β-galactosidase fut évaluée à l'aide d'un test colorimétrique, tel que décrit par Sambrook *et al.* (Maniatis, 1989), les densités optiques étant déterminées à la longueur d'onde de 420 nm (OD₄₂₀) à l'aide d'un spectrophotomètre Dynatech MR5000 (Dynatech Laboratories Inc., Billingshurst, UK). L'expression de la β-galactosidase fut évaluée selon un test de chémiluminescence, suivant les directives du fabricant du test «β-gal reporter gene assay» (Roche). Les plaques de 96

puits furent lues à l'aide de l'appareil MLX microtiter plate luminometer et du logiciel Revelation MLX406 (Dynatech).

Gel et immunobuvardage de type Western La présence du répresseur CymR fut confirmée par immunoblot suite à une migration sur gel 12% Novex (Invitrogen) et transfert sur membrane de nitrocellulose HybondTM (Amersham Pharmacia Biotech), suite à l'incubation en présence d'un anticorps polyclonal de lapin (1/1000) dirigé contre le répresseur. La révélation par chemiluminescence fut effectuée selon les directives du fabricant (Amersham Pharmacia Biotech).

Figure V. Évaluation colorimétrique du potentiel de répression du pool de cellules 293SF CymR quant à leur pouvoir à lier et réduire l'activité du promoteur CuO, relié à l'expression de la β -galactosidase, suite à la transfection transitoire par les plasmides pAdCuO/lacZ (RW9) et pDNA/SEAP. La présence de cumate (Cum) inactive le répresseur CymR, pour maximiser l'expression de la β -galactosidase. Le plasmide codant pour la phosphatase (SEAP) a permis de standardiser l'activité de la β -galactosidase pour les différents extraits cellulaires.



4.4-Résultats

Suite à la transfection des cellules 293SF par le plasmide pMPG-BFPq/tk*Néo/CymR, le pool cellulaire de 293SF CymR ne permet que faiblement l'observation de cellules exprimant la BFP au microscope à fluorescence. Cette protéine de fluorescence bleue représente un marqueur de criblage, permettant de confirmer rapidement, par visualisation au microscope à fluorescence, la réussite de la transfection. Le pool de cellules 293SF CymR exprime le répresseur CymR puisque suite à un test colorimétrique, l'activité de la β -gal est 5 fois plus élevée en présence de cumate, qui lie et inactive le répresseur CymR (Figure V).

L'infection par AdCMV5CuO/lacZ permet de comparer l'expression du CymR chez les différents clones générés par dilution limite. L'activité de la β -galactosidase fut évaluée par un test colorimétrique (Figure VI) et par chémiluminescence (Figure VII). Les clones possédant une faible expression basale et permettant une forte induction en présence de 1 μ g/ μ l de cumate sont le A, G, et N suite au test colorimétrique avec des niveaux d'induction de 13.5, 12.9 et 12 fois, respectivement (Figure VI). Par contre, selon le test de chémiluminescence, les clone A et le G seraient les meilleurs avec des niveaux d'induction de 18.7 et 14.5, respectivement (Figure VII). Le clone N est le seul qui permet de visualiser distinctement les cellules exprimant la BFP au microscope à fluorescence (Figure IX). Pour les autres clones, il est seulement possible de voir un faible halo bleuté aux endroits où se trouve une forte concentration de cellules. Il est important de noter que la présence du marqueur de fluorescence bleue n'est pas corrélée avec les niveaux d'expression du CymR. En effet, le clone N montrant une forte fluorescence bleue a un pouvoir de répression inférieur aux clones A et G, qui manifestent que faiblement leur BFP (Figure VI et VII), tandis que ses niveaux de CymR ne sont quasiment pas détectable par Western blot, contrairement aux autres clones (Figure VIII).

Les résultats obtenus en réalisant un immunobuvardage de type Western sur les extraits cellulaires correspondant aux différents clones se corrèlent difficilement avec les résultats obtenus pour les niveaux d'induction de la β -galactosidase. En effet, selon les figures VI et VII, les clones I et H sont apparentés par leur pouvoir très faible à induire la β -galactosidase, alors que des intensités très différentes sont détectés pour la bande de 28kDa correspondant au CymR : Le clone H montre les plus hauts niveaux de CymR, alors que ces niveaux sont très faibles pour le clone I (Figure VIII). Les deux clones

montrant les meilleurs niveaux d'induction de β -galactosidase par les tests de chemiluminescence et colorimétrique, soit le A et le G, affichent une relative bonne expression du CymR, bien que légèrement inférieure à celle produite par le clone H (Figure VIII). Ces derniers résultats semblent indiquer que la quantité de CymR produite par chacun des clones ne soit pas directement reliée au pouvoir de répression observable par les tests colorimétrique et de chemiluminescence.

Par la suite, un plasmide fut construit pour exprimer la protéase sous le contrôle d'un promoteur faible, puisqu'il fut rapporté que la surexpression de cette protéine pouvait nuire considérablement à la croissance virale (Oualikene, Lamoureux et al., 2000). Pour s'assurer d'une faible expression de la protéase, la boîte TATA du promoteur fort CMV5 fut cloné par une stratégie de PCR et introduite dans un vecteur pTR5DCGFP/PS pour y remplacer le promoteur inductible TR5. Le plasmide pTATA(CMV5)DCGFP/PS ainsi obtenu fut ensuite analysé de façon fonctionnelle par infection/transfection (Elahi, Oualikene et al., 2002) afin d'évaluer si les niveaux de protéase produits étaient suffisants pour permettre la réplication d'un AdV natif à l'exception qu'il comprend une protéase inactive. Les résultats de ce test fonctionnel se sont révélés positifs par l'apparition d'effets cytopathiques (ECP) chez les cellules ayant subit l'infection/transfection, signifiant ainsi que le virus natif a pu se reproduire jusqu'à provoquer la mort cellulaire. Le plasmide pTATA(CMV5)DCGFP/PS fut par la suite co-transfected avec un plasmide contenant le gène de résistance à la néomycine (tel que décrit dans Oualikene, Lamoureux et al., 2000) dans les cellules 293SF CymR (clone G) ainsi que dans les cellules 293A CymR (clone 21). Les pools de transfection furent maintenus sous pression sélective ($2\mu\text{g/ml}$) durant 2 semaines. L'identification des clones les plus performants de cette population quant à l'expression de la PS, tout en conservant les niveaux d'expression du CymR, sera achevée durant et après le dépôt de ce mémoire.

Figure VI. Évaluation colorimétrique du potentiel de répression des clones cellulaires 293SF CymR quant à leur pouvoir à lier et réduire l'activité du promoteur CuO, relié à l'expression de la β -galactosidase, suite à leur infection par le virus AdCMV5CuO/lacZ. La présence de cumate (Cum) inactive le répresseur CymR, pour maximiser l'expression de la β -galactosidase, alors que l'absence de cumate ne permet de lever l'inhibition exercé par le CymR. Le pool de transfection stable 293SF CymR fut aussi testé pour sa capacité à réprimé l'expression de la β -galactosidase. Les contrôles positif et négatif sont, respectivement, une lignée exprimant le CymR établie chez des cellules 293A, permettant une forte répression du transgène (clone 23), et les cellules 293A ne pouvant pas réprimer l'expression de la β -galactosidase.

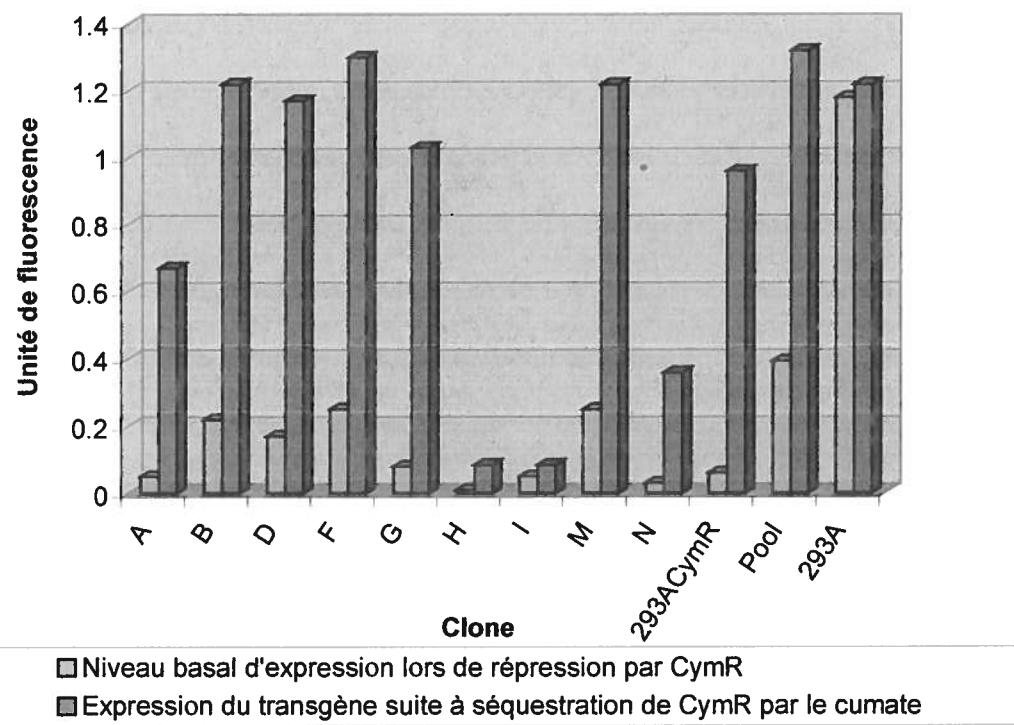
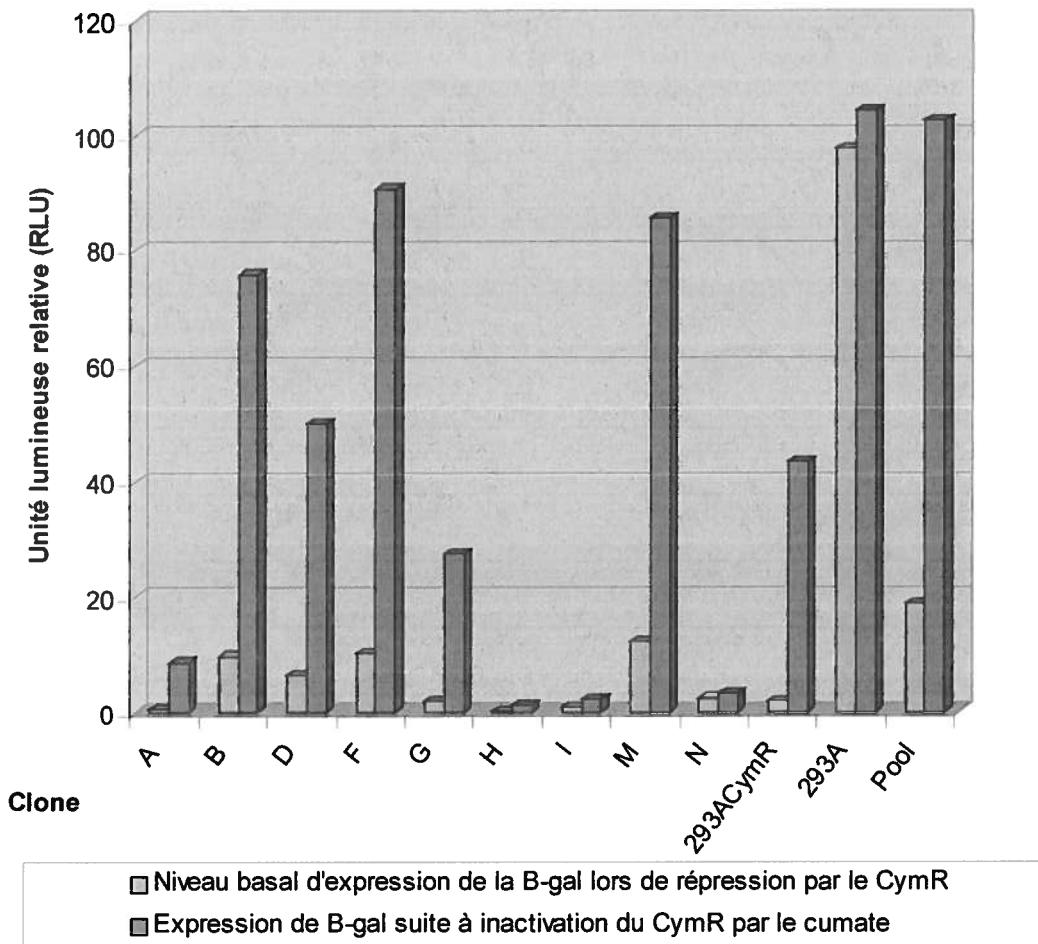


Figure VII. Évaluation par chémiluminescence du potentiel de répression des clones cellulaires 293SF CymR quant à leur pouvoir à lier et réduire l'activité du promoteur CuO, relié à l'expression de la β -galactosidase, suite à leur infection par le virus AdCMV5CuO/lacZ. La présence de cumate (Cum) inactive le répresseur CymR, pour maximiser l'expression de la β -galactosidase, alors que l'absence de cumate ne permet pas de lever l'inhibition exercé par le CymR. La population de transfectants stables 293SF CymR fut aussi testée pour sa capacité à réprimer l'expression de la β -galactosidase. Les témoins positif et négatif sont, respectivement, une lignée exprimant le CymR établie chez des cellules 293A, permettant une forte répression du transgène (clone 23), et les cellules 293A ne pouvant pas réprimer l'expression de la β -galactosidase.



4.5-Discussion

L'élaboration d'une lignée cellulaire permettant la production d'AdV codant pour un transgène toxique sous le contrôle du promoteur répressible CMV5CuO fut effectuée par l'introduction du répresseur CymR dans les cellules 293SF. Les neuf clones obtenus furent par la suite caractérisés quant à leur capacité à exprimer le répresseur CymR et leur pouvoir à réprimer un transgène dont l'expression dépend du promoteur répressible CMV5CuO. Le test colorimétrique effectué sur la population suite à une transfection transitoire a permis d'observer une faible induction du pool en présence de cumate (Figure V). La population de cellules transfectées est hétérogène, avec des cellules ayant intégré le transgène en des régions différentes de leur génome. Le clonage par dilution limite a permis d'isoler les meilleurs individus de cette population quant à leurs niveaux d'expression, mais aussi par leur stabilité à garder le transgène et à croître à un rythme normal pendant plusieurs semaines. Suite au clonage par dilution limite, les cellules peuvent être sélectionnées pour leur niveau d'expression du transgène par visualisation au microscope à fluorescence de la protéine de fluorescence bleue (BFP), qui est théoriquement co-exprimée avec le répresseur CymR (Figure IX). Par contre, l'observation des divers clones obtenus au microscope à fluorescence a démontré que l'intensité de cette protéine ne semble pas un marqueur fiable quant à l'expression de la molécule de répresseur CymR, puisque la fluorescence de la BFP est souvent trop faible pour être détectée. Le plastique qui compose les plaques et pétris utilisés pour la culture cellulaire possède une certaine auto-fluorescence dans le spectre bleue (*comm. pers.* de A. Caron), ce qui peut nuire à l'observation de la BFP. Pour vérifier le niveau de BFP des divers clones, il faudrait les observer au travers des pétris de verre, très peu auto-fluorescent dans le spectre bleu, en plus de pratiquer une exposition prolongée à l'aide d'une caméra sensible de type CCD. Pour démontrer clairement s'il existe une corrélation entre le niveau de CymR et celui de BFP, il faudrait mesurer la présence de la BFP par immunobuvardage de type Western sur les mêmes extraits que ceux utilisés pour montrer la présence de CymR par immunobuvardage. Avec une sensibilité réduite en regardant au travers des pétris de plastique, seulement le clone N permet d'observer des cellules bleues (Figure IX), alors que les analyses subséquentes permettent d'identifier d'autres clones positifs, et même meilleurs que le N, quant à l'expression du CymR. L'utilisation de la BFP demeure un marqueur utile de transfection, puisqu'il permet, en de bonnes conditions de microscopie, une rapide confirmation qualitative de la transfection (à l'intérieur de 48h

post-transfection). Son utilisation à des fins de quantification nécessiterait une méthode d'analyse plus sensible comme l'emploi d'anticorps spécifiques.

L'évaluation des niveaux d'induction des différents clones fut analysée par un test de chémiluminescence ainsi que par un test colorimétrique. De ces deux tests, les clones A et G ressortent les meilleurs quant à leur capacité à réprimer l'expression d'un transgène (β -galactosidase) sous le contrôle du promoteur CMV5CuO, par leur production de CymR (Figure VI et VII). Les niveaux d'expression de β -galactosidase (β -gal) obtenus en présence de cumate sont comparables à ceux du témoin positif, soit une lignée de cellules adhérentes 293A aussi transfectées de façon stable par le plasmide pMPG-BFPq/tk*Néo/CymR (clone 23), qui permet des niveaux d'induction de β -gal de 16 à 22 fois supérieurs par rapport aux niveaux réprimés (sans cumate) (Figure VI et VII). Les meilleurs clones sont ceux permettant une forte répression du transgène (sans cumate), puisque l'atout de cette lignée est de produire des AdVs codant pour des transgènes toxiques. La différence induction/répression est seulement de 3 et 4 fois pour la population transfectée, alors que cette différence est à peu près nulle pour les cellules 293SF non-transfектées n'exprimant pas le CymR et ne réagissent donc pas au cumate.

Les résultats obtenus par transfection transitoire à l'aide du plasmide pAdCuO/lacZ, où le gène de la β -galactosidase est sous le contrôle du promoteur sensible au cumate, furent normalisés par la co-transfection avec le plasmide pDNASEAP, contenant la phosphatase alcaline sécrétée humaine (SEAP) sous le contrôle du promoteur EI CMV. En effet, pour chaque transfections, l'activité de la SEAP fut évaluée sur les extraits cellulaires après ajout d'un substrat, qui suite à sa déphosphorylation par l'enzyme SEAP, est transformé en un composé instable qui émet de la lumière à DO₄₇₇. Les valeurs obtenues pour la détection de la β -galactosidase par le test de chémiluminescence furent relativisées pour la quantité d'ADN transfectée en fonction de l'activité SEAP pour chacun des extraits. Les résultats obtenus par infection ne furent pas relativisés de la sorte. La quantité de virus utilisée fut toutefois la même pour les différents clones, qui contenaient chacun un même nombre de cellules. De plus, les résultats obtenus par infection (réalisés en duplicita) furent validés par leur comparaison avec les résultats obtenus par transfection.

Les résultats obtenus par les méthodes colorimétriques et de chémiluminescence sont relativement semblables, à l'exception du résultat obtenu pour le clone N, classant les clones A et G comme ceux permettant une plus grande induction de la β -gal en présence de cumate, ainsi qu'une bonne répression du transgène en son absence. Les résultats très surprenants obtenus sur le clone N sont difficilement expliquables. Ce dernier clone étant apparu comme très bon, étant donné les résultats positifs obtenus par test colorimétrique et qu'il se soit avéré le seul à afficher une forte fluorescence bleue, mais il fut rejeté suite à son faible pouvoir d'activation du transgène en présence de cumate décelé par chémiluminescence (Figure VII). Pour cette raison, l'action inhibitrice du cumate est mise en cause d'avantage que l'expression de CymR par le clone N. Les expériences ayant été effectuées sur les mêmes extraits cellulaires, une explication rationnelle serait d'attribuer cette étrange divergence quant aux niveaux d'induction/répression du clone N à une malheureuse erreur de manipulation, où le cumate n'a peut être pas été ajouté au pétri. Toutefois, en admettant que le niveau d'induction de la β -gal du clone N doive se situer aux alentours des niveaux obtenus pour à la figure VI par test colorimétrique, il reste que ses niveaux d'induction de β -galactosidase ne sont pas les meilleurs et que ses niveaux d'expression de CymR sont les plus faibles lorsque détectés par immunobuvardage de type Western (Figure VIII), ce qui aurait tout de même conduit à rejeter ce clone.

La comparaison des niveaux d'induction et de répression de la β -gal selon la présence de cumate ou non avec les quantités de CymR détectées par immunobuvardage de type Western pourrait suggérer qu'une juste quantité de répresseur soit nécessaire pour que le promoteur CMV5CuO réponde correctement à la présence de cumate. Effectivement, alors que les clones A et G affichent des niveaux d'induction et de répression semblables au niveau atteints par les cellules 293 A clone 23, leur production de CymR est plutôt moyenne (Fig. VIII). Par contre, alors que les clones H et I, montrent tous deux une très faible induction de la β -gal, ils affichent des niveaux extrêmes en CymR. Cette dernière observation tend à supporter que de trop faibles ou trop élevés niveaux de CymR sont inappropriés pour réguler de façon optimale le promoteur CMV5CuO. Cependant, le clone 293 A numéro 23 montre une grande corrélation concernant son potentiel de répression, puisqu'il possède la meilleure capacité à réprimer le transgène (Figs. VI et VII) et qu'il produit aussi les niveaux de CymR les plus élevés. Il serait important de poursuivre les recherches de caractérisation du promoteur répressible afin de déterminer les conditions clonales optimales.

Figure VIII. Immunobuvardage de type Western effectué à l'aide d'un anticorps anti-répresseur CymR permettant de montrer une variation quant à la quantité de répresseur (CymR) produite par les différents clones cellulaires obtenus par dilution limite à partir de la population transfectée stable. Parallèlement, la lignée 293A CymR (clone 23) exprimant de hauts niveaux en CymR, et de la population transfectée fut aussi analysés quant à leur expression endogène du CymR.

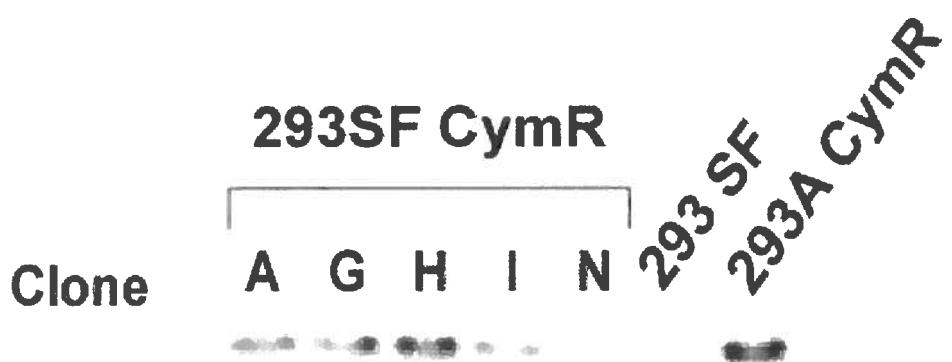
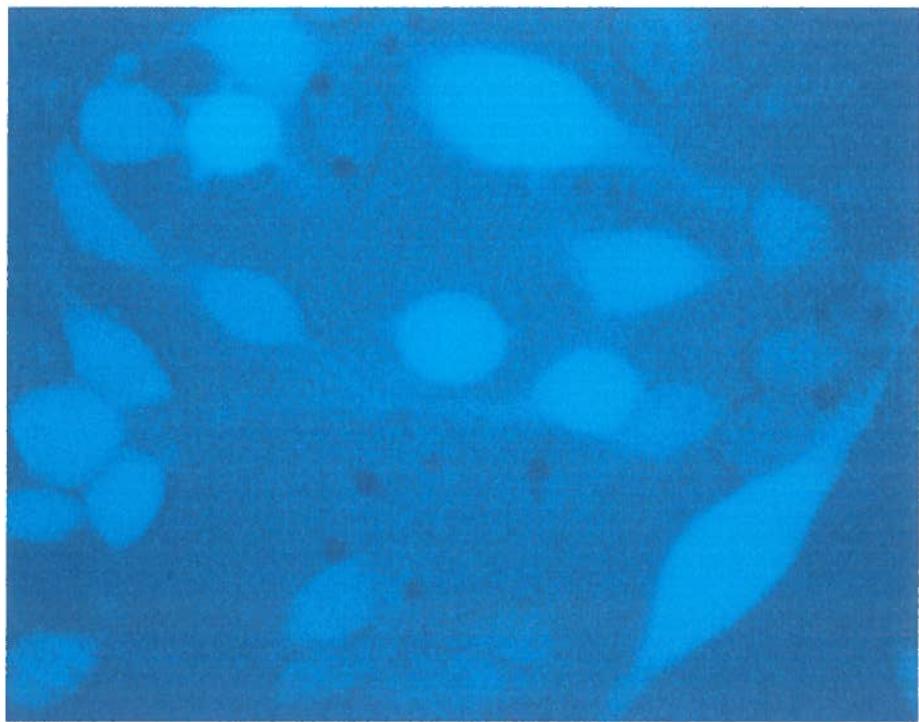


Figure IX. Cellules 293SF CymR clone N, exprimant la protéine fluorescence bleue (BFP). Le plasmide pMPG-BFPq/tk*Néo/CymR utilisé pour la transfection stable des cellules 293SF co-exprime la BFP avec le répresseur CymR. Le clone N, isolé par dilution limite à partir de la population transfectée, est le clone exprimant la BFP à de plus forts niveaux. Les images furent acquises au travers un filtre bleu au microscope à fluorescence à 40X à l'aide d'une caméra CCD et analysée à l'aide du logiciel Openlab.



4.6-Conclusion

La lignée 293SF CymR s'est avérée efficace pour réprimer la production d'un transgène se trouvant sous le contrôle du promoteur CuO. Ce type cellulaire pourra être utilisé afin de produire des AdV répressibles. Ces derniers pourront être utilisés en vue de vaccination génétique, ou bien en thérapie génique par l'expression d'une molécule thérapeutique (anti- ou pro-apoptotique). La production d'un adénovirus recombinant codant pour la protéine structurale GP₅, protéine immunogénique du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) causant l'apoptose en culture cellulaire (Gagnon, Langelier et al., 2001; Gagnon, Lachapelle et al. 2003 ; Suarez, Diaz-Guerra et al., 1996), sera poursuivie au-delà du dépôt du présent mémoire afin d'effectuer les premiers essais de vaccination chez le porc.

La production de virus répressible Ad/CMV5/CuO/GFP-PS permettant de pouvoir se répliquer pour un seul cycle réplicatif, grâce à l'intégrité de la région E1, sans produire de progéniture virale (non-disséminatifs) par l'absence de la protéase représente un atout majeur en immunisation génique chez les animaux. Effectivement, le promoteur répressible CuO pourra permettre d'atteindre des titres infectieux élevés pour ces AdVs en restreignant l'expression du virus dans les cellules 293 SF CymR, favorisant l'emploi d'une dose plus faible lors d'immunisation par les voies respiratoires (voir section 1.3.2.2-immunisation de porcs par un vaccin adénoviral) et permettra aussi l'emploi d'un seul virus pour immuniser les animaux. De plus, l'utilisation de virus réplicatifs/non-disséminatifs permettra d'exprimer abondamment le transgène chez l'animal pour induire une réponse immunitaire, sans que l'adénovirus ne puisse former de particules infectieuses pouvant être disséminées aux autres animaux de l'élevage ou d'autres élevages en contact avec les animaux vaccinés, et représentant un risque d'infection potentielle pour l'homme par la viande ou autres sous-produits de ces animaux vaccinés. En plus de représenter un mode d'immunisation plus sécuritaire, l'utilisation de ce nouveau type d'AdV en vaccination représente aussi des économies importantes de coûts par la possibilité de n'utiliser qu'un seul virus et de l'innoculer à l'animal de façon intra-nasale.

Un autre avantage marqué sera la possibilité de pouvoir discriminer entre les porcs vaccinés et les porcs infectés. Plusieurs pays exercent encore de nos jours un embargo sur les porcs importés séropositifs, ce qui représente des pertes économiques importantes pour le Canada dont la principale source de revenus de l'industrie de l'élevage des porcs provient de l'exportation.

CHAPITRE 5

CONCLUSION GÉNÉRALE

Par son impact sur la reproduction et la viabilité des porcs, le virus reproducteur et respiratoire porcin cause de sérieux problèmes à l'industrie porcine, conduisant à des pertes économiques importantes. La faible efficacité des vaccins développés jusqu'à maintenant ne permet pas de prévenir efficacement la transmission de l'agent et l'établissement de la maladie causée par le VSRRP. Depuis qu'il fut démontré que la vaccination génétique à l'aide de la glycoprotéine GP₅ permettait la production d'anticorps neutralisants et menait aussi à la protection de porcs et de souris contre une infection-défi (Pirzadehet Dea, 1997, 1998; Pirzadeh, Gagnon et al., 1998), plusieurs groupes, dont le nôtre, travaillent à développer un vaccin de type recombinant avec cette protéine prometteuse. Dernièrement, nos efforts à élaborer un vaccin sous-unitaire se sont tournés vers l'utilisation d'adénovirus recombinants humains (AdV), vu leurs nombreux avantages (Oualikene, Lamoureux et al., 2000). Seulement, la toxicité de la protéine GP₅ de la souche IAF-Klop du VSRRP (Gagnon, Langelier et al., 2001; Gagnon, Lachapelle et al. 2003) occasionne d'importantes difficultés à obtenir de hauts titres viraux. De fortes concentrations en virus recombinants sont souhaitables pour d'éventuelles applications en vaccinations, puisqu'un stock viral concentré permet de diminuer la dose à injecter à l'animal.

Les principaux objectifs du présent mémoire de maîtrise étaient de caractériser le mode de maturation ainsi que la voie apoptotique de la protéine GP₅ de la souche IAF-Klop du VSRRP, et de mettre au point une lignée cellulaire exprimant le répresseur CymR et la protéase PS, afin de produire à de hauts titres une nouvelle génération d'adénovirus recombinants à des fins de vaccination génétique.

L'étude du mode de maturation des protéines majeures de la souche IAF-Klop du VSRRP a permis de démontrer que l'expression de la protéine GP₅ par un vecteur adénoviral différait quelque peu quant à certaines étapes de sa maturation par rapport à l'infection naturelle par le VSRRP, notamment au niveau du profil de glycosylation, sans pour autant affecter les propriétés immunogéniques de la protéine (Chapitre 2). De façon plus appliquée, cette étude a permis de valider les résultats de vaccination obtenus précédemment avec cette protéine (Pirzadeh et Dea, 1998), puisque la protéine GP₅ ne nécessite pas la formation d'un hétérodimère avec la protéine M pour conduire à l'établissement d'une réponse immunitaire protectrice reliée à la formation d'anticorps neutralisants, comme l'avait suggéré certains auteurs dans le cas d'un autre *Arteriviridae* (Balasuriya, Heidner et al., 2000). Une certaine toxicité fut associée aux protéines N et à la GP₅ du VSRRP, puisque la production d'AdV exprimant ces dites protéines ne fut

possible que lorsque le gène correspondant à ces protéines fut placé sous le contrôle d'un promoteur inductible (TR5), plutôt que constitutif (CMV). Finalement, il fut démontré que la toxicité de la protéine GP₅ de la souche Nord Américaine IAF-Klop du VSRRP était attribuable en fait à de l'apoptose, comme démontré précédemment avec une souche Européenne (Suarez, Diaz-guerra et al., 1996). Les résultats permettant de cerner davantage le processus apoptotique induit par la protéine GP₅, présentés sous forme d'article scientifique, n'écartent pas la candidature de la protéine GP₅ à des fins de vaccination génétique. Cependant, il serait nécessaire d'approfondir les connaissances des propriétés apoptotiques de la protéine GP₅ afin d'optimiser la production d'adénovirus codant pour cette protéine. Aussi, la localisation des domaines apoptotiques de cette protéine pourrait permettre l'utilisation d'une protéine GP₅ tronquée, qui conserverait les domaines immunogéniques, mais sans les domaines apoptotiques, s'il s'avérait que ces domaines étaient physiquement distincts, afin de développer un vaccin sous-unitaire.

Jusqu'à maintenant, l'effet apoptotique de la GP₅ du VSRRP a uniquement été démontré par la présence de fragmentation d'ADN (Fernandez, Suarez et al., 2002; Kim, Benfield et al., 2002; Sirinarumitr, Zhang et al., 1998; Suarez, Diaz-Guerra et al., 1996), et dernièrement par l'activation de la caspase-3 (Gagnon, Langelier et al., 2001; Gagnon, Lachapelle et al. 2003). Les résultats présentés dans le présent mémoire permettent de remonter la cascade apoptotique jusqu'à l'activation de la caspase initiatrice -9, reliée au relargage du cytochrome C (Chapitre 3).

Dans le cadre de cette étude, la possibilité de l'apoptose induite par la voie apicale médié par les récepteurs de mort et l'activation de la pro-caspase-8 fut rapidement exclue, malgré le fait que l'induction de l'apoptose par GP₅ à partir de la membrane plasmique constituait une hypothèse séduisante pour répondre au processus de mort par apoptose collatérale observée par certains auteurs (Kim, Benfield et al., 2002; Sirinarumitr, Zhang et al., 1998; Sur, Doster et al., 1998). Effectivement, puisqu'il fut suggéré que la mort par apoptose collatérale puisse survenir suite à la libération de certaines cytokines par les cellules infectées par le VSRRP, tel le TNF- α (Kim, Benfield et al., 2002), il fut tentant d'assumer que les récepteurs de la famille TNFR1, associés à la pro-caspase-8 par leurs domaines cytoplasmiques, étaient responsables de l'apoptose. À défaut de passer par la voie extrinsèque menant à l'activation de la caspase apicale -8, la protéine GP₅ induit forcément une perturbation de l'homéostasie intracellulaire affectant l'un ou l'autre des organelles cellulaire pouvant initier la cascade apoptotique.

Puisque la protéine GP₅ s'accumule au niveau du réticulum endoplasmique (RE) afin d'y subir des modifications post-traductionnelles (Chapitre 2), et considérant les récentes publications rapportant l'induction de l'apoptose suite à une surcharge du RE (*revue dans* Ferri et Kroemer, 2003), il fut donc naturel de se tourner vers cet organelle pour déterminer si l'initiation du processus apoptotique en provenait. D'autant plus que le modèle d'apoptose tardif induit par la protéine GP₅ reste assez atypique (72h post-infection) et pourrait correspondre à un débordement des mécanismes de régulation du RE. Dans un premier temps, l'activation de la caspase apicale -12, découverte récemment par Nakagawa, Zhu, et al. (2000), fut évaluée par immunoblot de type western, suite à la co-infection de cellules MARC-145 avec le tTa et le virus inductible pour la protéine GP₅. Les résultats de cette expérience affichaient des niveaux de pro-caspase-12 extrêmement faibles pour les extraits cellulaires exprimant ou non la protéine GP₅ (résultats non-présentés). Afin de vérifier si la faible détection de la pro-caspase-12 était due à de faibles niveaux d'expression de la protéine chez les cellules MARC-145 ou bien par une mauvaise spécificité de l'anticorps, les niveaux basaux en pro-caspase-12 furent comparés à ceux obtenus chez les cellules A549, dont la pro-caspase-12 peut être clivée par le virus syncitial respiratoire (RSV) (Bitko et Barik, 2001). Les résultats obtenus indiquent que les cellules MARC-145 produisent une quantité quasi-insignifiante de pro-caspase-12, ce qui rend l'éventuelle détection du fragment clivé peu réalisable (résultats non-présentés). L'implication de la protéine Bik, protéine apparentée à Bcl-2 avec un seul domaine BH3, fut aussi considérée d'après les récentes données suggérant son implication dans l'induction de l'apoptose en provenance du RE (Germain, Mathai et al., 2002). Bien que les résultats préliminaires obtenus jusqu'à la rédaction de ce mémoire n'aient pas été concluants, il serait nécessaire de poursuivre les recherches en ce sens. Même si les récents travaux publiés par le groupe de Suarez suggèrent que les modifications post-traductionnelles de la protéine GP₅ ne sont pas nécessaires à l'induction de l'apoptose, et que le domaine de la protéine GP₅ responsable de l'apoptose soit dépourvu de glycosylation (Fernandez, Suarez et al., 2002), il serait important de poursuivre ces expériences au-delà de ces travaux de maîtrise afin de vérifier formellement si un stress en provenance du RE puisse être responsable de l'induction de l'apoptose.

Par son action anti-apoptotique à prévenir le clivage de la pro-caspase-3 chez les cellules MARC-145 exprimant la protéine GP₅, hsp70 ne fournit pas beaucoup d'indices quant à déterminer l'étape initiale d'induction de l'apoptose. Malgré, le fait que la protéine hsp70, principalement située dans le cytoplasme, puisse exercer son effet protecteur en de nombreux points en aval, ainsi qu'en amont du relargage du cytochrome

C (revue dans Beere et Green, 2001), sa capacité à prévenir la formation d'une brèche dans la membrane externe des mitochondries est retenue ici, puisqu'elle est commune avec le point d'action de la protéine E1B-19K. Il s'agirait maintenant de déterminer sur qu'elle cible mitochondriale la protéine adénovirale E1B-19K et la chaperonne moléculaire hsp70 exercent leurs actions protectrices. Les protéines Bax et Bak sont d'excellentes candidates, puisque leurs caractéristiques apoptotiques peuvent être neutralisées par E1B-19K (Perrez et White, 2000). De plus, la protéine hsp70 empêche l'insertion de Bax dans les mitochondries (*comm. pers.* de D.D Mosser). Afin de vérifier cette hypothèse, une expérience d'immunofluorescence (IF) fut réalisée avec un anticorps reconnaissant seulement la forme activée de Bax sur des cellules MARC-145 préalablement infectées avec un virus exprimant la protéine GP₅, ou bien la protéine contrôle GFPq. Même si les résultats de cette expérience ne montrent aucune translocation de Bax vers les mitochondries lorsque la protéine GP₅ est exprimée (résultats non-présentés), il serait nécessaire de confirmer ceci en effectuant un immunobuvardage de type western sur la fraction mitochondriale des cellules, suite à l'expression de la GP₅. La connaissance de la protéine responsable de la perte d'intégrité mitochondriale permettrait de continuer de remonter la voie apoptotique afin de déterminer l'endroit à partir duquel la protéine GP₅ déclenche l'apoptose.

Le postulat selon lequel la protéine GP₅ puisse interagir directement avec un analogue pro-apoptotique des Bcl-2 semble peu probable considérant le fait que l'hétérodimère E3-10.4/14.5K, connu pour bloquer l'apoptose induit par la voie apicale, puisse inhiber cette infection. Par contre, le fait que la protéine de la région E3-14.7K de l'adénovirus ne puisse bloquer l'activation de la caspase-3 sur les extraits de cellules MARC-145 exprimant la protéine GP₅ mène à considérer la possible intervention de cette protéine porcine à induire l'apoptose quelque part entre la membrane cytoplasmique et les mitochondries. Ceci pourrait s'effectuer par le biais d'un inducteur apical de mort pour lequel la protéine E3-14.7K n'offre aucune protection, contrairement à l'hétérodimère E3-10.4/14.5K. Puisqu'il fut démontré que l'hétérodimère E3-10.4/14.5K pouvait induire une réduction dans la présentation des récepteurs EGF (Tollefson, Stewart et al., 1991) et bloquer la signalisation en provenance de IL-1 et TNF- α en agissant au niveau de la signalisation par NF- κ B (Friedman et Horwitz, 2002), il serait possible que cet hétérodimère puisse agir sur un récepteur qui véhiculerait le stimulus apoptotique de la protéine GP₅. Un candidat intéressant, situé entre la membrane plasmique et les mitochondries, serait la caspase initiatrice -2. Cette caspase, contenant un domaine CARD, peut s'associer avec des membres des récepteurs de mort (Ahmad, Srinivasula et

al., 1997), et de récentes découvertes mentionnent que cette protéine peut favoriser la perte d'intégrité membranaire des mitochondries (Lassus, Opitz-Araya, et al., 2002). À cette fin, les expériences utilisant un anticorps spécifique pour la caspase-2_L ainsi qu'un inhibiteur spécifique de caspase-2, ont débutées seulement quelques temps avant le dépôt de ce mémoire. Les résultats fragmentaires obtenus ne permettent toutefois pas de développer sur l'éventuelle implication de cette caspase dans l'induction de l'apoptose par la protéine GP₅ du VSRRP. Par contre, puisque relativement peu de choses sont connues sur les diverses fonctions de E3-10.4/14.5K, il est aussi possible que cet hétérodimère puisse bloquer le processus apoptotique en agissant sur une cible non-reliée aux membranes plasmiques.

En dépit des diverses possibilités énoncées ci-haut, il ne faut pourtant pas exclure le fait que la protéine GP₅ du VSRRP ait pu évoluer de manière à induire l'apoptose en plus d'un point du processus de mort programmée. Aussi, des études futures devront évaluer si la même portion de la GP₅ Nord Américaine de la souche IAF-Klop du VSRRP est impliquée dans l'induction de l'apoptose observée induite par la GP₅ Européenne (Fernandez, Suarez et al., 2002). Même si le rapprochement fait entre l'apoptose observée avec le VSRRP complet et la protéine GP₅ exprimée par un AdV ne considère pas les autres composantes structurales du virion, elle pourrait toutefois d'expliquer en partie les lésions macroscopiques observables au niveau des poumons des porcs infectés. Les résultats présentés au chapitre 3 montrent certaines similitudes entre l'apoptose induite par la souche IAF-Klop du VSRRP et la protéine GP₅ de cette même souche. Toutefois, il serait aussi nécessaire d'étudier individuellement et conjointement les autres composantes structurales du VSRRP afin de déterminer si ces dernières peuvent réguler le procédé apoptotique enclenché par la protéine GP₅.

La manipulation de l'apoptose et de la machinerie cellulaire par les virus étant un processus très conservé au cours de l'évolution entre le virus et son hôte (Hay et Kannourakis, 2002), il est peu probable que la grande variation entre les séquences en acides aminés des protéines GP₅, des génogroupes NA et EU n'affecte le mode d'induction de l'apoptose. L'hypothèse d'une évolution divergente pour ces protéines de deux continents, permettrait tout de même d'expliquer le fait qu'aucune protection ne soit obtenue par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 pour une souche Européenne (Suarez, Diaz-Guerra et al., 1996), alors que l'implication directe des mitochondries dans l'apoptose induite par la GP₅ de la souche IAF-Klop est ici démontrée. Plus probable, la divergence observée est sûrement attribuable au fait que les niveaux de protéines Bcl-2

produits par les cellules N2A pour prévenir l'apoptose n'étaient pas assez élevés, comme les auteurs le suggèrent eux-mêmes. Toutefois, par le nombre élevé de copies virales obtenues lors d'infection avec l'AdV, l'expression du transgène est beaucoup plus efficace que sa contrepartie dans une lignée stable, qui contient habituellement une seule copie du transgène. Il serait intéressant de répéter l'expérience en diminuant la MOI des virus exprimant des gènes anti-apoptotiques, jusqu'à avoir une seule copie virale par cellule, tout en maintenant une MOI élevée pour le virus codant pour la GP₅. De cette manière, les résultats seraient plus comparables à ceux obtenus par Suarez et al. (1996). Par contre, puisque l'infection des cellules non-permissives, telles les MARC-145, par l'AdV nécessite la présence du transactivateur tTa dans la même cellule, il est difficile de contrôler efficacement l'expression du transgène à de si faibles MOI. Pour vérifier si de faibles niveaux en protéines anti-apoptotiques parviennent à prévenir l'apoptose induite par la protéine GP₅, il serait plus simple de seulement ajouter de la doxycycline (dox) au milieu pour contrôler l'expression du promoteur TR5, sensible à la dox, des transgènes suite à l'infection par l'AdV. Toutefois, cette avenue reste impossible pour le moment, puisque l'expression de la protéine GP₅ sera aussi atteinte par la dox. Ce type d'expérience est tout désigné pour l'utilisation conjointe du promoteur CMV5CuO exprimant la GP₅, et le système TR5 régulable pour exprimer les protéines anti-apoptotiques.

Bien qu'un type d'adénovirus recombinant fut déjà développé par notre laboratoire pour exprimer un transgène toxique (Massie, Couture et al., 1998), l'utilisation du promoteur inductible TR5 par la tétracycline dans la cassette d'expression permet de réguler un niveau d'expression basal du transgène qui ainsi ne peut interférer avec la production des AdVs. C'est notamment le cas pour la protéine GP₅ du VSRRP qui, à des niveaux supérieurs au niveau d'expression basal, s'avère toxique pour la machinerie de synthèse protéique des cellules infectées. L'interférence observée peut aussi agir sur la génération d'adénovirus. Pour ces deux avenues, l'absence d'expression du transgène reste la meilleure solution, afin de produire de forts titres en AdV exprimant la protéine GP₅ du VSRRP. La mise au point d'une lignée 293SF CymR PS permettra de maintenir une expression basale faible d'un transgène toxique pour assurer la production d'AdV. Bien que l'AdV codant pour la protéine GP₅ (ou d'une autre protéine toxique) sous le contrôle du promoteur répressible CMV5CuO ne soit pas encore disponible pour pouvoir mesurer son étanchéité par rapport au virus TR5 actuel, il est certain que les nouveaux AdV/CMV5CuO auront l'immense avantage pour les approches de vaccination de ne pas nécessiter de co-infection avec un trans-activateur. De plus, la présence de la protéase de l'adénovirus

permettra de produire des virus plus sécuritaires à d'éventuelles applications *in vivo*, telles la vaccination et la thérapie génique, puisque les particules virales ne pourront se former, malgré la réPLICATION et l'expression des protéines virales et du transgène (Oualikene, Lamoureux et al., 2000).

5.1-Perspectives

Les résultats présentés dans ce mémoire de maîtrise laissent croire que les premiers tests de vaccination à l'aide d'un virus seront effectués prochainement (le virus étant présentement en développement), afin d'induire la production d'une réponse immunitaire protectrice contre le VSRRP chez le porc. L'utilisation d'un adénovirus comprenant la région E1 nécessaire à la réPLICATION du virus, permettra un nombre élevé de copies virales, corrélé à une forte expression de la glycoprotéine majeure GP₅ du VSRRP *in vivo*, de façon à stimuler le système immunitaire. Le fait que notre futur vaccin soit réPLICATIF et que son mode d'injection prévue soit de façon oro-nasale, ciblant ainsi l'immunité de type mucosale due au tropisme respiratoire (ou intestinal) des adénovirus, représente des avantages importants sur les vaccins préparés à partir de virus atténués ou inactivés présentement disponibles commercialement. En effet, ceci permettra de minimiser la dose de virus à utiliser pour injecter les animaux, puisque ces derniers se répliqueront au site d'injection, ce qui aura pour but d'amplifier le signal. De plus, ce type de vaccin sous-unitaire facilitera le mode de vaccination, ce qui se traduit par une économie importante à l'échelle des producteurs de porcs. Une plus grande connaissance du mode d'induction de l'apoptose par le VSRRP et son éventuel contrôle, pourrait aussi aider à prévenir certains effets cytopathiques observés *in vivo* chez divers types de cellules de l'appareil germinal, où de l'apoptose fut rapportée suite à l'infection par le VSRRP (Sur, Doster et al., 1997), ou permettrait peut être même d'abolir ou de minimiser les lésions macroscopiques observées au niveau des poumons des porcs (Bilodeau, Dea et al., 1991; Christianson, Choi et al., 1993; Halbur, Paul et al., 1995; Rossow, Laube et al., 1996). De plus, la connaissance des régions de la protéine GP₅ de la souche IAF-Klop du VSRRP associées à l'induction de l'apoptose pourrait permettre de tronquer ces domaines afin de produire une protéine GP₅ non-apoptotique, tout en conservant ses propriétés immunogéniques. Finalement, l'accumulation de connaissances sur le type d'apoptose atypique observée suite à l'infection par le VSRRP, ainsi que par la protéine GP₅ seule, permettrait de comprendre d'avantage le mode de contrôle qu'exercent certaines protéines virales sur la cascade apoptotique de l'hôte.

CHAPITRE 6

6.1-Liste des références

- ACSADI, G., JANI, A., MASSIE, B., SIMONEAU, M., HOLLAND, P., BLASCHUK, K. et KARPATI, G. 1994. «A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity». Hum Mol Genet 3(4): 579-84.
- ACSADI, G., MASSIE, B. et JANI, A. 1995. «Adenovirus-mediated gene transfer into striated muscles». J Mol Med 73(4): 165-80.
- ADAMS, J.M. et CORY, S. 2001. «Life-or-death decisions by the bcl-2 protein family». Trends Biochem Sci 26: 61-6.
- ALBINA, E., LEFORBAN, Y., BARON, T., PLANAS DURAN, J.P. et VANNIER, P. 1992. «An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus». Ann Rech Vet 23(2): 167-76.
- AHMAD, M., SRINIVASULA, S.M., WANG, L., TALANIAN, R.V., LITWACK, G., FERNANDES-ALNEMRI, T. et ALNEMRI, E.S. 1997. «Cradd, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and fasl/tumor necrosis factor receptor-interacting protein rip». Cancer Res 57(4): 615-9.
- AMBRIOVIC, A., ADAM, M., MONTEIL, M., PAULIN, D. et ELOIT, M. 1997. «Efficacy of replication-defective adenovirus-vectored vaccines: protection following intramuscular injection is linked to promoter efficiency in muscle representative cells». Virology 238(2): 327-35.
- ANTONSSON, B. et MARTINOU, J.C. 2000. «The Bcl-2 protein family». Exp Cell Res 256(1): 50-7.
- ARCHAMBAULT, D. et ST-LAURENT, G. 2000. «Induction of apoptosis by equine arteritis virus infection». Virus Genes 20(2), 143-7.
- ARENDSD, M.J. et WYLLIE, A.H. 1991. «Apoptosis: mechanisms and roles in pathology». Int Rev Exp Pathol 32: 223-54.
- ASHHAB, Y., ALIAN, POLLIACK, A., PANET, A. et Yehuda, D.B. 2001. «Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern». FEBS Lett 495:56-60.
- BABIUK, L.A. et TIKOO, S.K. 2000. «Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces». J Biotechnol 83(1-2): 105-13.
- BABIUK, L.A., LEWIS, J., VAN DEN HURK, S. et BRAUN, R. 1999. «DNA immunization: present and future». Adv Vet Med 41:163-79.
- BABIUK, L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., LOEHR, B.I. et UWIERA, R. 2000. «Veterinary applications of DNA vaccines». Dev Biol (Basel) 104 :73-81.
- BALASURIYA, U.B., HEIDNER, H.W., HEDGES, J.F., WILLIAMS, J.C., DAVIS, N.L., JOHNSTON, R.E. et MACLACHLAN, N.J. 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(22): 10623-30.

- BAN, E., DUPRE, L., HERMANN, E., ROHN, W., VENDEVILLE, C., QUATANNENS, B., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., CAPRON, A. et RIVEAU, G. 2000. «CpG motifs induce Langerhans cell migration in vivo». *Int Immunol* 12(6): 737-45.
- BAN, E.M., VAN GINKEL, F.W., SIMECKA, J.W., KIYONO, H., ROBINSON, H.L. et MCGHEE, J.R. 1997. «Mucosal immunization with DNA encoding influenza hemagglutinin». *Vaccine* 15(8): 811-3.
- BARON, T., ALBINA, E., LEFORBAN, Y., MADEC, F., GUILMOTO, H., PLANAS DURAN, J. et VANNIER, P. 1992. «Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation». *Ann Rech Vet* 23(2): 161-6.
- BAUTISTA, E.M., MEULENBERG, J.J., CHOI, C.S. et MOLITOR, T.W. 1996. «Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Arch Virol* 141(7): 1357-65.
- BEERE, H.M. et GREEN, D.R. 2000. «Stress management - heat-shock protein-70 and the regulation of apoptosis». *Trends Cell Biol* 11(1): 6-10.
- BEERE, H.M., WOLF, B.B., CAIN, K., MOSSER, D.D., MAHBOUBI, A., KUWANA, T., TAILOR, P., MORIMOTO, R.I., COHEN, G.M. et GREEN, D.R. 2000. «Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-I apoptosome». *Nat Cell Biol* 2(8): 469-75.
- BENFIELD, D.A., NELSON, E., COLLINS, J.E., HARRIS, L., GOYAL, S.M., ROBISON, D., CHRISTIANSON, W.T., MORRISON, R.B., GORCYCA, D. et CHLADEK, D. 1992. «Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332)». *J Vet Diagn Invest* 4(2): 127-33.
- BIODEAU, R., DEA, S., SAUVAGEAU, R.A. et MARTINEAU, G.P. 1991. «'Porcine reproductive and respiratory syndrome' in Quebec». *Vet Rec* 129(5): 102-3.
- BITKO, V. et BARIK, S. 2001. «An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus». *J Cell Biochem* 80(3): 441-54.
- BOWERSOCK, T.L. et MARTIN, S. 1999. «Vaccine delivery to animals». *Adv Drug Deliv Rev* 38(2): 167-94.
- BOYA, P., ROQUES, B. et KROEMER, G. 2001. «Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level». *The Embo J* 20(16): 4325-31.
- BRENNER, C., CADIOU, H., VIEIRA, H.L., ZAMZAMI, N., MARZO, I., XIE, Z., LEBER, B., ANDREWS, D., DUCLOHIER, H., REED, J.C. et KROEMER, G. 2000. «Bcl-2 and bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator». *Oncogene* 19: 329-36.
- BROCHIER, B., AUBERT, M.F., PASTORET, P.P., MASSON, E., SCHON, J., LOMBARD, M., CHAPPUIS, G., LANGUET, B. et DESMETTRE, P. 1996. «Field use of a vaccinia-rabies recombinant vaccine for the control of sylvatic rabies in Europe and North America». *Rev Sci Tech* 15(3): 947-70.
- BRUDER, J.T., APPIAH, A., KIRKMAN, W.M., 3RD, CHEN, P., TIAN, J., REDDY, D., BROUGH, D.E., LIZONOVA, A. et KOVESDI, I. 2000. «Improved production of adenovirus vectors expressing apoptotic transgenes». *Hum Gene Ther* 11(1): 139-49.

- BUMP, N.J., HACKETT, M., HUGUNIN, M., SESHAGIRI, S., BRADY, K., CHEN, P., FERENZ, C., FRANKLIN, S., GHAYUR, T., LI, P., LICARI, P., MANKOVICH, J., SHI, L., GREENBERG, A.H., MILLER, L.K. et WONG, W.W. 1995. «Inhibition of ice family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35». *Science* 269: 1885-88.
- BYRNES, A.P. et GRIFFIN, D.E. 1998. «Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate». *J Virol* 72(9): 7349-56.
- CAIN, K., BROWN, D.G., LANGLAIS, C. et COHEN, G.M. 1999. «Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex». *J Biol Chem* 274(32): 22686-92.
- CALLEBAUT, P., ENJUANES, L. et PENSAERT, M. 1996. «An adenovirus recombinant expressing the spike glycoprotein of porcine respiratory coronavirus is immunogenic in swine». *J Gen Virol* 77(2): 309-13.
- CASTAGNER, F. 2002. Vecteur adénovirus protéase-délétés pour la vaccination génétique chez les porcs et développement d'une lignée cellulaire adhérente de complémentation 293A PSAd5. Laval, INRS-Institut Armand-Frappier. Mémoire de Maîtrise.
- CAVANAGH, D. 1997. «Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae». *Arch Virol* 142(3): 629-33.
- CHAI, J., DU, C., WU, J.-W., KYINS, S., WANG, X. et SHI, Y. 2000. «Structural and biochemical basis of apoptotic activation by smac/diablo». *Nature* 406: 855-62.
- CHEN, P., TIAN, J., KOVESDI, I., et BRUDER, J.T. 1998. «Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis». *J Biol Chem* 273(10): 5815-20.
- CHEN, Z., LI, K. et PLAGEMANN, P.G. 2000. «Neuropathogenicity and sensitivity to antibody neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus are determined by polygalactosaminoglycan chains on the primary envelope glycoprotein». *Virology* 266(1): 88-98.
- CHIRNSIDE, E.D., de VRIES, A.A., MUMFORD, J.A. et ROTTIER, P.J. 1995. «Equine arteritis virus-neutralizing antibody in the horse is induced by a determinant on the large envelope glycoprotein GL». *J Gen Virol* 76(8): 1989-98.
- CHRISTIANSON, W.T., CHOI, C.S., COLLINS, J.E., MOLITOR, T.W., MORRISON, R.B. et JOO, H.S. 1993. «Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses». *Can J Vet Res* 57(4): 262-8.
- COHEN, G.M. (1997). «Caspases: the executioners of apoptosis». *Biochem J* 326(1): 1-16.
- COLLINS, J.E., D.A. BENFIELD, W.T. CHRISTIANSON, L. HARRIS, J.C. HENNING, D.P. SHAW, S.M. GOYAL, S. CULLOUGH, R.B. MORRISON, H.S. JOO, D. GORCYCA et D. CHLADEK. 1992. «Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs». *J Vet Diagn Invest* 4: 17-126.
- CONZELMANN, K.K., VISSER, N., VAN WOENSEL, P. et THIEL, H.J. 1993. «Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group». *Virology* 193(1): 329-39.
- CORTI, O., SABATE, O., HORELLOU, P., COLIN, P., DUMAS, S., BUCHET, D., BUC-CARON, M. H. et MALLET, J. 1999. «A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine

- hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors». *Nat Biotechnol* 17(4): 349-54.
- COTE, J., GARNIER, A., MASSIE, B. et KAMEN, A. 1998. «Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells». *Biotechnol Bioeng* 59(5): 567-75.
- CUNNION, K.M. 1999. «Tumor necrosis factor receptors encoded by poxviruses». *Mol Genet Metabol* 67: 278-82.
- CZERKINSKY, C., ANJUERE, F., MCGHEE, J.R., GEORGE-CHANDY, A., HOLMGREN, J., KIENY, M.P., FUJIYASHI, K., MESTECKY, J.F., PIERREFITE-CARLE, V., RASK, C. et SUN, J.B. 1999. «Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development». *Immunol Rev* 170 : 197-222.
- DARJI, A., ZUR LAGE, S., GARBE, A.I., CHAKRABORTY, T. et WEISS, S. 2000. «Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier». *FEMS Immunol Med Microbiol* 27(4): 341-9.
- DEA, S., BILODEAU, R., ATHANASEOUS, R., SAUVAGEAU, R.A. et MARTINEAU, G.P. 1992. «Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus». *Can Vet J* 33 : 801-08.
- DEA, S., GAGNON, C.A., MARDASSI, H., PIRZADEH, B. et ROGAN, D. 2000. «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(4): 659-88.
- DEA, S., WILSON, L., THERRIEN, D. et CORNAGLIA, E. 2000. «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(1-2): 109-22.
- DECKER, T., SCHNELLER, F., KRONSCHNABL, M., DECHOW, T., LIPFORD, G.B., WAGNER, H. et PESCHEL, C. 2000. «Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype». *Exp Hematol* 28(5): 558-68.
- DELPUTTE, P.L., VANDERHEIJDEN, N., NAUWYNCK, H.J. et PENSAERT, M.B. 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(9): 4312-20.
- DEVERAUX, Q.L. et REED, J.C. 1999. «Iap family proteins-suppressors of apoptosis». *Genes Dev.* 13: 239-52.
- DEVERGNE, O., HATZIVASSILIOU, E., IZUMI, K.M., KAYE, K.M., KLEIJNEN, M.F., KIEFF, E. et MOSIALOS, G. 1996. «Association of *trafl*, *tra2*, and *traB* with an epstein-bar virus *lmp1* domain important for b-lymphocyte transformation: role in nf-kappa b activation». *Mol Cell Biol* 16: 7098-108.
- de VRIES, A.A., CHIRNSIDE, E.D., HORZINEK, M.C. et ROTTIER, P.J. 1992. «Structural proteins of equine arteritis virus». *J Virol* 66(11): 6294-303.
- de VRIES, A.A., POST, S.M., RAAMSMAN, M.J., HORZINEK, M.C. et ROTTIER, P.J. 1995. «The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers». *J Virol* 69(8): 4668-74.
- DIMITROV, T., KRAJCSI, P., HERMISTON, T.W., TOLLEFSON, A.E., HANNINK, M. et WOLD, W.S. 1997. «Adenovirus e3-10.4k/14.5k protein complex inhibits tumor necrosis factor-induced translocation of cytosolic phospholipase a2 to membranes». *J Virol* 71: 2830-37.

- DUAN, X., NAUWYNCK, H.J., FAVOREEL, H. et PENSAERT, M.B. 1998a. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of alveolar macrophages can be blocked by monoclonal antibodies against cell surface antigens». *Adv Exp Med Biol* 440 : 81-8.
- DUAN, X., NAUWYNCK, H.J., FAVOREEL, H.W. et PENSAERT, M.B. 1998b. «Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages». *J Virol* 72(5): 4520-3.
- DUROCHER, Y., PERRET, S. et KAMEN, A. 2002. «High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBDNA1 cells». *Nucleic Acids Res* 30(2): E9.
- EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M. et KAUFMANN, S.H. 1999. «Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis». *Annu. Rev. Biochem.* 68: 383-24.
- ELAHI, S.M., OUALIKENE, W., NAGHDI, L., O'CONNOR-MCCOURT, M. et MASSIE, B. 2002. «Adenovirus-based libraries: efficient generation of recombinant adenoviruses by positive selection with the adenovirus protease». *Gene Ther* 9(18): 1238-46.
- ELOIT, M., GILARDI-HEBENSTREIT, P., TOMA, B. et PERRICAUDET, M. 1990. «Construction of a defective adenovirus vector expressing the pseudorabies virus glycoprotein gp50 and its use as a live vaccine». *J Gen Virol* 71(10): 2425-31.
- ELSING, A. et BURGERT, H.G. 1998. «The adenovirus E3/10.4K-14.5K proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization». *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17): 10072-7.
- EVERETT, H., BARRY, M., LEE, S.F., SUN, X., GRAHAM, K., STONE, J., BLEACKLEY, R.C. et McFADDEN, G. 2000. «M11l: a novel mitochondria-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leukocytes». *J Exp Med* 196: 1127-39.
- EVERETT, H., BARRY, M., SUN, X., LEE, S.F., FRANTZ, C., BERTHIAUME, L.G., McFADDEN, G. et BLEACKLEY, R.C. 2002. «The myxoma poxvirus protein, m11l, prevent apoptosis by direct interaction with the mitochondria permeability transition pore». *J Exp Med* 191: 1487-98.
- FAABERG, K.S., EVEN, C., PALMER, G.A. et PLAGEMANN, P.G. 1995. «Disulfide bonds between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for viral infectivity». *J Virol* 69(1): 613-7.
- FANIDI, A., HANCOCK, D.C. et LITTLEWOOD, T.D. 1998. «Suppression of c-myc-induced apoptosis by the epstein-barr virus gene product bhrl1». *J Virol* 72: 8392-95.
- FERNANDEZ, A., SUAREZ, P., CASTRO, J.M., TABARES, E. et DIAZ-GUERRA, M. 2002. «Characterization of regions in the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus required to induce apoptotic cell death». *Virus Res* 83(1-2): 103-18.
- FERRI, F.K. et KROEMER, G. 2003. «Organelle-specific initiation of cell death pathway». *Nature Cell Biol* 3: E255-63.
- FISHER, K.J., CHOI, H., BURDA, J., CHEN, S.J. et WILSON, J.M. 1996. «Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis». *Virology* 217(1): 11-22.

- FRANCOIS, A., ETERRADOSSI, N., DELMAS, B., PAYET, V. et LANGLOIS, P. 2001. «Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmids». *J Virol* 75(11): 5288-301.
- FRIEDMAN, J.M. et HORWITZ, M.S. 2002. «Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation by the adenovirus E3-10.4/14.5K complex». *J Virol* 76(11): 5515-21.
- FRISCH, S.M. et MYMRYK, J.S. 2002. «Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm». *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(6): 441-52.
- GAGNON, C.A. 2001. Propriétés moléculaires et variabilités antigéniques et génomiques des protéines structurales du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP). Laval, Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier. Thèse de Doctorat.
- GAGNON, C.A., LANGEIER, Y., MASSIE, B. et DEA, S. 2001. «Biochemical properties and processing of the three major structural proteins of PRRS virus expressed by recombinant adenoviruses. Structural, functional and community aspects». *Adv Exp Med Biol* 494: 225-31.
- GAGNON, C.A., LACHAPELLE, G., LANGEIER, Y., MASSIE, B. et DEA, S. 2003. «Adenoviral-expressed GP5 is distinct from the authentic protein that is included in the porcine reproductive and respiratory syndrome virions». *Arch Virol Sous presse*
- GERMAIN, M., MATHAI, J.P. et SHORE, G.C. 2002. «BH-3-only BIK functions at the endoplasmic reticulum to stimulate cytochrome c release from mitochondria». *J Biol Chem* 277(20): 18053-60.
- GOLDMACHER, V.S., BARTLE, L.M., SKALETSKAYA, A., DIONNE, C.A., KEDERSHA, N.L., VATER, C.A., HAN, J.W., LUTZ, R.J., WATANABE, S., CAHIR McFARLAND, E.D., KIEFF, E.D., MOCARSKI, E.S. et CHITTENDEN, T. 1999. «A cytomegalovirus-encoded mitochondrial inhibitor of apoptosis structurally unrelated to bcl-2». *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12536-41.
- GONIN, P., OUALIKENE, W., FOURNIER, A. et ELOIT, M. 1996. «Comparison of the efficacy of replication-defective adenovirus and Nyvac poxvirus as vaccine vectors in mice». *Vaccine* 14(11): 1083-7.
- GONIN, P., PIRZADEH, B., GAGNON, C.A. et 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(1): 20-6.
- GOSSEN, M., BONIN, A.L. et BUJARD, H. 1993. «Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements». *Trends Biochem Sci* 18(12): 471-5.
- GOYAL, S.M. 1993. «Porcine reproductive and respiratory syndrome». *J Vet Diagn Invest* 5(4): 656-64.
- GRAHAM, F.L. et PREVEC, L. 1992. «Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines». *Biotechnology* 20: 363-90.
- GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C. et NAIRN, R. 1977. «Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5». *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- GRANVILLE, D.J., CARTHY, C.M., YANG, D., HUNT, D.W. et McMANUS, B.M. 1998. «Interaction of viral proteins with host cell death machinery». *Cell Death Diff* 5: 653-59.
- GRAY, C.W., WARD, R.V., KARRAN, E., TURCONI, S., ROWLES, A., VIGLIENGI, D., SOUTHAN, C., BARTON, A., FANTOM, K.G., WEST, A. et al. 2000. «Characterization of human htra2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response». *Eur J Biochem* 267: 5699-710.

- GURUNATHAN, S., SACKS, D.L., BROWN, D.R., REINER, S.L., CHAREST, H., GLAICHENHAUS, N. et SEDER, R.A. 1997. «Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*». *J Exp Med* 186(7): 1137-47.
- HALBUR, P.G., PAUL, P.S., FREY, M.L., LANDGRAF, J., EERNISSE, K., MENG, X.J., LUM, M.A., ANDREWS, J.J. et RATHJE, J.A. 1995. «Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus». *Vet Pathol* 32(6): 648-60.
- HARBOUR, J.W. et DEAN, D.C. 2000. «Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis». *Nat Cell Biol* 2(4): E65-7.
- HAY, S. et KANNOURAKIS, G. 2002. «A time to kill: viral manipulation of the cell death program». *J Gen Virol* 83(7): 1547-64.
- HENGARTNER, M.O. 2000. «The biochemistry of apoptosis». *Nature* 407(6805): 770-6.
- HOFMANN, K. 1999. «The modular nature of apoptotic signaling proteins». *Cell Mol Life Sci* 55(8-9): 1113-28.
- HORWITZ, M.S. 1996. «Adenoviruses». In *Fields Virology*, 3rd edn. FIELDS, B.N., KNIPE, D.M. et HAWLEY, P.M. et al. éditeurs. Philadelphia, Lippincott-Raven. 2149-71.
- HICKISH, T., ROBERTSON, K., CLARKE, P., HILL, M., di STEFANO, F., CLARKE, C. et CUNNINGHAM, D. 1994. «Ultrastructural localization of bhrf1: an epstein-barr virus gene product which has homology with bcl-2». *Cancer Res* 54: 2808-11.
- HUANG, D.C. et STRASSER, A. 2000. «Bh3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death». *Cell* 103: 839-42.
- HUANG, H.-K., JOAZEIRO, C.A.P., BONFOCO, E., KAMADA, S., LEVERSON, J.D. et HUNTER, T. 2000. «The inhibitor of apoptosis, ciap2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7». *J Biol Chem* 275: 26661-64.
- JACOTO, E., FERRI, K.F., EL HAMEL, C., DRUILLENNEC, S., HOEBEKE, J., RUSTIN, P., METIVIER, D., LENOIR, C., GEUSKENS, M., VIEIRA, H.L., LOEFFLER, M., BELZACQ, A.S., BRIAND, J.P., ZAMZAMI, N., EDELMAN, L., XIE, Z.H., REED, J.C., ROQUES, B.P. et KROEMER, G. 2001. «Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with hiv-1 vpr and bcl-2». *J Exp Med* 193: 509-20.
- JANI, A., LOCHMULLER, H., ACSADI, G., SIMONEAU, M., HUARD, J., GARNIER, A., KARPATI, G. et MASSIE, B. 1997. «Generation, validation, and large scale production of adenoviral recombinants with large size inserts such as a 6.3 kb human dystrophin Cdna». *J Virol Methods* 64: 111-124.
- JONES, D.H., CORRIS, S., MCDONALD, S., CLEGG, J.C. et FARRAR, G.H. 1997. «Poly(DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration». *Vaccine* 15(8): 814-7.
- JUSA, E.R., INABA, Y., KOUNO, M. et HIROSE, O. 1997. «Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Am J Vet Res* 58(5): 488-91.
- KAMADA, S., FUNAHASI, Y. et TSUJIMOTO, Y. 1997. «Caspase-4 and caspase-5, members of the ice/ced-3 family of cysteine proteases, are crma-inhibitable proteases». *Cell Death Diff* 4: 473-78.

- KARI, B. et GEHRZ, R. 1992. «A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope». *J Virol* 66(3): 1761-4.
- KEFFABER, K.K. 1989. «Reproductive failure of unknown etiology». *A.A.S.P. Newsletter* 1: 1-10.
- KERR, J.F., WINTERFORD, C.M. et HARMON, B.V. 1994. «Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy». *Cancer* 73(8): 2013-26.
- KIM, T.S., BENFIELD, D.A. et ROWLAND, R.R. 2002. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis». *Virus Res* 85(2): 133-40.
- KIM, H.S., KWANG, J., YOON, I.J., JOO, H.S. et FREY, M.L. 1993. «Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line». *Arch Virol* 133(3-4): 477-83.
- KRAJEWSKI, S., TANAKA, S., TAKAYAMA, S., SCHIBLER, M.J., FENTON, W. et REED, J. C. 1993. «Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes». *Cancer Res* 53(19): 4701-14.
- KLAUSNER, R.D., DONALDSON, J.G. et LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. 1992. «Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure». *J Cell Biol* 116(5): 1071-80.
- KLONJKOWSKI, B., GILARDI-HEBENSTREIT, P., HADCHOUEL, J., RANDRIANARISON, V., BOUTIN, S., YEH, P., PERRICAUDET, M. et KREMER, E.J. 1997. «A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo». *Hum Gene Ther* 8(17): 2103-15.
- KOCHANEK, S., CLEMENS, P.R., MITANI, K., CHEN, H.H., CHAN, S. et CASKEY, C.T. 1996. «A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase». *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 5731-6.
- KOZAK, M. 1987. «At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells». *J Mol Biol* 196(4): 947-50.
- KREUTZ, L.C. 1998. «Cellular membrane factors are the major determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus tropism». *Virus Res* 53(2): 121-8.
- KRIEG, A.M. 2000. «Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs». *Vaccine* 19(6): 618-22.
- KUROKAWA, M., KOYAMA, A.H., YASUOKA, S. et ADACHI, A. 1999. «Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication». *Int J Mol Med* 3: 527-30.
- KUWANA, T., MACKEY, M.R., PERKINS, G., ELLISMAN, M.H., LATTERICH, M., SCHNEITER, R., GREEN, D.R. et NEWMEYER, D.D. 2002. «Bid, bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane». *Cell* 111: 331-42.
- LANGEIER, Y., BERGERON, S., CHABAUD S., LIPPENS, J., GUILBAULT, C., SASSEVILLE, A.M., DENIS, S., MOSSER, D.D. et MASSIE, B. 2002. «The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation». *J Gen Virol* 83(11): 2779-89.

- LEMIEUX, P., GUERIN, N., PARADIS, G., PROULX, R., CHISTYAKOVA, L., KABANOV, A. et ALAKHOV, V. 2000. «A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle». *Gene Ther* 7(11): 986-91.
- LI, H., ZHU, H., XU, C.J. et YUAN, J. 1998. «Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis». *Cell* 94(4): 491-501.
- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHARDJO, I., SRINIVASULA, S. M., AHMAD, M., ALNEMRI, E. S. et WANG, X. 1997. «Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade». *Cell* 91(4): 479-89.
- LOEMBA, H.D., MOUNIR, S., MARDASSI, H., ARCHAMBAULT, D. et DEA, S. 1996. «Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Arch Virol* 141(3-4): 751-61.
- MACEN, J.L., GRAHAM, K.A., LEE, S.F., SCHREIBER, M., BOSHKOV, L.K. et McFADDEN, G. 1996. «Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and m111 genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit t lymphocytes». *Virology* 218: 232-37.
- MANIATIS, T., SAMBROOK, J. et FRITSCH, E.F. 1989 *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Boston, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MARDASSI, H., MOUNIR, S. et DEA, S. 1995. «Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain». *Arch Virol* 140(8): 1405-18.
- MARDASSI, H., MASSIE, B. et 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(1): 98-112.
- MARDASSI, H., ATHANASSIOUS, R., MOUNIR, S. et 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(1): 55-64.
- MARSHALL, W.L., YIM, C., GUSTAFSON, E., GRAF, T., SAGE, D.R., HANIFY, K., WILLIAMS, L., FINGEROTH, J. et FINBERG, R.W. 1999. «Epstein-barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with bax and bak». *J Virol* 73: 5181-85.
- MARTINUO, J.C. et GREEN, D.R. 2001. «Breaking the mitochondrial barrier». *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 63-7.
- MARZO, I., BRENNER, C., ZAMZAMI, N., JURGENSMEIER, J.M., SUSIN, S.A., VIEIRA, H.L., PREVOST, M.C., XIE, Z., MATSUYAMA, S., REED, J.C. et KROEMER, G. 1998. «Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis». *Science* 281: 2027-31.
- MASSIE, B. 1998a. BMAdEI, a new complementing cell line for the large scale production of E1-deleted Adenovirus (Ad) vectors devoid of RCA (replication competent Ad). patent 5,891,6690, U.S.
- MASSIE, B., MOSSER, D. D., KOUTROMATIS, M., VITTE-MONY, I., LAMOUREUX, L., COUTURE, F., PAQUET, L., GUILBAULT, C., DIONNE, J., CHABLA, D., JOLICOEUR, P. et LANGEIER, Y. 1998c. «New adenovirus vectors for protein production and gene transfer». *Cytotechnology* 28: 53-64.

- MASSIE, B., COUTURE, F., LAMOUREUX, L., MOSSER, D.D., GUILBAULT, C., JOLICOEUR, P., BELANGER, F. et LANGELIER, Y. 1998. «Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette». *J Virol* 72(3): 2289-96.
- MATTHEWS, D.A., CUMMINGS, D., EVELEGH, C., GRAHAM, F.L. et PREVEC, L. 1999. «Development and use of a 293 cell line expressing lac repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein». *J Gen Virol* 80(2) : 345-53.
- MAYR, G.A., CHINSANGARAM, J. et GRUBMAN, M.J. 1999. «Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate». *Virology* 263(2): 496-506.
- MAYR, G.A., O'DONNELL, V., CHINSANGARAM, J., MASON, P.W. et GRUBMAN, M.J. 2001. «Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs». *Vaccine* 19(15-16): 2152-62.
- MENG, X.J. 2000. «Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development». *Vet Microbiol* 74(4): 309-29.
- MENG, X.J., PAUL, P.S., HALBUR, P.G. et MOROZOV, I. 1995. «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(12) : 3181-8.
- MERCILLE, S., JOLICOEUR, P., GERVAIS, C., PAQUETTE, D., MOSSER, D.D. et MASSIE, B. 1999. «Dose-dependent reduction of apoptosis in nutrient-limited cultures of NS/0 myeloma cells transfected with the E1B-19K adenoviral gene». *Biotechnol Bioeng* 5(5): 516-28.
- METTENLEITER, T.C., ZSAK, L., ZUCKERMANN, F., SUGG, N., KERN, H. et BEN-PORAT, T. 1990. «Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus». *J Virol* 64(1): 278-86.
- MEULENBERG, J.J., BOS-de RUIJTER, J.N., van de GRAAF, R., WENSVOORT, G. et MOORMANN, R.J. 1998. «Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Virol* 72(1): 380-7.
- MEULENBERG, J.J., HULST, M.M., de MEIJER, E.J., MOONEN, P.L., den BESTEN, A., de KLUYVER, E.P., WENSVOORT, G. et MOORMANN, R.J. 1993. «Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV». *Virology* 192(1): 62-72.
- MEULENBERG, J.J. 2000. «PRRSV, the virus». *Vet Res* 31(1): 11-21.
- MEULENBERG, J.J., PETERSEN-DEN BESTEN, A., DE KLUYVER, E.P., MOORMANN, R.J., SCHAAPE, W.M. et WENSVOORT, G. 1995. «Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus». *Virology* 206(1): 155-63.
- MEULENBERG, J.J., PETERSEN DEN BESTEN, A., DE KLUYVER, E., VAN NIEUWSTADT, A., WENSVOORT, G. et MOORMANN, R.J. 1997. «Molecular characterization of Lelystad virus». *Vet Microbiol* 55(1-4): 197-202.
- MEULENBERG, J.J., HULST, M.M., DE MEIJER, E.J., MOONEN, P.L., DEN BESTEN, A., DE KLUYVER, E.P., WENSVOORT, G. et MOORMANN, R.J. 1994. «Lelystad virus belongs to a new virus family, comprising lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus». *Arch Virol Suppl* 9 : 441-8.

- MILLER, L.K. 1997. «Baculovirus interaction with host apoptotic pathways». *J Cell Physiol* 173: 178-82.
- MINN, A.J., VELEZ, P., SCHENDEL, S.L., LIANG, H., MUCHMORE, S.W., FESIK, S.W., FILL, M., et THOMPSON, C.B. 1997. «Bcl-x(I) forms an ion channel in synthetic lipid membranes». *Nature* 385: 353-57.
- MITTAL, S.K., PAPP, Z., TIKOO, S.K., BACA-ESTRADA, M.E., YOO, D., BENKO, M. et BABIUK, L.A. 1996. «Induction of systemic and mucosal immune responses in cotton rats immunized with human adenovirus type 5 recombinants expressing the full and truncated forms of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein Gd». *Virology* 222(2): 299-309
- MITTAL, S.K., PREVEC, L., GRAHAM, F.L. et BABIUK, L.A. 1995. «Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector». *J Gen Virol* 76(1) : 93-102.
- MONTEIL, M., LE POTTIER, M.F., RISTOV, A.A., CARIOLET, R., L'HOSPITALIER, R., KLONJKOWSKI, B. et ELOIT, M. 2000. «Single inoculation of replication-defective adenovirus-vectorized vaccines at birth in piglets with maternal antibodies induces high level of antibodies and protection against pseudorabies». *Vaccine* 18(17): 1738-42.
- MORROW, C.D., NOVAK, M.J., ANSARDI, D.C., PORTER, D.C. et MOLDOVEANU, Z. 1999. «Recombinant viruses as vectors for mucosal immunity». *Curr Top Microbiol Immunol* 236 : 255-73.
- MOSIALOS, G., BIRKENBACH, M., YALAMANCHILI, R., VanARSDALE, T., WARE, C. et KIEFF, E. 1995. «The epstein-barr virus transforming protein Lmp1 engages signalling proteins for the tumor necrosis factor receptor family». *Cell* 80: 389-99.
- MOSSER, D.D., CARON, A.W., BOURGET, L., DENIS-LAROSE, C. et MASSIE, B. 1997. «Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis». *Mol Cell Biol* 17(9): 5317-27.
- MOSSER, D.D., CARON, A.W., BOURGET, L., MERIN, A.B., SHERMAN, M.Y., MORIMOTO, R.I. et MASSIE, B. 2000. «The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis». *Mol Cell Biol* 20(19): 7146-59.
- MULLICK, A. et MASSIE, B. 2001. A cimate-inducible system for regulated expression in mammalian cells. (provisional patent application filed 04/01)
- MURTAUGH, M.P., ELAM, M.R. et KAKACH, L.T. 1995. «Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus». *Arch Virol* 140(8): 1451-60.
- MUZIO, M., STOCKWELL, B.R., STENNICKE, H.R., SALVESEN, G.S. et DIXIT, V.M. 1998. «An induced proximity model for caspase-8 activation». *J Biol Chem* 273(5): 2926-30.
- NAGATA, S. 1997. «Apoptosis by death factor». *Cell* 88(3): 355-65.
- NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B.A. et YUAN, J. 2000. «Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta». *Nature* 403(6765): 98-103.
- NARITA, M., SHIMIZU, S., ITO, T., CHITTENDEN, T., LUTZ, R.J., MATSUDA, H. et TSUJIMOTO, Y. 1998. «Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria». *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14681-86.

- NAUWYNCK, H.J., DUAN, X., FAVOREEL, H.W., VAN OOSTVELDT, P. et PENSAERT, M.B. 1999. «Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis». *J Gen Virol* 80(2) : 297-305.
- NELSEN, C.J., MURTAUGH, M.P. et FAABERG, K.S. 1999. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents». *J Virol* 73(1): 270-80.
- NELSON, E.A., CHRISTOPHER-HENNINGS, J. et BENFIELD, D.A. 1994. «Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus». *J Vet Diagn Invest* 6(4): 410-5.
- NELSON, E.A., CHRISTOPHER-HENNINGS, J., DREW, T., WENSVOORT, G., COLLINS, J.E. et BENFIELD, D.A. 1993. «Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies». *J Clin Microbiol* 31(12): 3184-9.
- NEYTS, J., SNOECK, R., SCHOLS, D., BALZARINI, J., ESKO, J.D., VAN SCHEPDAEL, A. et DE CLERCQ, E. 1992. «Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate». *Virology* 189(1): 48-58.
- NICHOLSON, D.W. et THORNBERRY, N.A. 1997. «Caspases: killer proteases». *Trends Biochem Sci* 22(8): 299-306.
- NOGAL, M.L., GONZALEZ de BUITRAGO, G., RODRIGUEZ, C., CUBELOS, B., CARRASCOSA, A.L., SALAS, M.L. et REVILLA, Y. 2001. «African swine fever virus iap homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells». *J Virol* 75: 2535-43.
- OLEKSIEWICZ, M.B., BOTNER, A. et NORMANN, P. 2001. «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(2): 109-25.
- OUALIKENE, W., LAMOUREUX, L., WEBER, J.M. et MASSIE, B. 2000. «Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy». *Hum Gene Ther* 11(9): 1341-53.
- OUALIKENE, W. et MASSIE, B. 2000. «Adenoviral vectors in functional genomics». *Cell Engineering*. Volume 2. A. RUBEAI. Kluwer Publishers, pp. 80-154.
- PARKS, R.J., CHEN, L., ANTON, M., SANKAR, U., RUDNICKI, M.A. et GRAHAM, F.L. 1996. «A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal». *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13565-70.
- PATON, D.J., BROWN, I.H., EDWARDS, S. et WENSVOORT, G. 1991. «'Blue ear' disease of pigs». *Vet Rec* 128(26): 617-635.
- PEREZ, D. et WHITE, E. 2000. «TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K». *Mol Cell* 6(1): 53-63.
- PIRZADEH, B. et DEA, S. 1997. «Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants». *J Gen Virol* 78(8) : 1867-73.
- PIRZADEH, B. et DEA, S. 1998. «Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Gen Virol* 79(5) : 989-99.

- PIRZADEH, B., GAGNON, C.A. et DEA, S. 1998. «Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein». *Can J Vet Res* 62(3): 170-7.
- PLAGEMANN, P.G. 1996. «Lactate dehydrogenase-elevating virus and related viruses». *Fields Virology. 3rd edn.* B. N. FIELDS, KNIPE, D. M. ET HOWLEY, P. M. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- PLAGEMANN, P.G. et MOENNIG, V. 1992. «Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses». *Adv Virus Res* 41: 99-192.
- PLANA DURAN, J., CLIMENT, I., SARRASECA, J., URNIZA, A., CORTES, E., VELA, C. et CASAL, J.I. 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(1): 19-29.
- POL, J.M., WAGENAAR, F. et REUS, J.E. 1997. «Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains». *Vet Microbiol* 55(1-4): 203-8.
- POL, J.M., VAN DIJK, J.E., WENSVOORT, G. et TERPSTRA, C. 1991. «Pathological, ultrastructure and immunohistochemical changes causes by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome [PEARS])». *Vet. Q.* 13 : 137-43.
- PORTER, K.R., KOCHEL, T.J., WU, S.J., RAVIPRAKASH, K., PHILLIPS, I. et HAYES, C.G. 1998. «Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses». *Arch Virol* 143(5): 997-1003.
- RAHMANI, Z., HUH, K.W., LASHER, R. et SIDDIQUI, A. 2000. «Hepatitis b virus x protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, hvdac3 and alters its transmembrane potential». *J Virol* 74: 2840-46.
- RANDRIANARISON-JEWTOUKOFF, V. et PERRICAUDET, M. 1995. «Recombinant adenoviruses as vaccines». *Biologicals* 23(2): 145-57.
- RAO, L., MODHA, K. et WHITE, E. 1997. «The e1b 19k protein associates with lamins in vivo and its proper localization is required for inhibition of apoptosis». *Oncogene* 15: 1587-97.
- REDDY, P.S., IDAMAKANTI, N., BABIUK, L.A., MEHTALI, M. et TIKOO, S.K. 1999a. «Porcine adenovirus-3 as a helper-dependent expression vector». *J Gen Virol* 80(11) : 2909-16.
- REDDY, P.S., IDAMAKANTI, N., CHEN, Y., WHALE, T., BABIUK, L.A., MEHTALI, M. et TIKOO, S.K. 1999b. «Replication-defective bovine adenovirus type 3 as an expression vector». *J Virol* 73(11): 9137-44.
- REED, J.C. 1997. «Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies». *Semin Hematol* 34(4 Suppl 5): 9-19.
- RESTIFO, N.P. 2000. «Building better vaccines: how apoptotic cell death can induces inflammation and activate innate and adaptative immunity». *Curr Opin Immunol* 12: 597-03.
- RICH, T., ALLEN, R.L. et WYLLIE, A.H. 2000. «Defying death after DNA damage». *Nature* 407(6805): 777-83.

- ROLPH, M.S. et RAMSHAW, I.A. 1997. «Recombinant viruses as vaccines and immunological tools». *Curr Opin Immunol* 9(4): 517-24.
- ROSSOW, K.D., LAUBE, K.L., GOYAL, S.M. et COLLINS, J.E. 1996. «Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion». *Vet Pathol* 33(1): 95-9.
- ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROTT, R.H. et WARD, T.G. 1953. «Isolation of a cytopathic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture». *Proc Soc Exp Biol Med* 84 : 570-3.
- ROWLAND, R.R., KERVIN, R., KUCKLEBURG, C., SPERLICH, A. et BENFIELD, D.A. 1999. «The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence». *Virus Res* 64(1): 1-12.
- SATTLER, M., LIANG, H., NETTESHEIM, D., MEADOWS, R.P., HARLAN, J.E., EBERSTADT, M., YOON, H.S., SHUKER, S.B., CHANG, S.B., CHANG, B.S., MINN, A.J. et al. 1997. «Structure of bcl-xl-bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis». *Science* 275: 983-86.
- SCHENDEL, S.L., XIE, Z., MONTAL, M.O., MATSUYAMA, S., MONTAL, M. et REED, J.C. 1997. «Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2». *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5113-18.
- SCHUSTER, R., GERLICH, W.H. et SCHAEFER, S. 2000. «Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis b virus x gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblast». *Oncogene* 19: 1173-80.
- SCUDDER, P., HANFLAND, P., UEMURA, K. et FEIZI, T. 1984. «Endo-beta-D-galactosidases of Bacteroides fragilis and Escherichia freundii hydrolyze linear but not branched oligosaccharide domains of glycolipids of the neolacto series». *J Biol Chem* 259(10): 6586-92.
- SHENK, T. 1996. «Adenoviridae: The virus and Their replication». *Fields Virology, 3rd edn.* B. N. FIELDS, KNIPE, D. M. ET HOWLEY, P. M. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- SHEPPARD, M., WERNER, W., TSATAS, E., MCCOY, R., PROWSE, S. et JOHNSON, M. 1998. «Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease». *Arch Virol* 143(5): 915-30.
- SHI, Y. 2001. «A structural view of mitochondria-mediated apoptosis». *Nat Struct Biol* 8: 394-01.
- SHIMIZU, S., IDE, T., YANAGIDA, T. et TSUJIMOTI, Y. 2000. «Electrophysiological study of a novel large pore formed by bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c». *J Biol Chem* 275: 12321-325.
- SHISLER, J., YANG, C., WALTER, B., WARE, C.F. et GOODING, L.R. 1997. «The adenovirus e3-10.4k/14.5k complex mediates loss of cell surface fas (cd95) and resistance to fas-induced apoptosis». *J Virol* 71: 8299-306.
- SIRINARUMITR, T., ZHANG, Y., KLUGE, J.P., HALBUR, P.G. et PAUL, P.S. 1998. «A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo». *J Gen Virol* 79 (12) : 2989-95.
- SMERDOU, C., TORRES, J.M., SANCHEZ, C.M., SUNE, C., ANTON, I.M., MEDINA, M., CASTILLA, J., GRAHAM, F.L. et ENJUANES, L. 1993. «Induction of an immune response to transmissible gastroenteritis coronavirus using vectors with enteric tropism». *Adv Exp Med Biol* 342 : 455-62.

- SNIJDER, E.J. et MEULENBERG, J.J. 1998. «The molecular biology of arteriviruses». *J Gen Virol* 79 (5) : 961-79.
- SRINIVASULA, S.M., DATTA, P., FAN, X.J., FERNANDES-ALNMERI, T., HUANG, Z. et ALNMERI, E.S. 2000. «Molecular determinants of the caspase-promoting activity of smac/diablo and its role in the death receptor pathway». *J Biol Chem* 275: 36152-7.
- SUAREZ, P., DIAZ-GUERRA, M., PRIETO, C., ESTEBAN, M., CASTRO, J.M., NIETO, A. et ORTIN, J. 1996. «Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis». *J Virol* 70(5): 2876-82.
- SUR, J.H., DOSTER, A.R. et OSORIO, F.A. 1998. «Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Vet Pathol* 35(6): 506-14.
- SUR, J.H., DOSTER, A.R., CHRISTIAN, J.S., GALEOTA, J.A., WILLS, R.W., ZIMMERMAN, J.J. et OSORIO, F.A. 1997. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis». *J Virol* 71(12): 9170-9.
- THERRIEN, D., ST-PIERRE, Y. et DEA, S. 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(6): 1099-116.
- TEODORO, J.G. et BRANTON, P.E. 1997. «Regulation of apoptosis by viral gene products». *J Virol* 71: 1739-46.
- TOLLEFSON, A.E., STEWART, A.R., YEI, S.P., SAHA, S.K. et WOLD, W. S. 1991. «The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus form a complex and function together to down-regulate the epidermal growth factor receptor». *J Virol* 65(6): 3095-105.
- TORRES, J.M., ALONSO, C., ORTEGA, A., MITTAL, S., GRAHAM, F. et ENJUANES, L. 1996. «Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus». *J Virol* 70(6): 3770-80.
- TORRES, J.M., SANCHEZ, C., SUNE, C., SMERDOU, C., PREVEC, L., GRAHAM, F. et ENJUANES, L. 1995. «Induction of antibodies protecting against transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) by recombinant adenovirus expressing TGEV spike protein». *Virology* 213(2): 503-16.
- TUBOLY, T., NAGY, E. et DERBYSHIRE, J.B. 1993. «Potential viral vectors for the stimulation of mucosal antibody responses against enteric viral antigens in pigs». *Res Vet Sci* 54(3): 345-50.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., GERDTS, V., LOEHR, B.I., PONTAROLLO, R., RANKIN, R., UWIERA, R. et BABIUKE, L.A. 2000. «Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals». *Adv Drug Deliv Rev* 43(1): 13-28.
- VAN NIEUWSTADT, A.P., MEULENBERG, J.J., VAN ESSEN-ZANBERGEN, A., PETERSEN-DEN BESTEN, A., BENDE, R.J., MOORMANN, R.J. et 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(7): 4767-72.
- VARGA, M.J., WEIBULL, C. et EVERITT, E. 1991. «Infectious entry pathway of adenovirus type 2». *J Virol* 65(11): 6061-70.
- VIEIRA, J.L.A., BELZACQ, A.S., HAOUZI, D., BERNASSOLA, F., COHEN, I., JACOTO, E., FERRI, K.F., EL HAMEL, C., BARTLE, L.M., MELINO, G., BRENNER, C., GOLDMACHER, V.

- et KROEMER, G. 2001. «The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite and 4-hydroxynonenal». *Oncogene* **in press**.
- VOICU, I.L., SILIM, A., MORIN, M. et ELAZHARY, M.A. 1994. «Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes». *Vet Rec* **134**(16): 422-3.
- WALKER, N.P., TALANIAN, R.V., BRADY, K.D., DANG, L.C., BUMP, N.J., FERENZ, C.R., FRANKLIN, S., GHAYUR, T., HACKETT, M.C., HAMMILL, L.D. et al. 1994. «Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer». *Cell* **78**: 343-52.
- WEBER, J.M. 1995. «Adenovirus endopeptidase and its role in virus infection». *Curr Top Microbiol Immunol* **199**(1) : 227-35.
- WEILAND, E., WIECZOREK-KROHMER, M., KOHL, D., CONZELMANN, K.K. et 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**(3): 171-86.
- WEILAND, E., BOLZ, S., WEILAND, F., HERBST, W., RAAMSMAN, M.J., ROTTIER, P.J. et DE VRIES, A.A. 2000. «Monoclonal antibodies directed against conserved epitopes on the nucleocapsid protein and the major envelope glycoprotein of equine arteritis virus». *J Clin Microbiol* **38**(6): 2065-75.
- WENSOORT, G., TERPSTRA, C., POL, J.M., TER LAAK, E.A., BLOEMRAAD, M., DE KLUYVER, E.P., KAGTEN, C., VAN BUITEN, L., DEN BESTEN, A., WAGENAAR, F. et al. 1991. «Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus». *Vet Q* **13**(3): 121-30.
- WOLD, W. S., DORONIN, K., TOTH, K., KUPPUSWAMY, M., LICHTENSTEIN, D.L., et TOLLEFSON, A. E. 1999. «Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic». *Curr Opin Immunol* **11**(4): 380-6.
- WICKHAM, T.J., MATHIAS, P., CHERESH, D.A. et NEMEROW, G.R. 1993. «Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment». *Cell* **73**(2): 309-19.
- WU, W.H., FANG, Y., FARWELL, R., STEFFEN-BIEN, M., ROWLAND, R.R., CHRISTOPHER-HENNINGS, J. et NELSON, E.A. 2001. «A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by orf2b». *Virology* **287**(1): 183-91.
- WYLLIE, A.H., KERR, J.F. et CURRIE, A.R. 1980. «Cell death: the significance of apoptosis». *Int Rev Cytol* **68** : 251-306.
- XIANG, Z. et ERTL, H.C. 1999. «Induction of mucosal immunity with a replication-defective adenoviral recombinant». *Vaccine* **17**(15-16): 2003-8.
- XIANG, Z.Q., YANG, Y., WILSON, J.M. et ERTL, H.C. 1996. «A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier». *Virology* **219**(1): 220-7.
- XU, Z.Z., HYATT, A., BOYLE, D.B. et BOTH, G.W. 1997. «Construction of ovine adenovirus recombinants by gene insertion or deletion of related terminal region sequences». *Virology* **230**(1): 62-71.
- YANG, L., FREY, M.L., YOON, K.J., ZIMMERMAN, J.J. et PLATT, K.B. 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**(8): 1599-619.

- YOON, K.J., WU, L.L., ZIMMERMAN, J.J., HILL, H.T. et PLATT, K.B. 1996. «Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs». *Viral Immunol* 9(1): 51-63.
- ZAMZAMI, N. et KROEMER, G. 2003. «Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization - the (w)hole story?» *Curr Biol* 13: R71-3.
- ZHANG, Y., SHARMA, R.D. et PAUL, P.S. 1998. «Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Vet Microbiol* 63(2-4): 125-36.
- ZOU, H., HENZEL, W.J., LIU, X., LUTSCHG, A. et WANG, X. 1997. «Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3». *Cell* 90(3): 405-13.
- ZOU, H., LI, Y., LIU, X. et WANG, X. 1999. «An apaf-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9». *J Biol Chem* 274: 11549-56.

