

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ A

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE-IMMUNOLOGIE

PAR

MAÏMOUNA N'DIAYE

**CARACTÉRISATION D'UN VARIANT ANTIGÉNIQUE DU VIRUS INFLUENZA
PORCIN TYPE A (H1N1) ASSOCIÉ A LA PNEUMONIE PROLIFÉRATIVE ET
NÉCROSANTE**

JUIN 1995

A mes parents
Pour leur amour
Pour leur soutien.

Une partie de ce travail a été présentée.

1. **D.J.S. Arora, N'Diaye Maimouna, J. Lecomte and S.Dea. 1994.**
Monoclonal antibodies against porcine proliferative necrotizing pneumonia causing influenza variant. 13th Annual Meeting of the American Society for Virology, University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, USA, 9-13 Juillet 1994 (Abstracts p 248).

2. **Maimouna N'Diaye, Jit Arora et S.Dea. 1994.**
Différenciation de la souche d'influenza virus porcin associée à la PPN à l'aide d'anticorps monoclonaux. IX^E Conférence en pathologie animale, Sherbrooke, Québec, Canada, 4-5 Mai 1994 (Programme et résumé des communications p 14).

3. **Rekik, R., M. N'Diaye, S. Dea and D.J.S. Arora. 1993.**
Nucleotide sequence analysis of the HA gene of swine H1N1 influenza virus associated with proliferative and necrotizing pneumonia and characterization of specific monoclonal antibodies. 74th Conference for Research Workers in animal diseases, Chicago, Nov. 8-9 (Abstract P 83).

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|------|
| TABLE DES MATIERES..... | iv |
| LISTE DES FIGURES..... | viii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | x |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | xi |
| SOMMAIRE..... | xiii |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| REVUE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 6 |
| 1. Généralités sur le virus influenza..... | 7 |
| 1.1 Taxonomie..... | 7 |
| 1.2 Morphologie..... | 7 |
| 1.3 Propriétés physico-chimiques du virus influenza..... | 8 |
| 1.4 Biologie moléculaire du virus influenza..... | 11 |
| 1.5 Le cycle de répllication du virus influenza..... | 17 |
| 2. L'hémagglutinine..... | 19 |
| 2.1 Biosynthèse..... | 19 |
| 2.2 Structure de l'hémagglutinine..... | 20 |
| 2.3 Les sites de glycosylation..... | 27 |
| 2.4 Sites antigéniques..... | 30 |
| 2.5 Fonctions..... | 32 |
| 3. Mécanismes de variation antigénique..... | 37 |
| 3.1 Le glissement antigénique (Drift antigénique)..... | 37 |
| 3.2 Le mécanisme de recombinaison génétique (Shift antigénique)..... | 40 |
| 3.3 Le mécanisme de recombinaison intramoléculaire..... | 41 |
| 4. Les différents types du virus de l'influenza chez le porc..... | 41 |
| 5. Stabilité antigénique du virus influenza porcin..... | 44 |
| 6. Le rôle du porc comme hôte intermédiaire dans la transmission du virus..... | 46 |
| 7. La grippe porcine classique..... | 49 |

| | | |
|---------------------------|--|----|
| 8. | La pneumonie proliférative et nécrosante (PPN) .. | 51 |
| 8.1 | Définition clinique..... | 51 |
| 8.2 | Lésions macroscopiques..... | 53 |
| 8.3 | Les lésions histologiques..... | 53 |
| 8.4 | Caractéristiques sérologiques et génétiques du virus..... | 54 |
| 8.4.1 | Caractérisation sérologique..... | 54 |
| 8.4.2 | Caractérisation génétique..... | 55 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES..... | | 56 |
| 1. | Source du virus..... | 57 |
| 2. | Production des différentes souches virales..... | 57 |
| 3. | Purification du virus..... | 58 |
| 3.1 | Étape de concentration..... | 59 |
| 3.2 | Étape de purification..... | 59 |
| 3.3 | Test d'hémagglutination..... | 60 |
| 3.4 | Détermination de la concentration protéique..... | 61 |
| 3.5 | Analyse de la pureté des préparations virales purifiées..... | 62 |
| 4. | Production des virus en cultures cellulaires..... | 63 |
| 4.1 | Conditions de culture..... | 63 |
| 4.2 | Technique de plages..... | 64 |
| 5. | Production de sérums hyperimmuns chez les lapins..... | 66 |
| 6. | Production de sérums hyperimmuns chez des porcelets..... | 67 |
| 7. | Production de sérums hyperimmuns chez les souris..... | 67 |
| 8. | Production d'anticorps monoclonaux..... | 68 |
| 8.1 | Préparation des protéines virales pour l'immunisation..... | 68 |
| 8.2 | Immunisation des souris | 68 |
| 8.3 | Fusion cellulaire..... | 69 |
| 8.4 | Tests sérologiques utilisés pour le criblage des hybridomes sécréteurs..... | 72 |
| 8.4.1 | Test ELISA indirecte..... | 72 |
| 8.4.2 | Test d'inhibition de l'hémagglutination..... | 74 |
| 8.4.2.1 | Inactivation d'inhibiteurs non spécifiques dans les sérums..... | 74 |
| 8.4.2.2 | Description du test d'inhibition de l'hémagglutination..... | 75 |
| 8.5 | Clonage des hybridomes par la méthode des dilutions limites..... | 75 |

| | | |
|----------------|---|-----|
| 8.6 | Détermination de l'isotype des AcMo..... | 76 |
| 8.7 | Congélation et décongélation des clones cellulaires..... | 78 |
| 9. | Production des liquides d'ascite..... | 79 |
| 10. | Test de neutralisation selon la technique des plages | 80 |
| 11. | Epreuves immunohistochimiques..... | 81 |
| 11.1 | Détermination de la dose infectieuse (DITC ₅₀) par immunoperoxydase..... | 81 |
| 11.2 | Immunofluorescence indirecte (IFI)..... | 83 |
| 12. | Immunomarquage à l'or colloïdal..... | 84 |
| 13. | Epreuve d'ELISA de blocage..... | 86 |
| 14. | Amplification et analyse des gènes viraux..... | 88 |
| 14.1 | Concentration des virus..... | 88 |
| 14.2 | Extraction d'ARN viral..... | 89 |
| 14.2.1 | A partir du virus concentré..... | 89 |
| 14.2.2 | A partir des lysats de cellules infectées...90 | |
| 14.3 | Origine et choix des amorces pour la réaction RT-PCR..... | 91 |
| 14.4 | Amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne (PCR)..... | 92 |
| 14.4.1 | Réaction de la transcription inverse (RT)....92 | |
| 14.4.2 | Réaction d'amplification par polymérisation en chaîne..... | 93 |
| 14.5 | Analyse des produits d'amplification en gels d'agarose..... | 94 |
| 15. | Clonage des gènes..... | 94 |
| 15.1 | Purification des produits d'amplification.....94 | |
| 15.2 | Clonage de la portion HA1 du gène HA.....95 | |
| 15.2.1 | Clonage dans le plasmide pUC19.....95 | |
| 15.2.2 | Clonage dans le vecteur T.....96 | |
| 15.3 | Transformation des bactéries d' <i>Escherichia coli</i>96 | |
| 15.4 | Isolement des plasmides recombinants et confirmation de la présence de l'insert.....97 | |
| 16. | Séquençage..... | 99 |
| RESULTATS..... | | 101 |
| 1. | Caractéristique du profil polypeptidique des virus influenza porcins..... | 102 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 2. | Caractérisation antigénique des souches virales étudiées..... | 107 |
| 3. | Réactivité des isolats envers les sérums hyperimmuns..... | 107 |
| 4. | Clonage et caractérisation des AcMo anti-HA du virus QC91..... | 110 |
| 4.1 | Isolement d'hybridomes sécréteurs d'anticorps anti-HA du virus QC91..... | 110 |
| 4.2 | Caractérisation des AcMo sécrétés par les cultures d'hybridomes..... | 110 |
| 4.3 | Caractérisation des AcMo produits en liquide d'ascite..... | 114 |
| 4.4 | Comparaison sérologique des différents virus de l'influenza porcin associés à la PPN..... | 124 |
| 4.5 | Capacité de l'AcMo G9 à entrer en compétition avec les sérums hyperimmuns de porc ou sérums de porcs convalescents en ELISA..... | 127 |
| 5. | Analyses génomiques des isolats québécois du virus de l'influenza porcin ayant été associés aux lésions de PPN..... | 133 |
| 5.1 | Profil électrophorétique des fragments d'ADN (HA1) amplifié par PCR..... | 133 |
| 5.2 | Sélection des clones recombinants..... | 136 |
| 5.3 | Analyse des séquences de la portion HA1 de la protéine HA des souches du virus influenza porcin..... | 139 |
| 5.3.1 | Comparaison des séquences nucléotidiques des fragments HA1..... | 139 |
| 5.3.2 | Comparaison des séquences en acides aminés de la portion HA1 de la protéine A des différentes souches du virus influenza porcin..... | 149 |
| | DISCUSSION..... | 156 |
| | CONCLUSION..... | 170 |
| | REMERCIEMENTS..... | 174 |
| | BIBLIOGRAPHIE..... | 176 |
| | ANNEXES..... | 190 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|-----------|--|-----|
| FIGURE 1 | : Représentation schématique du virus influenza.. | 9 |
| FIGURE 2 | : Représentation schématique de la structure primaire de la protéine HA..... | 22 |
| FIGURE 3 | : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la protéine HA et localisation des sites antigéniques..... | 25 |
| FIGURE 4 | : Illustration schématique de la position des sites antigéniques des virus H1N1 et H3N2 sur l'arrangement trimérique de la protéine HA..... | 33 |
| FIGURE 5 | : Profils polypeptidiques des souches QC81 et QC91 du virus de l'influenza porcine obtenus sous des conditions non-réductrices.... | 103 |
| FIGURE 6 | : Profils polypeptidiques des souches QC81 et QC91 du virus de l'influenza porcine obtenus sous des conditions réductrices..... | 105 |
| FIGURE 7 | : Détermination de l'isotype des différents AcMo produits contre la souche QC91 du virus de l'influenza porcine | 116 |
| FIGURE 8 | : Capacité de l'AcMo G9 produit en liquide d'ascite à neutraliser la souche homologue (QC91) et la souche de référence (QC81) du virus de l'influenza porcine..... | 120 |
| FIGURE 9 | : Détermination par IFI de la réactivité de l'AcMo G9 produit en liquide d'ascite contre la souche homologue (QC91) et la souche de référence (QC81) du virus de l'influenza porcine.. | 122 |
| FIGURE 10 | : Liaison spécifique de l'AcMo G9 aux projections de surface des particules virales telle que déterminée par l'épreuve d'immunomarquage à l'or colloïdal..... | 125 |
| FIGURE 11 | : Courbe de compétition obtenue entre l'AcMo G9 (ascite) et le sérum de porc hyperimmun produit contre la souche homologue (QC91) telle que déterminée par ELISA..... | 131 |

- FIGURE 12 : Courbe de compétition obtenue entre l'AcMo G9 (ascite) et les sérums de porcs convalescents ayant eu des problèmes respiratoires attribuables à des lésions de PPN..... 134
- FIGURE 13 : Profil électrophorétique du fragment du gène codant pour la protéine HA1 des différents isolats du virus de l'influenza porcine tel qu'amplifié par RT-PCR..... 137
- FIGURE 14 : Sélection des bactéries recombinantes porteuses de la région du gène codant pour la portion HA1 de la protéine HA des souches du virus de l'influenza porcine..... 140
- FIGURE 15 : Sélection des bactéries recombinantes porteuses de la région du gène codant pour la portion HA1 de la protéine HA de la souche IAF-1747 du virus de l'influenza porcine..... 142
- FIGURE 16 : Comparaison des séquences nucléotidiques ADN (HA1) des différentes souches du virus de l'influenza porcine..... 145
- FIGURE 17 : Comparaison des séquences en acides aminés de la portion HA1 de la protéine HA des différentes souches du virus de l'influenza porcine..... 150

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|--------------|---|-----|
| TABLEAU I | Caractérisation antigénique des souches QC91 et QC81 du virus de l'influenza porcin propagées dans les œufs embryonnés de poule telle que déterminée par IHA..... | 108 |
| TABLEAU II | Réactivité antigénique croisée des souches QC91 et QC81 du virus de l'influenza porcin déterminée à l'aide des sérums hyperimmuns de lapins..... | 109 |
| TABLEAU III | Réactivité antigénique croisée des souches QC91 et QC81 du virus de l'influenza porcin déterminée à l'aide des sérums hyperimmuns de souris..... | 111 |
| TABLEAU IV | Isolement d'hybridomes sécréteurs d'AcMo inhibant l'activité HA de la souche QC91 du virus de l'influenza porcin..... | 112 |
| TABLEAU V | Caractérisation des AcMo dirigés contre la protéine HA de la souche QC91 du virus de l'influenza porcin..... | 115 |
| TABLEAU VI | Capacité des AcMo produits en liquides d'ascite à inhiber l'activité hémagglutinante de la souche homologue (QC91) et la souche de référence (QC81) du virus de l'influenza porcin..... | 118 |
| TABLEAU VII | Comparaison antigénique de différents virus de l'influenza porcin associés à la PPN telle que déterminée par le test IHA à l'aide d'AcMo contre la souche QC91..... | 128 |
| TABLEAU VIII | Pourcentages d'homologie existant entre les séquences nucléotidiques de la portion HA1 du gène HA des différentes souches du virus de l'influenza porcin..... | 148 |
| TABLEAU IX | Pourcentages d'homologie existant entre les séquences en acides aminés de la portion HA1 de la protéine HA des différentes souches du virus de l'influenza porcin..... | 152 |

LISTE D'ABRÉVIATION

| | |
|-------------------------------|--|
| 2ME | 2- mercaptoéthanol |
| Å | Angström |
| AcMo | Anticorps monoclonal |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNC | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| Ala | Alanine |
| Asn | Asparagine |
| Asp | Acide aspartique |
| Arg | Arginine |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messager |
| Cys | Cystéine |
| BSA | Albumine sérique bovine |
| DAB | Tétrahydrochlorure de 3,3'diaminobenzidine |
| DEAE | Diéthyl- aminoéthyl dextran |
| DEPC | Diéthyl- pyrocarbonate |
| DICT ₅₀ | Dose infectieuse induisant un effet cytopathique dans plus de 50% des cultures cellulaires infectées |
| dNTP | Déoxynucléotides triphosphates |
| DMSO | Diméthyl sulfoxyde |
| DO | Densité optique |
| E:T | Effectrice: cible |
| EDTA | Acide éthylène diamine tétracétique |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| FITC | Isothiocyanate de fluorescéine |
| g | Force gravitationnelle |
| Gln | Glutamine |
| Glu | Acide glutamique |
| g | Gramme |
| Gly | Glycine |
| H ₂ O ₂ | Peroxyde d'hydrogène |
| HA | Hémagglutinine |
| HAT | Hypoxanthine-aminoptérine-thymidine |
| HEPES | N-2-hydroxyethylpiperazine-N'- 2 éthane sulfonyl |
| His | Histidine |
| hre(s) | Heure(s) |
| HRP | Peroxydase de Raifort |
| HT | Hypoxanthine - thymidine. |
| IFI | Immunofluorescence indirecte |
| IHA | Inhibition de l'hémagglutination |
| Ile | Isoleucine |
| ip | Intra-péritoniéal |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside |
| iv | Intra-veineuse |
| kb | Kilopaires de bases |
| kDa | Kilodalton |
| Leu | Leucine |
| Lys | Lysine |

| | |
|------------------|--|
| M1 | Protéine de la matrice |
| MDCK | Madin Darby canine kidney (cellules de rein de chien) |
| MEM | Milieu essentiel minimum d'Eagle |
| Milieu 1:1 | MEM avec base saline de Earle - MEM avec base saline de Hank (rapport 1:1) |
| min | Minute |
| mM | Millimolaire |
| mg | Milligramme |
| Mr | Masse moléculaire |
| NaN ₃ | Azoture de sodium |
| ngr | Nanogramme |
| nm | Nanomètre |
| NP | Nucléoprotéine |
| OMS | Organisation mondiale de la santé |
| OPD | Hypochlorure d'orthophénylène diamine |
| p/p | Poids/poids |
| p/v | Poids/volume |
| PA | Protéine acide |
| pb | Paire de bases |
| PB1 | Protéine basique 1 |
| PB2 | Protéine basique 2 |
| PBS | Solution saline phosphaté |
| PCR | Réaction en chaîne de la polymérase |
| PEG-1000 | Polyéthylène glycol-1000 |
| PPN | Pneumonie proliférative et nécrosante |
| PTA | Acide phosphotungstique |
| QC81 | A/SW/QC/192/81 (H1N1) |
| QC91 | A/SW/QC/5393/91 (H1N1) |
| RDE | Activité enzymatique destructrice du récepteur |
| RT | Transcription inverse |
| rpm | Révolutions par minute |
| SDS | Sodium dodécyl sulfate |
| sec | Seconde |
| Ser | Sérine |
| SFB | Sérum foetal bovin |
| SPF | Exempt de pathogènes spécifiques |
| SRRP | Syndrome reproducteur et respiratoire porcin |
| STET | Sucrose (8%), triton X-100 (0,5 %), EDTA (50 mM), tris pH 8 (50 mM) et lysozyme 0,5 mg/ mL |
| Thr | Thréonine |
| TP | Température de la pièce (22°C - 25°C) |
| TPCK | N-Tosyl-L-phénylalaninyl chlorométhylcétone |
| Tris | Hydroxy-méthyl amino méthane |
| Trp | Tryptophane |
| Tyr | Tyrosine |
| U | Unité |
| UHA | Unité hémagglutinante |
| UV | Ultra violet |
| v/v | Volume/volume |
| XGAL | Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside |

SOMMAIRE .

Au Québec en 1990, un nouveau variant du virus influenza de type A (H1N1) porcine a été isolé d'animaux affectés par des problèmes respiratoires attribuables à des lésions de pneumonie proliférative et nécrosante (PPN). Les études sérologiques comparatives réalisées avec le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) n'ont démontré aucune réactivité de ce nouvel isolat envers différents sérums hyperimmuns dirigés contre des souches de virus d'influenza humains de type A (H1N1, H2N2, H3N2), B et C. De plus, ce nouvel isolat québécois s'est avéré antigéniquement apparenté mais distinct des souches porcines québécoises et américaines de référence, A/Swine/Québec/192/81 (H1N1) (QC81) et A/Swine/New Jersey/8/76(H1N1), et celles communément associées aux épidémies de grippe classique survenues au Québec avant cette période.

L'étude des variations antigéniques de ce nouveau variant a été effectuée. L'objectif était de produire des anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés spécifiquement contre l'hémagglutinine (HA) de la nouvelle souche A/Swine/Québec/5393/91(H1N1) (QC91) afin d'établir les paramètres pour la mise au point d'une épreuve ELISA de blocage permettant la distinction entre les anticorps produits chez le porc contre les souches associées à des lésions de PPN et la souche de référence (QC81). Par ailleurs, les relations antigéniques et génétiques existant entre la souche QC91 et les autres isolats québécois

associés à des lésions de PPN ont été évaluées de même que l'évolution antigénique et génétique des souches du virus de l'influenza porcine A(H1N1) circulant dans la population porcine au Québec de 1981 à 1990.

Des AcMo ont été obtenus suite à l'immunisation de souris BALB/c avec les préparations de virus QC91 dissocié à l'éther-tween 20. Six AcMo appartenant tous à la sous classe d'immunoglobulines IgG1 et spécifiques à la protéine HA de la souche QC91 ont été obtenus. Un AcMo désigné G9 a été produit en liquide d'ascite en vue des études de caractérisation. Bien qu'une réactivité croisée partielle ait été observée par les tests d'immunofluorescence indirecte et de neutralisation de l'infectivité envers la souche québécoise de référence (QC81), l'AcMo G9 a réagi spécifiquement avec la souche QC91 au test d'IHA. Aucune inhibition de l'activité hémagglutinante du virus QC81 n'a été démontrée. En outre un marquage spécifique à l'or colloïdal des projections de surface du virion (QC91) avec l'AcMo G9 a été observé en microscopie électronique. Les travaux préliminaires sur la mise au point d'une épreuve immunoenzymatique ont montré que les sérums polyclonaux de porcs infectés expérimentalement et de porcs ayant connu des épisodes de PPN entrent en compétition avec l'AcMo G9 spécifique à la souche QC91.

L'analyse sérologique à l'aide de l' AcMo G9 de deux autres isolats IAF-1747 et IAF-Klop (deux isolats associés à la PPN et provenant respectivement des mêmes fermes d'élevage et de fermes différentes du QC91) a démontré que ces derniers partageaient les mêmes déterminants antigéniques que le virus QC91. Cependant, la comparaison des séquences en acides aminés de la portion HA1 du gène HA (excluant la séquence en acides aminés du peptide signal) de ces deux isolats avec celle déduite pour la souche QC91 a révélé 16 mutations en résidus d'acides aminés dans la séquence de l'isolat IAF-Klop et 8 changements d'acides aminés dans celle de l'isolat IAF-1747.

La réactivité de l'AcMo G9 envers le virus IAF-1192 (une souche virale de l'influenza porcine A (H1N1) isolée des porcs en 1987 durant une épidémie de grippe porcine classique au Québec) a démontré que ces deux virus possédaient des déterminants antigéniques différents. Les études de séquençage ont montré qu'au niveau de la portion HA1 de la protéine HA, la souche IAF-1192 différait des souches QC91 et QC81 par au moins 19 et 12 acides aminés, respectivement.

Ces travaux montrent que:

1. l' AcMo G9 de type IgG1 est spécifique à la protéine HA du virus QC91,

2. les porcs produisent des anticorps contre l'épitope différenciant la souche QC91 de la souche de référence (QC81),
3. les différents isolats québécois associés à la PPN sont antigéniquement identiques à la souche QC91 en dépit de leur diversité génétique considérable,
4. plusieurs souches distinctes (antigéniquement et génétiquement) du virus de l'influenza porcine A(H1N1) circulaient dans la population porcine au Québec de 1981 à 1990.

INTRODUCTION

Responsable de la pandémie de grippe la plus catastrophique à la veille de la 1^{ère} guerre mondiale (20 millions de pertes humaines), le virus influenza type A est non seulement le plus pathogène et le plus répandu chez l'homme, mais aussi le plus fréquemment isolé chez d'autres mammifères de même que plusieurs espèces aviaires (Webster et al., 1992). Isolé pour la première fois chez le porc en 1930 par Richard Shope aux Etats-Unis (Shope, 1931), le virus influenza A (H1N1) est le plus commun chez cette espèce et est entre autre reconnu comme l'une des principales causes d'affections respiratoires chez les porcs en Amérique du Nord (Hinshaw et al., 1978b). Les pertes économiques attribuables aux affections grippales (perte de poids, retard de croissance, avortements, mortalités de porcelets à l'allaitement, et complications respiratoires) sont difficiles à estimer, mais sont probablement plus importantes que l'on ne le réalise (Woods, 1972).

Cependant, bien que le virus influenza porcin A (H1N1) ne représente pas actuellement une menace économique majeure en Amérique du Nord, il constitue le virus influenza animal le plus surveillé par l'Organisation Mondiale de la Santé du point de vue santé publique. La transmissibilité à l'homme et aux espèces aviaires a été démontrée (Webster et al., 1992). Le porc serait potentiellement un hôte intermédiaire et un réservoir pour l'émergence de nouveaux virus recombinants

(Castrucci et al., 1993), qui pourraient être à l'origine d'une nouvelle pandémie (Donatelli et al., 1991).

Une étude du virus influenza porcin A (H1N1) effectuée par l'organisation mondiale de la santé à travers le monde entier, a démontré qu'il existe deux variants antigéniques dont la distribution géographique diffère considérablement. Celui désigné "US" apparenté aux souches dites porcines et circulant en Amérique du Nord, et celui désigné "Europe" plus proche des virus influenza A (H1N1) isolés d'espèces aviaires et circulant dans plusieurs pays européens (Hinshaw et al., 1984).

En dépit de l'apparition de nouvelles souches variantes aux Etats - Unis (Olsen et al., 1993) et au Canada (Dea et al., 1992b), le virus influenza porcin de type A (H1N1) circulant en Amérique du Nord a démontré une assez grande stabilité antigénique (Sheerar et al., 1989; Noble et al., 1993) et génétique (Luoh et al., 1992; Noble et al., 1993) depuis 1965.

Au Québec en 1990, un nouveau variant du virus influenza porcin A (H1N1), A/Swine/Québec/5393/91 (H1N1) (QC91), a été isolé chez des porcs affectés par un nouveau type de pneumonie, désigné pneumonie proliférative et nécrosante (PPN), la maladie étant surtout rencontrée dans les maternités et les engraissements (Morin et al., 1990). Les travaux préliminaires ont permis de démontrer: 1. Que le nouveau variant québécois

était antigéniquement apparenté, mais distinct des souches américaines et québécoises de référence:

A/Swine/New Jersey/8/76 (H1N1) et A/Swine/Québec/192/81 (H1N1) (QC81) (Dea et al., 1992b). 2. Qu'il existait une divergence d'au moins 5 % entre les séquences d'acide ribonucléique (ARN) génomique se traduisant par une substitution de 14 acides aminés dans la sous-unité HA1 du nouveau variant dont deux affectant les déterminants antigéniques majeurs S_b et C_a (Rekik et al., 1994). Présentement, les laboratoires de diagnostic des viroses animales ne disposent d'aucun test sérologique permettant l'identification de ce nouveau variant antigénique. Par les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), les sérums de porcs affectés par la PPN réagissent avec des titres similaires contre le QC91 et le QC81.

La présente étude a été menée avec comme principaux objectifs:

1. D'obtenir des anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés spécifiquement contre les déterminants antigéniques de l'hémagglutinine (HA) du virus QC91.
2. D'évaluer les paramètres pour la mise au point d'une épreuve ELISA de blocage ou de compétition permettant la différenciation entre les anticorps de porcs produits contre les souches associées à des lésions de PPN et la souche de référence (QC81).

3. D' établir les relations antigénique et génétique entre les différents virus de l'influenza porcin de type A (H1N1) associés à des lésions de PPN.
4. D'étudier les variations antigénique et génétique du virus de l'influenza A(H1N1) circulant dans la population porcine au Québec de 1981 à 1990.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur le virus influenza.

1.1 Taxonomie.

Les virus influenza sont des virus enveloppés dont le génome est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire, segmenté et de polarité négative (Klenk et al., 1991). Ces virus sont classés en trois sérotypes A, B, C, définis par l'existence de déterminants antigéniques majeurs distincts au niveau de leurs protéines internes: la protéine de la matrice (M1) et la nucléoprotéine (NP) (Murphy et Webster, 1990). Les virus appartenant au type A sont classifiés en différents sous-types selon les propriétés antigéniques de leurs deux glycoprotéines de surface, l'HA et la neuraminidase (NA). Jusqu'à présent, on a identifié pour les virus influenza de type A 14 sous- types d'HA et 9 sous-types de NA, répertoriés à partir de virus isolés chez les espèces humaines, aviaires et mammifères (Webster et al., 1992).

1.2 Morphologie.

Les particules virales sont de taille et morphologie variables et arborent à leur surface des spicules (Kilbourne, 1987). Celles nouvellement isolées ont un aspect filamenteux, mais celles adaptées dans les œufs embryonnés ou en cultures cellulaires après plusieurs passages sont principalement sphériques et possèdent un diamètre variant entre 80 et 120 nm. Les spicules correspondant à la protéine HA sont en forme de

bâtonnets, ayant une dimension de 16 nm de longueur et de 5 nm de largeur et sont uniformément répartis à la surface du virion. La protéine NA est plutôt associée à des spicules en forme de champignon, moins abondantes et plutôt disposées en amas. L'enveloppe virale est constituée d'une couche lipoprotéique dérivée de la membrane plasmique de la cellule-hôte; elle recouvre une coque formée par la protéine M1. Cette dernière renferme la nucléocapside qui est constituée par huit segments d'ARN arrangés en complexes ribonucléoprotéiques hélicoïdaux (Lamb et Choppin, 1983). Une représentation schématique du virus de l'influenza est illustrée dans la figure 1.

1.3 Propriétés physico-chimiques du virus influenza.

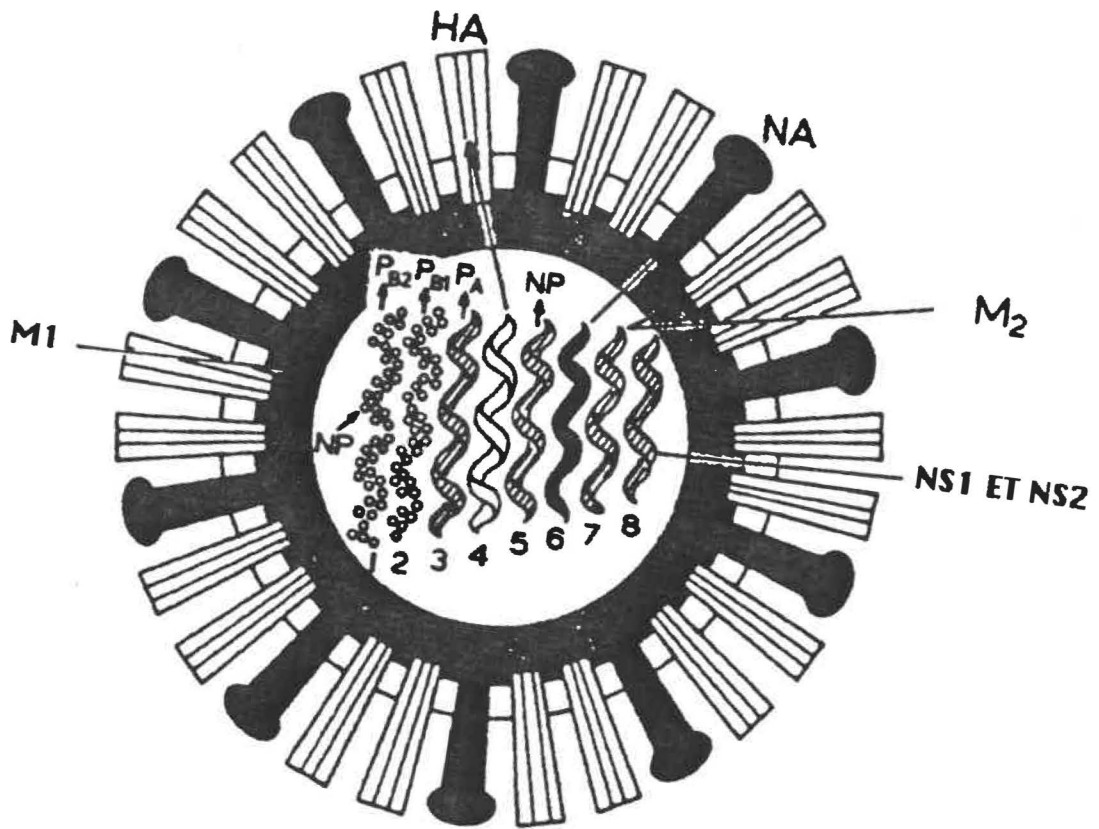
Les virus influenza ont en moyenne une masse moléculaire (M_r) de 250×10^3 kilodaltons (kDa) (Kilbourne, 1987). Les particules non filamenteuses ont une vitesse de sédimentation de 700 à 800 S. Leur densité de flottation dans le saccharose est de $1,19 \text{ g/cm}^3$. L'infectivité du virus est considérablement réduite après son exposition à des valeurs de pH très acides et aux rayons gamma et ultra violets (U.V). Le virus est rapidement inactivé aux températures supérieures à 56°C . Il est très sensible aux traitements par les solvants organiques (éther, chloroforme) et les détergents anioniques et cationiques, mais

FIGURE 1. Représentation schématique du virus influenza.

La particule virale est constituée de trois principaux éléments structuraux:

1. L'enveloppe dérivée de la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte dans laquelle sont ancrées deux types de projections de surface constituées des protéines HA et de NA.
2. La coque constituée par la protéine M1.
3. La nucléocapside renfermant les huit segments individuels du génome viral en forme d'hélice. Les segments 1 à 6 codent pour les protéines structurales basiques (PB1 et PB2), acide (PA), HA, NP et NA du virus respectivement. Le segment 7 code pour la protéine structurale M1 et une protéine non structurale M2. Les deux protéines non structurales (NS1 et NS2) sont codées par le segment 8.

* Adapté selon Lamb et Choppin (1983).



de tels traitements n'altèrent pas les propriétés antigéniques des protéines structurales du virion (Klenk et al., 1991).

Généralement, une particule virale se compose de 0,8 à 1% d'ARN, 70 à 75 % de protéines, 20 à 24% de lipides et 5 à 8 % d'oligosaccharides (Kilbourne, 1975).

1.4 Biologie moléculaire du virus influenza.

Les huit segments du génome du virus influenza A codent pour sept protéines de structure et trois protéines associées plutôt à des fonctions végétatives que l'on retrouve dans les cellules infectées: M2, NS1 et NS2. Parmi les protéines structurales, trois sont associées à la polymérase (PB2, PB1 et PA), deux sont glycosylées et associées aux projections de surface (HA et NA), les deux autres sont la protéine de la nucléocapside NP et la protéine M1 (Lamb et Choppin, 1983).

Les trois premiers grands segments d'ARN viral codent pour trois protéines associées à l'ARN polymérase. Les premier et deuxième segments, d'une longueur de 2341 nucléotides, codent pour les protéines PB1 et PB2 constituées respectivement de 759 et 757 résidus d'acides aminés. Le troisième segment d'une longueur de 2233 nucléotides code pour la protéine PA constituée de 716 résidus d'acides aminés (Lamb et Choppin, 1983; Lamb, 1989). Les trois protéines PB2, PB1 et PA peuvent être

différenciées selon leurs cartographies peptidiques telles que déterminées par électrophorèse en double dimension (Horisberger, 1980). Leurs Mr sont respectivement de 86,5 kDa, 85,7 kDa et 82,4 kDa. Ces trois protéines sont associées à la NP et sont abondamment retrouvées dans le virion (en moyenne de 30 à 60 molécules / particule virale). Elles forment un complexe intervenant dans la synthèse de l'ARN messager (ARNm) durant le cycle de répllication du génome viral (Lamb, 1989).

Le quatrième segment génomique code pour la protéine HA associée à l'un des deux types de projections de surface. Les propriétés de cette protéine d'enveloppe seront résumées en détail dans le chapitre suivant.

Le cinquième segment génomique de 1565 nucléotides code pour la NP (Lamb, 1989). Cette protéine, hautement phosphorylée, est constituée de 498 résidus d'acides aminés et possède une Mr de 56,01 kDa (Lamb, 1989). La NP est associée aux protéines PB1, PB2 et PA, formant avec les segments du génome viral plusieurs complexes ribonucléoprotéiques. La protéine NP est abondamment retrouvée dans le virus (1000 molécules / particule virale) (Lamb, 1989). Elle porte les déterminants antigéniques majeurs spécifiques de groupe permettant de classifier les trois différents sérotypes A, B et C du virus influenza. Cependant, des variations antigéniques mineures entre la NP des différents sous - types du virus influenza A

ont été démontrées (Schild et al., 1979). Par ailleurs, Buckler-White et Murphy (1986) ont démontré qu'il existe deux classes phylogéniquement différentes de la protéine NP, l'une étant d'origine humaine et l'autre dérivant des espèces aviaires.

Le sixième segment génomique code pour la NA, la deuxième protéine associée à l'enveloppe du virion. Il s'agit d'un tétramère possédant une Mr de 220 kDa. Ses quatre sous-unités ou monomères possèdent une Mr de 50,087 kDa et sont liés deux à deux par un pont disulfure (Lamb, 1989). La structure tridimensionnelle de la protéine NA a été révélée par cristallographie aux rayons X à la résolution de 2,9 Å (Varghese et al., 1983). La protéine présente deux parties: 1) une tête qui est en forme de bâtonnet et dont les dimensions sont de 100 Å x 100 Å x 60 Å et 2) une tige qui supporte la tête. La structure de la tête montre que chacun des monomères est constituée de 6 feuillets *bêta* identiques et disposés comme les pales d'une hélice (Colman et Ward, 1985). Chaque monomère présente à sa surface le site actif catalytique de la protéine. Ce dernier est constitué de 9 résidus d'acides aminés de polarité acide, 6 résidus d'acides aminés basiques et trois résidus d'acides aminés hydrophobes. Colman et al. (1983) ont rapporté que cette séquence d'acides aminés est relativement bien conservée chez tous les sous-types de virus influenza A.

Seulement quatre déterminants antigéniques ont été définis sur la protéine NA de la souche A/RI/5⁺/57 (H2N2) (Colman et Ward, 1985). Parmi ces déterminants, deux sont localisés à proximité du site catalytique de la protéine. L'enzyme NA du virus de l'influenza est une protéine de type II (Lamb, 1989). Immédiatement après sa synthèse, la protéine précurseur subit deux types de modifications post-traductionnelles: la tétramérisation et la glycosylation. Pendant ces étapes de transformation, le peptide signal demeure lié à la protéine. Par la suite, la protéine se greffe à la membrane plasmique par son domaine hydrophobe et la portion NH₂ terminale demeure dirigée vers le cytoplasme.

Le rôle de la protéine NA dans la réplication virale n'est pas encore bien défini. Selon Gottschalk (1957), la NA catalyse le clivage du lien N-cétosidique entre les résidus d'acide sialique des récepteurs cellulaires (acide N-acetylneuraminique) et les groupements oligosaccharides des deux protéines de l'enveloppe virale NA et HA. Cette fonction permet à la NA d'assurer entre autre la libération de nouvelles particules virales des cellules infectées suite au processus de bourgeonnement et puis l'infection des cellules épithéliales du tractus respiratoire (Palese et al., 1974). Par ailleurs, la neutralisation de l'infectivité virale par les AcMo dirigés contre les deux sites antigéniques de la protéine NA situés au

voisinage du site de clivage a été démontrée. Jusqu'à présent, il a été possible d'associer une activité hémagglutinante à la protéine NA de deux sous-types d'influenza de type A, soit le sous-type N9 (Laver et al., 1984) et le sous-type N2 de la souche A/Aichi/68 (Arora et Fouchard-Gabriel, 1986).

Le segment sept du génome viral code pour deux protéines et un peptide (Lamb et Choppin, 1983; Lamb, 1989). L'ARN viral est transcrit en un ARNm qui est d'abord traduit en la protéine M1. Après quelques épissages, il génère respectivement les protéines M2 et le peptide M3.

La protéine M1 est constituée de 252 résidus d'acides aminés et possède une Mr de 27,07 kDa. Elle constitue la protéine la plus abondante retrouvée dans le virion (3000 molécules /particules virale). La protéine M1 forme la coque (couche épaisse) sous-jacente à la couche lipoprotéique de l'enveloppe et confère à cette dernière sa rigidité assurant son intégrité structurale (Lamb, 1989). Il a été démontré que la protéine M1 intervient à deux niveaux au cours du cycle de la réplication du virus: 1) elle assure le transport du noyau vers le cytoplasme de la nucléocapside associée à la protéine NP nouvellement synthétisée (Martin et Helenius, 1991) et 2) elle sert de jonction entre la nucléocapside et la membrane plasmique durant l'assemblage du virion (Choppin et al., 1972).

La protéine M2 est une protéine non structurale. Elle est abondamment exprimée au niveau de la membrane plasmique des cellules infectées et très peu représentée dans le virion (23 à 60 molécules/ particule virale) (Lamb, 1989). C'est une protéine constituée de 97 résidus d'acides aminés et possédant une Mr de 15 kDa. La protéine M2 est un tétramère, les quatre sous-unités sont liées par des ponts disulfures (Holsinger et Lamb, 1991). Cette protéine appartient au groupe des protéines membranaires de type III. Après sa synthèse, il y a l'ancrage de la protéine M2 dans la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte par son domaine hydrophobe et son extrémité C-terminale demeure orientée vers le cytoplasme (Lamb, 1989). Elle agit comme une pompe à ions H^+ et cette propriété lui confère deux fonctions principales dans le cycle de réplication du virus. D'une part, elle intervient dans l'acidification du compartiment endosomal et d'autre part, elle permet l'hydrolyse de la jonction entre la protéine M1 et la nucléocapside, ce qui permet à cette dernière de passer à travers le noyau et d'initier le cycle de réplication du virus. L'acidification du compartiment endosomal entraîne un changement de la conformation de la protéine HA, ce qui favorise la fusion entre la membrane du virus et celle de l'endosome, permettant ainsi la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire (Pinto et al., 1992).

Le segment huit du génome viral code pour les protéines NS1 et NS2. Ces deux protéines ne sont retrouvées que dans les cellules infectées (Lamb, 1989). La protéine NS1 est une protéine phosphorylée, constituée de 220 à 237 résidus d'acides aminés et possédant une Mr de 25 kDa. Elle n'est pas présente dans le virus purifié, mais se retrouve associée aux polyribosomes dans les cellules infectées (Krug, 1989). Sa fonction n'est pas bien connue, quoique le rôle de "Shut off" de la synthèse des protéines cellulaires durant la réplication du génome viral lui a été attribué. En outre, il semble que la protéine NS1 active la NP afin qu'elle puisse à participer à la transcription de l'ARN viral (Lamb, 1989).

La protéine NS2 est synthétisée par suite d'un épissage de l'ARNm transcrit à partir de l'ARN8. Sa localisation cellulaire et sa fonction dans les cellules infectées n'ont pas encore été élucidées (Lamb, 1989).

1.5 Le cycle de réplication du virus influenza.

Le cycle de réplication du virus influenza de type A s'effectue en trois étapes. La première consiste en l'adsorption du virus aux récepteurs cellulaires. Cette étape nécessite l'adhésion des domaines anti-récepteurs du virus aux résidus d'acide sialique (Acide N-acétyl-neuraminique α 2-3 ou α 2-6 lactose) des récepteurs cellulaires (Marsh et Helenius, 1989). Dans la deuxième étape, il y a la libération de la

nucléocapside du virus dans le cytoplasme. Un changement de conformation de l'HA est d'abord induit par suite de l'acidification du compartiment endosomal. Puis, il y a la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de l'endosome, ce qui permet de libérer la nucléocapside dans le cytoplasme. La nucléocapside migre ensuite dans le noyau où s'effectue la réplication du génome viral (Marsh et Helenius, 1989). La troisième étape ou réplication du génome viral conduit essentiellement à la synthèse de trois types d'ARN.

La transcription primaire conduit d'abord à la synthèse d'ARNm à partir des 8 segments de l'ARN viral. La synthèse de ces ARNm nécessite le concours des trois protéines virales PB1, PB2 et PA et de l'ARN polymérase II de la cellule-hôte. La protéine PB2 s'associe à la coiffe méthylée en position 5' de l'ARN polymérase II cellulaire pour former le complexe réplcatif. La protéine PB1 assure l'élongation de la chaîne en catalysant l'addition de chaque nucléotide en sa position 3' (Shapiro et Krug, 1988). La transcription de l'ARNm se termine à 17-22 nucléotides en aval de l'extrémité 5' de l'ARN viral. Cette transcription inachevée est attribuable à l'insertion d'une séquence polyadénylée.

La transcription secondaire s'effectue en deux étapes. Dans la phase précoce, il y a la synthèse d'une chaîne d'ARN dont la séquence nucléotidique est complémentaire à celle de

l'ARN génomique. Cet ARN répliatif n'est ni coiffé, ni polyadénylé. L'association de la protéine NP empêcherait l'arrêt prématuré de cette transcription (Krug, 1989). La phase tardive de la transcription secondaire conduit à la synthèse de l'ARN viral de polarité négative.

La synthèse des protéines virales s'effectue dans le cytoplasme (Klenk, 1991). La protéine NP, de même que les trois protéines PB1, PB2, PA nouvellement synthétisées, se retrouvent associées aux segments génomiques pour former le complexe ribonucléoprotéique. Ce complexe se lie par la suite à la protéine M1, ce qui assure son transfert dans le cytoplasme. La dernière étape consiste à la liaison de ce complexe formé à la membrane plasmique sur laquelle viennent se greffer les deux protéines de surface HA et NA. Les particules virales nouvellement formées doivent contenir une copie de chacun des 8 segments d'ARN pour perpétuer le cycle de répliation du virus (Lamb et Choppin, 1983).

2. L' hémagglutinine.

Cette protéine d'enveloppe compte approximativement pour 25 % de la masse protéique du virus et forme 90% des projections de surface (Webster et al., 1982).

2.1 Biosynthèse.

La protéine HA est codée par le segment 4 de l'ARN viral et se présente sous forme d'un trimère de Mr de 224,64 kDa (Wilson et Cox, 1990). Sa synthèse s'effectue dans le réticulum endoplasmique rugueux, puis elle est transportée vers la membrane plasmique par les vésicules de transport de l'appareil de Golgi. Ce polypeptide subit diverses modifications post-traductionnelles. Il y a d'abord le clivage du peptide signal (Copeland et al., 1988), suivi du repliement de la structure en feuillets *bêta* au niveau de la partie globulaire (Yewdell et al., 1988) et de la trimérisation (Copeland et al., 1988). Les processus de glycosylation et d'acétylation de la protéine s'effectuent au niveau de l'appareil de Golgi (Lamb, 1989). Après migration de la protéine vers la membrane plasmique, les protéases cellulaires clivent chaque monomère en deux chaînes polypeptidiques, HA1 et HA2 de Mr 46 kDa et 27 kDa respectivement. Ces deux sous-unités sont liées entre elles par un pont disulfure formé entre les résidus cystéine (Cys) en positions 14 de HA1 et 137 de HA2 (Klenk et al., 1975).

2.2 Structure de l'hémagglutinine.

Les séquences nucléotidiques du segment quatre de l'ARN viral de plusieurs sous-types de virus influenza A (H1, H2, H3, H7) ont été déterminées; il semblerait que la longueur du gène est identique pour les différents sous types du virus influenza

type A (Lamb et Choppin, 1983). Par contre, la protéine HA de la souche virale A/Aichi/68 (H3N2) est codée par un gène de 1762 nucléotides. Cet ARN génomique ne possède qu'un seul cadre de lecture ouvert; il code pour le peptide signal constitué de 16 résidus d'acides aminés et un polypeptide de 566 acides aminés. Ce polypeptide est formé des deux sous-unités HA1 et HA2. D'une part, une séquence de 27 résidus d'acides aminés hydrophobes, se trouvant à proximité de l'extrémité C-terminal de la sous-unité HA2, permet l'ancrage du polypeptide au niveau de la membrane plasmique de la cellule-hôte. D'autre part, une séquence de 10 résidus d'acides aminés hydrophiles demeurent dans le cytoplasme. Il s'agit donc d'une protéine transmembranaire avec ses domaines cytoplasmique, membranaire et extra-cellulaire. La figure 2 présente une illustration schématique de la structure primaire de la protéine HA.

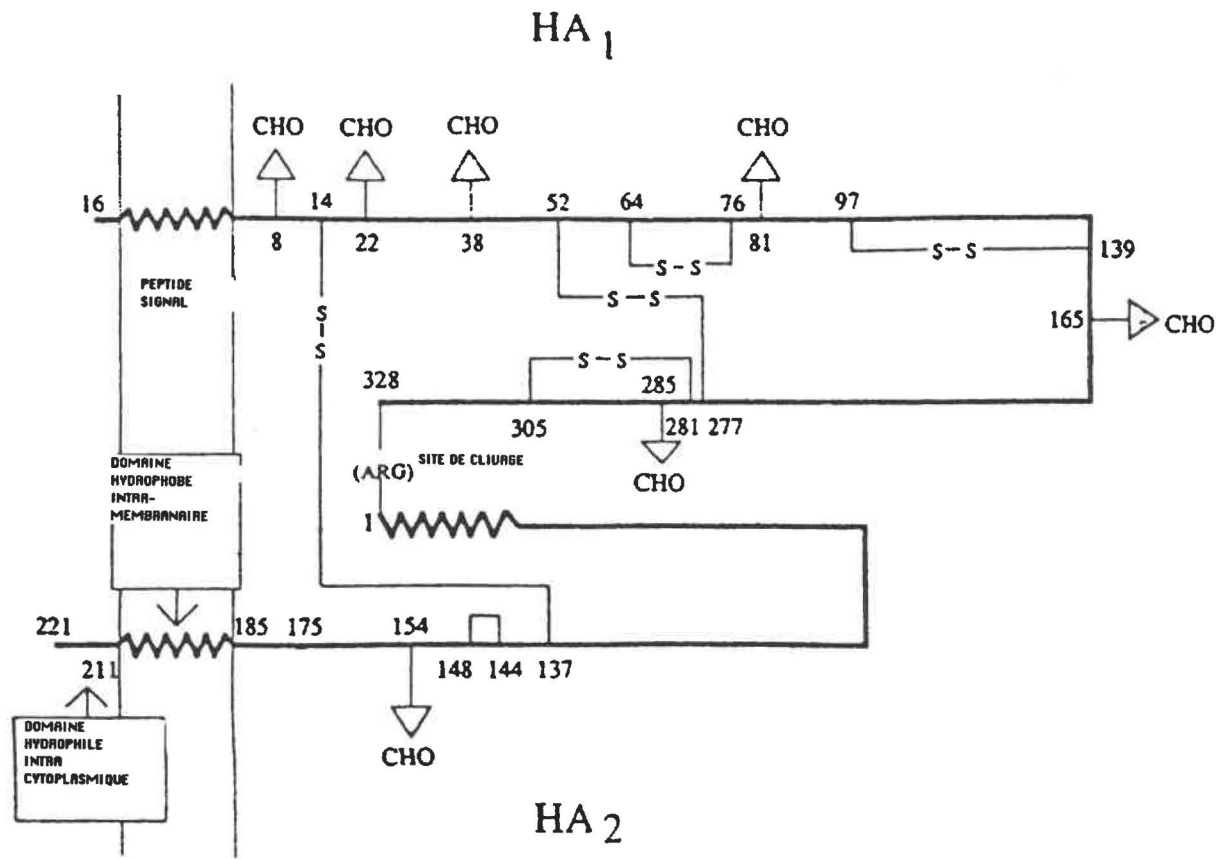
La protéine HA de la souche A/Swine/Indiana/1726/88 (H1N1) du virus influenza porcin est codée par un gène de 1778 nucléotides (Luoh et al., 1992). Ce gène code pour un peptide signal de 17 acides aminés et pour les sous-unités HA1 et HA2 constitués respectivement de 326 et de 222 résidus d'acides aminés.

Wilson et al. (1981) ont permis de déterminer la structure tridimensionnelle de la HA de la souche A/ Aichi/68 (H3N2)

FIGURE 2. Représentation schématique de la structure primaire de la protéine HA.

Le segment 4 du génome viral code pour un peptide signal (16 aa) et les deux sous-unités polypeptidiques HA1 et HA2. Le site de clivage composé d'un seul résidu arginine (ARG) est localisé en position 328 entre l'extrémité C-terminale de la sous-unité HA1 et l'extrémité N-terminale de la sous-unité HA2. Une séquence de 27 acides aminés hydrophobes, en amont de l'extrémité C-terminal de la sous-unité HA2, constitue le domaine d'ancrage de la protéine HA dans la membrane plasmique de la cellule-hôte. Par ailleurs, une queue de 10 acides aminés hydrophiles constitue le domaine intra-cytoplasmique. Les sites de glycosylation (CHO) sont au nombre de six dans la sous-unité HA1 et ils sont localisés en position 8, 22, 38, 81, 165 et 285, celui situé dans la sous-unité HA2 est en position 154. Les ponts disulfures (S-S) liant les résidus Cys sont au nombre de quatre dans la sous-unité HA1 et sont situés en position 52-277, 64-76, 97-139 et 281-305, tandis que ceux qui relient les sous-unités HA1 et HA2 sont respectivement en position 14 et 137.

* Adapté de (Wilson et Cox, 1990)



par la technique de cristallographie aux rayons X à la résolution de 3 Å. La molécule est constituée de deux parties distinctes: une partie tubulaire et une globulaire. La partie tubulaire est longue et fibreuse. Elle est arrangée en une super hélice α à triple brins et est représentée par la sous-unité HA2 et d'une partie de la sous-unité HA1. La partie tubulaire est surmontée par la partie globulaire ou tête qui est formée uniquement de la sous-unité HA1. Sa structure présente des feuilletts β antiparallèles.

L'organisation structurale de la protéine HA montre qu'elle comprend d'abord un domaine membranaire constitué par la sous-unité HA1. Puis, on retrouve un domaine intramembranaire qui se poursuit sur une longueur de 135 Å. Il y a par la suite un repliement de la protéine qui revient vers la membrane sur une longueur de 60 Å par son extrémité C-terminale et se lie à une petite hélice composée de HA2. Le changement de conformation du polypeptide entraîne la relocalisation de l'extrémité N-terminale de HA2 à 20-21 Å de l'extrémité C-terminale de la sous-unités HA1. La figure 3 est une représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la protéine HA.

Les liaisons secondaires correspondent aux ponts disulfures. Wilson et Cox (1990) ont déterminé leur localisation sur la protéine HA du virus influenza type A (H3N2). Ces liaisons

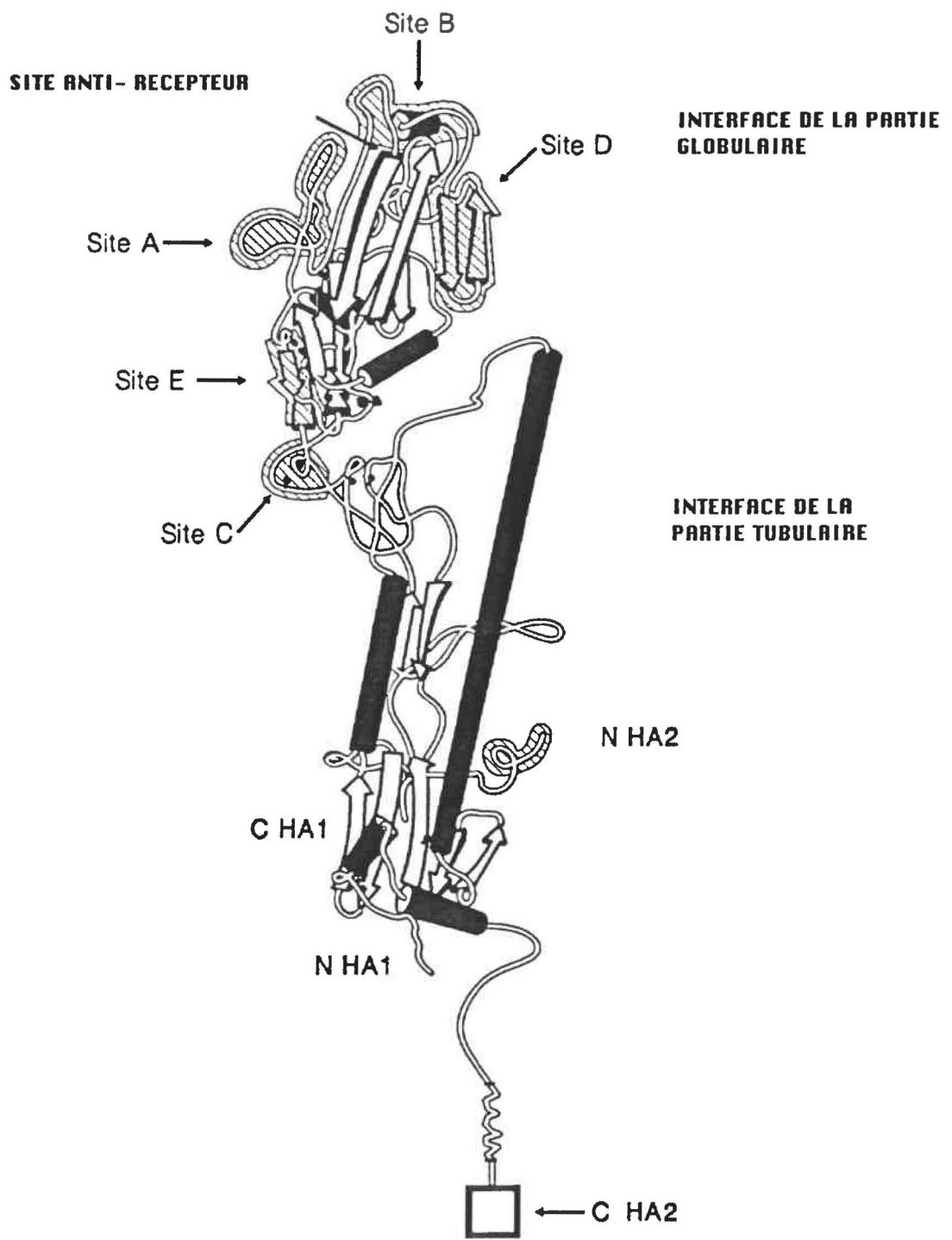
FIGURE 3. Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la protéine HA et localisation des sites antigéniques.

La structure tridimensionnelle de HA présente deux parties distinctes.

1. La partie tubulaire est constituée par les deux sous - unités HA1 et HA2. Elle est organisée en une hélice alpha à triple brins (cylindres).
2. La partie globulaire ou tête globulaire est constituée par la sous - unité HA1. Elle est arrangée en feuilletts bêta (flèches) antiparallèles.

La tête globulaire abrite le site anti-récepteur et comporte les cinq déterminants antigéniques. Les sites antigéniques A et B sont tous deux localisés dans les boucles qui sont situées entre les feuilletts bêta (les positions de résidus d'acides aminés qui les constituent sont mentionnés dans le texte (Section 3.4)). Le site D est localisé à l'interface au point de contact des têtes globulaires des trois monomères. Le site C se trouve à la limite des parties globulaire et tubulaire, tandis que le site E est localisé à la base de la partie globulaire.

* Adaptée selon Murphy et Webster (1990).



impliquent des ponts disulfures entre les résidus Cys en position 52 et 277, 64 et 76, 97 et 139, 281 et 305 de la sous-unité HA1. En plus, une liaison entre les résidus Cys en position 14 et 137 relie le polypeptide HA1 et HA2. Les structures secondaires assurent la stabilité finale de la structure tertiaire de la protéine HA (figure 2) (Ward, 1981).

Les structures quaternaires stabilisent l'oligomère (Wiley et Skehel, 1987). Elles interviennent dans la partie tubulaire précisément au niveau des hélices. Dans cette région, elles constituent des forces de type Van der Waals et stabilisent les interactions entre les monomères. Dans la partie globulaire, l'oligosaccharide en position 165 favorise d'importantes interactions entre les sous-unités de chaque monomère.

Les travaux de Wilson et al. (1981) suggèrent que la structure tridimensionnelle est identique pour tous les types du virus influenza A. Cependant, la souche virale humaine A/PR/8/34 (H1N1) (Wiley et Skehel, 1987), de même que le virus influenza porcin A (H1N1) (Inskter et al., 1993), ne présentent pas d'oligosaccharide en position 165 de leur sous-unités HA1.

2.3 Les sites de glycosylation.

La structure tridimensionnelle de la protéine HA d'une souche appartenant au sérotype H3N2 a révélé la présence de 7

sites de glycosylation apparemment bien conservés parmi les isolats (Wiley et Skehel, 1987). Tous ces sites sont N-glycosylés; les oligosaccharides sont liés par une liaison covalente à des résidus d'asparagine (Asn) retrouvés dans l'arrangement de séquence d'acides aminés Asn-x-Ser/Thr. Les chaînes d'oligosaccharides sont de 2 types: le type I et le complexe de type I. Les oligosaccharides présents en position 81 et 165 sur le polypeptide HA appartiennent au type I et se composent de glucosamine et de mannose. Les oligosaccharides en position 8, 22, 38, 81, 165, 285 sur la protéine HA font partie du complexe de type I et sont constitués de glucosamine, mannose et galactose (Ward, 1981). La majorité des sites (six) de glycosylation sont localisés au niveau de la sous-unité HA1. Ils sont tous situés au niveau de la surface latérale du polypeptide, sauf l'oligosaccharide en position 165 qui est localisé au niveau de l'interface de la portion globulaire (Wiley et Skehel, 1987). Le site existant au niveau de la sous-unité HA2 est en position 154 (Figure 2).

D'après Roberts et al. (1993), le nombre de sites de glycosylation conservés et leur localisation au niveau de la protéine HA sont très importants. Ainsi, trois grandes fonctions sont assignées aux sites en position 12 et 28 de la partie tubulaire de la sous-unité HA1 et au site en position 478 de la sous-unité HA2 de la souche virale A/FPV/Rostock 34

(H7N1). Les travaux de ce chercheur montrent l'importance de ces sites de glycosylation dans le repliement et l'assemblage de ce polypeptide. En outre, la protection de la protéine HA contre la dégradation protéolytique et le phénomène d'agrégation ont été attribués à ces sites. La glycosylation assurerait une meilleure efficacité du transport de l'HA du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Par analogie au virus influenza de type A (H3N2), ces sites de glycosylation correspondent aux résidus Asn localisés en position 22, 38 et 483.

Les sites de glycosylation situés dans la région globulaire de la protéine HA influencent grandement les caractéristiques antigéniques du virus. Le camouflage ou le dévoilement des déterminants antigéniques sont associés à l'apparition ou à la disparition des sites de glycosylation et peuvent entraîner l'apparition de nouveaux variants antigéniques (Caton et al., 1982; Skehel et al., 1984).

Le virus influenza porcine de type A (H1N1) possède cinq sites N-glycosylés bien conservés parmi les différents isolats. Par contre, à l'exception d'une nouvelle souche variante désignée A/Swine/Nebraska/92 (H1N1) (Olsen et al., 1993), il n'existe aucun site de glycosylation au niveau de la partie globulaire de la sous-unité HA1 à proximité du site anti-récepteur (Inkster et al., 1993).

2.4 Sites antigéniques.

Laver et al. (1981) ont rapporté l'existence de quatre déterminants antigéniques sur la protéine HA du virus de l'influenza humain (H3N2). Ces déterminants antigéniques ont ensuite été localisés au niveau de la structure tridimensionnelle de la molécule par Wiley et al. (1981) (Figure 3). Selon Yewdell et Gerhard (1981), tous les déterminants antigéniques sont situés au niveau de la partie distale globulaire de la sous-unité HA1 de la protéine HA du virus influenza (H3N2). Ils définissent des régions immunodominantes réagissant spécifiquement avec les anticorps sans qu'il n'y ait une altération de la conformation de la protéine. Le site A forme la première boucle et est constitué des résidus d'acides aminés occupant les positions 133 et 137, 140 à 146. Le site B constitue la seconde boucle et est localisé au niveau de la base supérieure de la partie distale globulaire de la sous-unité HA1 à proximité du site anti-récepteur. Il regroupe les résidus d'acides aminés situés en position 155 à 160, 186 à 197. Le site C est situé à la limite des portions globulaire et tubulaire de la protéine, à une longueur d'environ 60 Å de la partie distale de la portion globulaire. Il est constitué par les résidus cystéines localisés en position 52 et 277. Le site D est situé à l'interface des parties globulaires de chacun des trois monomères. Il regroupe les acides aminés situés en position 202 à 220. Wiley et al. (1981) ont suggéré

l'existence d'un cinquième déterminant ou site **E**. Ce dernier serait localisé à proximité de la base de la tête globulaire et serait formé des résidus d'acides aminés en position 78 à 122.

Quant au virus influenza A (H1N1), Lubeck et Gerhard (1981) ont mentionné la présence de quatre déterminants antigéniques sur la protéine HA de la souche virale humaine A/PR/8/34(H1N1). Ces déterminants antigéniques sont classés en deux types. Les sites désignés S_a et S_b déterminent les sites antigéniques spécifiques des souches virales, tandis que ceux désignés C_a et C_b correspondent aux sites antigéniques communs à plusieurs souches. La localisation de ces sites et leur composition en acides aminés ont été déterminées sur la base de la structure primaire de la protéine HA (Caton et al., 1982). Le site S_a est constitué des résidus d'acides aminés occupant les positions 128 et 192, 158 et 160 et 162 à 167, l'acide aminé en position 164 étant exclu. Le site S_b est constitué des résidus d'acides aminés se trouvant en position 192, 193, 196, 198, 156, 159. Le site C_a est subdivisé en parties C_{a1} et C_{a2} . La partie C_{a1} regroupe les résidus d'acides aminés en position 169, 173, 207, 273, 182 et 240; tandis que la partie C_{a2} comprend les résidus d'acides aminés en position 140, 143, 145, 224 et 225. Le site C_b est formé par les acides aminés 78 à 83. La localisation des sites antigéniques sur la structure tridimensionnelle de la souche H3N2 du virus de l'influenza

humain montre que les sites S_b et C_a correspondent respectivement aux sites B et D (Wiley et al., 1981). Cependant, les sites S_a et C_b n'ont pas leur équivalent au niveau de la protéine HA du variant H3N2, bien que quelques résidus d'acides aminés du site C_{a2} correspondent à ceux du site A. La figure 4 montre la localisation des sites antigéniques des virus H1N1 et H3N2 sur l'arrangement trimérique du polypeptide HA.

Sheerar et al. (1989) et Luoh et al. (1992) ont démontré qu'il existe quatre déterminants antigéniques au niveau de la protéine HA du virus de l'influenza porcine de type A (H1N1). Jusqu'à présent, trois de ces déterminants, S_a , S_b et C_a ont été localisés sur la molécule.

2.5 Fonctions.

Trois grandes fonctions sont attribuées à la protéine HA du virus influenza A.

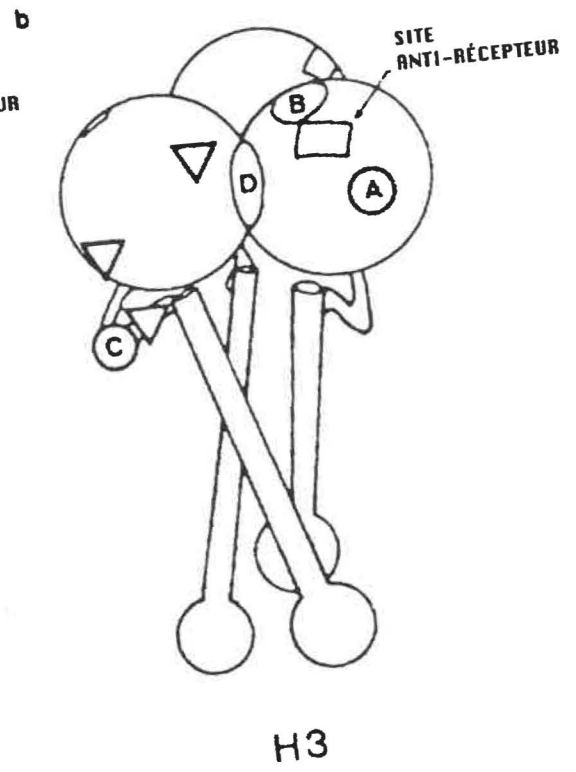
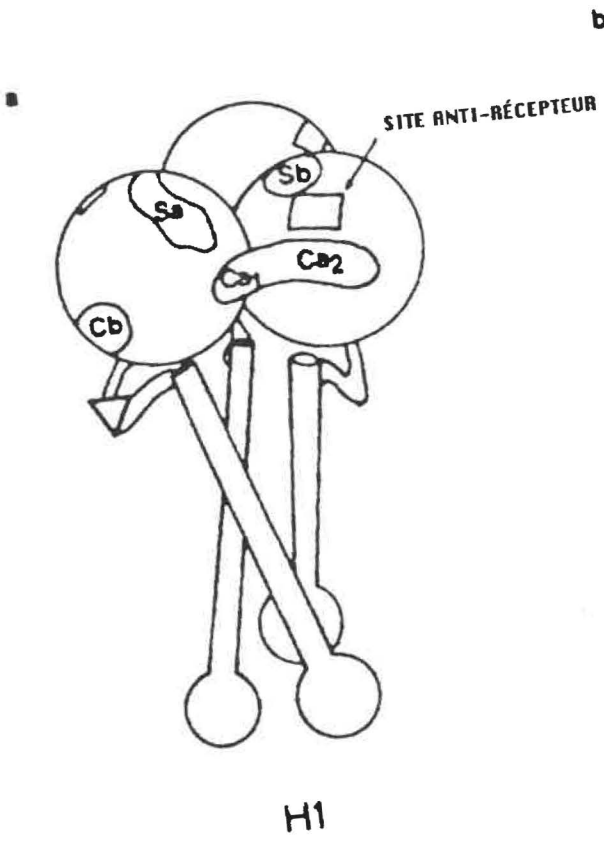
1. Le virus se lie aux résidus d'acide sialique (acide N-acétyl-neuraminique) des récepteurs cellulaires par le site anti-récepteur de sa protéine HA afin d'initier le cycle de la réplication virale (Marsh et Helenius, 1989). D'après les travaux de Wiley et Skehel (1987), le site anti-récepteur est une fosse creuse nichée dans la partie distale globulaire de la sous-unité HA1 (Wiley et Skehel, 1987). La séquence d'acides aminés qui constitue ce site (Tyr 98, Trp 153, His 183, Gly 190, Leu 194 et Tyr 195) est identique chez toutes les souches

FIGURE 4. Illustration schématique de la position des sites antigéniques des virus H1N1 et H3N2 sur l'arrangement trimérique de la protéine HA.

La figure **a** présente la localisation des quatre sites antigéniques du virus influenza A (H1N1) sur le trimère HA. Il s'agit: des sites S_a et S_b pour les sites spécifiques de souches virales et les sites C_a (C_{a1} et C_{a2}) et C_b pour ceux communs à plusieurs souches virales. La figure **b** montre la position des déterminants antigéniques du virus influenza A (H3N2): les sites A, B, C et D. Le site anti-recepteur et seulement les sites de glycosylation localisés dans la partie globulaire HA1 des virus sont représentés.

La comparaison des sites antigéniques en fonction de leur localisation sur le trimère HA montre que les sites S_b , C_a et quelques résidus du site C_{a2} du virus H1N1 correspondent respectivement aux sites B, D et A du virus H3N2.

* Adaptée selon Caton et al. (1982).



virales d'influenza appartenant aux types A et B (Weis et al.,1988). Le site anti-récepteur est entouré par les déterminants antigéniques de la protéine HA. Cependant, il demeure inaccessible aux anticorps.

2. La fusion de l'enveloppe virale à la membrane endosomale s'effectue par le peptide de fusion localisé dans la sous-unité HA2. La séquence d'acides aminés hydrophobes qui le constitue se trouve au niveau de l'extrémité N-terminale du polypeptide HA2. Lamb (1989) a rapporté à cet effet que le clivage par les enzymes cellulaires de la molécule HA en ses deux sous-unités HA1 et HA2 est un facteur essentiel pour l'infectivité du virus.

Jusqu'à présent, deux enzymes cellulaires catalysant le clivage de la protéine HA ont été identifiées, soient la trypsine initiant le clivage et la carboxypeptidase B catalysant la suppression de l'acide aminé basique (Arg) (Lamb, 1989). En plus de son rôle dans le cycle infectieux, les travaux de Rott (1992) ont démontré qu'il y avait une association entre la structure du site de clivage et la pathogénicité des souches virales. Chez les souches virales non pathogènes, un seul acide aminé basique (Arg) constitue le site de clivage; chez celles très pathogènes, en l'occurrence les sous-types aviaires H5 et H7, les travaux de Wood et al. (1994) ont démontré la présence de plusieurs résidus d'acides aminés basiques organi-

sés selon la séquence Lys-Lys-Arg-Gln-Lys-Arg. Cette présence multiple d'acides aminés basiques au niveau du site de clivage rend ce dernier accessible aux protéases cellulaires et est associée aux infections systémiques souvent fatales (Webster et al., 1982; Rott, 1992). Les mêmes auteurs ont réussi à expliquer les mécanismes associés aux changements de la structure moléculaire au niveau du site de clivage des souches virales très pathogènes, à savoir:

a. l'insertion d'acides aminés basiques suite à une mutation survenue dans le gène codant, ou une recombinaison intra-moléculaire entre les régions des génomes codant pour les protéines cellulaires et virales.

b. le dévoilement d'une séquence d'acides aminés basiques causé par la perte d'un site de glycosylation localisé à proximité du site de clivage.

3. La protéine HA est la cible majeure de la réponse immunitaire humorale protectrice, de même que de la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Wilson et Cox, 1990). Les anticorps dirigés contre les quatre déterminants antigéniques de la protéine HA neutralisent l'infectivité virale (Lubeck et Gerhard, 1981). Cependant, le mécanisme de la neutralisation diffère suivant les classes d'immunoglobulines (Ig) impliquées. Les IgA et IgM bloquent l'adhésion du virus aux récepteurs cellulaires (Taylor et Dimmock, 1985). Les IgG empêchent la

synthèse de l'ARNm en bloquant la transcription de l'ARN viral (Possee et al., 1982).

Seule la sous-unité HA1 induit une réponse de type humorale et protectrice. Les deux sous-unités HA1 et HA2 contribuent au développement de l'immunité cellulaire. Les cellules T lymphocytaires cytotoxiques sont les principales cellules stimulées et elles limiteraient la dissémination du virus chez l'hôte infecté (Gould et al., 1987).

3. Mécanismes de variation antigénique.

Parmi les trois principaux sérotypes du virus de l'influenza, le sérotype A est incontestablement celui qui démontre le plus haut niveau de diversité antigénique (Wilson et Cox, 1990). D'après Webster et al. (1982, 1992) et Domingo et al. (1993), la variation antigénique de façon générale survient à la suite de substitutions d'acides aminés au sein des protéines immunogènes. Les mêmes auteurs mentionnent trois principaux mécanismes, auxquels s'associent les particules défectueuses, qui contribuent à l'apparition de variants antigéniques. Il s'agit du glissement antigénique (Drift), la cassure antigénique (Shift) et de la recombinaison intra-moléculaire.

3.1 Le glissement antigénique (Drift antigénique).

Ce type de changement résulte de l'accumulation graduelle de mutations ponctuelle survenant au niveau du gène codant pour

les protéines immunogènes. Ces mutations ponctuelles peuvent impliquer la substitution, la délétion ou l'insertion de nucléotides dans le gène pouvant aboutir au changement d'un ou de plusieurs acides aminés dans la séquence d'acides aminés de ces protéines. De tels changements d'acides aminés survenant dans les déterminants antigéniques de la protéine HA permettent au virus d'échapper aux anticorps neutralisants (Webster et al., 1982; Raymond et al., 1983). Plusieurs facteurs favorisant la sélection de variants antigéniques du virus influenza A (H1N1) ont été rapportés.

La pression immunologique exercée par l'hôte a longtemps été suggérée (Webster et al., 1982; Raymond et al., 1983; Wilson et Cox, 1990). Cependant, ce facteur est fortement controversé de nos jours (Domingo et al., 1993). L'isolement simultané de plusieurs variants antigéniques chez un individu immunocompromis a été démontré par Rocha et al. (1991).

La pression exercée par la cellule-hôte conduit aussi à des variations antigéniques. Robertson et al. (1987) et Wood et al., (1989), associent l'apparition de variants antigéniques avec le passage successif du virus dans les œufs embryonnés. L'altération des caractéristiques biochimiques et antigéniques qui en résultent ont été attribuées à:

- la substitution d'acides aminés à proximité du site anti-récepteur et affectant les déterminants antigéniques avoisinants (Katz et al., 1987)
- au camouflage du site antigénique à la suite de l'apparition d'un site de glycosylation dans la partie distale globulaire près du site anti-récepteur (Inkster et al., 1993).
- aux erreurs de lecture de l'ARN polymérase du génome viral qui contribuent à l'apparition de variants antigéniques (Rocha et al., 1991 ; Domingo et al., 1993). Puisque l'ARN polymérase du virus intervient dans la réplication virale, son incapacité à corriger les erreurs de mutation survenues dans le génome peut occasionner l'apparition de mutants génomiques. Ces deux chercheurs affirment qu'il existerait ainsi une population virale hétérogène constituée entre autre par un faible pourcentage de mutants. Steinhauer et Holland (1987) ont rapporté que la sélection positive d'un mutant était liée à un changement environnemental causé en grande partie par les particules défectueuses.

Un mécanisme mimant le "glissement antigénique" a été suggéré par Luoh et al. (1992) comme étant responsable de l'apparition de variants antigéniques du virus influenza porcine

A (H1N1). Il s'agit de substitutions d'acides aminés ayant été localisées en dehors du site antigénique et qui affectent les caractéristiques biochimiques et antigéniques du virus, tel que démontré par Kilbourne et al., (1979) et Both et al., (1983).

3.2 Le mécanisme de recombinaison génétique (Shift antigénique).

Des modifications majeures de l'antigénicité de la protéine HA surviennent lorsqu'il y a un changement complet du gène codant. Deux mécanismes associés à ce processus ont été rapportés:

- a. La recombinaison entre les différents segments d'ARN viral de souches animales et humaines a été mentionnée par Webster et al. (1982, 1992). La nature segmentée du génome viral favorise ce réassortiment génétique et a été considérée comme le principal mécanisme associé à la formation des trois sous-types de virus responsables des pandémies grippales chez l'homme. Il s'agit de sous-types H1N1, H2N2 et H3N2 apparus respectivement en 1933, 1957 et 1968, avec la réapparition du sous-type H1N1 en 1977.
- b. L'introduction de nouvelles souches virales phylogéniquement différentes ou provenant d'une autre zone géographique a aussi été rapportée (Donatelli et al., 1991 ; Olsen et al., 1993).

3.3 Le mécanisme de recombinaison intramoléculaire.

La recombinaison entre les gènes cellulaires et viraux a été rapportée par Webster et al. (1982, 1992). Le réassortiment entre les différents segments génomiques se traduit par l'insertion d'acides aminés au niveau du site de clivage protéolytique. Rott (1992) a associé ce changement moléculaire de la structure du site de clivage à l'apparition de variants antigéniques.

4. Les différents types du virus de l'influenza chez le porc.

Les sérotypes A et C du virus de l'influenza ont été associés aux infections grippales chez l'espèce porcine.

L'infection naturelle de porcs par une souche du virus de l'influenza appartenant au sérotype C a été démontrée pour la première fois en Chine (Yuanji et Desselberger, 1984). Il avait été alors démontré que la souche virale porcine était antigéniquement apparentée à la souche humaine C/New Jersey/1/76 et pouvait expérimentalement se transmettre d'un porc à l'autre.

Les sérotypes H1N1, H3N2 et H1N2 sont les trois principaux sous-types du virus de l'influenza de type A ayant été isolés de porcs (Webster et al., 1992; Castrucci et al., 1993). Toutefois, le sérotype H1N1 est celui qui est le plus communément associé à des problèmes respiratoires chez cette espèce

animale. Chambers et al. (1991) ont indiqué une prévalence d'infection de plus de 51 % chez les porcs des états du Centre et du Nord des Etats-Unis. La situation est similaire au Canada, en particulier au Québec où une prévalence de 42,8 % a été rapportée en 1974 (Gagnon et al., 1974). En Europe, le virus A (H1N1) a été isolé pour la première fois en Italie (Donatelli et al., 1991) et circule actuellement dans tous les pays de l'Europe Occidentale et du Nord (Haesebrouck, 1986). La majorité des épidémies sévères de grippe porcine survenues au Canada (Morin et al., 1981), en Italie (Donatelli et al., 1991) et plus récemment en Angleterre (Brown et al., 1993) ont été attribuées au sérotype H1N1.

Les analyses sérologiques réalisées par Hinshaw et al. (1984), de même que celles des séquences nucléotidiques du gène codant pour la protéine HA effectuées par Scholtissek et al. (1983) et Neumeier et Meier-Ewert (1992) ont révélé l'existence de deux variants antigéniques du sérotype H1N1 chez l'espèce porcine. Ces deux variants ont une distribution géographique différente. Celui circulant en Amérique du Nord, ou variant "US", est d'origine porcine. Celui circulant en Europe est plutôt d'origine aviaire. Il semble toutefois que ces deux variants circulent simultanément en Italie (Donatelli et al., 1991).

Pour ce qui est du sérotype H3N2, il semble que deux variants antigéniques phylogéniquement différents existent chez l'espèce porcine: l'un d'origine humaine et l'autre aviaire (Webster et al., 1993). Chambers et al. (1991) ont estimé à 11,1 % le taux d'infection de la population porcine dans les états au Sud des Etats Unis. Au Canada, une prévalence sérologique de 6,7 % a été rapportée parmi les élevages de la province de Québec (Gagnon et al., 1974). Ce virus a aussi été isolé chez les porcs en Asie (Kundin, 1970) et en Europe (Haesebrouck, 1986).

En Taiwan et au Sud-Est de la Chine, des virus H3N2 d'origine aviaire et humaine ont été isolées chez les porcs (Kida et al., 1988).

Il semble que le variant H1N2 soit un virus réassorti et qu'il ait été isolé chez des porcs au Japon à la suite d'une infection mixte par les souches virales humaines H1N1 et H3N2 (Sugimura et al., 1980). La transmission de ce virus recombinant d'un porc à l'autre n'a pas encore été rapportée.

Une étude phylogénique rétrospective, ayant été réalisée à l'échelle internationale, a permis d'établir que la souche A/Swine/Hong Kong/126/82 était issue d'un phénomène de recombinaison génétique s'étant opéré chez l'espèce porcine entre une

souche aviaire (H3N2) et une souche humaine (H3N2) (Castrucci et al., 1993).

5. Stabilité antigénique du virus influenza porcin.

Le sérotype H1N1 du virus influenza porcin de type A, le plus répandu en Amérique du Nord, a témoigné d'une grande stabilité antigénique et génétique depuis 1965. Les études sérologiques et génétiques effectuées sur des souches du virus isolées de 1965 à 1988 (Sheerar et al., 1989; Luoh et al., 1992) et de 1986 à 1991 (Noble et al., 1993) ont montré que la protéine HA avait grandement préservé ses propriétés antigéniques au cours de ces années. Le mécanisme exact permettant d'expliquer cette stabilité antigénique parmi les isolats de ce virus n'a pas encore été élucidé, mais plusieurs hypothèses ont été émises:

a. D'après Meier-Ewert et Dimmock (1970) et Hinshaw et al. (1978b), la pression immunologique exercée par l'hôte favorisant la sélection de variants antigéniques est quasi-inexistante chez le porc. Ceci serait attribuable au fait que les porcs vivent en promiscuité et ont une courte espérance de vie. La perpétuité du cycle de réplication virale est de ce fait assurée par le transfert successif du virus dans une large population porcine, plutôt juvénile et non immune.

b. La grande stabilité antigénique du virus influenza porcin de type A (H1N1) a été associée au fait qu'il y avait une faible évolution moléculaire du gène codant pour la protéine HA. Sugita et al. (1991) ont démontré un taux de substitution nucléotidique de 0,0041 par site antigénique par an. Ces auteurs ont estimé ce taux comme étant non significatif par comparaison à celui de substitutions nucléotidiques silencieuses (0,0116). Luoh et al. (1992) ont rapporté des taux annuels de substitution d'acides aminés compris entre 0,40 % et 0,48 % s'établissant au niveau de la protéine HA. Par ailleurs, leurs travaux ont démontré que les substitutions par les acides aminés Asp, Glu, Glu survenues respectivement dans les sites C_a, S_b et S_a de la protéine HA des souches virales isolées entre 1965 et 1982 n'ont pas affecté les caractéristiques antigéniques de la protéine.

c. Inskter et al. (1993) ont attribué la grande stabilité antigénique du virus à l'absence de sites de glycosylation dans la partie distale globulaire de la sous-unité HA1 à proximité du site anti-récepteur. Ces chercheurs ont démontré que l'apparition de sites de glycosylation consécutive à la pression sélective de la cellule-hôte pouvait modifier les propriétés antigéniques de la protéine HA par camouflage des déterminants antigéniques localisés dans cette région.

6. Le rôle du porc comme hôte intermédiaire dans la transmission du virus.

Deux facteurs essentiels définissent le rôle déterminant du porc dans la transmission du virus influenza. D'une part, la grande susceptibilité du porc à s'infecter avec les souches virales humaines et aviaires et d'autre part, la transmission du virus influenza du porc aux humains et aux espèces aviaires (Webster et al., 1992, 1993).

La transmission du virus influenza porcin (H1N1) aux espèces aviaires a été largement mise en évidence avec l'isolement de ce virus chez les canards et les dindes en Amérique du Nord (Hinshaw et al., 1978a), en Chine (Butterfield et al., 1978) et en Europe (Ottis et Bachman, 1980). Le mécanisme exact par lequel les canards contractent le virus n'a pas encore été démontré. Expérimentalement, la présence du virus a été mise en évidence dans le tractus respiratoire et non dans le tube digestif (localisation naturelle du virus). L'isolement du virus influenza porcin chez les dindes a aussi été démontré par Hinshaw et al. (1983) et Aymard et al. (1985). De même, la transmission de cette souche virale des dindes aux humains a aussi été rapportée (Hinshaw et al., 1983).

En ce qui concerne la transmission du virus influenza porcin à l'homme, Smith et al. (1976) furent les premiers à signaler l'isolement d'un virus influenza porcin de type A

(H1N1) à partir des tissus pulmonaires d'un jeune garçon de 14 ans atteint de la maladie de Hodgkin. Depuis cette date, des cas sporadiques de transmission du virus influenza porcine aux humains ont été rapportés presque chaque deux ans. En 1976, la transmission du virus porcine a été mise en évidence chez des soldats (500 personnes) de l'armée américaine localisés au Fort Dix dans le New Jersey (Top et Russel, 1977; Kendal et al., 1977; Gaydos et al., 1977). Huit ans plus tard, Patriaca et al. (1984) ont isolé le virus porcine chez une fillette du Nevada, âgée de 4 ans et atteinte d'un syndrome lymphoblastique. La même année, Dasco et al. (1984) ont signalé l'infection de deux garçons âgés de 6 et 20 ans par le virus porcine dans le Sud-Est du Texas. En 1989, l'isolement du virus influenza porcine associé à des infections post-partum a été rapporté chez une jeune femme du Wisconsin (Rota et al., 1989). Enfin, plus récemment, Wentworth et al. (1994) sont parvenus à isoler une souche d'influenza virus porcine chez un éleveur de porcs de l'état du Maryland. La transmission du virus chez tous ces individus est survenue par suite d'un contact avec des porcs, sauf pour le cas rapporté par Patriaca et al. (1984).

De façon similaire, la transmission naturelle de souches de virus influenza humain et ou d'espèces aviaires aux porcs a aussi été démontrée. En Amérique du Nord, Pensaert et al. (1981) ont isolé chez le porc un virus influenza de type A

(H1N1) provenant de canards. Par la suite, les analyses sérologiques réalisées par Hinshaw et al. (1984), de même que les travaux de Scholtissek et al. (1983) et de Neumeier et Meier-Ewert (1992) au niveau du gène de la protéine HA, ont révélé que le virus influenza porcine A (H1N1) circulant en Europe est d'origine aviaire.

Kida et al. (1988) sont les premiers à avoir démontré la transmission du virus influenza humain au porc. Il s'agit du sous-type H3N2 isolé chez les porcs en Taïwan et au Sud de la Chine.

Le rôle du porc comme hôte intermédiaire ("mixing vessel") dans l'émergence des nouveaux variants antigéniques pouvant être associés à une nouvelle pandémie de grippe humaine est sérieusement étudié de nos jours. En plus des preuves sérologiques suggérant l'infection des porcs par le virus recombinant H1N2 (Sugimura et al., 1980), les travaux de Castrucci et al. (1993) ont démontré que le virus H3N2, en l'occurrence la souche A/Swine/Hong Kong/126/82, est un virus recombinant (H3N2) ayant été engendré de façon naturelle chez les porcs entre 1983 et 1985. Ce virus réassorti comprend les gènes codant pour les protéines internes PB1 et PA du sous-type H3N2 aviaire et les autres gènes ont été obtenus d'un variant H3N2 humain. Ainsi, ces chercheurs ont été les premiers à démontrer qu'un mécanisme de réassortiment génétique entre des

souches humaines et animales pouvait s'effectuer chez le porc. Toutefois, un tel mécanisme n'a assurément pas été impliqué dans l'évolution des souches H1N1 plus communément isolées de l'espèce porcine en Amérique du Nord entre 1976 et 1990 (Wright et al., 1992).

7. La grippe porcine classique.

La grippe porcine causée par le virus influenza type A est habituellement une maladie respiratoire aiguë, à caractère épidémique et de nature très contagieuse (Easterday, 1986). Elle est d'apparition soudaine et la transmission se fait rapidement à l'ensemble du troupeau (Haesebrouk, 1986). Le mode de transmission, encore méconnu, semble s'effectuer par les aérosols, la voie d'entrée du virus étant principalement le nasopharynx. Les épidémies sont généralement saisonnières, bien que l'infection et la maladie puissent être rapportées durant toute l'année (Easterday, 1986).

Cliniquement, la maladie se caractérise par de l'anorexie ou une baisse de l'appétit, une fièvre habituellement élevée (42,2°C), une dyspnée (respiration saccadée) accompagnée d'une toux paroxystique. On note le plus souvent une conjonctivite et des écoulements nasaux et oculaires. Les animaux sont habituellement léthargiques et perdent du poids (Easterday, 1986). La maladie dure de 5 à 7 jours et généralement la guérison est très rapide, sauf dans de rares cas où une

pneumonie peut conduire à la mort (Kilbourne, 1987). Les taux de mortalité sont habituellement très faibles, variant de 1 à 4 % (Haesebrouck, 1986; Kilbourne, 1987). Toutefois, la morbidité est très élevée et les animaux de tous les âges sont affectés. La sévérité de la maladie dépend de plusieurs facteurs dont le stress (Easterday., 1986), la régie (problèmes de ventilation, humidité, entassement des animaux, absence de compartimentation) et les conditions de l'environnement pouvant favoriser les infections bactériennes secondaires (Haesebrouck, 1986; Kilbourne, 1987). Au sein des élevages pratiqués en "tout plein-tout vide", souvent seuls les truies et porcs adultes développent la maladie, les jeunes porcelets étant protégés momentanément par l'immunité acquise par les anticorps maternels (Easterday, 1986). La fièvre peut entraîner des problèmes d'avortement chez les truies et une baisse de fertilité chez les mâles. La transmission trans-placentaire des sérotypes H1N1 et H3N2 entraîne des problèmes de la reproduction, notamment des taux anormaux de porcelets morts-nés (Gourreau et al., 1985). Cependant, Haesebrouck (1986) a rapporté que ceci aboutit rarement à des problèmes d'avortement et de développement de foetus.

Du point de vue pathologique, les lésions se localisent au niveau du tractus respiratoire (Easterday, 1986). Les lésions macroscopiques diffèrent suivant que l'infection soit

naturelle ou expérimentale (Easterday, 1986). Les poumons démontrent une coloration rouge-prune avec des lobes clairement délimités et une hypertrophie des ganglions lymphatiques souvent œdemateux (Kilbourne, 1987). En cas de pneumonie cranio-ventrale bilatérale, les lobes pulmonaires caudaux sont affaissés et rouges vifs; les lobes craniaux, moyens et accessoires sont aussi affectés (Morin et al., 1981). Les lésions microscopiques consistent en une bronchiolite et bronchite aiguës accompagnée d'une nécrose intense de l'épithélium bronchiolaire et une pneumonie sérocellulaire affectant le plus souvent les lobes cranio-ventraux (Easterday, 1986).

8. La pneumonie proliférative et nécrosante (PPN).

8.1 Définition clinique.

La PPN est un nouveau type de pneumonie. Ce syndrome respiratoire méconnu, est apparu pour la première fois au Québec en automne 1988 (Morin et al., 1990) et par la suite dans d'autres provinces du Canada, dont le Manitoba (Austin et Bystrom, 1991) et l'Ontario (Thomson et Carman, 1991). Bien qu'un nouveau variant du virus influenza porcin de type A (H1N1) a été premièrement associé à ce nouveau syndrome (Morin et al., 1990; Dea et al., 1992b), plusieurs études démontrent l'existence d'autres virus comme agents responsables dans l'étiologie de ce syndrome ou comme facteurs prédisposant à l'affection. En 1992, les travaux de Dea et al. (1992b)

montraient la présence d'anticorps contre le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (SRRP) chez des porcs affectés par la PPN. Un année plutard Magar et al. (1993) rapportait l'isolement du virus SRRP des poumons de porcs atteints de PPN. En 1994, les travaux de Larochelle et al. (1994) et ceux de Magar et al. (1994) démontrèrent une fois de plus l'isolement du virus SRRP à partir des poumons de porcs (provenant respectivement du Québec et de l' Ontario) présentant des lésions PPN , sans évidence de présence de virus de l'influenza. Très récemment, Bikour et al. (1994) ont rapporté l'isolement d'un variant H3N2 du virus de l'influenza type A à partir des tissus pulmonaires de porcs démontrant des lésions de PPN, sans toutefois rapporté la reproduction expérimentale de la maladie.

Cliniquement, la maladie est très contagieuse et la contamination du troupeau s'effectuerait après l'introduction de porcs infectés dans un troupeau sain. Les porcelets dans les pouponnières et dans les locaux d'engraissement, âgés entre 4 et 16 semaines, constituent la population cible (Girard et al., 1992).

Les signes cliniques observés sont une fièvre prolongée, une dyspnée et polypnée, une respiration de type abdominale, mais comparativement à la grippe conventionnelle ou classique les porcs ne toussent pratiquement pas (Morin et al., 1990 ;

Dea et al., 1992b). La morbidité est très élevée (Morin et al., 1990). Des taux élevés de mortalité chez les nouveaux-nés et les porcelets non-sevrés ont été rapportés (Dea et al., 1992b). Les infections secondaires multiples d'origine virale (cytomegalovirus), bactériennes (Haemophilus parasuis, Streptococcus suis) et parasitaires (Pneunocystis carinii) qui accompagnent la maladie suggèrent un état d'immunodéficience chez les porcs affectés (Morin et al., 1990).

8.2 Lésions macroscopiques.

A la nécropsie, les poumons ont souvent une apparence de mosaïque ou chair de poisson, ils sont de couleur rouge-prune ou grisâtre, pesants, caoutchouteux et très congestionnés (Morin et al., 1990). On dénote souvent la présence d'une hypertrophie marquée des ganglions médiastinaux et bronchiques, de même qu'une broncho-pneumonie purulente affectant les lobes cranio-ventraux. La coupe transversale des poumons montrent un parenchyme similaire au thymus.

8.3 Les lésions histologiques.

Les lésions histologiques ayant été décrites sont de trois types: exsudatives, prolifératives et nécrotiques (Morin et al., 1990 ; Dea et al., 1992b).

Les lésions exsudatives se caractérisent par la présence d'un exsudat riche en protéines et macrophages dans la lumière

des alvéoles pulmonaires. En plus, on dénote la présence de débris de cellules nécrotiques et de syncytia dans la lumière des canaux alvéolaires et une infiltration marquée des septa alvéolaires par des cellules mononuclées ou lymphoplasmocytaires.

Les lésions prolifératives se résument principalement à une prolifération marquée des pneumocytes de type II entraînant une épithélialisation alvéolaire. Une hyperplasie focale de l'épithélium bronchiolaire peut être observée.

L'aspect nécrotique est représenté par la présence de débris cellulaires (macrophages et cellules épithéliales) dans les alvéoles. On dénote aussi des foyers de nécrose au niveau de l'épithélium bronchoalvéolaire.

8.4 Caractéristiques sérologiques et génétiques du virus.

8.4.1 Caractérisation sérologique.

Morin et al. (1990) furent les premiers à démontrer la présence d'antigènes du virus de l'influenza au niveau des tissus pulmonaires des porcelets affectés par la PPN, et un virus influenza de type A fut cultivé dans les œufs embryonnés de poule. Initialement, aucune réactivité croisée n'a été observée entre ce virus influenza porcine et les différents sous-types humains (H1N1, H2N2 et H3N2) (Morin et al., 1990; Dea et al., 1992b). Plus tard, Dea et al. (1992b) ont

démontré par des analyses sérologiques (tests d'IHA) que la protéine HA du virus de l'influenza porcine associé aux lésions de PPN est antigéniquement apparentée mais distincte de celles des souches virales H1N1 communément isolées aux Etats-Unis et au Québec. La maladie a pu être reproduite expérimentalement chez des porcelets gnotobiotiques inoculés par la voie intranasale avec les préparations purifiées de ce nouveau variant ne démontrant qu'une réaction antigénique partielle contre les souches de référence A/Swine/New Jersey/8/76 et QC81 (Dea et al., 1992b).

8.4.2 Caractérisation génétique.

La cartographie des oligonucléotides générés à la suite de la digestion par la ribonucléase T1 de l'ARN génomique total du variant H1N1 associé aux lésions de PPN, de même que la séquence nucléotidique du gène codant pour la sous-unité HA1, ont été réalisées et comparées à celles de la souche de référence (QC81) (Rekik et al., 1994). L'ARN génomique du nouveau variant québécois montre un niveau de divergence d'au moins 5% avec celui de la souche QC81. La séquence d'acides aminés du polypeptide HA1 du nouveau variant démontre au moins 14 substitutions. Parmi ces substitutions d'acides aminés, certaines affectent les sites antigéniques C_a et S_b et un site de glycosylation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1. Source du virus.

Les différentes souches virales utilisées ont été obtenues du laboratoire du Professeur Serge Dea, Centre de Recherche en Virologie à l'Institut Armand-Frappier. La souche QC91 de même que les isolats IAF-Klop et IAF-1747 ont été isolés de porcelets à l'allaitement et de porcs à l'engraissement dont les poumons présentaient des lésions de PPN (Dea et al., 1992b). Les souches du virus influenza QC81 et A/Swine/Québec/1192/87(H1N1) (IAF-1192) ont été isolées de porcs malades lors d'épidémies de grippe porcine classique survenues au Québec respectivement en 1981 (Morin et al., 1981) et 1987. La souche virale IAF-1192 a été obtenue du Docteur Grégoire Marsolais, Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.

2. Production des différentes souches virales.

Les différentes souches de virus influenza porcine ont d'abord été clonées par la technique de plages en utilisant une lignée cellulaire continue de rein de chien (Madin Darby canine kidney (MDCK); American Type Culture Collection N° CCL34, Rockville, Maryland, USA). Après le clonage, des stocks des différents isolats ont été préparés à la suite de leur propagation dans des œufs embryonnés de poule de 11 jours d'âge. Les liquides allantoïdiens ont été récoltés stérilement et testés par l'épreuve d'hémagglutination afin de déterminer la présence

du virus. Les liquides positifs en virus influenza ont été par la suite aliquotés et conservés à -80°C .

Les différents isolats de virus de l'influenza porcine ont été produits dans des œufs embryonnés de poule de 11 jours d'âge selon la technique standard "WHO collaborating centers for reference and research on influenza (1982)". Les œufs étaient d'abord mirés à l'aide d'une lampe dans le but de vérifier la viabilité de l'embryon et de localiser la chambre à air à travers laquelle s'effectuait la ponction. Ensuite chaque œuf était inoculé avec 0,2 ml de préparation virale dont la dose infectieuse avait été préalablement ajustée à 2 unités hémagglutinante/ml (UHA/ml) dans du PBS. Les œufs étaient par la suite incubés à 34°C en atmosphère humide pendant 48 heures (hres), puis à 4°C pendant 17 hres afin d'éviter l'éclatement des vaisseaux sanguins durant le prélèvement. Le liquide allantoïdien infecté fut récupéré dans des bouteilles stériles contenant 0,02% d'azoture de sodium (NaN_3) et conservé à 4°C . Avant l'étape de purification, le liquide allantoïdien était clarifié par filtration à travers de la laine de verre (Pyrex Fiber Glass, Corning, New York, USA).

3. Purification de virus.

La technique décrite par Arora et al. (1985) fut utilisée. Cette technique consistait en une étape de concentration suivie de la purification en deux étapes.

3.1 Étape de concentration.

Dans un tube de polyallomère de 30 ml (Beckman, Toronto, Ontario, Canada), on déposait préalablement 1,0 ml d'une solution de 50 % (p/p) de saccharose ultra pure (Canadian Scientific Products, London, Ontario, Canada) dans du PBS additionné de 0,04% NaN_3 . Ce premier coussin était congelé dans de l'azote liquide pendant 30 secondes (sec). Puis 2,0 ml d'une solution de saccharose de 22 % (p/p) était déposé dans le même tube et congelé comme mentionné précédemment. Les tubes étaient ensuite remplis avec 30 ml du liquide allantoïdien infecté et centrifugés à 100 000 x g durant 1 hre à 4°C. Le surnageant était rejeté par aspiration en ne laissant que 3,0 ml en dessus du coussin de saccharose. Le culot contenant les particules virales, ainsi que le coussin de saccharose, étaient de nouveau congelés dans de l'azote liquide afin de procéder à une seconde centrifugation du liquide allantoïdien. Le liquide allantoïdien concentré était par la suite récupéré en vue de l'étape de purification.

3.2 Étape de purification.

Le liquide allantoïdien concentré était d'abord dispersé trois fois durant 10 sec à l'aide d'un appareil à ultrasons (Sonic dismembrator, Fisher Scientific, Farmingdale, New York, USA) à une intensité de 30 megahertz/sec, puis clarifié par centrifugation à 1000 x g pendant 10 minutes (min) à 4°C.

Après avoir rajusté la concentration en saccharose de la suspension virale à 50 % (p/p), on procédait à l'étape de centrifugation à 100 000 x g pendant 90 min à 4°C. Le surnageant était ensuite récupéré et la concentration en saccharose était par la suite ramenée à 26 % (p/p) avec du PBS. Une dernière centrifugation à 100 000 x g pendant 90 min 4°C permettait la sédimentation des particules virales qui étaient finalement resuspendues dans 0,2 ml de PBS et conservées à -80°C avant usage.

3.3 Test d'hémagglutination.

La technique préconisée par le "WHO collaborating centers for reference and research on influenza (1982)" a été utilisée. Un volume de 0,05 ml de PBS était déposé dans les puits d'un plateau de microtitrage de 96 puits à fond conique (Linbro, Flow, Mississauga, Ontario, Canada), laissant les premières rangées intactes. Ensuite 0,1 ml de la suspension virale à titrer était déposé dans les puits des premières rangées et une dilution en série logarithmique de base deux était effectuée. Un volume de 0,05 ml d'une suspension fraîche et homogène d'érythrocytes de coq (0,5%) était ensuite ajouté dans chaque puits. Les plateaux étaient couverts, agités manuellement et incubés à la température de la pièce (TP) pendant 30 min. Tous les tests étaient effectués en duplicata. Les titres d'hémagglutination (HA/ml) furent exprimés selon la réciproque de la

plus haute dilution de la suspension virale au delà de laquelle existait une absence totale d'hémagglutination caractérisée par la présence d'un bouton ou culot bien délimité de globules rouges. Une réaction positive était caractérisée par la présence d'un tapis d'érythrocytes adhérent au fond du tube, plutôt que par la présence d'un bouton d'érythrocytes pouvant facilement se défaire suite à une légère agitation.

3.4 Détermination de la concentration protéique.

La technique décrite dans le manuel du laboratoire Pierce (Chemical Company, Rockford, Illinois, USA) a été utilisée pour déterminer la teneur en protéines de la préparation virale purifiée. Une solution contenant 1 mg/ml d'albumine sérique bovine (BSA), (RIA Grade, Sigma, Anachemia, Montréal, Québec, Canada) fut utilisée pour l'établissement de la courbe étalon. La solution de travail était d'abord préparée en mélangeant le réactif A (acide bicinchoninic) au réactif B dans des proportions de 50:1 (Voir annexe I point 6). Ensuite 1,0 ml de cette solution était rajouté à 0,1 ml de l'échantillon à doser et à la préparation standardisée de BSA. Les tubes étaient alors incubés dans un bain-marie à 60°C pendant 1 hre. Après refroidissement, les densités optiques (DO) étaient lues au spectrophotomètre (Carry (1E) U.V - Visible Varian, Australia) à une longueur d'onde de 562 nm. La quantité de protéines dans l'échantillon était ensuite déterminée à partir de la courbe

étalon établie à partir des DO obtenues pour les différentes dilutions de la solution de BSA (voir annexe II point 4).

3.5 Analyse de la pureté des préparations virales purifiées.

Le degré de pureté des préparations virales purifiées QC91 et QC81 a été déterminé par des analyses d'électrophorèse sur gels discontinus de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) suivant la technique décrite par Laemmli (1970). Les suspensions virales, ajustées à une concentration protéique de 0,010 mg, furent ajoutées à la solution "tampon échantillon" (0,025 M Tris- HCl pH 6,8, contenant 10% (p/v) de SDS, 20 % (v/v) de glycérol, 0,02 % (p/v) de NaN_3 , 0,01 % de bleu de bromophénol et 0,1 % (v/v) de β -mercaptoéthanol(2-ME)) et portées à ébullition pendant 2 min afin de permettre la dénaturation des protéines virales. Des gels de séparation et de regroupement de 1 centimètre d'épaisseur furent coulés entre deux plaques de verre du système d'électrophorèse (Mini-ProteanII Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories, Ltd., Richmond, Californie, USA.). Le gel de concentration contenant 4% de polyacrylamide et 0,1 % de SDS fut préparé dans du tampon Tris - HCl 0,125 M, pH 6,8. Le gel de séparation, contenant 12,5% de polyacrylamide et 0,1 % SDS, fut préparé dans le tampon Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8. Après polymérisation des gels à la TP, les échantillons étaient déposés sur le gel et l'électrophorèse était effectuée sous une

tension constante de 200 V pendant 45 min en utilisant comme tampon de réservoir une solution Tris 25 mM, pH 8,3, contenant 0,1 % SDS et 192 mM de glycine. Une quantité déterminée d'un mélange de protéines standards (1 µg) (Bio-Rad) de hautes et faibles Mr fut aussi traitée et analysée de la même façon. Ce mélange comprenait: la *myosine* (200 kDa), la *β galactosidase* (116,5 kDa), la *phosphorylase b* (97,4 kDa), la *BSA* (66,2 kDa), l'*ovalbumine* (45 kDa), l'*anhydrase carbonique bovine* (31 kDa), l'*inhibiteur de trypsine* de la fève de soya (21,5 kDa) et le *lysozyme* (14,4 kDa).

4. Production des virus en cultures cellulaires.

4.1 Conditions de culture.

Les cellules MDCK étaient divisées tous les quatre jours pour leur maintenance. Pour la division des cellules, les surnageants de culture étaient d'abord rejetés et les feuillets cellulaires étaient lavés une fois pendant 2 min avec de la trypsine TRL 0,01 % (Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, USA) additionnée d'EDTA 0,04%. Les cellules étaient ensuite incubées avec la même trypsine pendant 15 min à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO₂. Les cellules dispersées étaient comptées et leur viabilité était estimée après une coloration au bleu de trypan. Le milieu de culture consistait en un mélange 50:50 des milieux MEM avec la base saline de Earle (Gibco, BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg,

Maryland, USA) et MEM avec la base saline de Hank's (Gibco) auxquels étaient ajoutés 0,2% de gentamycine, 0,1% d'amphotéricine (Fungizone^r), 1% de L-glutamine et 10% du sérum foetal bovin (SBF, Gibco). Les cultures cellulaires étaient incubées jusqu'à confluence à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO₂.

Pour la propagation virale, les feuillets confluent étaient d'abord lavés deux fois avec le tampon PBS. Ensuite, un volume de 0,5 ml de la suspension virale ajustée à la concentration de 1 UHA /ml était doucement ensemencé sur ces feuillets cellulaires. Après une période d'absorption d' 1 hre à 37°C, on rajoutait du milieu 50:50 sans sérum mais contenant 10 unités par ml de trypsine TPCK (Sigma Chemical, Co., St-Louis, Missouri, USA). Les cellules infectées étaient incubées comme décrit précédemment jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathique maximal (48 hres). Après trois cycles de congélation-décongélation, les surnageants de culture étaient clarifiés par centrifugation à 5000 x g pendant 20 min, puis conservés à -70°C avant l'étape de purification.

4.2 Technique de plages.

La technique décrite par Tobita et al. (1975) et le protocole préalablement établi dans notre laboratoire (Fouchard-Gabriel, 1985) ont été utilisés. Comme décrit précédemment, les cellules MDCK étaient mises en culture à la

concentration de 100 000 cellules par ml dans les puits d'un plateau de culture de 60 mm de diamètre (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario, Canada) à raison de 5,0 ml par puits. Les cellules étaient incubées à 37°C en atmosphère enrichie de 5% de CO₂ jusqu'à l'obtention d'un feuillet confluent (72 hres). Les feuillets cellulaires étaient par la suite lavés deux fois avec du PBS, puis inoculés avec 0,2 ml de suspension virale diluée en série logarithmique de base deux avec du PBS contenant 0,2 % de BSA. Après une période d'adsorption d'1 hre à 37°C, un volume de 5,0 ml de milieu de maintien ajusté à 42°C était ajouté dans chaque puits. Le milieu de maintien (voir annex I.4) était constitué du milieu MEM-Earle's supplémenté de 0,2 % de BSA, 0,2 % de glucose, 10 unités par ml de trypsine TPCK, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, 0,22% de bicarbonate de sodium, 100 µg/ml de diethyl-aminoethyl dextran (Pharmacia, Uppsala, Sweden) et 1% d'agar Oxoid L28 (Oxoid Limited, Basingtoke, Hampshire, England). Après gélification de l'agar à la TP pendant 20 min, les cellules étaient incubées comme décrit précédemment, les plateaux étant toutefois inversés. Les plages devenaient habituellement visibles après trois jours d'incubation. Les feuillets étaient par la suite fixés à l'aide d'une solution de 5% de formaldéhyde pendant 15 min à la TP, puis colorés au violet de gentiane 0,1 % pendant 1 min afin de permettre la révélation des plages.

Le titre viral fut ensuite calculé selon la formule décrite dans l'annexe II.1.

5. Production de sérum hyperimmun chez les lapins.

Quatre lapins albinos de Nouvelle Zélande (Fermes de Sélection Cunipur, Saint Valérien, Québec, Canada.), âgés de 11 à 12 semaines et pesant environ 2,5 kilogrammes, ont été inoculés avec les virus purifiés QC81 et QC91 suivant le protocole décrit par Schild et Pereira (1969). Les lapins ont reçu une première dose de 0,1 mg de protéines virales (0,5 ml) mélangées à un volume égal (0,5 ml) d'adjuvant complet de Freund (Difco, Laboratories. Détroit, Michigan, USA) par la voie intramusculaire. Après une période de 7 jours, les lapins furent réinjectés par la voie intramusculaire avec une dose de 0,1 mg de protéines virales mélangées à un volume égal d'adjuvant incomplet de Freund (Difco). La dernière injection ou dose de rappel a été effectuée 45 jours après la seconde injection; les lapins reçurent une dose finale de 1,0 ml d'une suspension contenant 0,15 mg de protéines virales mélangées à un volume égal d'adjuvant incomplet de Freund. Cette dernière injection fut donnée par la voie sous cutanée à des sites multiples. Les lapins ont été saignés par ponction de la veine marginale de l'oreille avant et après chaque série d'injection afin d'obtenir du sérum préimmun (témoin négatif) et de permettre le suivi de la cinétique d'apparition des anticorps.

La dernière saignée a été effectuée par ponction intracardiaque 10 jours après la dernière dose de rappel.

6. Production de sérum hyperimmun chez les porcelets.

Des porcelets (deux porcelets par souche virale) exempts de pathogènes spécifiques (E.O.P.S) et âgés de 4 à 5 semaines ont été inoculés à trois occasions par la voie intranasale à l'aide des préparations purifiées des virus QC91 et QC81. Ces injections ont été données à des intervalles de 2 semaines. A chaque occasion, les animaux reçurent environ 0,5 mg de protéines virales. La quatrième injection consistait en un mélange égal de protéine virale (0,5 mg) et d'adjuvant incomplet de Freund injecté par la voie intramusculaire (quadriceps). Les animaux ont été saignés par ponction cardiaque, sous anesthésie au pentobarbital, aux jours 63 et 7. Pour les expériences d'immunisation des porcelets un lot constitué au minimum de trois porcelets non immunisés servaient de témoins.

7. Production de sérum hyperimmun chez les souris.

Des sérums hyperimmuns de souris ont été obtenus lors des essais d'immunisation de souris en vue des expériences sur la production d'AcMo (voir section 8).

8. Production d'AcMo.

8.1 Préparation des protéines virales pour l'immunisation.

Le virus purifié QC91 a été dissocié avec de l'éther suivant la technique décrite par Stahl-Hennig et al. (1992), en utilisant toutefois du Tween-20 comme détergent. Ce traitement permettrait de séparer la membrane du reste de la particule virale dans le but d'exposer un plus grand nombre de déterminants antigéniques de la protéine HA de l'enveloppe virale. Brièvement, la suspension virale ajustée à la concentration de 10 000 UHA fut mélangée à un volume égal d'éthyl-éther (Fisher) auquel fut rajouté 0,1% Tween 20. Le mélange fut gardé sous agitation lente pendant 30 min à la TP, puis centrifugé à 1500 x g pendant 10 min à 4°C. La phase organique fut éliminée et la phase aqueuse contenant les protéines fut débarrassée de l'éther par barbotage sous un jet d'azote.

8.2 Immunisation des souris.

La méthode décrite par Kida et al. (1982) a été utilisée suivant un protocole d'immunisation décrit dans le livre "Antibodies (1988)". Trois souris BALB/c (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) de sexe féminin et pesant entre 18 et 20 grammes (g) ont été utilisées. Une quantité totale de 0,030 mg de protéines du virus QC91 fut injectée aux souris, ce qui correspondait approximativement à 0,010 mg de la protéine HA. Pour la première injection, chaque souris reçut par voie intra-

péritonéale 0,5 ml d'une émulsion (50:50) de protéine virale et d'adjuvant complet de Freund. Lors de la deuxième et de la troisième injections données respectivement aux jours 14 et 35, les souris reçurent la même dose d'antigène viral mélangé à un volume égal d'adjuvant incomplet de Freund. Pour la dernière injection, chaque souris reçut 0,5 ml d'une suspension virale contenant 0,06 mg de protéines virales par les voies intrapéritonéale (0,25 ml) et intraveineuse (0,25 ml). Cette dernière injection de rappel fut administrée 4 jours (jour 56) précédant l'étape de la fusion cellulaire. Des échantillons sanguins ont été prélevés aux jours 0, 24 et 45 par ponction du sinus veineux situé au niveau de l'orbite oculaire. Ces prélèvements permirent de constituer les stocks de sérums préimmuns et de suivre la cinétique d'apparition des anticorps. Les sérums obtenus furent aussi utilisés pour la mise au point des tests sérologiques en vue du criblage des hybridomes sécréteurs d'AcMo. Trois souris BALB/c gardées dans la même salle que les souris immunisées contre le virus QC91 constituaient le groupe témoin.

8.3 Fusion cellulaire.

Les rates de deux souris ont été prélevées sous anesthésie au pentobarbital. Elles ont ensuite été débarrassées de tous résidus de graisse et découpées en multiples petits morceaux à l'aide d'un bistouri. Les morceaux ont ensuite été

triturerés sous une légère pression exercée à l'aide du piston d'une seringue tuberculine. Les cellules spléniques furent collectées et transférées dans un tube contenant 3,0 ml de milieu RPMI 1640 (Difco, Rockford, Maryland, USA), tamponné par l'addition d'HEPES (15 mM) et de NaHCO₃ (20 mM). Le milieu avait été préalablement supplémenté de 100 mM de pyruvate de sodium, 20 mM de L-glutamine, 0,125 mg/ ml d'amphotéricine, 0,05 mg /ml de gentamycine. Après avoir complété le volume de la suspension cellulaire à 10 ml avec le RPMI 1640, cette dernière fut filtrée à travers une compresse de coton stérile. Après une centrifugation à 200 x g pendant 10 min, le culot cellulaire fut repris avec 2,0 ml de milieu. Afin d'évaluer le nombre de cellules effectrices disponibles, un volume de 0,1 ml de cellules spléniques fut ajouté à 0,9 ml de la solution de lyse. Cette solution de lyse consistait en un mélange de 8,29 g/ ml de chlorure d'ammonium, 1,0 g/ ml de carbonate de potassium et de 0,037 g/ ml d' EDTA disodique. Par la suite un aliquot de 100 µl de cellules était ajouté à 0,9 ml de RPMI 1640 et le nombre de cellules vivantes était déterminé suite à une coloration au bleu trypan. Comme les cellules spléniques effectrices, les cellules myélomateuses de souris non sécrétrices, P3X63-AG8.653 (ATCC CRL 1580), ont aussi été dénombrées. La coloration par exclusion au bleu trypan fut aussi utilisée pour évaluer le degré de viabilité de la suspension de cellules myélomateuses.

Pour la fusion cellulaire, un rapport de 10 cellules effectrices (E) (10^8 cellules spléniques) pour une cellule myélomateuse cible (T) (10^7 cellules P3X63-AG8.653) fut utilisé. La suspension cellulaire mixte était d'abord complétée à 10 ml avec du RPMI 1640, puis centrifugée à $200 \times g$ pendant 10 min. Le surnageant était ensuite aspiré et le culot resuspendu sous une légère agitation. Subséquemment, un volume de 1,0 ml de polyéthylèneglycol 1000 était rajouté goutte à goutte pendant 60 sec sur le culot cellulaire. Par la suite, dans le même tube, un volume de 1,0 ml de RPMI 1640 préréchauffé à 37°C était ajouté à deux reprises dans une période de 60 sec. Le volume était complété à 10 ml avec du RPMI 1640 préréchauffé à 37°C , avant d'être centrifugé à $200 \times g$ pendant 10 min. Le culot cellulaire était finalement resuspendu dans 40 ml de milieu de culture préréchauffé à 37°C de façon à ajuster la concentration cellulaire à 500 000 cellules par ml. Le milieu de culture consistait en du milieu RPMI 1640 supplémenté de 10 % de SFB, d'hypoxanthine(H), d'aminoptérine(A) et de thymidine(T) (HAT). La solution stock de HAT 100X contenait $4,1 \times 10^{-7}$ M d'aminoptérine, $1,6 \times 10^{-5}$ M de thymidine et 1×10^{-4} M d'hypoxanthine. Un volume de 0,2 ml de milieu de culture était déposé dans tous les puits de deux plateaux de culture de 96 puits (Nunc, Gibco, Burlington, Ontario, Canada). Les cellules étaient ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère humide enrichie de 7 % de CO_2 pendant sept jours. On remplaçait par

la suite le milieu de sélection par du milieu frais chaque deux jours jusqu'à la disparition totale des cellules non fusionnées (12 jours). A ce moment, le milieu de sélection était remplacé par du milieu RPMI 1640 supplémenté de 10 % SFB, d'hypoxanthine et de thymidine jusqu'au développement normal des hybridomes. Finalement, du milieu de culture ne contenant aucun inhibiteurs et supplémenté de 10% de SFB et d'antibiotiques était utilisé et remplacé tous les deux jours jusqu'à l'obtention de cultures confluentes des différents hybridomes.

8.4 Tests sérologiques utilisés pour le criblage des hybridomes sécréteurs.

8.4.1 Test ELISA indirecte.

Une épreuve d'ELISA indirecte, telle que décrite précédemment par Kida et al. (1982), a été réalisée pour la détection d'anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine HA de la souche QC91. Le virus purifié (1,0 mg) fut d'abord dissocié dans le "tampon de dissociation" qui consistait en du tampon 0,02 M Tris, pH 7,8, contenant 0,15 M NaCl, 0,5 % Tween-20, et 0,6 M KCl (voir annexe I point 1.b). Lors de la réalisation de l'épreuve, 0,05 ml de la préparation antigénique contenant 200 UHA (10 µg de protéines virales) de virus était déposé dans les puits d'un plateau de microtitrage de 96 puits à fond plat (Nunc). Après une période d'incubation de 17 hres à 4°C, les plateaux étaient lavés quatre fois avec la solution

tampon de lavage (voir annexe I point 1.d) et les sites non spécifiques d'adsorption étaient bloqués avec 0,3 ml d'une solution 1% BSA durant 60 min à la TP. Par la suite les plateaux étaient lavés (quatre fois) et 0,05 ml de surnageant de culture d'hybridomes était déposé dans chaque puits. Après une période d'incubation supplémentaire de 90 min à la TP, les plateaux étaient relavés quatre fois avant l'ajout de 0,05 ml par puits d'une préparation d'Ig de chèvre anti-IgG de souris couplées à la peroxydase de raifort (Kirkegaard and Perry, Laboratories Burlington, Ontario, Canada) diluée 1/8000 était déposé dans chaque puits. Les plateaux étaient par la suite incubés à la TP pendant 60 min. Après une dernière étape de lavage, on dispensait dans chaque puits 0,1 ml de la solution de révélation contenant 0,4% d'hypochlorure d'orthophénylène diamine (OPD, Sigma Chemical, Co., St- Louis, Missouri, USA.) et 0,012% H₂O₂ (voir annexe I point 1.f). Les plateaux étaient finalement gardés à l'obscurité pendant 15 min et la réaction colorométrique était interrompue par l'addition de 0,1 ml d'HCl 1N dans chaque puits. Les DO étaient déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek, Multiskan, Flow) à une longueur d'onde de 492nm.

Chacun des surnageants de culture d'hybridomes fut testé en duplicata. Les sérums préimmuns dilués 1/100 et les sérums hyperimmuns positifs de souris BALB/c dilués 1/800 constituaient les témoins négatifs et positifs, respectivement. Pour

l'interprétation des résultats, une valeur de DO supérieure ou égale à 0,4 (moyenne des négatifs multipliée par 3) était considérée comme positive.

8.4.2 Test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA).

Les tests IHA ont été faits suivant la technique standard préconisée par le " WHO collaborating centers for reference and research on influenza (1982)".

8.4.2.1 Inactivation d'inhibiteurs non spécifiques dans les sérums.

Les sérums obtenus après immunisation des souris et lapins, de même que les liquides d'ascite, étaient préalablement traités avec l'enzyme RDE (N-acetylneuraminyldase) isolé de *Vibrio cholerae* (MCF Diagnostic Incorporation, Mississauga, Ontario, Canada). Ce traitement avait pour but de détruire les inhibiteurs non spécifiques de l'hémagglutination présents dans les sérums ou liquides d'ascite. Ainsi, 0,1 ml de l'échantillon à traiter était déposé dans un tube contenant au préalable 0,4 ml de RDE (100 U/ ml). Après 16 hres d'incubation dans un bain-marie à 37°C, 0,5 ml d'une solution de citrate de sodium 1,5 % était rajoutée. Les tubes étaient vigoureusement agités et incubés pendant 30 min à 56°C. Les sérums étaient conservés à -20°C avant usage.

8.4.2.2 Description du test d'inhibition de l'hémagglutination.

Comme dans le test d'hémagglutination, 0,025 ml de PBS était au préalable déposé dans les puits coniques d'un plateau Linbro (Flow) de 96 puits en laissant ceux des premières rangées intacts. Ensuite 0,05 ml de sérum était déposé dans les puits des premières rangées et une dilution en série logarithmique de base deux était effectuée. Après avoir ajouté 0,025 ml de la suspension virale ajustée à 4 UHA /0,025 ml, les plateaux étaient couverts, agités manuellement et incubés pendant 30 min à la TP. Ensuite, 0,05 ml d'érythrocytes de coq, à la concentration de 0,5 % dans du PBS était déposé dans tous les puits. La lecture des plateaux était effectuée après 30 min d'incubation à la TP. Tous les tests étaient effectués en duplicata et la spécificité du test était vérifiée en incluant comme témoins des sérums positifs et négatifs connus. De plus, les sérums traités au RDE étaient aussi testés pour vérifier l'absence d'inhibiteurs non spécifiques. Les titres IHA correspondaient à la réciproque de la plus haute dilution du sérum ou du liquide d'ascite inhibant complètement l'activité hémagglutinante de 4 UHA du virus.

8.5 Clonage des hybridomes par la méthode des dilutions limites.

Des fibroblastes irradiés d'embryon de souris, BALB/c

X 3T3, clone A31 (ATCC, CCL 163) ont été utilisés comme cellules nourricières non-sécrétrices pour le clonage. La concentration de ces cellules était ajustée à 200 000 cellules par 0,1 ml dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% du SFB. Ensuite 0,1 ml de cette suspension cellulaire était déposé dans les cupules de plateaux de microtitrage de 96 puits et incubées pendant 17 hres à 37°C dans une atmosphère humide enrichie à 7% de CO₂. Pour l'étape de clonage, les hybridomes étaient d'abord comptés et leur viabilité était vérifiée après coloration au bleu trypan. Ensuite, des dilutions décimales étaient effectuées afin d'obtenir une concentration finale d' 1 cellule par 0,1 ml ou 10 cellules par ml. Les cellules d'hybridomes (0,1 ml) étaient alors dispensées dans chacun des puits de plateaux contenant les cellules nourricières. Après sept jours d'incubation à 37°C en atmosphère humide enrichie de 7% de CO₂, la présence d'hybridomes était visualisée sous microscope. Le milieu de culture (RPMI 1640, SFB 10%) était changé tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules. Les surnageants des cultures cellulaires confluentes étaient finalement testés pour la présence d'anticorps par le test IHA, tel que décrit précédemment (voir section 8.4.2.2).

8.6 Détermination de l'isotype des AcMo.

Une technique de double immunodiffusion dans des gels d'agarose (Ouchterlony, 1958) a été utilisée pour déterminer la

classe et sous-classe d' Ig secrétées par les différents hybridomes obtenus. Un volume de 3,0 ml d'une préparation de gel de 0,1% d'agarose Seakem (Marine Colloids Div., FMC Corporation, Rockland, USA) dans du PBS était délicatement coulé à la surface de lames de verre d'une dimension de 9,0 cm x 3,5 cm x 0,5 cm en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air. Après gélification de l'agarose à la TP, des puits de 3 mm de diamètre étaient percés dans le gel à l'aide d'un poinçon. Dans le puits central, 10 μ l d'AcMo à tester était déposé, tandis que 10 μ l des différents sérums de lapin dirigés contre les classes et sous-classes d' Ig, IgG₁, IgG₂(a,b), IgG₃ et IgM de souris, de même que les sérums dirigés contre les chaînes légères lambda(λ) et kappa(κ) (Miles Laboratories Inc. Etobicoke, Ontario, Canada), étaient déposés dans les puits périphériques. Après diffusion totale des échantillons dans le gel, les plaques étaient incubées dans une chambre humide pendant 17 hres à la TP. Les plaques étaient par la suite placées dans un bain de PBS, puis avec un scalpel, les gels étaient délicatement décollés. Après lavage dans du PBS pendant 10 min, les gels étaient placés sur une membrane "Gel Bond Page-Film" (Bio-Rad) de 100 x 125 mm, en évitant la formation de bulles d'air à l'interface. Un mince film de PBS était déposé à la surface du gel, qui était ensuite recouvert avec du papier à main en appliquant une pression de 150 g pour assécher le gel. Cette opération fut reprise deux fois de

suite en maintenant le gel appliqué sur la membrane. Les membranes étaient colorées au bleu de coomassie 0,5 % et séchées avec un séchoir jusqu'à transparence, ce qui permettait une meilleure visualisation des bandes tout en facilitant la conservation des membranes. Un résultat positif se traduisait par l'apparition d'une ligne de précipitation entre les puits contenant les AcMo à tester et le puits contenant le sérum dirigé contre l'isotype approprié.

8.7 Congélation et décongélation des clones cellulaires.

La congélation des hybridomes fut réalisée alors que les cellules étaient en pleine phase de croissance logarithmique et encore sécrétrices d'anticorps. En prenant soin de toujours opérer sur la glace, le culot cellulaire obtenu après centrifugation à 200 x g pendant 10 min était resuspendu dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% SFB et 10% DMSO préréfroidi. Des aliquots de 1,0 ml de la suspension cellulaire ajustée à une concentration 1×10^6 à 5×10^6 cellules par/ml étaient d'abord gardés pendant 17 hres à -70°C , puis finalement conservés à -180°C .

Pour la décongélation, les hybridomes sécréteurs gardés à -180°C étaient décongelés rapidement dans un bain-Marie à 37°C . Les cellules étaient successivement resuspendues dans 20 ml de milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% de SFB préréchauffé à 37°C , puis centrifugées à 200 x g pendant 10 min pour se

débarrasser du DMSO. Les cellules viables contenues dans un aliquot étaient finalement comptées après coloration au bleu trypan et le reste de la suspension cellulaire était remis en culture dans des plateaux de 24 puits (Corning) à une concentration initiale de 200 000 cellules par ml.

9. Production des liquides d'ascite.

La technique décrite par Hoogenraad et Wraight (1986) fut utilisée pour la préparation des cellules hybridomes à injecter. Les cellules de trois hybridomes clonés (G9, D3, B8) provenant initialement du même clone (F8), mais de différents sous-clones ont été utilisées pour la production de liquides d'ascite. Les cellules hybridomes en culture ont d'abord été centrifugées à 200 x g pendant 10 min, puis lavées deux fois avec du PBS. Le culot cellulaire fut resuspendu dans du PBS et la concentration de cellules fut ajustée à 10^6 cellules par ml de PBS. Trois lots de 3 souris BALB/c âgées de 12 semaines ont été au préalable immunodéprimées par injection de 0,5 ml de 2,6,10,14 tétraméthyl pentadécane (pristane, Aldrich Chemical Company Inc, Milwaukee, Wisconsin, USA) par la voie ip aux jours J0 et J14. Une semaine après la dernière injection de "pristane", chaque souris reçut environ 0,5 ml d'une suspension de cellules hybridomes injecté par la voie ip. Les souris étaient contrôlées visuellement tous les jours et palpées afin de vérifier l'apparition de tumeurs abdominales et pour

apprécier la quantité d'ascite sécrétée. A partir de la deuxième semaine, les liquides d'ascite furent prélevés chaque deux jours par ponction de l'abdomen à l'aide d'une aiguille de calibre 18G X 1½. Les liquides d'ascite étaient collectés dans des tubes de 10 ml contenant 1,0 ml d'une solution d'Alsever à 10% (Gibco, USA) comme anticoagulant. Pour se débarrasser des lipides et des érythrocytes, les liquides d'ascite étaient centrifugés à 1000 x g pendant 10 min, avant d'être conservés à -20°C.

10. Test de neutralisation selon la technique des plages.

La technique décrite par Kida et al. (1982) utilisant une dose virale constante de 100 à 200 pfu/ ml a été utilisée. La dilution appropriée de la suspension virale fut établie (voir section 4.2). Puis l'AcMo à tester était dilué en série logarithmique de base 10 dans du PBS supplémenté de 0,2% SFB. Un volume de 0,6 ml des différentes dilutions de l'AcMo à tester était additionné à un volume identique de la suspension virale. Après 1 hre d'incubation à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO₂, 0,2 ml du mélange AcMo-virus était déposé sur les feuillets cellulaires MDCK confluents préparés en plateaux de 24 puits (Corning) et préalablement rincés deux fois au PBS. Après un contact d'1 hre à 37°C, on rajoutait 5,0 ml du milieu de maintien contenant de l'agar Oxoïd™ tel que décrit à la section 4.2. Après gélification du milieu à la TP

pendant 20 min, les plateaux étaient réincubés en position inversée à 37°C en atmosphère humide supplémenté de 5 % de CO₂. Au bout de trois jours d'incubation, la couche d'agar était délicatement enlevée, et les feuillets cellulaires étaient fixés par l'addition de 2,5 ml de formaldéhyde à 5 % et colorés au violet de gentiane (0,1 %) pendant 1 min. Les feuillets cellulaires étaient enfin rincés avec de l'eau et séchés à la TP. Le titre neutralisant de l'AcMo fut déterminé comme la réciproque de la plus haute dilution entraînant une réduction de 50% du nombre de plages. Toutes les dilutions ont été testées en triplicata. Un titrage à rebours des différentes dilutions virales fut effectué pour confirmer la dose de virus utilisée pour le test.

11. Epreuves immunohistochimiques.

11.1 Détermination de la dose infectieuse (DICT₅₀) par immunoperoxydase.

Le titre infectieux des souches virales QC91 et QC81 a été estimé selon la plus haute dilution de la suspension virale pouvant induire un effet cytopathique dans plus de 50% des feuillets cellulaires inoculés. Afin de faciliter la lecture de l'effet cytopathique, une technique d'immunoperoxydase fut utilisée permettant ainsi d'obtenir une coloration spécifique des cellules infectées et de déterminer le titre viral. Cette technique fut réalisée selon la procédure décrite par Bélanger

et al. (1988). Brièvement, les feuillets de cellules MDCK préparés en plateaux de 96 puits ont été inoculés à raison de 100 μ l de la suspension virale diluée en série logarithmique de base dix. Quatre puits ont été utilisés pour chacune des dilutions. Après une période d'incubation de quatre jours à 37°C, les plateaux étaient vidangés de leur milieu, et les feuillets cellulaires étaient lavés trois fois avec du PBS. Par la suite, les cellules étaient fixées à l'aide d'une solution de méthanol 100% additionnée de 3 % H₂O₂. Après une incubation de 15 min à la TP, 0,1 ml de la dilution 1/500 du sérum hyperimmun de lapin anti-QC91 (ou anti-QC81) était déposé dans chaque puits. Les plateaux étaient par la suite incubés pendant 2 hres à 37°C en présence d'un atmosphère humide enrichie de 5 % de CO₂. Les feuillets étaient relavés trois fois avec du PBS et réincubés 2 hres à 37°C en présence de la dilution 1/1000 d'une préparation d'Ig de chèvre anti-IgG de lapin couplées à la peroxydase (Goat anti-Rabbit HRP conjugated ICN Biomedicals Inc. Costa Mess, Californie, USA). Après trois autres lavages au PBS, la réaction immune était révélée par l'addition de 0,1 ml du substrat 3 3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) (Gibco) en présence d'H₂O₂. Finalement, après une incubation de 15 min à la TP, les feuillets cellulaires étaient rincés deux fois avec de l'eau distillée afin d'arrêter la réaction enzymatique. L'énumération des foyers d'infection était faite sous le microscope. Le titre viral ou DICT₅₀ était

calculé selon la formule de Reed et Muench (1938) (voir annexe II, point 2).

11.2 Immunofluorescence indirecte (IFI).

Une quantité prédéterminée (0,1 ml) d'une suspension de cellules MDCK ajustée à la concentration de 200 000 cellules / ml, dans du milieu (1:1) supplémenté de 10 % SFB, fut déposée dans les puits d'un plateau de 96 puits. Les feuillets cellulaires confluent étaient par la suite lavés deux fois avec du PBS et inoculés avec une dose de 100 DICT₅₀ (0,1 ml) de virus. Après une période d'adsorption d'1 hre à 37°C en présence d'une atmosphère humide enrichie de 5 % de CO₂, 0,1 ml du milieu de culture (1:1) supplémenté de 10 unités de trypsine TPCK/ml était rajouté aux cellules. Après une période d'incubation de 20 hres à 37°C, les feuillets étaient rincés avec du PBS et fixés pendant 30 min à la TP à l'aide d'une solution prérefroidie de 80 % d'acétone dans du PBS. Les feuillets étaient ensuite séchés pendant 15 min à la TP. Pour le test IFI, 0,05 ml des différentes dilutions en base quatre de l'AcMo, effectuées dans du PBS additionné de 0,8 % de BSA, était déposées dans chacun des puits. Après une période d'incubation de 90 min à 37°C en présence d'une atmosphère humide enrichie de 5 % de CO₂, les feuillets cellulaires étaient lavés six fois avec du PBS. Par la suite, 0,05 ml de la préparation d'Ig de mouton anti-IgG de souris couplées à l'isothiocyanate de

fluorescéine (Boehringer Mannheim GmbH, Laval, Québec, Canada), préalablement diluée 1/60 dans le PBS additionné de 0,8 % de BSA, était déposé dans chaque puits. Après une incubation subséquente de 90 min, les feuillets cellulaires étaient rincés quatre fois avec du PBS, puis deux fois avec de l'eau distillée. Après avoir déposé 0,025 ml d'une préparation de glycérol: PBS (3:1) dans chaque puits, on procédait à la lecture de la fluorescence à l'aide d'un microscope sous rayonnement U.V (Laborlux K, Leitz; Saint Laurent, Québec, Canada).

La réactivité par IFI des différents AcMo contre les cellules infectées a été vérifiée à deux reprises et à chaque fois, la dilution de la préparation d'anticorps était testée en duplicata. La spécificité du test a été vérifiée en incluant lors des différents essais des temoins: l'AcMo a été testé contre des cellules non infectées et des cellules non infectées mais incubées en présence du conjugué seulement. Un témoin ascite négative (ascite de souris riche en AcMo anti-coronavirus de dinde) et un témoin positif (un AcMo dirigé contre un déterminant antigénique majeur de la nucléoprotéine du virus influenza humain de type A (Serotec Ltd, Oxford, London, United Kingdom) ont été utilisés respectivement aux dilutions de 1/100 et 1/10.

12. Immunomarquage à l'or colloïdal.

Le protocole décrit par Déa et Garzon, 1991 a été utilisé. Un échantillon (3 μ l) des virus purifiés QC91 et QC81

était ajouté à une goutte d'eau (50 μ l), sur laquelle était ensuite déposée une grille de nickel nue pendant 5 min. Les grilles étaient ensuite séchées à la TP et les sites non spécifiques étaient bloqués en déposant les grilles sur une goutte de PBS contenant 1% (p/v) d'ovalbumine pour une période d'1 hre. Les grilles étaient ensuite lavées par des trempages successifs (10 X) dans du PBS durant 10 min et déposées immédiatement sur une goutte de la dilution 1/160 dans du PBS-ovalbumine de l'ascite enrichie en AcMo. Après une incubation de 17 hres à 4°C, les grilles étaient lavées comme décrit précédemment, trempées dans la solution de blocage pendant 30 min à la TP et finalement déposées sur une goutte de la préparation d'Ig de chèvre anti-IgM et IgG de souris couplées à l'or colloïdal (15 nm) (Biocell Research, Cedarlane, Ontario, Canada). Après 30 min de contact à la TP, un dernier lavage des grilles était effectué cinq fois pendant 5 min dans le PBS, puis cinq fois dans de l'eau distillée afin d'éliminer les sels. Après le séchage et la coloration à l'acide phosphotungstique (PTA 3 %, pH 6) pendant 1 min, les grilles étaient examinées au microscope électronique à transmission (Hitachi 7100) sous une tension de 60 à 80 Kv. Pour confirmer la spécificité de l'attachement de l'AcMo aux particules virales, différents témoins ont été inclus lors des essais dont un AcMo de la sous-classe IgG1 dirigé contre le coronavirus de dinde à la dilution 1/160 et un témoin PBS.

13. Epreuve d'ELISA de blocage.

Une combinaison des techniques de Callebaut et al. (1989) et Simkins et al. (1989, 1993) a été utilisée. Le virus QC91 (0,5 µg) dissout dans 0,05 ml du tampon 0,05 M carbonate-bicarbonate de sodium à pH 9,6 (voir annexe I point 2) a été déposé dans chacun des puits d'un plateau (Nunc) de 96 puits à fond plat. Après une période d'incubation de 17 hres à 4°C, les plateaux étaient rincés quatre fois avec la solution tampon de lavage (voir annexe I, point 1c). Les sites non spécifiques d'adsorption étaient par la suite bloqués par un contact d'1 hre à la TP avec du PBS contenant 1% BSA. Lors des différents essais, les sérums de porcs à tester étaient préalablement dilués en série logarithmique de base deux (en commençant avec la dilution 1/8) dans du PBS contenant 0,5 % BSA et 0,05 % Tween-20 (voir annexe I point 1.e) et 0,05 ml des différentes dilutions était dispensé dans les puits, en omettant les puits servant de "blanc de lecture". Les différents sérums provenaient: 1) de porcelets immunisés avec la souche virale QC91 et saignés aux jours 12, 42, 67, et 97 post-immunisation. Les titres IHA de 80, 320, 1600, 2560 ont été respectivement obtenus contre la souche homologue QC91. 2) des porcelets d'élevages aux prises avec des problèmes respiratoires attribuables à des lésions de PPN. Des titres IHA supérieurs à 640 contre les deux souches virales étudiées (QC91 et QC81) avaient été révélés dans quelques cas. Les sérums de

référence négatifs (titre IHA inférieur à 20 contre la souche QC91) provenaient de porcelets E.O.P.S ou de porcelets ayant été immunisés contre le SRRP. Après une incubation de 17 hres à 4°C, les plateaux étaient lavés deux fois afin de se débarrasser du matériel non adsorbé. Par la suite, 0,05 ml d'AcMo dilué 1/16 000 était dispensé dans chacun des puits. A la suite d'une incubation de 90 min à la TP, les plateaux étaient relavés quatre fois et 0,05 ml de la préparation d'Ig de chèvre anti-IgG de souris couplées à la peroxydase (Kirkegaard and Perry, Laboratories), préalablement diluée à 1/8000 dans le tampon de diluant pour anticorps, était déposé dans chacun des puits. Après un contact d'1 hre à la TP et une dernière étape de lavage, 0,1 ml de la solution de révélation contenant 0,4% OPD et 0,012% H₂O₂ (Voir annexe I, point 1.f) était dispensé dans tous les puits. Les plateaux étaient gardés en obscurité pendant 15 min à la TP, puis la réaction enzymatique était stoppée par l'addition de 0,1 ml d' HCl 1N. Les densités optiques étaient finalement mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek, Multiskan, Flow) à 492 nm.

Il est à noter que chacun des sérums a été testé en duplicata lors des différents essais. La dose de virus (0,5 µg) fut choisie à la suite des résultats de tests préliminaires et correspondait à la quantité maximum de protéines virales adsorbées donnant le minimum de bruit de fond. La dilution de travail de l' AcMo (ascite) (1/16 000) correspondait à la

dilution donnant des valeurs de DO_{492nm} comprises entre 1,5 et 1,0 au test ELISA indirect. La spécificité de la réaction a été vérifiée par comparaison aux valeurs obtenues pour les différents témoins incluant du liquide allantoïdien d'œufs embryonnés non infectés, un liquide d'ascite riche en AcMo anti-coronavirus de dinde, ainsi que des témoins PBS et sérum de porc préimmun ou de porcelets E.O.P.S. Le pourcentage de blocage a été calculé selon la formule décrite en annexe (voir annexe II point 3); Une réduction de 50 % de la DO obtenue pour l'AcMo seul était considérée comme significative.

14. Amplification et analyse des gènes viraux.

14.1 Concentration des virus.

Pour obtenir le virus concentré des souches virales IAF-Klop, IAF-1192 et IAF-1747, les liquides allantoïdiens produits (voir point 2.) ont été récoltés après quatre jours d'incubation, puis clarifiés par une centrifugation à 7500 x g pendant 30 min à 4°C. Les surnageants étaient ensuite déposés sur un coussin (20 ml) d'une solution de 30% (p/p) de saccharose préparée dans le tampon TNE (voir annexe I, point 7.c) et centrifugés à 100 000 x g pendant 3 hres à 4°C. Par la suite, les culots étaient resuspendus dans 0,1 ml de TNE contenant 1 μ l de RNAsine (Pharmacia, Biotech Canada Inc. Baie d'Urfée, Canada), un inhibiteur de ribonucléases, et conservés à -70°C.

14.2 Extraction d'ARN viral.

14.2.1 A partir du virus concentré.

La technique décrite par Chomczynski et Sacchi (1987) a été utilisée. Le virus concentré à partir du liquide allantoïdien (0,2 ml) était déposé dans un tube eppendorf préalablement traité avec une solution 0,1% de diéthyl-pyrocarbonate (DEPC) (Sigma) afin d'éliminer les ribonucléases. Après ajout de 1 μ l de RNAsine, l'extraction de l'ARN s'effectuait par l'addition successive de: 0,5 ml de solution de dénaturation (solution D), 0,05 ml d'acétate de sodium 2M, pH 4, 0,5 ml de phénol saturé à l'eau (Gibco, USA), 0,1 ml de chloroforme-isoamyl dans les proportions 49:1. La solution D consistait en une solution d'isothiocyanate de guanidine 4M (Sigma) préparée dans du citrate de sodium 25 mM à pH 7, contenant 0,1 M de 2-ME et 0,5 % de sarkosyl. Après une agitation vigoureuse de 10 sec, le mélange était incubé sur la glace durant 15 min et puis centrifugé à 15 000 rpm pendant 20 min à 4°C (Centrifugeuse eppendorf, Brinkmann). La phase aqueuse était récupérée et on y rajoutait 0,5 ml d'isopropanol. Le mélange était bien agité et placé à -20°C pendant 1 heure afin de permettre la précipitation de l'ARN génomique. Après une centrifugation à 15 000 rpm pendant 10 min à 4°C, le culot d'ARN était resuspendu dans 0,30 ml d'un mélange 50:50 de solution D et d'isopropanol. La suspension était incubée à -20°C pendant 1 heure, suivie d'une centrifugation à 15 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le culot

était ensuite lavé avec 75% d'éthanol (0,2 ml) et recentrifugé pendant 5 min à 15 000 rpm. Finalement, le culot d'ARN était séché sous vide pendant 2 min (Speedvac, Savant Instrument, Inc. Farmingale, New York, USA) et resuspendu dans 20 μ l d'eau traitée au DEPC contenant 1 μ l de RNAsine. L'ARN extrait était conservé à -70°C.

14.2.2 A partir des lysats de cellules infectées.

La technique décrite par Glisin et al. (1974) a été utilisée pour l'extraction d'ARN viral à partir des lysats de cellules MDCK. Les feuilletts cellulaires infectés étaient préalablement rincés avec du PBS, puis les cellules étaient lysées dans 1,0 ml de la solution d'isothiocyanate de guanidine (GIT) et recueillies dans un tube eppendorf. La solution de GIT consistait en une solution d'isothiocyanate de guanidine 4M (Sigma) préparée dans du citrate de sodium 3M, pH 6, contenant 0,1 M de 2-ME. En opérant sur de la glace, le lysat cellulaire était passé dix fois à travers une seringue munie d'une aiguille de calibre 26 G. Puis, un égal volume de la solution de phénol-chloroforme-alcool isoamyl (24:24:1) était rajouté au lysat cellulaire. Après une centrifugation à 15 000 rpm pendant 1 min, la phase aqueuse (phase supérieure) était récupérée, suivie de deux autres extractions au phénol-chloroforme. Ensuite, un volume égal de chloroforme était rajouté à la phase aqueuse extraite et le mélange était recentrifugé à

15 000 rpm pendant 1 min. Une seconde extraction au chloroforme était effectuée, puis l'ARN était précipité par l'ajout de 2,5 volumes d'éthanol et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M à pH 7. Le mélange était incubé à -70°C pendant 30 min et puis, centrifugé à 15 000 rpm pendant 20 min. Par la suite, le culot d'ARN était resuspendu dans 1,0 ml d'éthanol à 70 %. Après une dernière étape de centrifugation à 15 000 rpm pendant 15 min, le culot d'ARN était séché sous vide pendant 2 min, resuspendu dans 20 µl d'eau traitée au DEPC contenant 1 µl de RNAsine, et finalement conservé à -70°C.

14.3. Origine et choix des amorces pour la réaction RT-PCR.

Les paires d'amorces oligonucléotidiques sélectionnées ont été déduites de la séquence du gène HA de la souche américaine A/Swine/Indiana/1726/88 (H1N1) du virus de l'influenza porcine (Luoh *et al.*, 1992). Les amorces correspondaient à des séquences oligonucléotidiques de la portion du gène HA codant pour la sous-unité HA1. L'amorce sens désigné 7S (5' GCAGGG-GAAAATAAAAGCCAC 3') correspondait à la séquence d'oligonucléotides localisés aux positions 8 à 28 du gène, tandis que l'amorce anti-sens 1065R (5'AGCAATGGCTTCAAACAGACC3') était complémentaire-inverse à la séquence d'oligonucléotides situés aux positions 1065 à 1085 du gène. Les amorces ont été synthétisées (Service de synthèse des oligonucléotides, Centre de recherche en microbiologie appliquée, IAF) en prenant soin

d'incorporer des sites de reconnaissance (AGGTTC) pour l'enzyme de restriction *ECOR1* au niveau de leurs extrémités 5'. Ceci avait pour but de faciliter la "ligation" des produits d'amplification obtenus par PCR dans le vecteur pUC19 lors des expériences de clonage.

14.4 Amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne (PCR).

Le protocole décrit par Reikik et al. (1994) a été utilisé pour la synthèse et l'amplification par RT-PCR des copies d'ADNc correspondant à la portion du gène (HA) codant pour la protéine HA1 des différents isolats québécois.

14.4.1 Réaction de la transcription inverse (RT).

L'ARN génomique préparé précédemment a d'abord été transcrit en ADNc sous l'action de la transcriptase inverse (RT). L'ARN viral (100 à 500 ng) était ajouté au mélange réactionnel contenant 9 μ l d'eau traitée au DEPC, 1 μ l de l'amorce 1065R (solution stock de 50 picomoles/ μ L) et 1 μ l RNAsine. Le mélange était bien agité, incubé à 70°C pendant 10 min, puis refroidi rapidement sur la glace pendant 15 min. Pour la réaction RT, on rajoutait 6 μ l d'un mélange contenant 2 μ l du tampon 10X pour l'enzyme RT (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl pH 9, 15 mM MgCl₂), 2 μ l (10 mM) de chacun des déoxynucléotides triphosphates (dNTP), 2 μ l de MgCl₂ 25 mM, supplémenté de 200 unités (U) par réaction de l'enzyme transcriptase

inverse du virus Moloney de la leucémie murine (Pharmacia). Après une incubation à 42°C pendant 1 hre, une incubation supplémentaire de 5 min à 94°C était effectuée dans le but d'inactiver l'enzyme et de dénaturer les complexes ARN-ADNc. La préparation finale était utilisée directement pour la réaction d'amplification enzymatique.

14.4.2 Réaction d'amplification par polymérisation en chaîne.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume final de 100 μ l. Les différents produits du mélange réactionnel étaient ajoutés dans l'ordre suivant: 65,5 μ l d'H₂O, 10 μ l du tampon "Taq DNA polymérase" 10X (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada), 2 μ l de chacun des dNTPs, 1 μ l de chacune des amorces (7S et 1065R), 20 μ l du mélange RT et 2,5 U de l'enzyme " Taq DNA polymerase ". Après avoir bien mélangé, 75 μ l d'huile minérale était déposé à la surface du mélange réactionnel afin de prévenir l'évaporation, puis les tubes étaient déposés dans le support du thermocycleur "DNA Thermal Cyclor" de Cetus (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, USA). Les échantillons ont été soumis à 35 cycles d'amplification. Chacun des cycles comprenait une phase de dénaturation d'une durée de 1 min à 94°C, une phase d'appariement de 2 min à 55°C et une phase d'élongation de 1 min à 72°C. Pour le dernier cycle, la phase d'extension était rallongée à 10 min afin d'épuiser l'enzyme. L'ADN plasmidique déjà séquencé des virus

QC81 et QC91 a été utilisé comme témoin positif. Les échantillons amplifiés étaient refroidis à 4°C avant d'être analysés par électrophorèse.

14.5 Analyse des produits d'amplification en gels d'agarose.

Les produits de la réaction PCR étaient analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Des quantités de 1 µl du produit d'amplification dilué 1/4 dans le tampon échantillon (voir annexe I, point 7.b) étaient déposées dans les puits d'un gel d'agarose de 0,8% p/v dans du tampon TAE (voir annexe I, point 7.a) contenant du bromure d'éthidium (dilution finale 1/1000 d'une solution de 10 mg/ml). Le même tampon était utilisé comme " tampon de réservoir" et l'électrophorèse était conduite sous une tension constante de 90 V durant 60 min. Le gel était ensuite exposé aux rayons U.V (Transilluminator FBTIV-816 Fisher Scientific, Pittsburgh, Philadelphie, USA) ce qui permettait de visualiser les bandes des fragments d'ADN amplifiés et d'en estimer la longueur par comparaison à la distance de migration de fragments d'ADN standards ("1 Kb DNA ladder" BRL Research Laboratories Inc., Rockville, Maryland, USA).

15. Clonage des gènes.

15.1 Purification des produits d'amplification.

Les produits d'amplification, obtenus à partir de l'ARN génomique des souches étudiées, ont été directement excisés des

gels d'agarose (0,8 % de "Low melting gel" BRL, Research) après leur migration électrophorétique. Les fragments d'ADNc ont été purifiés à l'aide de la trousse "Magic DNA Purification Kit" (Promega, Madison, Wisconsin, USA) suivant les directives du manufacturier.

15.2 Clonage de la portion HA1 du gène HA.

15.2.1 Clonage dans le plasmide pUC19.

Les fragments d'ADNc, extraits à partir des gels d'agarose, ont été purifiés et digérés par l'enzyme *ECORI* suivant la technique décrite par Sambrook et al. (1989). Le plasmide purifié fut digéré par la même enzyme et déphosphorylé par l'utilisation de la phosphatase alcaline intestinale de veau (Pharmacia) permettant ainsi d'obtenir des extrémités compatibles pour la réaction de "ligation". Brièvement, à un volume de 10 μ l d'ADN (50 ng/ μ l) furent ajoutés successivement: 2 μ l de tampon pour enzyme "One Phor All" (10 x) (Pharmacia) et 1 μ l d'enzyme *ECORI* (Pharmacia) 20 000 U/ml. Après une incubation à 37°C pendant 45 min, la réaction de digestion fut stoppée en augmentant la température d'incubation à 65°C pendant 20 min, suivie d'une seconde incubation à la TP durant 20 min. "La ligation" de l'insert au vecteur a été réalisée en utilisant un ratio 1:3. Ainsi, 100 ng d'ADN (HA1) furent mélangés à 300 ng d'ADN plasmidique. La réaction de "ligation" fut initiée en ajoutant successivement 1 μ l du tampon de "ligation" (10 x) et

0,5 μ l de la ligase du phage T4 (8 500 U/ml). Le mélange réactionnel fut incubé à 15°C pendant 17 hres, puis conservé à -20°C.

15.2.2 Clonage dans le vecteur T.

Le clonage dans le vecteur pCR II (Invitrogen, Co, San Diego, CA) a été effectué suivant les indications du manufacturier. Ce clonage était facilité par l'ajout d'une adénosine supplémentaire aux extrémités 3' des fragments amplifiés par la "Taq polymérase" et la "ligation" de l'ADN (HA1) au vecteur dont les extrémités 5' présentaient des bases thymidines libres. La réaction de "ligation" était produite par l'action de la ligase du phage T4. Les produits de "ligation" étaient conservés à -20°C.

15.3 Transformation des bactéries d'*Escherichia coli*.

Des cellules *Escherichia coli* (XL1 blue) compétentes et résistantes à la tétracycline ont été transformées par les plasmides recombinants par transfection en présence de CaCl₂. Brièvement, une quantité (10ng) de l'ADN du vecteur recombinant était d'abord déposée dans un tube d'isopropylène de 5 ml (Sarsted, Montréal, Canada) placé dans un bain de glace. Puis, 0,1 ml de la suspension de cellules (XL1 blue) (DO ajustée à 0,6 à la longueur d'onde de 600 nm) venant d'être décongelées était rajouté à l'ADN plasmidique. Le mélange était soigneusement agité et incubé dans un bain-Marie à 42°C pendant 60 sec

pour le choc thermique. Puis, 0,9 ml du milieu de culture SOC (voir annexe I, point 8.c) était rajouté et le mélange était incubé à 37°C sous une agitation constante à 250 rpm (Scientific, Edison, New Jersey, USA) afin d'initier la croissance bactérienne. Après une période d'agitation d'1 hre, 0,1 ml de cellules transformées était étalé sur des boîtes de pétri contenant le milieu 2 YT supplémenté de 1,5 % d'agar, d'antibiotiques sélectifs , d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) et de bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (XGAL) (voir annexe point 8.d). Ces deux derniers sont les substrats qui permettent la sélection colorométrique des bactéries recombinantes (colonies blanches), le gène de la β -galactosidase ayant été rendu inopérant à la suite de l'insertion du gène étranger. Les antibiotiques utilisés étaient la tétracycline et l'ampicilline (dans le cas du clonage dans le plasmide pUc 19), ou l'ampicilline et la kanamycine (dans le cas du clonage dans le vecteur pCR II).

15.4 Isolement des plasmides récombinants et confirmation de la présence de l'insert.

Les bactéries recombinantes ou colonies blanches ont été individuellement criblées par isolement direct des plasmides. Les bactéries repiquées étaient mises en culture dans 2,0 ml du milieu 2YT (voir annexe I, point 8.a) additionné des antibiotiques sélectifs. Après 17 hres d'incubation à 37°C sous une

agitation constante à 250 rpm, les plasmides étaient isolés suite à une lyse bactérienne en présence de lysozyme. La technique rapide "Boiling miniprep" telle que décrite dans le livre "Short protocols in Molecular Biology (1992)" a été utilisée à cette fin. Brièvement, 1,5 ml de la suspension bactérienne était centrifugé à 13 000 rpm pendant 2 à 3 min. Le culot était par la suite resuspendu dans 0,2 ml d'une solution de lyse et incubé dans un bain d'eau bouillante durant 30 sec. La solution de lyse ou STET était constituée de 8% sucrose, 0,5 % Triton X-100, 50 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA et 0,5 mg/ml de lysozyme) (Voir annexe I point 8.e). Après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 15 min, le surnageant était récupéré et on y rajoutait 0,220 ml d'isopropanol. L'ADN plasmidique était précipité après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 15 min et resuspendu dans 40 μ l d'eau. L'ADN plasmidique était finalement digéré avec l'enzyme *ECORI* pour vérifier s'il contenait l'insert. Pour cette digestion, 10 μ l du plasmide extrait étaient ajoutés à un volume égal du mélange réactionnel (4 μ l de tampon "One Phor All" (10x), 1 μ l d'enzyme *ECORI*, 4 μ l de RNase et 11 μ l H₂O₂). Le mélange était incubé pendant 2 hres à 37°C. Pour le séquençage, l'ADN plasmidique des clones positifs était ensuite extrait par la méthode de lyse alcaline suivant le protocole décrit dans la trousse MagicTM (Miniprep DNA purification system, Promega).

16. Séquençage.

Le séquençage des inserts clonés a été effectué suivant la méthode décrite par Sanger basée sur la terminaison de la synthèse de la chaîne d'ADN par l'ajout de didéoxynucléotides. L'enzyme T7 "DNA polymérase" (Pharmacia) a été utilisée pour la synthèse de la chaîne d'ADN complémentaire. Un appareil de séquençage automatique (ALF: Automated Laser Fluorescent DNA sequencer, Pharmacia) a été utilisé. Des amorces universelles sens et anti-sens complémentaires aux séquences du phage M13 (en amont et en aval du site *ECOR1*) ont été utilisées pour déterminer les séquences adjacentes aux régions conservées des deux extrémités du gène ADN (HA1) cloné dans le vecteur pUC19. Des amorces universelles sens du phage M13 et anti-sens de la région du promoteur SP6 ont été utilisées dans le cas des fragments clonés dans le vecteur pCR II. La séquence du gène cloné a été complétée en utilisant des amorces internes marquées à la fluorescéine. L'amorce sens désignée 345 (5'GGGACATGTTACCCAGGAGAT 3') correspondait à la séquence d'oligonucléotides localisée aux positions 345 à 366 du gène (HA) codant pour la protéine HA1, tandis que l'amorce anti-sens désigné 810 (5'CCACTAGATTTCCAGTTC 3') était complémentaire et de sens inverse à la séquence d'oligonucléotides localisés aux positions 810 à 822 du gène (HA). Une troisième amorce anti-sens désignée 500 (5'GTAGAAGCTGTTTGCTCCAGC 3') a été synthétisée et le profil électrophorétique des différents oligonucléo-

tides a été révélé par autoradiographie. Elle correspondait à la séquence d'oligonucléotides localisée aux positions 500 à 521 du gène (HA) codant pour la protéine HA1. Les séquences d'ADN obtenues ont été étudiées et analysées à l'aide du programme Gene Works 2.2 (Intelligenetics Inc. Mountain View, Californie, USA) et la traduction en acides aminés, de même que les analyses de comparaison de séquences ont été effectuées à l'aide du programme Mc Vector 3.5 (International Biotechnologies).

RESULTATS

1. Caractéristique du profil polypeptidique des virus influenza porcins.

Les figures 5 et 6 représentent les profils électrophorétiques sur gels de 12 % de polyacrylamide des protéines structurales des virus influenza porcins purifiés par ultracentrifugation isopycnique sur gradients de saccharose. Sous des conditions non-réductrices (Figure 5), la souche variante (QC91), de même que la souche de référence (QC81), démontrèrent des profils polypeptidiques identiques. Les principales bandes observées correspondaient aux formes dimérique (150 kDa) et monomérique (70 kDa) de la protéine HA, à la forme oligomérique de la protéine NA (125 kDa), la protéine NP (62 kDa), de même que la protéine M1 (29 kDa). Sous des conditions réductrices (Figure 6), le profil de migration observé était identique pour les deux souches virales sauf pour la protéine NA. La protéine NA du virus QC91 était alors représentée par un doublet correspondant à des polypeptides dont les M_r furent estimées à 68 et 66 kDa, tandis que le monomère NA du virus QC81 était représenté par une bande unique dont la M_r fut estimée à 66 kDa. Les distances de migration observées dans le cas des autres protéines étaient relativement identiques pour les deux virus, les M_r ayant été estimées à 62, 53, 29 et 28 kDa pour les protéines NP, HA1, M et HA2 respectivement.

FIGURE 5. Profils polypeptidiques des souches QC81 et QC91 du virus de l'influenza porcine obtenus sous des conditions non-réductrices.

Les souches QC81 et QC91 du virus de l'influenza porcine ont été purifiées par ultracentrifugation isopycnique sur gradients de saccharose. Des quantités égales (10 μ g) des virus purifiés, de même qu'environ 1 μ g de protéines standards de hautes et faibles Mr, ont été préalablement dissociées par ébullition dans le tampon échantillon de Laemmli en absence de 2-ME, clarifiées par centrifugation et finalement déposées sur "un gel de 12% polyacrylamide - SDS". Les protéines ont été séparées par électrophorèse sous une tension constante de 200 V pendant 45 min.

La figure représente les profils polypeptidiques des virus QC81 et QC91 révélés après électrophorèse sous des conditions non-réductrices et coloration au bleu de coomassie (0,25 %). Toutes les bandes proviennent du même gel. Le profil de migration des protéines standards est représenté à la gauche; la myosine (200 kDa), la β galactosidase (116,5 kDa), la phosphorylase b (97,4 kDa), l'albumine sérique bovine (66,2 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31 kDa), l'inhibiteur de la trypsine de la fève de soya (21,5 kDa), et le lysozyme (14,4 kDa) ont été utilisés pour déterminer les Mr des protéines d'origine virale.

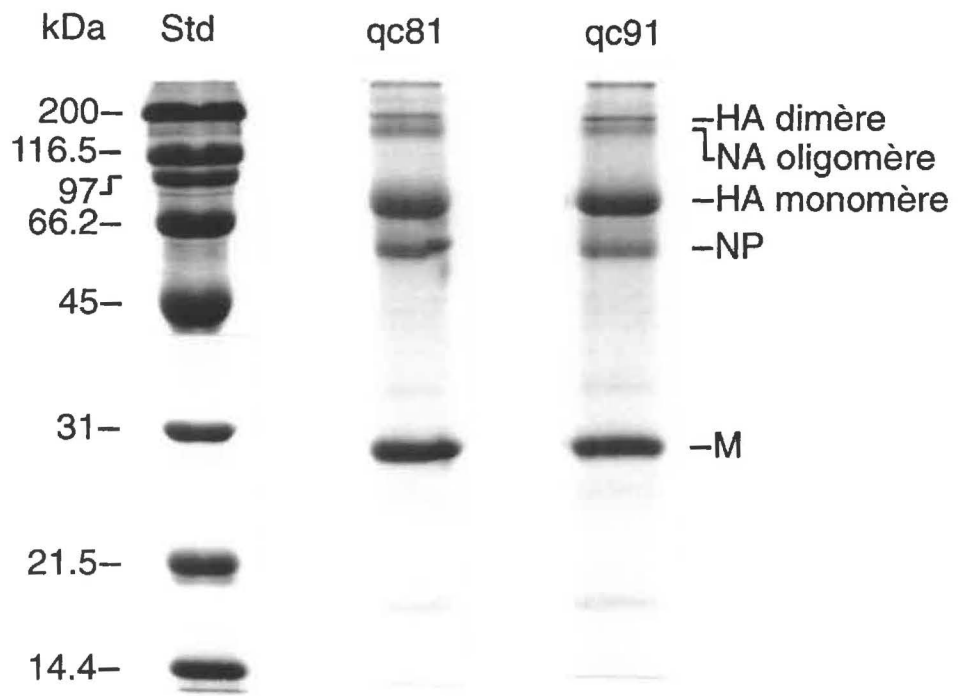
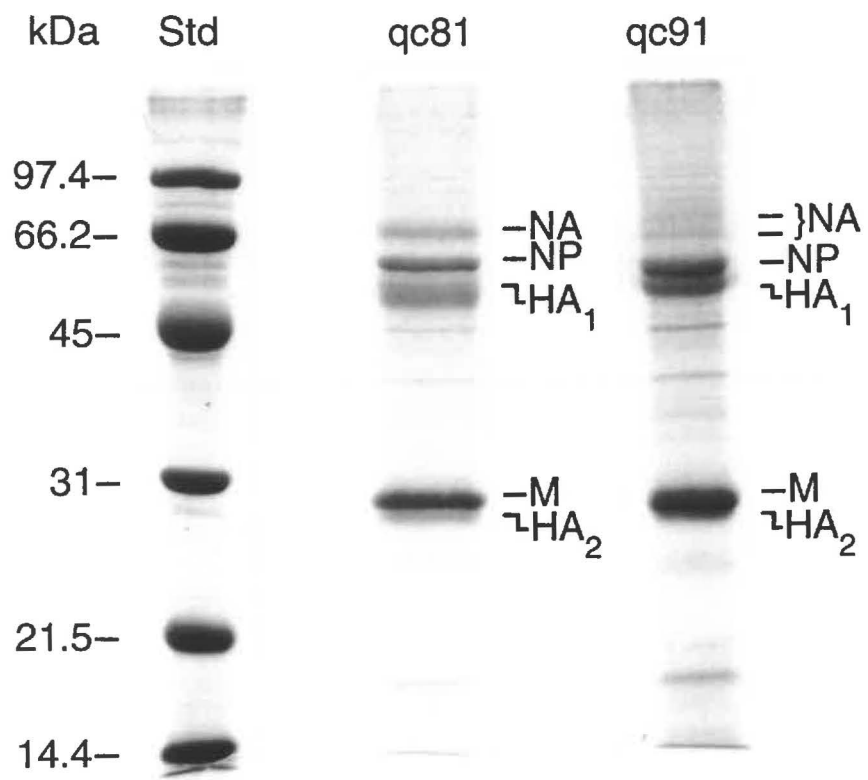


FIGURE 6. Profils polypeptidiques des souches QC81 et QC91 du virus de l'influenza porcine obtenus sous des conditions réductrices.

Les souches QC81 et QC91 du virus de l'influenza porcine ont été purifiées par ultracentrifugation isopycnique sur gradients de saccharose. Des quantités égales (10 μ g) des virus purifiés, de même qu'environ 1 μ g de protéines standards de hautes et faibles Mr, ont été préalablement dissociées par ébullition dans le tampon échantillon de Laemmli en présence de 2-ME, clarifiées par centrifugation et finalement déposées sur un "gel de 12% polyacrylamide-SDS". Les protéines ont été séparées par électrophorèse sous une tension constante de 200 V pendant 45 min.

La figure représente les profils polypeptidiques des virus QC81 et QC91 révélés après électrophorèse sous des conditions réductrices et coloration au bleu de coomassie (0,25 %). Toutes les bandes proviennent du même gel. Le profil de migration des protéines standards est représenté à la gauche; la myosine (200 kDa), la β galactosidase (116,5 kDa), la phosphorylase b (97,4 kDa), l'albumine sérique bovine (66,2 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31 kDa), l'inhibiteur de la trypsine de la fève de soya (21,5 kDa), et le lysozyme (14,4 kDa) ont été utilisées pour déterminer les Mr des protéines d'origine virale.



2. Caractérisation antigénique des souches virales étudiées.

Au début, il était primordial de vérifier que les virus cultivés dans les œufs embryonnés et purifiés dans le laboratoire avaient préservé les caractéristiques antigéniques des souches virales parentales isolées à partir des poumons de porcs présentant des lésions de PPN. Les travaux préliminaires avaient démontré que les virus QC91 et QC81 pouvaient être différenciés sérologiquement par les tests d'IHA (Dea et al., 1992b). La sensibilité des souches virales QC91 et QC81, cultivées sur les œufs embryonnés, vis-à-vis des sérums hyperimmuns de coq initialement produits contre les souches parentales homologues a été évaluée par des tests d'IHA. Les titres IHA obtenus contre les souches cultivées au laboratoire étaient similaires (1/1280-1/2560) à ceux obtenus avec les stocks initiaux (Tableau I).

3. Réactivité des isolats envers les sérums hyperimmuns.

La réactivité des souches QC81 et QC91 contre les sérums hyperimmuns de lapins et de souris homologues et hétérologues a été évaluée par des tests IHA. Les titres obtenus avec les sérums hyperimmuns de lapin étaient identiques contre les deux différents isolats, d'où l'impossibilité de distinguer ces deux différents virus à l'aide des sérums hyperimmuns produits chez cette espèce animale (Tableau II). Bien que l'antisérum anti-QC91 produit chez des souris n'ait pas permis de différencier

TABLEAU I Caractérisation des souches QC91 et QC81 du virus de l'influenza porcine propagées dans les œufs embryonnés de poule telle que déterminée par IHA.

| VIRUS | Sérum hyperimmun de coq contre les virus | |
|-------------------|--|------|
| | QC91 | QC81 |
| QC91 _a | 1280 | - |
| QC81 _a | - | 2560 |
| QC91 _b | 2560 | - |
| QC81 _b | - | 1280 |

- a: Les souches virales parentales QC91 et QC81 isolées d'homogénats de poumons de porcs présentant respectivement des lésions associées à la PPN (QC91) et des lésions de bronchite et de bronchiolite nécrotiques et pneumonie interstitielle (QC81).
- b: Les souches virales QC91 et QC81 propagées dans les œufs embryonnés de 11 jours d'âge.
- Le titre IHA est la réciproque de la plus haute dilution sérique inhibant 4 UHA de virus
 - Un titre IHA supérieur ou égal à 160 a été considéré comme titre significatif.
 - La variation antigénique entre deux souches virales était considérée significative si l'écart entre les titres IHA était supérieur ou égal à 4 dilutions logarithmiques de base deux.

TABLEAU II Réactivité antigénique croisée des souches QC91 et QC81 du virus de l'influenza porcin déterminée à l'aide des sérums hyperimmuns de lapins.

| VIRUS | Sérum hyperimmun de lapin contre les virus | |
|-------|--|------|
| | QC91 | QC81 |
| QC81 | 640 | 2560 |
| QC91 | 640 | 1280 |

- Le titre IHA est la réciproque de la plus haute dilution sérique inhibant 4 UHA du virus.
- Un titre IHA supérieur ou égal à 160 a été considéré comme titre significatif.
- La variation antigénique entre deux souches virales était considérée significative si l'écart entre les titres IHA était supérieur ou égal à 4 dilutions logarithmiques de base deux.

entre la souche homologue (QC91) et la souche QC81, des titres IHA différents contre ces deux virus ont été obtenus pour le sérum hyperimmun de souris anti-QC81 (Tableau III).

4. Clonage et caractérisation des AcMo anti-HA du virus QC91.

4.1 Isolement d'hybridomes sécréteurs d'anticorps anti-HA du virus QC91.

Les expériences de fusion cellulaire réalisées à l'aide des splénocytes de deux souris, ayant été hyperimmunisées contre la souche QC91 purifiée et dissociée à l'éther-tween 20, ont permis d'obtenir 163 hybridomes. Les hybridomes ont été testés par le test ELISA indirect. Parmi les hybridomes sécrétant des anticorps bloquant l'HA par l'épreuve d'ELISA indirecte, 46 d'entre eux sécrétaient des anticorps inhibant l'activité HA du virus homologue par le test d'IHA. Par la suite 8 hybridomes inhibant l'activité HA des souches QC91 et QC81, de même que 4 hybridomes désignés B6, F8, B11 et H6, n'inhibant que l'activité HA de la souche homologue, ont été sélectionnés (Tableau IV).

4.2 Caractérisation des AcMo sécrétés par les cultures d'hybridomes.

Au total, six AcMo désignés B10, D3, E1, G9, G11 et B8 ont été obtenus après deux sous-clonages de l'hybridome-mère F8. Les résultats des tests IHA ont indiqué que ces AcMo inhibaient significativement l'activité hémagglutinante de la

TABLEAU III Réactivité antigénique croisée des souches QC91 et QC81 du virus de l'influenza porcine déterminée à l'aide des sérums hyperimmuns de souris.

| VIRUS | Sérum hyperimmun de souris contre les virus | |
|-------|---|------|
| | QC91 | QC81 |
| QC91 | 5120 | 5120 |
| QC81 | 40 | 2560 |

- Le titre IHA est la réciproque de la plus haute dilution sérique inhibant 4 UHA du virus.
- Un titre IHA supérieur ou égal à 160 a été considéré comme titre significatif.
- La variation antigénique entre deux souches virales était considérée significative si l'écart entre les titres IHA était supérieur ou égal à 4 dilutions logarithmiques de base deux.

TABLEAU IV Isolement d'hybridomes sécréteurs d'AcMo inhibant l'activité HA de la souche QC91 du virus de l'influenza porcin

| Hybridomes | Titres IHA obtenus pour les surnageants de culture des hybridomes lorsque testées contre les virus | |
|------------|--|------|
| | QC91 | QC81 |
| B6* | 160 | <5 |
| F8* | 160 | <5 |
| B11* | 160 | <5 |
| H6* | 160 | <5 |
| B9 | 5 | 5 |
| E3 | 80 | 80 |
| F2 | 320 | 320 |
| E1 | 5 | 5 |
| F6 | 320 | 320 |
| G2 | 160 | 160 |
| B1 | 5 | 5 |
| B3 | 5 | 5 |

TABLEAU IV (suite).

- Les titres IHA correspondent à la valeur réciproque de la plus haute dilution des surnageants de culture d'hybridome inhibant 4 UHA de virus.
 - Seuls les titres IHA supérieurs ou égalant 160 ont été considérés comme significatifs.
 - La variation antigénique entre les deux souches virales était considérée comme significative si l'écart entre les titres IHA était supérieur ou égal à 4 dilutions logarithmiques de base deux.
- *: Les hybridomes sécrétant des AcMo spécifiques contre la protéine HA de la souche QC91 du virus de l'influenza porcin.

souche QC91 ; des titres IHA contre la souche homologue (QC91), au moins 32 fois plus élevés que les titres IHA obtenus avec la souche de référence (QC81) ont été obtenus (Tableau V).

L'isotype et la sous-classe des Ig secrétées par ces différents hybridomes ont été déterminés. Les résultats du test Ouchterlony de double immunodiffusion sur gel d'agarose ont permis de démontrer que ces six AcMo possédaient tous une chaîne lourde de type *Gamma* (γ) et une chaîne légère *Kappa* (κ) (Figure 7).

4.3 Caractérisation des AcMo produits en liquide d'ascite.

Afin d'augmenter la concentration des AcMo, des liquides d'ascite ont été produits chez des souris BALB/c après l'inoculation par la voie intrapéritonéale des cellules hybrides B8, G9 et D3. Ces trois clones provenaient tous du même hybridome-mère F8, mais de sous-clones différents (voir Tableau V). Seuls les sous-clones G9 et D3 ont permis d'obtenir respectivement 10 ml et 20 ml de liquide d'ascite. Les résultats des tests d'IHA réalisés avec ces liquides d'ascite ont permis de confirmer les résultats précédemment obtenus avec les surnageants de culture de ces mêmes clones; cependant, les titres IHA étaient de 16 à plus de 200 fois plus élevés que les titres initialement obtenus avec les surnageants des cultures d'hybridomes D3 et G9, respectivement (Tableau VI). L'ascite obtenu dans le cas du clone G9 qui présentait le titre IHA le plus considérable (81 920) a ainsi été utilisé pour les autres tests de caractérisation.

TABLEAU V Caractérisation des AcMo dirigés contre la protéine HA de la souche QC91 du virus de l'influenza porcin.

| Hybridome ^a | Sous-clones ^b | Clones | Souches virales | |
|------------------------|--------------------------|--------|-----------------|------|
| | | | QC91 | QC81 |
| F8 | E1 | B10 | 160 | <5 |
| | | D3 | 320 | <5 |
| | | E1 | 160 | <5 |
| | | G9 | 320 | <5 |
| | | G11 | 320 | <5 |
| | B11 | B8 | 160 | <5 |

- Les titres IHA correspondent à la valeur réciproque de la plus haute dilution des surnageants de culture d'hybridome inhibant 4 UHA de virus.
- Seuls les titres IHA supérieurs ou égalant 160 ont été considérés comme significatifs.
- La variation antigénique entre les deux souches virales était considérée comme significative si l'écart entre les titres IHA était supérieur ou égal à 4 dilutions logarithmiques de base deux.

a: Hybridomes-mères

b: Les sous clones ont été obtenus après clonage par dilutions limites des hybridomes-mères.

FIGURE 7. Détermination de l'isotype des différents AcMo produits contre la souche QC91 du virus de l'influenza porcin.

La technique de double diffusion d'Ouchterlony sur gels d'agarose 1% a été utilisée pour la détermination de l'isotype ou la sous-classe des Ig sécrétées dans les surnageants de culture des six hybridomes (B10, D3, E1, G9, G11 et B8). Dans les puits centraux, 10 μ l de surnageant de chaque hybridome fut déposé, tandis que les puits latéraux contenaient 10 μ l de sérum de lapin dirigé contre les différentes classes et sous-classes d'Ig de souris (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM), de même contre les chaînes légère κ , λ . Après une incubation de 17 hres à la TP, les gels ont été colorés avec le bleu de coomassie et séchés pour bien visualiser les lignes de précipitation.

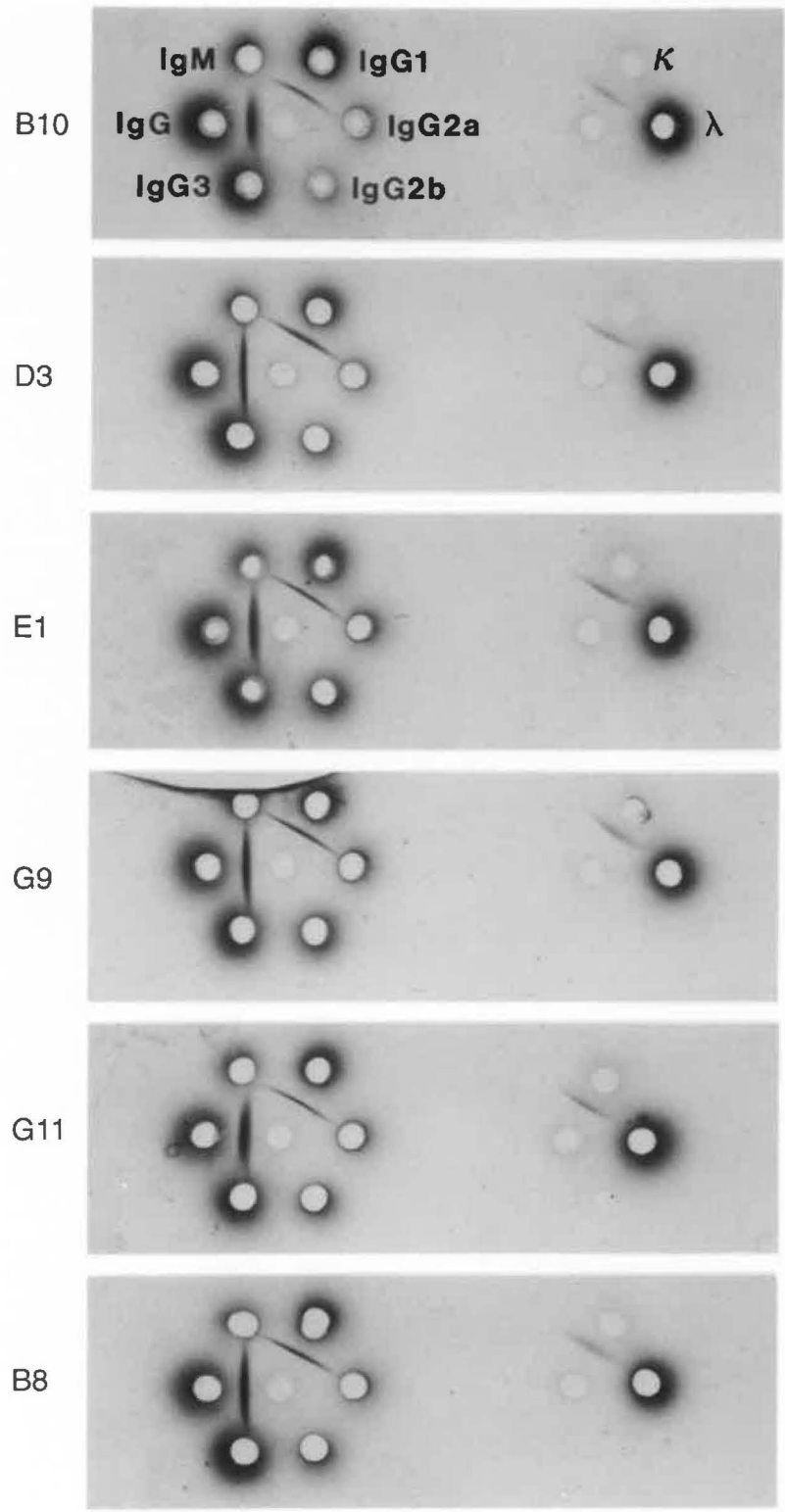


TABLEAU VI Capacité des AcMo produits en liquides d'ascite à inhiber l'activité hémagglutinante de la souche homologue (QC91) et la souche de référence (QC81) du virus de l'influenza porcin.

| VIRUS | Liquide d'ascite* produit avec les hybridomes | |
|-------|---|------|
| | G9 | D3 |
| QC91 | 81 920 | 5120 |
| QC81 | <10 | <10 |

- *: Les liquides d'ascite ont été obtenus en inoculant par la voie intrapéritonéale des souris BALB/c, présensibilisées avec du pristane, avec 500 000 cellules hybridomes G9 et D3.
- Le titre IHA est la réciproque de la plus haute dilution de l'AcMo (liquide d'ascite) inhibant 4 UHA de virus.
 - Un titre IHA supérieur ou égal à 160 a été considéré comme titre significatif.
 - La variation antigénique entre les deux souches virales était considérée comme significative si l'écart entre les titres IHA était supérieur ou égal à 4 dilutions logarithmiques de base deux.

L'AcMo G9 a ensuite été évalué pour son aptitude à neutraliser l'infectivité des deux souches virales propagées sur les cellules MDCK. Les résultats rapportés dans la figure 8 montrent qu'à la dilution 1/400 000, l'AcMo G9 pouvait neutraliser l'effet cytopathique induit par la souche homologue (QC91), mais non celle induite par la souche QC81. La neutralisation de l'infectivité était caractérisée par une réduction d'au moins 50 % du nombre de plages obtenu suite à l'infection des cultures cellulaires MDCK avec des doses infectieuses de 184 pfu/ml pour le virus QC91 et de 100 pfu/ml pour le virus QC81. Une neutralisation de l'infectivité de la souche QC81 ne fut observée qu'à la dilution 1/10 de l'AcMo G9.

D'une part, la capacité de l'AcMo G9 à se lier aux cellules MDCK infectées avec les virus QC91 ou QC81 a été évaluée par le test d'IFI et d'autre part, son aptitude à réagir avec les projections d'HA situées à la surface des particules virales a été évaluée en microscopie électronique après immunomarquage à l'or colloïdal.

Les résultats du test IFI (Figure 9) indique qu'il était toujours possible d'observer une fluorescence cytoplasmique à la dilution limite de 1/163 840 de l'AcMo G9 avec les cellules

FIGURE 8. Capacité de l'AcMo G9 produit en liquide d'ascite à neutraliser la souche homologue (QC91) et la souche de référence (QC81) du virus de l'influenza porcin.

La technique de plages fut utilisée pour déterminer l'activité neutralisante de l'AcMo G9. Les suspensions virales QC81 et QC91, ajustées à des titres respectifs de 100 et 184 pfu/ml, ont d'abord été incubées 1 hre à 37°C en présence des dilutions sérielles de base dix de l'AcMo G9. Les mélanges de dilution AcMo-virus furent ensuite déposés sur les feuillets cellulaires confluents de cellules MDCK et après une période d'adsorption d' 1 hre, on rajouta le milieu de recouvrement gélifié, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. Après une période d'incubation de trois jours à 37°C en présence d'une atmosphère enrichie de 5% CO₂, les feuillets furent fixés avec une solution de 5% de formaldéhyde, puis colorés au violet de gentiane 0,1%. La spécificité du test a été démontrée en incluant les témoins de cellules MDCK non infectées et de cellules MDCK non infectées mais ensemencées avec l'ascite enrichi en AcMo G9 dilué au 1/10. Il est à mentionner que par la suite une série de dilution allant de 1/10 à 1/500 000 a été effectuée de afin de déterminer la dilution de l'AcMo (1/400 000) entraînant une réduction de 50 % du nombre de plages. Les virus qc91 et qc81 représentent respectivement les souches virales QC91 et QC81.

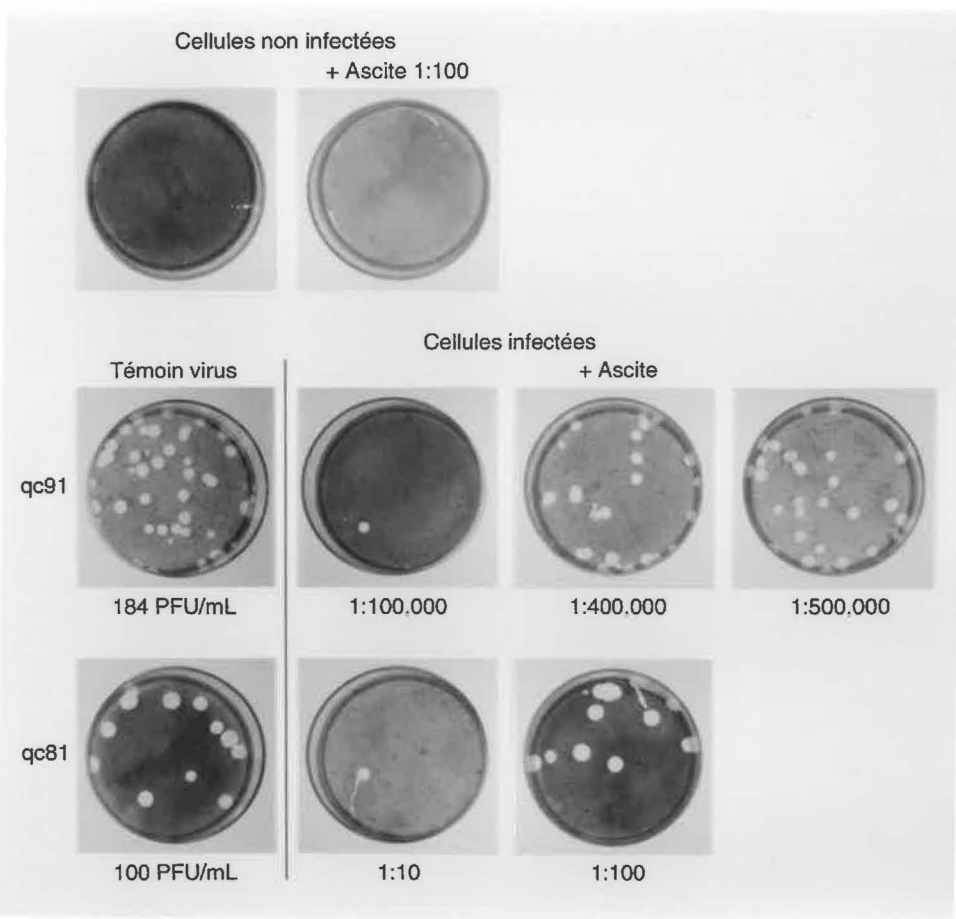
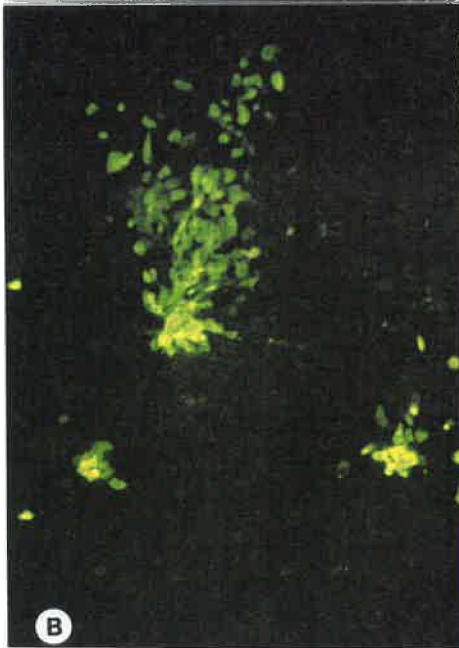
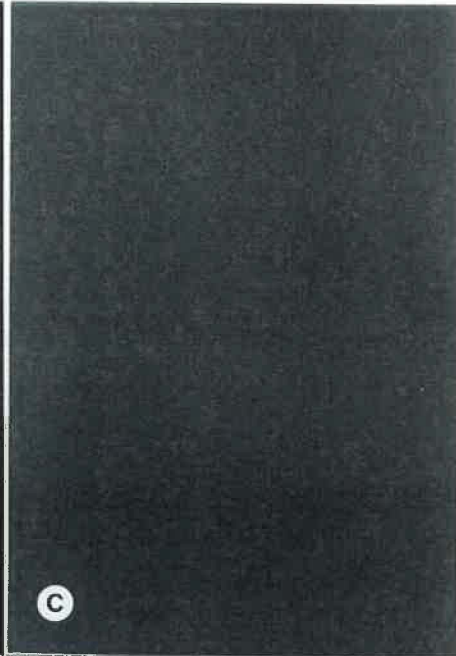


FIGURE 9. Détermination par IFI de la réactivité de l'AcMo G9 produit en liquide d'ascite contre la souche homologue (QC91) et la souche de référence (QC81) du virus de l'influenza porcin.

Des feuillets cellulaires confluents MDCK, préparés dans des plateaux de 96 puits, ont été ensemencés avec les préparations virales QC91 et QC81. Les titres infectieux déterminés après révélation par le test d'immunoperoxydase (résultats non montrés) ont été ajustés à 100 DICT₅₀/0,1 ml. Après une période d'adsorption d'1 hre, les cultures cellulaires infectées ont été incubées dans un milieu de maintien supplémenté de 10 U/ml de trypsine à 37°C et en atmosphère humide enrichie de 5% de CO₂. Les feuillets ont été fixés avec un mélange de 80% d'acétone prérefroidi à 4°C après 20 hres post-infection et puis incubées en présence de différentes dilutions de l'AcMo G9, comme décrit précédemment. Le complexe-immun était par la suite révélé avec une préparation d'Ig de lapin anti-IgG de souris couplées à l'isothiocyanate de fluorescéine. Un AcMo dirigé contre un déterminant de la protéine NP du virus influenza humain de type A a été utilisé comme témoin positif (A) et un AcMo dirigé contre le coronavirus entérique des dindes a été utilisé comme témoin négatif (D). Aucune réactivité n'a été démontrée envers les cellules non-infectées. La réaction spécifique de l'AcMo G9 dilué 1/163 840, contre les cellules infectées par le virus homologue (QC91) et la souche de référence (QC81) est illustrée en B et C. Aucune réactivité contre la souche QC81 n'a pu être démontrée à une dilution supérieure à 1/10 de l'AcMo G9.



MDCK infectées avec le virus homologue QC91; cette fluorescence cytoplasmique était identique à celle observée pour la réaction "témoin positif" obtenue avec un AcMo dirigé contre un déterminant de la protéine NP du virus influenza humain de type A et utilisé à la dilution 1/10. Dans le cas des cellules infectées avec la souche QC81, il ne fut pas possible d'observer de fluorescence lorsque la dilution de l'AcMo G9 était supérieure à 1/10.

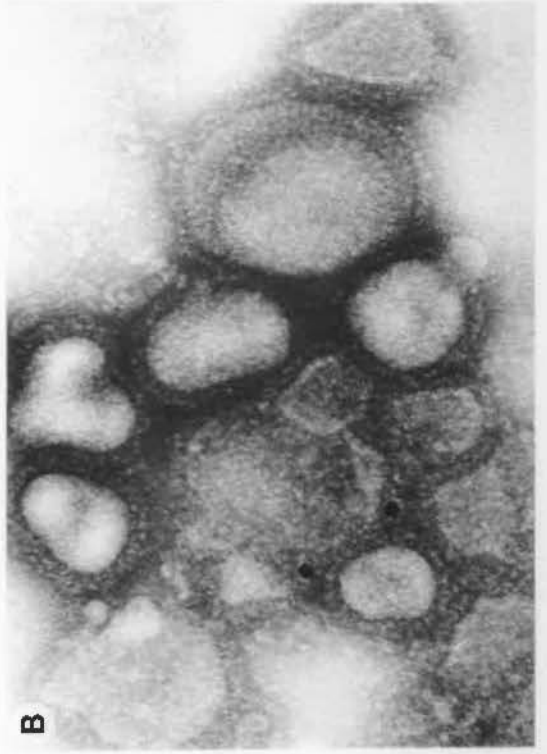
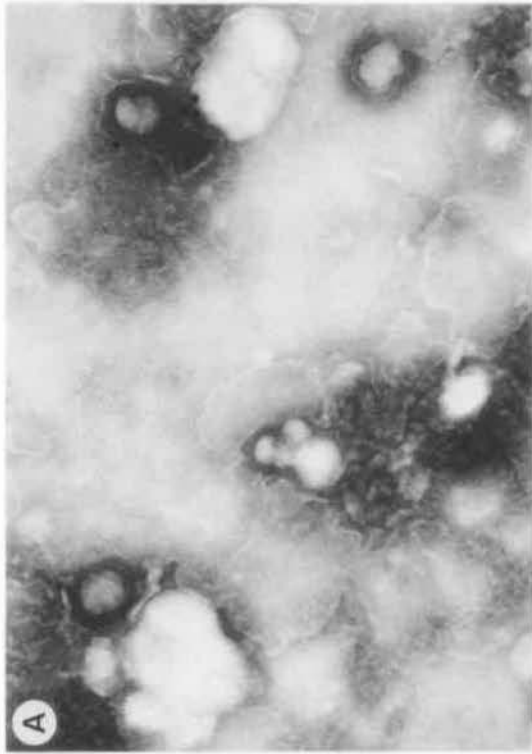
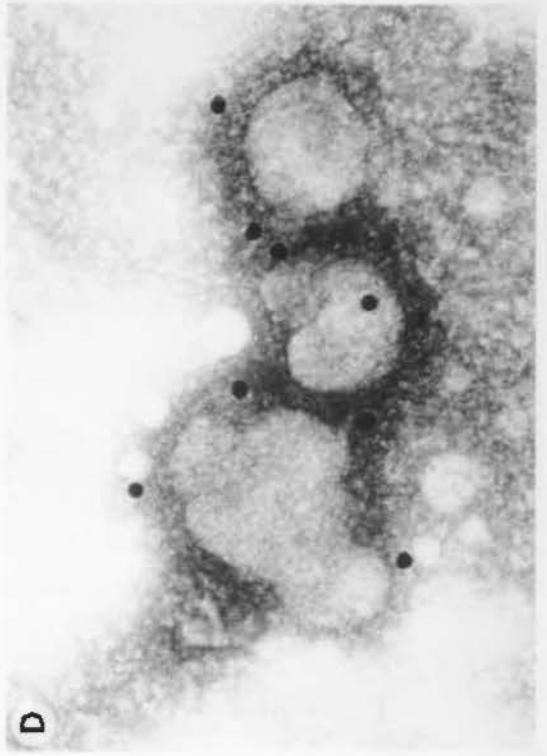
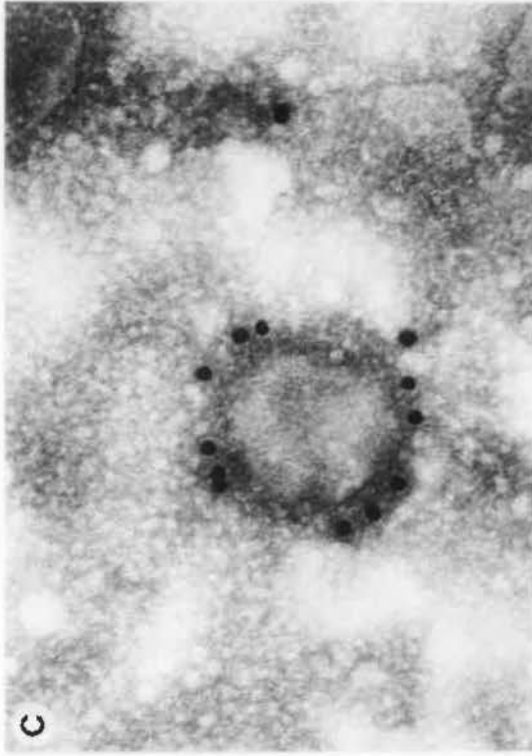
Les résultats du test d'immunomarquage à l'or colloïdal ont démontré la capacité de l'AcMo G9 à se fixer spécifiquement aux projections de surface des particules virales de la souche homologue (QC91), tel qu'observé en microscopie électronique après imprégnation négative (Figure 10). Une réaction négative fut obtenue à la suite à l'incubation de l'AcMo G9 avec le virus QC81, de même qu'après incubation de la suspension virale QC91 en présence d'ascite anti-coronavirus de dinde (IgG1) utilisé comme témoin négatif.

4.4 Comparaison sérologique des différents virus de l'influenza porcine associés à la PPN.

Afin d'évaluer les relations antigéniques existant entre la souche QC91 et d'autres isolats québécois du virus de l'influenza porcine ayant été associés à des lésions de PPN, des tests IHA ont été effectués contre les isolats IAF-Klop et IAF-1747 utilisant les différents AcMo obtenus contre le virus QC91

FIGURE 10. Liaison spécifique de l'AcMo G9 aux projections de surface des particules virales telle que déterminée par l'épreuve d'immunomarquage à l'or colloïdal.

Sur une grille de nickel fut déposé 3 μ l de virus purifié (QC91 et QC81). Une première incubation avec l'AcMo G9, pendant 17 hres à 4°C, suivie d'une seconde incubation avec l'anti-IgG de souris couplé à l'or colloïdal de 15 nm de diamètre. Les grilles furent par la suite colorées avec la solution PTA 3% (p/v) à pH 6 et observées en microscopie électronique au grossissement 210 000. En (A): Réactivité du virus QC91 après incubation en présence d'ascite témoin négatif (IgG1 anti-coronavirus de dinde); (B): Réactivité de la souche QC81 à l'AcMo G9; (C et D): Réactivité de la souche QC91 à l'AcMo G9.



Les résultats obtenus ont démontré que tous les AcMo inhibaient l'activité hémagglutinante des isolats IAF-Klop et IAF-1747 aux mêmes titres que la souche homologue (QC91) (Tableau VII).

4.5 Capacité de l'AcMo G9 à entrer en compétition avec les sérums hyperimmuns de porc ou sérums de porcs convalescents en ELISA.

Afin de déterminer s'il serait possible de distinguer entre les anticorps produits chez les porcs contre les souches de référence (QC81) et celle associée aux lésions de PPN (QC91), les paramètres d'un test ELISA de blocage ont été évalués. Dans cette épreuve, on déterminait si les animaux infectés par une souche associée aux lésions de PPN produisaient dans leur sérum des anticorps dirigés spécifiquement contre l'épitope reconnu par l'AcMo G9 permettant de différencier la souche QC91 de la souche QC81. Nous avons donc évalué si les sérums de tels porcs possédaient des anticorps pouvant entrer en compétition avec l'AcMo G9.

Un tel test de compétition fut d'abord évalué contre un sérum hyperimmun ayant été produit chez des porcelets E.O.P.S contre l'isolat purifié QC91. Les titres IHA contre la souche homologue furent évalués après chacune des quatre inoculations. Des titres IHA de 1/80, 1/320, 1/1600 et 1/2560 ont été obtenus

TABLEAU VII Comparaison antigénique de différents virus de l'influenza porcin associés à la PPN telle que déterminée par le test IHA à l'aide d'AcMo contre la souche QC91.

| Souches virales | Surnageant des cultures des hybridomes | | | | | |
|-----------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| | D3 | E1 | G9 | G11 | B8 | B10 |
| QC91 | 320 | 320 | 640 | 160 | 320 | 320 |
| IAF-1747a | 320 | 320 | 320 | 160 | 320 | 160 |
| IAF-Klop _b | 320 | 640 | 640 | 320 | 640 | 320 |
| IAF-1192 _c | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 |
| QC81 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 | <5 |

^a L'isolat IAF-1747 a été isolé de porc de la même ferme que la souche QC91, mais six mois après l'isolement de cette dernière.

^b L'isolat IAF-Klop a été isolé de porcs d'autres fermes affectés par la PPN.

^c La souche IAF-1192 a été isolée en 1986 de porcs de fermes québécoises ayant expérimentées une épidémie de grippe porcine classique. (Suite page 130)

TABLEAU VII (suite).

- Les titres IHA correspondent à la réciproque de la plus haute dilution de l'AcMo testé (surnageant de culture) inhibant 4 UHA de virus.
- Un titre IHA supérieur ou égal à 160 a été considéré comme titre significatif.
- La variation antigénique entre les deux souches virales était considérée comme significative si l'écart entre les titres IHA était supérieur ou égal à 4 dilutions logarithmiques de base deux.

après les jours 12, 42, 67 et 97 post-immunisation. Des titres inférieurs à 1/20 ont été obtenus pour les sérums pré-immuns.

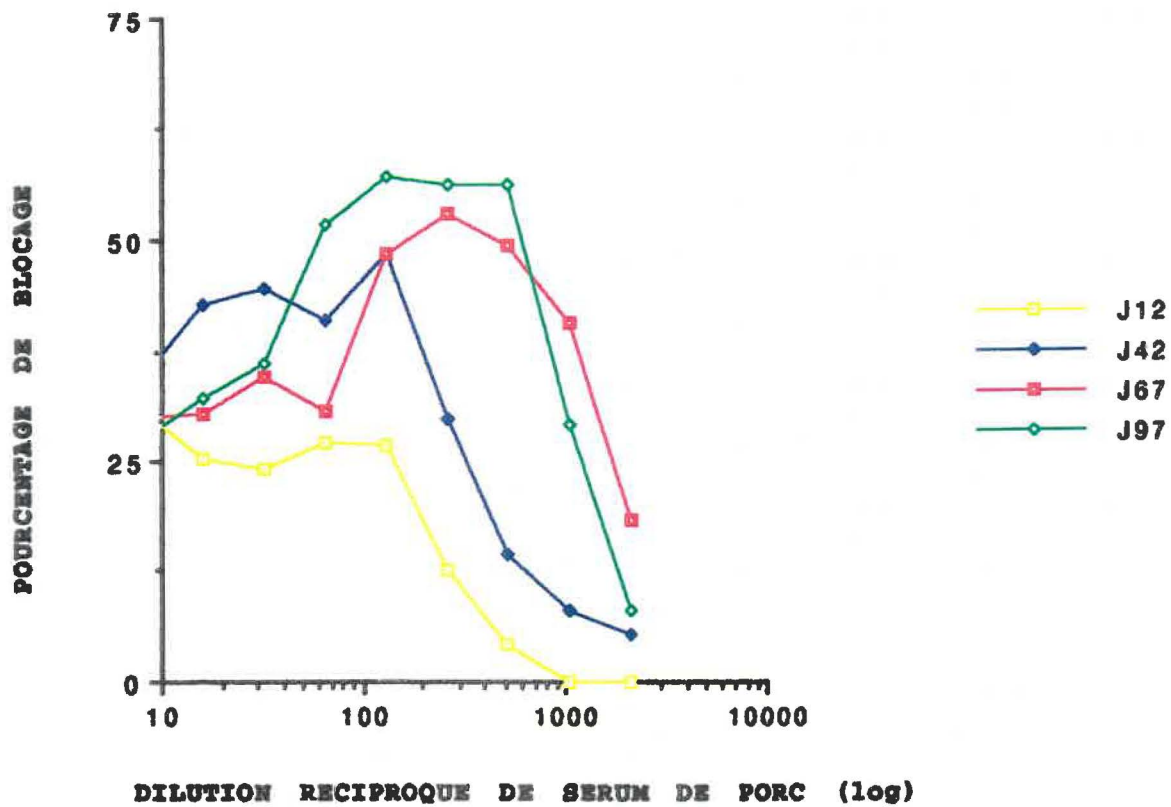
La préparation d'antigène utilisée pour l'enrobage des plateaux était constituée du virus QC91 ajusté à la concentration 0,5 µg/0,05 ml. Parmi les différentes solutions de blocage utilisées, c'est la solution de 1 % de BSA qui permet d'obtenir les résultats les plus reproductibles. Les différentes dilutions de l'ascite riche en AcMo G9 ont été testées en ELISA indirecte contre la préparation virale purifiée. Une valeur d'absorbance de 1,5 à 1,0 a pu être enregistrée aux dilutions comprises entre 1/16 000 et 1/256 000.

La figure 11 illustre la courbe de compétition obtenue lorsque différentes dilutions du sérum hyperimmun furent testées contre la dilution fixe 1/16 000 de l'ascite G9. Les résultats démontrent qu'il y avait une compétition entre les anticorps présents dans le sérum hyperimmun et l'AcMo G9. Un degré de compétition supérieur à 50% a été observé avec les dilutions 1/128 jusqu'à 1/512 du sérum hyperimmun. Une compétition légèrement supérieure à 25 % a pu être notée jusqu'à la dilution 1/1024 du sérum hyperimmun. A une dilution supérieure à 1/2048, aucune compétition ne fut démontrée avec le sérum de porcs immunisés.

Des sérums (2) récupérés de porcs provenant de fermes affectées par des problèmes respiratoires attribuables à des

FIGURE 11. Courbe de compétition obtenue entre l'AcMo G9 (ascite) et le sérum de porc hyperimmun produit contre la souche homologe (QC91) telle que déterminée par ELISA.

Une quantité constante (0,5 µg) de virus QC91 a été adsorbée au fond des plateaux de 96 puits. Les sérums hyperimmuns testés ont été prélevés de porcelets inoculés expérimentalement avec la souche QC91 aux jours 0, 12, 42, 67 et 97 post-immunisation. Les titres IHA respectifs étaient de 1/20, 1/80, 1/320, 1/1600 et 1/2560. Les sérums ont été dilués en série de base deux (avec une dilution initiale de 1/8). Après une première incubation de 17 hres à 4°C, une seconde incubation de 90 min hres à la TP a été effectuée en présence d'une dilution constante (1/16 000) de l'ascite G9 donnant une valeur d'absorbance supérieure à 1,0. Par la suite, l'attachement de l'AcMo au virus a été révélé consécutivement à une incubation en présence de la préparation d'Ig de chèvre anti-IgG de souris couplées à la peroxydase. La réaction enzymatique fut révélée à la suite de l'ajout du substrat de l'enzyme (OPD). Le pourcentage de compétition a été calculé selon la formule présentée à l'annexe III.3. Une compétition supérieure à 50% a été notée aux dilutions du sérum hyperimmun comprises entre 1/256 et 1/512. Une compétition supérieure à 25% a été observée jusqu'à la dilution 1/1024 du sérum hyperimmun. virus QC91. fermes positives. Une compétition moyenne de 39 % fut notée aux dilutions s'étendant entre 1/256 et 1/512. A la dilution 1/1024 du sérum testé, une compétition négligeable de 20 % fut observée.



Ces deux sérums présentaient des titres IHA de 1/640 quand testés avec les souches QC91 et QC81. Après leurs incubations avec les différentes dilutions de sérums positifs et négatifs de porcs s'étendant de 1/8 à 1/2048; le pourcentage de compétition a été calculé selon la formule décrite à l'Annexe II.3. Les résultats rapportés dans la figure 12 démontrent qu'il y avait une compétition entre les anticorps présents chez ces animaux et l'AcMo G9. Un fort degré de compétition (80 % à 65%) a été observé avec les dilutions 1/8 à 1/256 de ces sérums de porcs obtenus des fermes positives. Une compétition moyenne de 39 % fut notée aux dilutions s'étendant entre 1/256 et 1/512. A la dilution 1/1024 du sérum testé, une compétition négligeable de 20 % fut observée.

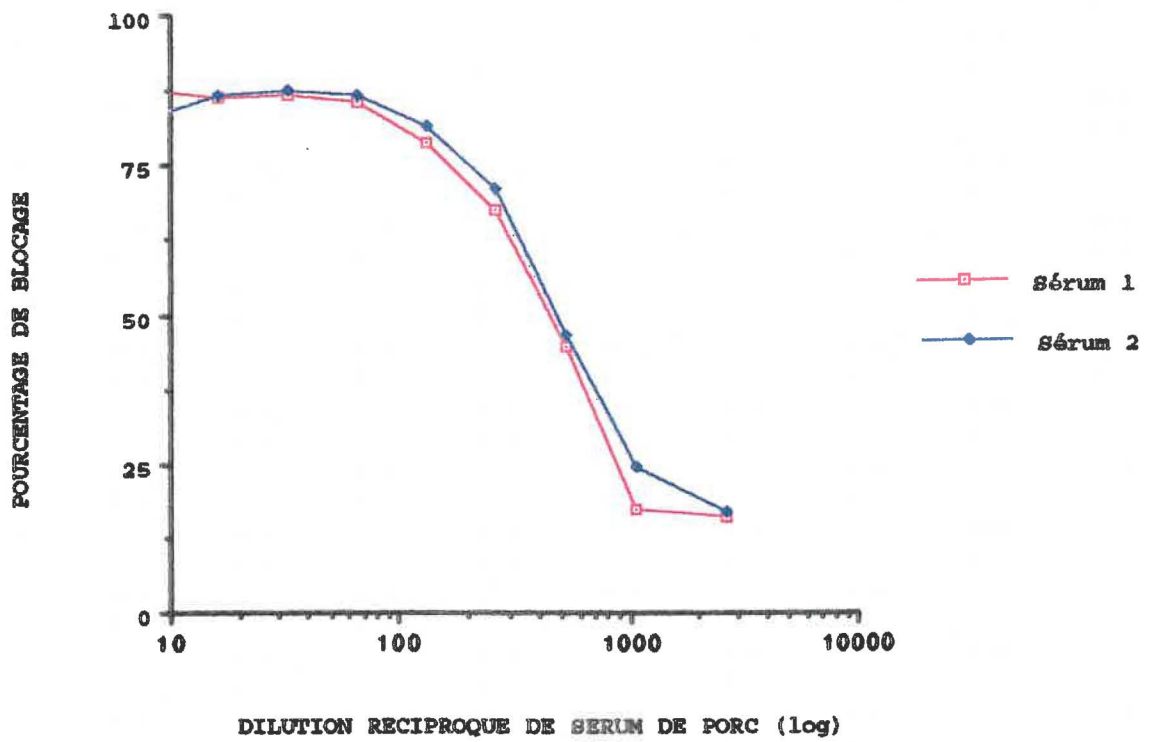
5. Analyses génomiques des isolats québécois du virus de l'influenza porcine ayant été associés aux lésions de PPN.

5.1 Profil électrophorétique des fragments d'ADN (HA1) amplifié par PCR.

L'ARN génomique de la souche virale (IAF-1192) a été extrait à partir du virus concentré suivant la technique de Chomczynski et Sacchi(1987), tandis que l'ARN des isolats IAF-Klop et IAF-1747 a été extrait des lysats de cellules MDCK infectées par ces virus par la technique de Glisin et al. (1974). Des copies d'ADNc, correspondant à la région HA1 du gène codant pour la protéine HA, ont été générées et ampli-

FIGURE 12. Courbe de compétition obtenue entre l'AcMo G9 (ascite) et les sérums de porcs convalescents ayant eu des problèmes respiratoires attribuables à des lésions de PPN.

Une quantité constante (0,5 μ g) de virus QC91 a été adsorbée au fond des plateaux de 96 puits. Ensuite, les sérums de porcs de champs (titre IHA \geq 1/640 contre la souche virale QC91 et celle de référence (QC81)), de même que les sérums négatifs de porcs, ont été dilués en série de base deux (avec une dilution initiale au 1/8), déposés dans les plateaux et incubés pendant 17 hres à 4°C. Une seconde incubation de 90 min à la TP a été effectuée en présence d'une dilution constante (1/16 000) de l'AcMo (G9) donnant une valeur d'absorbance supérieure à 1,0. Par la suite l'attachement de l'AcMo au virus a été révélé consécutivement à une incubation en présence de la préparation d'Ig de chèvre anti-IgG de souris couplées à la peroxydase et à la réaction du complexe avec la substrat de l'enzyme (OPD). Le pourcentage de compétition a été calculé selon la formule présentée à l'annexe III. 3. Une compétition supérieure de 80 à 65 % a été notée aux dilutions des sérums de champs comprises entre 1/8 et 1/256. Une compétition moyenne de 39 % a été observée à la dilution 1/512 des sérums. A la dilution au 1/1024 des sérums, une compétition négligeable de 20 % fut observée.



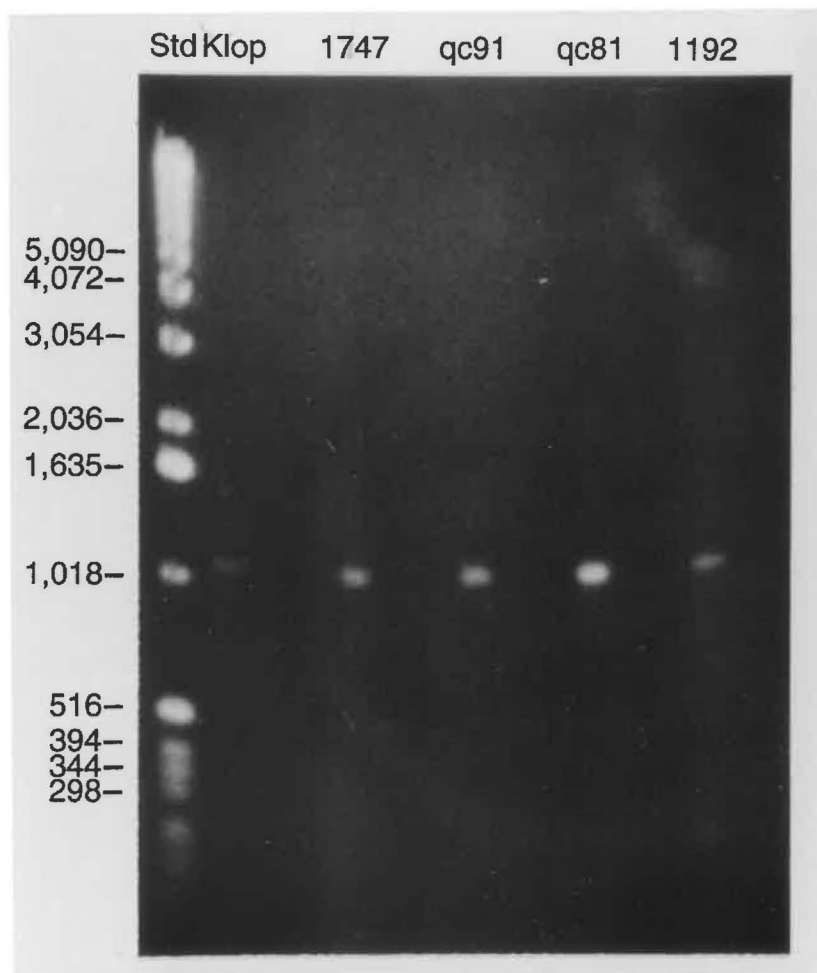
fiées par PCR en utilisant les amorces oligonucléotidiques 7S (sens) et 1065R (anti-sens) (voir Matériel et Méthodes) comprenant à leurs extrémités 5' un site de reconnaissance spécifique pour l'enzyme de restriction *ECORI*. La figure 13 représente le profil de migration électrophorétique de l'ADN (HA1) amplifié à partir des différents virus. Un fragment d'ADN d'environ 1,1 Kb et d'une longueur similaire à ceux amplifiées à partir des souches témoins QC91 et QC81 (Rekik et al., 1994) a été obtenu pour les isolats IAF-Klop, IAF-1747 et IAF-1192.

5.2 Sélection des clones recombinants.

Les fragments d'ADN (HA1) synthétisés et amplifiés à partir de l'ARN génomique des isolats IAF-Klop, IAF-1747 et IAF-1192 ont été clonés dans le vecteur pUC19. Les clones recombinants issus de la transformation des bactéries compétentes XL1-Blue ont été criblés selon leur capacité à croître sur le milieu de sélection contenant de l'ampicilline et de la tétracycline. Les plasmides ont été extraits des colonies bactériennes transformées (blanches) et la vérification de la longueur de l'insert a été effectuée à la suite de la migration électrophorétique de l'ADN plasmidique digérée par l'enzyme *ECORI*. La figure 14 montre les produits de la digestion partielle du vecteur révélant trois fragments d'ADN: la forme circulaire du vecteur d'une longueur approximative de 5000

FIGURE 13. Profil électrophorétique du fragment du gène codant pour la protéine HA1 des différents isolats du virus de l'influenza porcine tel qu'amplifié par RT-PCR.

Un volume de 1 μ l du produit d'amplification obtenu par la réaction RT-PCR à partir des préparations d'ARN des virus IAF-1747, IAF-Klop, IAF-1192, ainsi qu'un mélange d'ADN servant de standard moléculaire, ont été dilués dans du "tampon échantillon" et furent déposés dans les puits d'un gel d'agarose de 0,8 % (p/v) contenant du bromure d'éthidium. Après électrophorèse d'1 hre sous une tension constante de 90 V, le gel fut exposé aux rayons U.V afin de permettre la révélation des produits amplifiés. Les fragments HA1 (ADNc) obtenus à partir des virus QC91 et QC81 ont servi en tant que témoins positifs. Il est à noter que les virus qc91 et qc81 (sur la figure 13) correspondent aux souches virales QC91 et QC81 respectivement.



paire de bases (pb), la forme linéaire du vecteur de 3000 pb et un insert d'ADN ayant été amplifié par PCR à partir des différents isolats testés (Rekik *et al.*, 1994). Des inserts migrant au même niveau que les fragments HA1 des souches de références QC81 et QC91 ont été clonés pour les virus IAF-Klop et IAF-1192. Le produit de digestion de l'ADN plasmidique du virus IAF-1747 a montré un insert d'une longueur légèrement supérieure à 500 pb (Figure 15) (puits 3, 5, 6). Les résultats obtenus avec cet isolat suggèrent la présence à l'intérieur du fragment HA1 d'un site de restriction pour l'enzyme *ECORI*. Le fragment HA1 du IAF-1747 a dû être conséquemment cloné dans le T-vecteur PCR 2000 (Invitrogène).

5.3 Analyse des séquences de la portion HA1 de la protéine HA des souches du virus influenza porcine

5.3.1 Comparaison des séquences nucléotidiques des fragments HA1.

La séquence nucléotidique de la sous-unité HA1 du gène codant pour la protéine HA, incluant le site de clivage protéolytique, a été obtenue pour chacune des souches étudiées. Les inserts de deux clones recombinants pour chacune des souches ont été séquencés par la méthode de Sanger basée sur la terminaison de la synthèse de la chaîne d'ADN par l'ajout de didéoxynucléotides (voir Matériel et Méthodes). L'enzyme T7 DNA polymérase (Pharmacia) a été utilisée pour les expériences

FIGURE 14. Sélection des bactéries recombinantes porteuses de la région du gène codant pour la portion HA1 de la protéine HA des souches du virus de l'influenza porcine.

Un volume de $1\mu\text{l}$ du produit de la digestion par l'enzyme *ECORI* de l'ADN plasmidique extrait des clones recombinants porteurs du fragment HA1 du gène HA des virus IAF-Klop, IAF-1192, QC91 et QC81, ainsi que le mélange d'ADN servant de standard moléculaire, ont été dilués dans le tampon échantillon et déposés dans les puits d'un gel d'agarose de 0,8 % (p/v) contenant du bromure d'éthidium. Après une électrophorèse d'1 hre sous une tension constante de 90 V, le gel fut exposé aux rayons U.V pour la révélation. La figure 14 représente les profils électrophorétiques des produits de la digestion partielle de deux clones recombinants sélectionnés pour chacune des souches virales IAF-Klop et IAF-1192. Les trois fragments d'ADN visibles sur le gel correspondent respectivement à la forme circulaire du vecteur d'une longueur approximative de 5,0 kilopaires de bases (Kb), à la forme linéaire du vecteur d'une longueur d'environ 3,0 Kb et l'insert correspondant au produit amplifié par RT-PCR (longueur d'environ 1,1 Kb) similaire à ceux amplifiés à partir des virus témoins QC91 et QC81.

Il est à mentionner que les virus qc81 et qc91 (sur la figure 14) correspondent respectivement aux souches virales QC81 et QC91 respectivement.

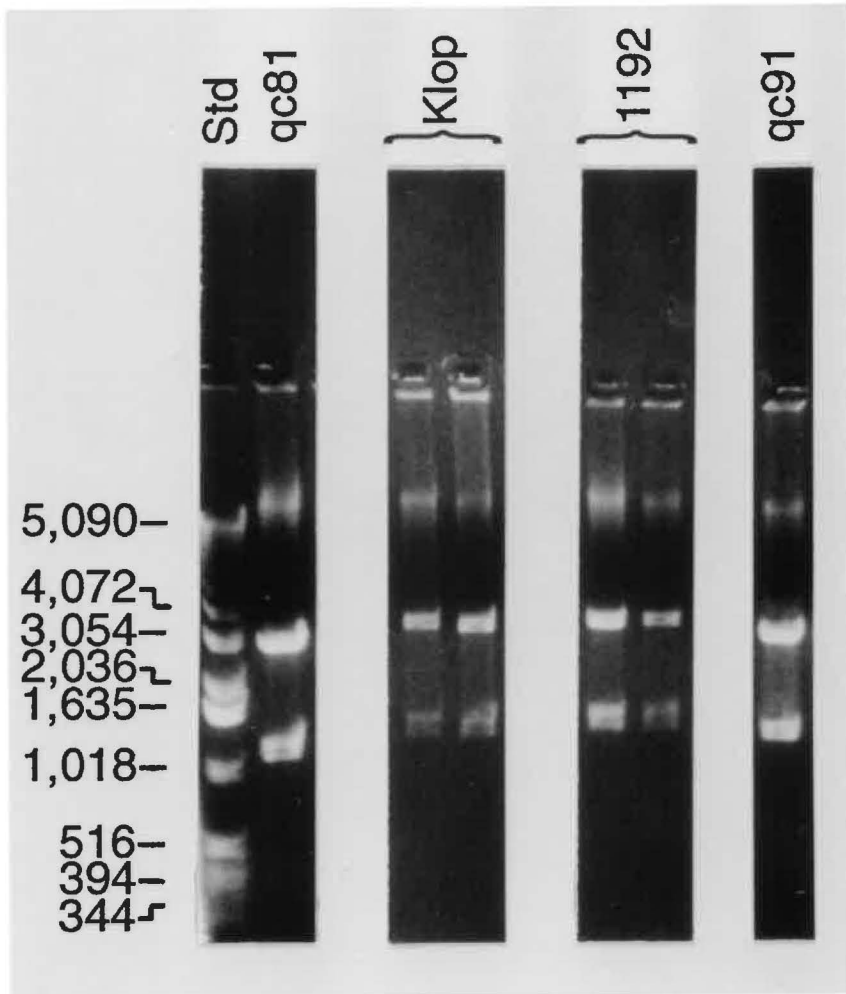
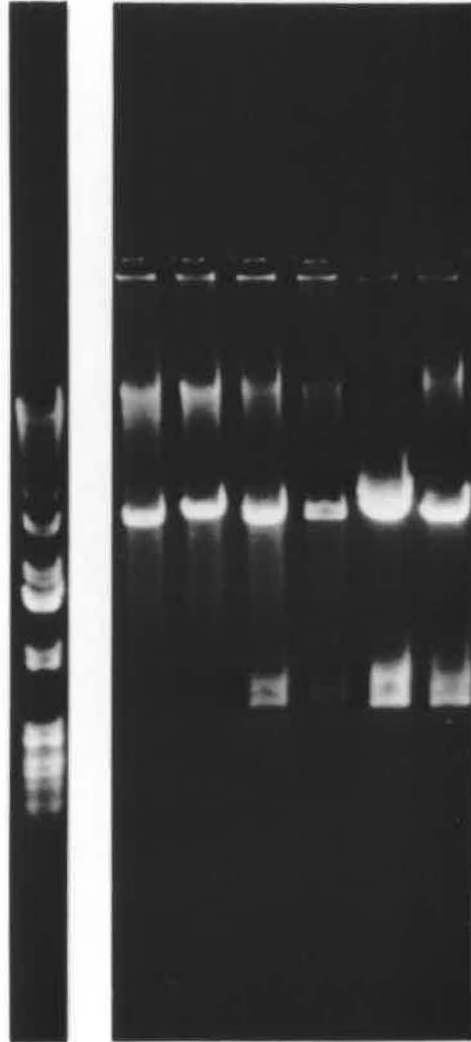


FIGURE 15. Sélection des bactéries recombinantes porteuses de la région du gène codant pour la portion HA1 de la protéine HA de la souche IAF-1747 du virus de l'influenza porcine.

Un volume de 1 μ l du produit de la digestion par l'enzyme *ECOR1* de l'ADN plasmidique extrait des clones recombinants porteurs du fragment HA1 du gène HA de l'isolat IAF-1747, ainsi que le mélange d'ADN servant de standard moléculaire, ont été dilués dans le tampon échantillon et déposés dans les puits 1 à 6 d'un gel d'agarose de 0,8 % (p/v) contenant du bromure d'éthidium. Après une électrophorèse d'1 hre sous une tension constante de 90 V, le gel fut exposé aux rayons U.V pour la révélation. En plus des formes circulaires (5,000 Kb) et linéaire (3,000 Kb) du plasmide non-digéré, le produit de digestion de l'ADN plasmidique du virus IAF-1747 a montré un insert d'une longueur légèrement supérieure à 500 pb (puits 3, 5, 6), ce qui suggère la présence à l'intérieur du fragment HA1 de ce virus d'un site de restriction pour l'enzyme *ECOR1*.

Std 1 2 3 4 5 6

5,090—
4,072—
3,054—
2,036—
1,635—
1,018—
516—
394—
298—



de séquençage. La figure 16 représente l'alignement des séquences nucléotidiques des fragments HA1 des virus IAF-1747, IAF-Klop et IAF-1192 avec celles déjà publiées des souches QC91 et QC81 (Rekik et al., 1994). La séquence nucléotidique du fragment HA1 de la souche QC91 fut utilisée comme référence et seuls les nucléotides qui diffèrent ont été mentionnés pour les autres souches. La longueur des fragments HA1 amplifiés et clonés était de 1078 nucléotides, ce qui est identique à la longueur du fragment amplifié pour les souches témoins QC91 et QC81. Le calcul des pourcentages d'homologie entre les séquences des fragments HA1 des différentes souches a montré que les séquences des isolats IAF-Klop et IAF-1747 étaient respectivement analogues à 96 % et 95% avec celles des souches QC91 et QC81 (Tableau VIII). Par contre, les degrés d'homologie furent estimés à 94 % et 97 % lors de la comparaison de la souche IAF-1192 aux souches QC91 et QC81. Une similarité de 97% a été observée entre la séquence HA1 de la souche IAF-1747 et celle de la souche IAF-Klop, tandis que l'analogie n'était que de 93% entre les séquences de la souche virale IAF-1192 et celles des deux premières.

FIGURE 16. Comparaison des séquences nucléotidiques ADN (HA1) des différentes souches du virus de l'influenza porcin.

Les séquences des virus IAF-1747, IAF-Klop, IAF-1192 ont été alignées avec celles déjà publiées des virus QC91 et QC81 (Rekik et al., 1994). La séquence nucléotidique du virus QC91 est décrite dans toute sa longueur et les nucléotides distincts des autres virus sont mentionnés. Les amorces sens (7S) et anti-sens (1065 R) ont été utilisées pour le PCR, et les amorces sens (345) et anti-sens (810 R et 500 R) ont été utilisées pour le séquençage.

AMORCE 7S

| | | | | | | | | | | |
|------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| QC91 | GCAGGGGAAA | ATAAAGCCA | CCAAGATGAA | GGCAATACTA | TTAGTCTTGC | TATATACTACT | TACAGCCGCA | AATGCAGACA | CACTATGTAT | 90 |
| 1747 | | | | | |T. | | | | 90 |
| KLOP | | | | | |T.T. | | | | 90 |
| 1192 | | | ..G. | | |T. | | | | 90 |
| QC81 | | | ..G. | | |T. | | | | 90 |
| | | | | | | | | | | |
| QC91 | AGGTTATCAT | GCAAATAATT | CAACTGACAC | TGTTGATACA | GTAAGTAGAAA | AGAATGTAAC | AGTAACACAA | TCTGTAAACC | TTCTAGAAGA | 180 |
| 1747 | | | | | | | | | ..C..... | 180 |
| KLOP | | | | | | | | | | 180 |
| 1192 | | | | | | G..... | | |A. | 180 |
| QC81 |G. | | | | | | | | | 180 |
| | | | | | | | | | | |
| QC91 | CAAACATAAC | GGAAACTAT | GTAAGTAGG | GGGAATAGCC | CCATTGCACT | TGGGTAAATG | TAACATGCT | GGATGGCTTT | TGGGAAATCC | 270 |
| 1747 | ..GG..... | | ..C..... | | | | | |C.. | 270 |
| KLOP | ..GG..... | | ..C..... |C..... | | | | |C.. | 270 |
| 1192 | ..G..... | | | ..G..... |T. | | C..... | |C.. | 270 |
| QC81 | ..GG..... | |G.. | ..G..... | | | C..... | |C.. | 270 |

AMORCE 345 S

GGG ACATGTTACC CAGGAGAT

| | | | | | | | | | | |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| QC91 | AGAATGTGAA | TTACTATTCA | CAGTAAGCTC | ATGGTCTTAC | ATTGTGGAAA | CATCTAACTC | AGACAATGGG | ACATGCTACC | CAGGAGATTT | 360 |
| 1747 | | | | | | | | | | 360 |
| KLOP | | ..T..C.. | | | | | | | | 360 |
| 1192 | | ..T.G... |A. | | G..... | ..G..A.. | | ..TA.. | | 360 |
| QC81 | | | | | G..... | ..G..... | | ..T... | | 360 |
| | | | | | | | | | | |
| QC91 | CATCGATTAT | GAGGAGCTGA | GAGAGCAGTT | GAGCTCAGTA | TCATCATTG | AAAGATTGGA | GATATTCCCC | AAGGAAAGTT | CATGGCCCAA | 450 |
| 1747 |A..... | | |G |C. | | | ..C..... | | 450 |
| KLOP | | | | | | | | ..C..... | | 450 |
| 1192 |A..... | ..A..A... | ..G..... |G | | ..C..C.. | | ..C..... | ..G..... | 450 |
| QC81 |A..... | ..A..A... | |G | | ..C..... | | ..C..... | ..G..... | 450 |

AMORCE 500 R

CGACCTCGTT TGTCGAAGAT G

| | | | | | | | | | | |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| QC91 | TCATGAAACA | AACAGAGGTG | TGACGGCAGC | ATGCCCTTAT | GCTGGAGCAA | ACAGCTTCTA | CAGAAATTTA | ATTTCGGCTGG | TGAAAAAAGG | 540 |
| 1747 | | | | | | | | ..A..... | ..A....G.. | 540 |
| KLOP |G.. | | ..T..... | ..T..... | ..C..... | | | ..A..... | | 540 |
| 1192 | | | G..... | G..... | ..A..G... | | | ..A..... |G. | 540 |
| QC81 | | | | | ..C..... | | | ..A..... |G. | 540 |

TABLEAU VIII Pourcentages d'homologie existant entre les séquences nucléotidiques de la portion HA1 du gène HA des différentes souches du virus de l'influenza porcin.

| | QC81 | QC91 | 1747 | KLOP | 1192 |
|------|------|------|------|------|------|
| QC81 | - | 96% | 95% | 95% | 97% |
| QC91 | 96% | - | 96% | 96% | 94% |
| 1747 | 95% | 96% | - | 97% | 93% |
| KLOP | 95% | 96% | 97% | - | 93% |
| 1192 | 97% | 94% | 93% | 93% | - |

5.3.2 Comparaison des séquences en acides aminés de la portion HA1 de la protéine HA des différentes souches du virus de l'influenza porcin.

Les séquences en acides aminés de la portion HA1 de la protéine HA des différentes souches virales étudiées ont été déduites des séquences nucléotidiques en utilisant le programme Mac Vector version 3.5. La figure 17 présente l'alignement des virales IAF-1747, IAF-KLOP et IAF-1192 comparativement à celles déjà publiées pour les souches QC91 et QC81 (Rekik et al., 1994). La séquence du virus QC91 fut utilisée comme référence et seuls les acides aminés qui diffèrent dans le cas des autres virus furent indiqués. En plus, les acides aminés correspondant aux quatre sites antigéniques C_a , C_b , S_a et S_b définis pour le virus humain A/PR/8/34 par Caton et al., (1982) sont mentionnés sur la séquence. Aucune délétion ou insertion d'acides aminés n'a été observée entre les séquences HA1 des virus étudiés. Tous ces fragments présentaient une longueur de 327 acides aminés, les 17 premiers acides aminés constituant le peptide signal. Les mutations d'acides aminés localisées dans séquences en acides aminés de la protéine HA1 des souches le peptide signal et celles rapportées après le site de clivage ont été ignorées pour la comparaison des séquences. Un degré d'homologie de 96 % a été démontré entre les séquences des sous-unités HA1 des souches QC91 et IAF-1747 (Tableau IX).

FIGURE 17. Comparaison des séquences en acides aminés de la portion HA1 de la protéine HA des différentes souches du virus de l'influenza porcin.

Les séquences en acides aminés de la sous-unité HA1 de la protéine HA des souches IAF-1747, IAF-Klop, IAF-1192, de même que les séquences des souches témoins QC81 et QC91 (Rekik et al., 1994) sont représentées. La séquence entière de la sous-unité HA1 du virus QC91 est rapportée, tandis que seuls les acides aminés qui diffèrent sont représentés pour les autres souches virales. Les trois déterminants antigéniques du virus influenza porcin A (H1N1) (C_a, S_a et S_b) sont indiqués de même que le site de clivage au niveau de l'Arg (R) entre les sous-unités HA1 et HA2 (« »). Les sites potentiels de N-glycosylation (N-X-S/T) sont soulignés. Voir annexe III pour la liste d'abréviation des acides aminés.

HAI

QC91 MKAILLVLLY TLTAANADTL CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL 50
 1747F..... 50
 KLOP IF..... 50
 QC81F..... .V..... 50
 1192F.....R. 50

cbcbcbcbcb cbcb

QC91 EDKHNGKLCK LGGIAPLHLG KCNIAGWLLG NPECELLFTV SWSYIVETS 100
 1747 ..R..... 100
 KLOPT..... .S.. 100
 QC81V... 100
 1192 .NR..... R..... 100

cb sa caca

QC91 NSDNGTCYPG DFIDYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHETNRGVT 150
 1747N..... 150
 KLOPA.. S 150
 QC81N.....A.. 150
 1192 K.....N.. .N.....A.. 150

cacacaca ca sb sasasbsasasasasasa sa ca cacaca

QC91 AACPYAGANS FYRNLIWLVK KGNSYPKLSK SYVMNKGKEV LVLWGIHHP 200
 1747 200
 KLOP S 200
 QC81E..... 200
 1192E.....A...T 200

sb sbsbsb sb sbcb caca caca

QC91 TSNDQOSLYQ NADTYVFGS SKFNRKFKPE IATRPKVRNQ AGRMNYWTL 250
 1747I.. ..Y.K.... ..G. 250
 KLOP .N..... .A..... ..Y.K.... ..G. T. 250
 QC81 ..T..... .A..... ..Y..... ..G. 250
 1192 ..A..... .A..... ..Y..... ..G. 250

ca

QC91 VEPGDTITFE ATGNLVVPRY AFAMKRGSGS GIIISDTPIH DCDTTCQTPK 300
 1747N... 300
 KLOPA... ..A.V. ..N... 300
 QC81 I..... ..N... 300
 1192 I..... ..N... ..C... 300

HAI«»HA2

QC91 GAINSLPFQ NIHPVTIGEC PKYVKSTKLR MATGLRNIPS IQSRGLFGAI 350
 1747V.....E.. 350
 KLOPV.....E.. 350
 QC81 350
 1192K.E.. 350

QC91 A 351
 1747 . 351
 KLOP . 351
 QC81 . 351
 1192 . 351

TABLEAU IX Pourcentages d'homologie existant entre les séquences en acides aminés de la portion HA1 de la protéine HA des différentes souches du virus de l'influenza porcin.

| | QC81 | QC91 | 1747 | KLOP | 1192 |
|------|------|------|------|------|------|
| QC81 | - | 96% | 96% | 94% | 97% |
| QC91 | 96% | - | 96% | 94% | 93% |
| 1747 | 96% | 96% | - | 97% | 94% |
| KLOP | 94% | 94% | 97% | - | 92% |
| 1192 | 97% | 93% | 94% | 92% | - |

Entre ces deux virus, on identifia 8 changements d'acides aminés (en positions 53, 114, 208, 223, 225, 239, 293 et 312) incluant seulement trois acides aminés chargés (Arg, Asn et Lys) en position 53, 114 et 225. Des mutations en acides aminés ont aussi été identifiées à l'intérieur des séquences correspondant aux sites antigéniques S_b (en position 208) et C_a (en position 239), tandis qu'un changement apparu en position 293 a entraîné l'apparition d'un nouveau site potentiel de glycosylation.

La souche IAF-1747 démontra un degré de similarité de 96% avec la souche de référence (QC81) (Tableau IX). Entre ces deux virus, on identifia 12 changements d'acides aminés (en positions 22, 53, 96, 137, 172, 203, 214, 225, 251, 275, 293, et 312) dont deux acides aminés chargés (Arg et Lys) en position 53 et 225. Au niveau des sites antigéniques, on identifia une seule mutation au niveau du site S_b (en position 203). Contrairement au virus QC91, il n'y a pas eu de mutation de l'acide aminé 239 (C_a) entre les virus QC81 et IAF-1747, mais le changement de l'acide aminé (293) a entraîné l'apparition d'un nouveau site de glycosylation.

Un degré d'homologie de 94% a été démontré entre les séquences en acides aminés des sous-unités HA1 des souches IAF-Klop et QC91 (Tableau IX).

Au moins 16 changements d'acides aminés (en position 64, 88, 137, 150, 200, 202, 214, 223, 225, 239, 241, 267, 287, 289, 293, 312) ont été identifiés dont 2 acides aminés chargés (Tyr et Lys) en position 223 et 225 respectivement. Comme pour la souche IAF-1747, un changement d'acide aminé est apparu au niveau du site antigénique C_a en position 239 et un changement survenu en position 293 a résulté en l'apparition d'un site potentiel de glycosylation.

Comparativement à la souche QC81, la souche IAF-Klop démontra un degré d'homologie de 94 % (Tableau IX) avec des changements impliquant 19 acides aminés (en position 22, 64, 88, 96, 114, 150, 172, 200, 202, 203, 225, 241, 251, 257, 275, 287, 289, 293, 312) dont deux acides aminés chargés (Asn et Lys) en position 114 et 225 respectivement). Comme pour la souche IAF-1747, aucun changement d'acide aminé n'a été observé au niveau du site antigénique C_a entre l'isolat IAF-Klop et la souche QC81, mais celui survenu en position 293 a résulté en l'apparition d'un nouveau site de glycosylation.

Quant à la séquence d'acides aminés de la sous-unité HA1 de la souche IAF-1192, une analogie de 93 % avec la souche QC91 (Tableau IX) fut observée. Un changement de 19 acides aminés a été identifié (en position 39, 52, 53, 91, 101, 108, 114, 137, 172, 195, 200, 203, 214, 223, 239, 251, 275, 285 et 319) dont 5 acides aminés chargés: des résidus Arg en position 39,

53 et 91, des résidus Lys en position 101 et 319. Certains changements ont aussi été identifiés au niveau des sites antigéniques S_b (en position 203), S_a (en position 172) et C_a (en position 239).

Lorsque comparée à la souche QC81, c'est 97 % d'homologie qui a pu être démontrée avec 12 changements d'acides aminés (en position 22, 39, 52, 53, 91, 101, 108, 195, 200, 203, 285 et 319), incluant 5 acides aminés chargés dont trois résidus Arg en position 39, 53, 91 et deux résidus Lys en position 101 et 319. Les mêmes changements d'acides aminés identifiés précédemment entre les souches QC91 et QC81 au niveau des sites antigéniques C_a (position 239) et S_a (position 172) ont été reconnus avec la souche IAF-1192, cependant le changement d'acide aminé survenu en position 203 dans le site S_b était unique à la souche IAF-1192.

DISCUSSION

L'objectif principal de notre étude était de produire des AcMo spécifiquement dirigés contre la protéine HA de la nouvelle souche QC91 afin de pouvoir différencier cette dernière de la souche de référence (QC81). Nous nous sommes basés sur les résultats préliminaires des travaux de caractérisation antigénique et génétique qui montrèrent:

1. que le virus QC91 était antigéniquement apparenté, mais distinct de la souche de référence (QC81) (Dea et al., 1992b),
2. qu'il existait une divergence d'au moins 5 % entre les séquences d'ARN génomique du virus QC91 et QC81 se traduisant par 14 substitutions d'acides aminés dans la sous-unité HA1 de la protéine HA du virus QC91 affectant deux principaux déterminants antigéniques (C_a et S_b) et un site de glycosylation (Rekik et al., 1994).

Nous avons d'abord étudié par un test d'IHA la réactivité des différentes souches virales contre les sérums hyperimmuns produits chez des souris. Les résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire avaient montré que les sérums de lapins ne pouvaient distinguer la protéine HA des deux souches virales (Tableau II) d'où la nécessité d'effectuer ce test avec des antisérums produits chez une autre espèce animale. Tel qu'indiqué dans le Tableau III, nos résultats ont permis de démontrer que les antisérums de souris, contrairement à ceux

produits chez des lapins, pouvaient distinguer le virus QC91 du virus QC81 en reconnaissant certains épitopes spécifiques au niveau de leur protéine HA. Ceci suggère une différence au niveau de la reconnaissance des déterminants antigéniques du virus chez différentes espèces animales dont il faudrait tenir compte pour les études de caractérisation antigénique des virus influenza porcins. Des résultats similaires ont été observés avec le virus influenza équin (Binns *et al.*, 1993). Ces études antérieures avaient permis de démontrer que les AcMo produits chez des souris pouvaient distinguer la protéine HA de souches variantes responsables d'épidémies de grippe chez les chevaux, contrairement aux sérums équins monospécifiques produits contre la souche de référence circulant habituellement dans la population équine.

Des six hybridomes sécréteurs d'AcMo contre le virus QC91, le liquide d'ascite produit avec les cellules d'hybridome du clone G9 fut utilisé pour les tests de caractérisation. Les quatre tests sérologiques utilisés (inhibition de l'hémagglutination, immunofluorescence indirecte, neutralisation de la production de plages et immunomarquage à l'or colloïdal) ont permis de démontrer la spécificité de l'AcMo G9 pour la souche QC91. Les titres obtenus lors des tests d'IHA et de neutralisation étaient comparables. Ces deux tests permettent de définir spécifiquement les déterminants antigéniques de la protéine HA localisés à proximité du site anti-récepteur (Lee

et al., 1993). Les anticorps dirigés contre les sites antigéniques bloquent l'attachement du virus au récepteur cellulaire et inhibent l'hémagglutination *in vitro* (Weis et al., 1988). Nos observations ont permis de démontrer la spécificité de l'AcMo G9 pour la protéine HA du virus QC91. Cependant, les tests de neutralisation et d'IFI ont montré une réaction croisée avec le virus QC81 à une dilution 1/10 de l'AcMo G9. Le mécanisme expliquant cette faible réaction croisée reste à déterminer, mais pourrait être de nature non spécifique étant donné la haute valeur des titres obtenus contre la souche homologue (QC91). Il est aussi probable que cette réactivité soit dirigée contre les autres acides aminés formant l'épitope-cible. L'acide aminé substitué au niveau du site antigénique pourrait être responsable d'un changement de conformation, ce qui expliquerait l'absence de réactivité de l'AcMo G9 dans le test d'immunobuvardage (résultat non rapporté). Pour les fins d'identification sérologique des différentes souches isolées à partir des spécimens cliniques, il serait souhaitable d'utiliser cet AcMo à une dilution d'au moins 1/100.

Notre second objectif consistait à établir les paramètres pour le développement d'un test ELISA de compétition pouvant servir au dépistage des anticorps spécifiques produits contre ce nouveau variant antigénique chez les porcs infectés. En considérant la spécificité de l'AcMo G9 pour la protéine HA du

virus QC91, nous avons effectué un test ELISA mettant en compétition ce dernier avec les sérums de porcs immunisés expérimentalement avec le virus QC91 et ceux provenant de deux fermes porcines aux prises avec des problèmes respiratoires attribuables à des lésions de PPN. Dans le cas des antisérums provenant des deux porcs ayant été infectés par la voie intranasale avec les préparations virales purifiées, l'analyse de nos résultats a montré que ces animaux possédaient dès le jour 12 des anticorps bloquant l'attachement de l'AcMo G9 au virus ayant servi à enrober les plateaux (30% de blocage à la dilution 1/128). Un pourcentage de blocage de 57 % a été obtenu au jour 97 avec les dilutions 1/256 à 1/512 (Figure 11). Les pourcentages de blocage obtenus à la dilution 1/256 des sérums provenant de cas cliniques étaient comparables à ceux obtenus dans le cas des animaux ayant été infectés expérimentalement et saignés au jour 97 (Figure 12). Ainsi, ces sérums hyperimmuns de porcs dilués au 1/256 pourront servir de témoins positifs pour les tests ultérieurs. En outre, des pourcentages de compétition de 66,47 % (sérum no.1) et de 62,16 % (sérum no.2) ont été observés. Ces résultats ont donc permis de démontrer que les porcs provenant de fermes où avait été diagnostiquée la PPN, possédaient des anticorps spécifiquement dirigés contre l'épitope reconnu par l' AcMo G9.

Mc Gregor (Luoh et al., 1992) a utilisé la même approche sérologique et a démontré que les porcs produisaient des anticorps spécifiquement dirigés contre les trois déterminants antigéniques majeurs de la protéine HA du virus influenza porcin de type A (H1N1).

Pour les deux sérums obtenus de cas cliniques, des pourcentages de blocage variant de 78,8% à 87,6 % ont été déterminés pour les dilutions comprises entre 1/8 et 1/128. Ces pourcentages de blocage sont très supérieurs à ceux observés avec les sérums des porcs immunisés contre la souche homologue (QC91). Considérant que la souche QC81 et plusieurs autres souches virales circulent dans les élevages de porcs du Québec (Morin et al., 1981, Bikour et al., 1994, Larochelle et al., 1994 et Magar et al., 1994), il est probable que des anticorps contre ces différents virus soient aussi présents dans les échantillons cliniques, ce qui a été confirmé par les analyses effectuées par le test d'IHA contre les souches QC81 et QC91. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour évaluer les facteurs expliquant cette interférence et pour déterminer la dilution à laquelle il faudra tester les sérums obtenus de cas cliniques pour conclure à une infection par le nouveau variant antigénique. Des études précédentes avaient démontré l'incapacité de distinguer chez les porcs infectés de façon naturelle la présence d'anticorps dirigés contre la souche QC81

et ceux dirigés contre le nouveau variant antigénique (QC91) par le test d'IHA conventionnel (Dea et al., 1992b).

Notre troisième objectif consistait à évaluer les relations antigénique et génétique entre les différents isolats québécois associés à des lésions de PPN. Deux isolats ayant été associés à des lésions de PPN, en plus de l'isolat QC91, ont été comparés dans notre étude. L'isolat IAF-1747 et QC91 provenaient de la même ferme d'élevage, mais avaient été associés à des épisodes de PPN survenues à six mois d'intervalle, alors que l'isolat IAF-Klop a été associé à des épisodes de PPN survenues dans une ferme porcine située dans une autre région géographique du Québec (plus de 200 km de la ferme précédente).

Les analyses sérologiques (Tableau VII) effectuées par le test d'IHA ont montré que les isolats IAF-1747 et IAF-Klop partagent au niveau de leur protéine HA les mêmes déterminants antigéniques que ceux de la souche QC91. Les différences observées entre les titres IHA ne sont pas significatives, l'écart entre les titres étant inférieur à un facteur de 4 (WHO collaborating centers for reference and research on influenza, 1982). Ces résultats indiquent que les deux isolats sont antigéniquement apparentés à la souche QC91. Cependant, un nombre plus important d'isolats devront être testés afin de déterminer:

1. si tous les virus associés à des lésions de PPN sont antigéniquement identiques,
2. s'il existe une diversité antigénique selon la distribution géographique des virus associés aux lésions de PPN,
3. si d'autres sérotypes peuvent être associés à la PPN.

Récemment, un variant H3N2 a été isolé des tissus pulmonaires de porcs affectés de PPN (Bikour *et al.*, 1994). Bien que la reproduction expérimentale de la maladie n'ait pas été rapportée dans le cas de cet isolat, l'hypothèse que différents virus influenza et d'autres virus comme le virus SRRP et le coronavirus respiratoire porcin puissent être associés à de telles lésions demeurent plausibles. Par ailleurs, Laroche *et al.* (1994) ont pu démontrer à l'aide d'une technique immunohistochimique la présence d'antigènes du virus du SRRP dans des coupes de poumons de porc affectés de lésions de PPN, sans qu'ils puissent démontrer la présence d'antigènes du virus de l'influenza porcin.

L'analyse des séquences nucléotidiques des gènes (HA1) de même que celles déduites en acides aminés des isolats IAF-1747 et IAF-Klop comparativement à celles du virus QC91 a démontré un pourcentage d'homologie de 96 % (Tableau VIII) et des changements de 16 et 8 acides aminés ayant été identifiés selon le cas (Figure 17).

Luoh et al. (1992) ont rapporté qu'un taux de mutations annuel compris entre 0,40 % et 0,48 % survient dans la protéine HA du virus influenza porcine de type A (H1N1). Ce pourcentage correspond à un niveau de substitution de 9 à 11 acides aminés survenant sur une période de 7 ans.

Les résultats de nos travaux démontrent que les changements d'acides aminés observés dans la séquence HA1 des deux isolats IAF-Klop et IAF-1747 sont considérablement supérieurs à ceux rapportés plus haut. Ce qui montre qu'en dépit du haut degré d'homologie entre les séquences en acides aminés du virus QC91 et les isolats IAF-1747 (96 %) et IAF-Klop (94 %) (Tableau IX), il semble exister une diversité génétique dans la population virale associée à la PPN.

Rocha et al. (1991) ont démontré l'infection simultanée d'un individu immunodéficient par plusieurs variants génomiques du virus influenza de type A (H1N1). Ces chercheurs ont mis en évidence 8 isolats sur une période de 10 mois chez un enfant atteint de déficiences immunitaires combinées sévères. Parmi ces isolats, cinq présentaient un degré de substitution en acides aminés de l'ordre de 45 % et 73 % pour les protéines HA et NP respectivement. Tel que suggéré par ces auteurs, la diversité génétique observée entre les différents isolats IAF-Klop, IAF-1747 et QC91 pourrait être en partie attribuable à l'état d'immunodéficiences ayant été rapporté chez les porcs

démontrant des lésions de PPN et qui favoriserait l'infection par différentes souches variantes (Morin et al., 1990). Il faut aussi mentionner que les isolats IAF-1747 et IAF-Klop ont été cultivés à partir des tissus pulmonaires de porcs provenant de fermes affectées simultanément par la PPN et le SRRP. Le virus responsable du SRRP est associé à la destruction des macrophages alvéolaires (Wensvoort et al., 1991), ce qui favoriserait l'établissement d'autres infections virales, dont les infections par différents variants du virus de l'influenza. La même hypothèse a été retenue par Olsen et al. (1993) pour expliquer le mécanisme ayant entraîné l'apparition du nouveau variant antigénique A/Swine/Nebraska/92 (H1N1) dans des élevages porcins de l'état du Nebraska.

Par ailleurs, une même mutation impliquant un résidu Gly en position 239 (site C_a) est survenue dans le cas des deux isolats, alors qu'un autre changement impliquant un résidu Ile en position 208 (site S_b) fut observé dans le cas de l'isolat IAF-1747. En se référant aux résultats sérologiques (Tableau VII), la mutation de l'acide aminé au niveau du site C_a ne semble pas avoir affecté la réactivité de l'AcMo G9 avec les deux isolats.

Une substitution commune de l'acide aminé en position 293 dans les séquences des sous-unités HA1 des isolats IAF-Klop et IAF-1747 aurait conduit à la réapparition d'un site de glycosylation. Rekik et al. (1994) avait associé la disparition de ce

site glycosylation chez les souches virales QC91 et QC81 à l'apparition du nouveau variant antigénique. Les résultats obtenus dans notre étude démontrent que la réapparition de ce site n'affecte pas la réactivité spécifique de l'AcMo G9 dans les tests d'IHA.

On doit toutefois insister sur le fait que les séquences nucléotidiques des isolats IAF-1747 et IAF-Klop ont été déterminées suite à l'amplification enzymatique de la région HA1 à partir de l'ARN génomique viral extrait des cellules MDCK infectées, contrairement aux séquences déterminées préalablement pour la souche QC91 propagée dans les œufs embryonnés. Inkster et al. (1993) ont rapporté dans leur étude du virus influenza type A (H1N1) que les mutations d'acides aminés qui survenaient à proximité du site anti-récepteur étaient associées à l'apparition des sites de glycosylation. Les résultats de leurs travaux attribuaient l'apparition de sites de glycosylation à la pression sélective de la cellule hôte favorisant l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires. Bien que les travaux de Katz et al., (1987) rapportaient que ces changements affectaient les propriétés biologiques du virus tout en altérant certains déterminants antigéniques avoisinants, ce mécanisme n'a jamais été décrit comme favorisant la sélection de variants antigéniques chez le virus influenza porcine A (H1N1) (Kilbourne, 1978). Par ailleurs, jusqu'à présent, la

présence d'un site de glycosylation dans cette partie de la sous-unité HA1 du virus influenza porcin de type A (H1N1) (Inkster et al., 1993) n'a été révélée que dans le cas de la souche A/SW/NB/92 (H1N1) (Olsen et al., 1993). Des études sont alors nécessaires pour localiser ce site de glycosylation sur la structure tridimensionnelle en vue de déterminer son rôle biologique.

L' étude des variations antigénique et génétique des virus influenza porcin de type A (H1N1) circulant au Québec de 1981 à 1990 fut notre dernier objectif. La souche virale IAF-1192 isolée à la suite d'une épidémie de grippe survenue en 1987 dans un élevage porcin du Québec, fut incluse dans notre étude considérant l'hypothèse qu'elle serait une souche intermédiaire de l'influenza porcin de type A (H1N1). La comparaison des séquences nucléotidiques de la souche IAF-1192 avec celles des virus QC81 et QC91 a démontré respectivement un degré d'analogie de 97% et 94%, tandis que celles déduites en acides aminés présentaient respectivement 12 et 19 changements d'acides aminés. Ce qui démontre que la souche IAF-1192 était beaucoup plus proche de la souche QC81 que de la souche QC91, bien qu'elle ait été isolée six ans après les épidémies de grippe porcine classique (Morin et al., 1981). L'analyse des séquences en acides aminés des régions correspondant aux sites antigéniques majeurs des souches QC81 et IAF-1192 a révélé la

présence de variations seulement au niveau du site S_b en position 203 (un résidu Thr (QC81) et Ala (IAF-1192)). Dans le cas de la souche QC91, un changement d'acides aminés a été observé au niveau des sites S_b en position 203 (un résidu Ala (IAF-1192) et Asn (QC91)), S_a en position 172 (Glu (IAF-1192) et Gly (QC91)) et C_a en position 239 (Gly (IAF-1192) et Asn (QC91)). De plus, une mutation de l'acide aminé en position 285 (un résidu Cys) est survenue au niveau de la sous-unité HA1 de la souche IAF-1192. La réactivité de la souche IAF-1192 contre l'AcMo G9 s'est avérée comparable à celle observée avec la souche QC81. En effet, l'activité hémagglutinante des deux souches virales n'était pas inhibée suite à leur incubation en présence de cet AcMo (Tableau VII). Ces observations montrent que les virus QC91 et IAF-1192 présentent des déterminants antigéniques distincts.

Plusieurs variants antigéniques des souches du virus influenza type A (H1N1) humaines et porcines ont été caractérisés à l'aide d'AcMo dirigés contre un épitope dont l'altération de la structure moléculaire était attribuée à la substitution d'un seul acide aminé (Wood et al., 1989; Rocha et al., 1991, Yamada et al., 1991; Kilbourne et al., 1979; Both et al., 1983; Wentworth et al., 1994). A la lumière de ces travaux, des expériences de mutagénèse dirigée devraient permettre de confirmer si la substitution de l'acide aminé identifiée au niveau du site S_b et qui fut aussi rapportée auparavant par

Rekik et al. (1994) est associée à l'apparition du nouveau variant antigénique.

CONCLUSION

Notre étude consistait principalement à produire des AcMo spécifiques à la protéine HA du nouveau variant de l'influenza porcine afin d'établir les paramètres pour la mise au point d'une épreuve d'ELISA de compétition pour le diagnostic différentiel. Les comparaisons antigénique et génétique des différents isolats associés aux lésions de PPN ont aussi été étudiées de même que les variations antigénique et génétique des virus influenza porcine de type A (H1N1) circulant au Québec de 1981 à 1990.

Cette étude nous a permis de démontrer que:

1. l'AcMo G9 de type IgG1 réagit spécifiquement avec la protéine HA de la souche variante (QC91). Aucune inhibition de l'activité hémagglutinante de la souche de référence (QC81) n'a été observée. Ainsi, ces travaux confirment les résultats des analyses sérologiques et génétiques démontrant que ce nouveau variant de l'influenza porcine de type A (H1N1) associé à la PPN et isolé en 1990 des fermes d'élevage du Québec appartient à un sérotype distinct,
2. les sérums de porc de fermes d'élevage entrent en compétition avec l'AcMo G9. Ceci démontre ainsi que les porcs produisent des anticorps spécifiques à la protéine HA du virus QC91. Ces résultats représentent une étape préliminaire pour le développement d'un test ELISA de compétition permettant non seulement de différencier le virus QC91 de la souche QC81, mais

qui pourrait représenter un bon outil pour les enquêtes épidémiologiques de suivi,

3. les isolats québécois associés à des lésions de PPN sont antigéniquement identiques au virus QC91. Aucune variation antigénique n'a été observée entre les différents isolats provenant des fermes porcines du Québec affectées par des problèmes respiratoires attribués à des lésions de PPN. Toutefois, une variation génétique considérable a été observée entre les isolats étudiés et la souche QC91,

4. Au Québec, plusieurs souches distinctes du virus influenza type A (H1N1) circulent dans la population porcine depuis 1981. L'analyse sérologique à l'aide de l'AcMo G9 a montré que la souche virale associée aux épidémies de grippe porcine en 1987 est antigéniquement distincte de la souche QC91.

Contrairement à la grande stabilité ayant été rapportée parmi les souches que démontre le virus influenza porcin A (H1N1) circulant en Amérique du Nord depuis 15 ans, nos résultats confirment des études précédentes suggérant l'apparition d'une nouvelle situation épidémiologique dans la population porcine au Québec. La circulation de souches virales distinctes et l'émergence de variants antigéniques nécessitent à cet effet un programme de surveillance épidémiologique. Nos résultats constituent certes une étape

préliminaire au futur développement de test de diagnostic permettant de suivre l'évolution des souches virales d'influenza porcin, mais aussi de prévenir l'épidémie au sein de la population porcine et éventuellement, la population humaine.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements au Dr **D.J.S Arora**, directeur de recherche et Professeur au Centre de Recherche en Virologie, pour la confiance qu'il a témoigné à mon égard en me proposant ce travail et pour l'enseignement et la formation dont j'ai bénéficié sous son encadrement.

Je voudrais également remercier le Pr. **S. Dea** co-directeur de recherche et Professeur au Centre de Recherche en Virologie. J'aimerais aujourd'hui lui témoigné tout mon respect et ma profonde reconnaissance pour la disponibilité, la patience, l'esprit compréhensif et la rigueur scientifique dont il a fait preuve durant ce travail.

Mes remerciements vont aussi au Pr. **Jacqueline Lecomte** et à Mesdames **Nicole Labrèche** et **Denise MacSween**, pour leurs conseils judicieux et leur grande patience durant la production des anticorps monoclonaux.

J'aimerais aussi remercier Mesdames **Louise Wilson** et **Nicole Sawyer** et Monsieur **Marc Henrichon** pour leur aide technique et leurs conseils très appréciés.

Je tiens aussi à remercier mon oncle **Cheick Omar Ouedrago** et ma tante **Ami Kanta** pour leur support et encouragements constants.

Enfin mes remerciements vont à tous ceux qui de loin ou de près ont contribué à la réalisation de ce travail.

Ce travail a été rendu possible grâce aux subventions du Conseil de Recherche en Pêcherie et Agro-Alimentaires du Québec (CORPAQ).

BIBLIOGRAPHIE

ANTIBODIES. 1988. " The Laboratory Manual" (ed.): Harlow, E.D., D. Lane. Cold Spring Harbor Laboratory.

ARORA, D.J.S., P. TREMBLAY, R. BOURGAULT et S. BOILEAU. 1985. Concentration and purification of influenza virus from allantoic fluid. *Anal. Biochem.* 144: 189-192.

ARORA, D.J.S. et L.F. GABRIEL. 1986. Characterization of influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity and its comparison with that of viral neuraminidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 884: 73-83.

AUSTIN, R. et J. BYSTROM. 1991. Proliferative and necrotizing pneumonia in Manitoba. *Can. Vet. J.* 32: 371.

AYMARD, M., A.R. DOUGLAS, M. PONTAINE, J.M. GOURREAU, C. KAISER, M. MILLION et J.J. SKEHEL. 1985. Antigenic characterization of influenza A (H1N1) viruses recently isolated from pigs and turkeys in France. *Bull World Health Organ.* 63: 537-542.

BELANGER, F., R. ALAIN, P. PAYMENT, J. LECOMPTE et M. TRUDEL. 1988. Rapid titration of bovine, caprine and human RS virus by a micro-immunoperoxidase assay using a monoclonal antibody and a permissive ovine kidney cell line. *J. Virol. Methods.* 20: 107-107.

BIKOUR, M.H, E. CORNAGLIA, J.M.WEBER et Y.ELAZHARY. 1994. Antigenic characterization of an H3N2 swine influenza virus isolated from pigs with proliferative and necrotizing pneumonia in Quebec. *Can. J. Vet. Res.* 58: 287-290.

BINNS, M.M., J.M. DALY, E.D. CHRIRNSIDE, J.A. MUMFORD, J.M. WOOD, C.M. RICHARDS et R.S. DANIELS. 1993. Genetic and antigenic analysis of an equine influenza H3 isolate from the 1989 epidemic. *Arch. Virol.* 130: 33-43.

BOTH, G.W., C.H. SHI et E.D. KILBOURNE. 1983. Hemagglutinin of swine influenza virus: a single amino acid change pleiotropically affects viral antigenicity and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 6996-7000.

BROWN, I.H., R.J. MANVELL, D.J. ALEXANDER, P. CHAKRAVERTY, V.S.HINSHAW et R.G. WEBSTER. 1993. Swine influenza outbreaks in England due to a new H1N1 virus. *Vet. Rec.* 132: 461-462.

- BUCKLER-WHITE, A.J. et B.R. MURPHY. 1986. Nucleotide sequence analysis of the nucleoprotein gene of an avian and a human influenza virus strain identities two classes of nucleoproteins. *Virology*. 155: 345-355.
- BUTTERFIELD, W.K., C.H. CAMPBELL, R.G. WEBSTER et K.F. SHORTRIDGE. 1978. Identification of a swine influenza virus (Hsw1N1) isolated from duck in Hong Kong. *J. Infect. Dis.* 138: 686-689.
- CALLEBAUT, P., M.B. PENSAERT et J. HOOYBERGHS. 1989. A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with the TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Vet. Microbiol.* 20: 9-19.
- CASTRUCCI, M.R., I. DONATELLI, L. SODOLI, G. BARIGAZZI, Y. KAWAOKA et R.G. WEBSTER. 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 193: 503-506.
- CATON, A.J., G.G. BROWNLEE, J.W. YEWDELL et W. GERHARD. 1982. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31: 417-427.
- CHAMBERS, T.M., V.S. HINSHAW, Y. KAWAOKA, B.C. EASTERDAY et R.G. WEBSTER. 1991. Influenza viral infection of swine in the United States 1988-1989. *Arch. Virol.* 116: 261-265.
- CHOMCZYNSKI, P. et N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- CHOPPIN, P.W., R.W. COMPANS, A. SCHEID, J.J. MCSHARRY et S.G. LAZAROWITZ. 1972. Structure and assembly of viral membranes, in : *Membranes Research* (C.F. Fox, ed.) Academic Press, Orlando, FL: 163-179.
- COLMAN, P.M., VARGHESE J.N. et W.G. LAVER. 1983. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 303: 41-44.
- COLMAN, P.M. et C.W. WARD. 1985. Structure and diversity of influenza virus neuraminidase. *Curr.Top. Microbiol. Immunol.* 114: 177-255.

- COPELAND, C.S., K.P. ZIMMER, K.R. WAGNER, G.A. HEALEY, I. MELLMAN et A. HELENIUS. 1988. Folding, trimerization, and transport are sequential events in the biogenesis of influenza virus hemagglutinin. *Cell* 53: 197-209.
- DASCO, C.C, R.B. COUCH, H.R.SIX. J.F. YOUNG. J.M. QUARLES et J.A. KOSEL. 1984. Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 20: 833-835.
- DEA, S. et GARZON, S. 1991. Identification of coronaviruses by the use of indirect protein A-gold immunoelectron microscopy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 299-305 (1991).
- DEA, S., R. ATHANASSIOUS, R.A. SAUVAGEAU et G.P. MARTINEAU. 1992a. Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: Isolation of an envelopped virus serologically-related to lelystad virus. *Can. Vet. J.* 33: 801-808.
- DEA, S., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU, C. MONPETIT et G.P. MARTINEAU. 1992b. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 380-392.
- DOMINGO, E., J. DIEZ, M.A. MARTINEZ, J. HERNANDEZ, A. HOLGUIN, B. BORREGO et M.G. MATEU. 1993. New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J. Gen. Virol.* 74: 2039-2045.
- DONATELLI, I., L. CAMPITELLI, M.R. CASTRUCCI, A. RUGGIERI, L. SIDOLI et J.S. OXFORD. 1991. Detection of two antigenic subpopulations of A (H1N1) influenza viruses from pigs: antigenic drift or interspecies transmission. *J. Med. Virol.* 34: 248-257.
- EASTERDAY, B.C. 1986. "Swine influenza", dans *Diseases of Swine* (ed.): Leman A.D, B. Straw, R.D. Glock, W.L. Mengeling, R.H.C. Penny, E. Scholl. 6th Ed. Iowa State. University Press, Ames, IA: 244-254.
- FOUCHARD-GABRIEL, L. 1985. Etudes des propriétés biochimiques et biologiques de la Neuraminidase associée à la protéine bifonctionnelle (HANA). Mémoire de maîtrise, Institut Armand Frappier, Université du Québec. 155 pages.
- GAGNON, A.N., A. BOUDREAU, G. MARSOLAIS, G. LUSSIER et P. MAROIS. 1974. Maladies porcines à étiologie virale dans la province du Québec. 1. Influenza. *Can. Vet. J.* 15: 312-315.

GAYDOS, J.C., R.A. HODDER, F.H. JR.TOP, V.J. SODEN, R.G. ALLEN, J.D. BARTLEY, J.H. ZABKAR, T. NOWOSINWSKY et P.K. RUSSELL. 1977. Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976). I. Case finding and clinical study of cases. *J.Infect Dis.* 136: S356-362.

GIRARD, C., M. MORIN et Y.ELAZHARY. 1992. Experimentally induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia with an influenza A virus. *Vet. Rec.* 130: 206-207.

GLISIN, V., R. CRKVENJAKOV et C. BYUS. 1974. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry.* 13: 2633-2637.

GOTTSCHALK, A. 1957. The specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*, *Biochim. Biophys. Acta* 23: 654-646.

GOULD, K.G., H. SCOTNEY, A.R. TOWNSEND, J. BASTIN et G.G. BROWNLEE. 1987. Mouse H-2k restricted cytotoxic T cells recognize antigenic determinants in both the HA1 and HA2 subunits of the influenza A/PR/8/34 hemagglutinin. *J. Exp. Med.* 166: 693-701.

GOURREAU, J.M., C. KAISER, F. MADEC, J. LABIE, P. VANNIER, M. AYMARD, A.VIGOUROUX et F. SALINGARDES. 1985. Passage du virus grippal par la voie transplacentaire chez le porc dans les conditions naturelles. *Ann. Inst. Pasteur (Virol.)* 136E: 55-63.

HAESEBROUCK, F. 1986. Viruses associated with influenza. *IPVS Pig Health Special.* 16: 12-13.

HINSHAW, V.S., R.G. WEBSTER et B. TURNER. 1978a. Novel influenza A viruses isolated from Canadian feral ducks: including strains antigenically related to swine influenza (Hsw1N1) viruses. *J. Gen. Virol.* 41: 115-127.

HINSHAW, V.S., W.J. BEAN JR, R.G. WEBSTER et B.C. EASTERDAY. 1978b. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. *Virology* 84: 51-62.

HINSHAW, V.S., R.G. WEBSTER, W.J. BEAN, J.C. DOWNIE et D.A. SENNE. 1983. Swine influenza-like viruses in turkeys: potential source of virus for humans? *Science* 220: 206-208.

HINSHAW, V.S., D.J. ALEXANDER, M. AYMARD, P.A. BACHMANN, B.C. EASTERDAY, C. HANNOUN, H. KIDA, M. LIPKIND, J.S. MACKENZIE et K. NEROME. 1984. Antigenic comparisons of swine-influenza-like H1N1 isolates from pigs, birds and humans: an international collaborative study. *Bull. World Health Organ.* 62: 871-878.

HOLSINGER, L.J. et R.A. LAMB. 1991. Influenza M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* 183: 32-43.

HOOGENRAAD, N.J et C.J. WRAIGHT. 1986. The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production. *Methods Enzymol.* 121: 375-381.

HORISBERGER, M.A. 1980. The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology* 107: 302-305.

INKSTER, M.D., V.S. HINSHAW et I.T. SCHULTZE. 1993. The hemagglutinins of duck and human H1 influenza viruses differ in sequence conservation and in glycosylation. *J. Virol.* 67: 7436-7443.

KATZ, J.M., C.W. NAEVE et R.G. WEBSTER. 1987. Host cell-mediated variation in H3N2 influenza viruses. *Virology* 156: 386-395.

KENDAL, A.P., M. GOLDFIELD, G.R. NOBLE et W.R. DOWDLE. 1977. Identification and preliminary antigenic analysis of swine influenza-like viruses isolated during an influenza outbreak at Fort Dix, New Jersey. *J. Infect. Dis.* 136 : S381-385.

KIDA, H., L.E. BROWN et R.G. WEBSTER. 1982. Biological activity of monoclonal antibodies to operationally defined antigenic regions on the hemagglutinin molecule of A/Seal/Massachusset/1/80 (H7N7) influenza virus. *Virology* 122: 38-47.

KIDA, H., K.F. SHORTRIDGE et R.G. WEBSTER. 1988. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* 162: 160-166.

KILBOURNE, E.D. 1975. *The influenza viruses and influenza.* Academic Press New York. San Fransisco, London. 573 pages.

KILBOURNE, E.D. 1978. Genetic dimorphism in influenza viruses: characterization of stably associated hemagglutinin mutants differing in antigenicity and biological properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 6258-6262.

KILBOURNE, E.D., S. MC GREGOR et B.C. EASTERDAY. 1979. Hemagglutinin mutants of swine influenza virus differing in replication characteristics in their natural host. Infect. Immun. 26: 197-201.

KILBOURNE, E.D. 1987. Influenza. Plenum Medical Book Company. New York. 359 pages.

KLENK H.-D, R. ROTT, M. ORLICH et J. BLODORN. 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. Virology 68: 426-439.

KLENK, H.-D. 1991. "Orthomyxoviridae" dans Classification and Nomenclature of viruses (ed.): Francki, R.I.B., C.M. Fauquet, D.l. Knudson, F. Brown. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag Wien New York: 263-272.

KRUG, R.M. 1989. "Expression and replication of the influenza virus genome" dans The influenza viruses (ed.): Krug, R.M., H. Fraenkel-Conrat, R.R. Wagner. New York: Plenum Press: 89-152.

KUNDIN, W.D. 1970. Hong Kong A-2 influenza virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. Nature 228: 857.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

LAMB, R.A., C.J. LAI et P.W. CHOPPIN. 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: Colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 4170-4174.

LAMB, R.A et P.W. CHOPPIN. 1983. The gene structure and replication of influenza virus. Annu. Rev. Biochem. 52: 467-506.

LAMB, R.A. 1989. "Gene and proteins of the influenza viruses" dans The influenza viruses (ed.): Krug, R.M., H. Fraenkel-Conrat, R.R. Wagner. New York: Plenum Press: 1-88.

- LAROCHELLE R., R. SAUVAGEAU et R. MAGAR. 1994. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Québec. *Can. Vet. J.* 35: 513-515.
- LAVER, W.R., G.M. AIR, R.G. WEBSTER W. GERHARD, C.W. WARD et T.A. DOPHEIDE. 1981. The mechanism of antigenic drift in influenza virus: sequence changes in the haemagglutinin of variants selected with monoclonal hybridoma antibodies. *Philos Trans R Soc Lond Biol.* 288: 313-326.
- LAVER, W.G., P.M. COLMAN, R.G. WEBSTER, V.S. HINSHAW et G.M. AIR. 1984. Influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity. *Virology* 13: 314-324.
- LEE, B.W., R.F. BEY, M.J. BAARSCH, R.B. MORRISON et W. FREESE. 1993. Determination of hemagglutination-inhibition titers to influenza A virus in porcine sera by use of an enzyme - linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1270-1276.
- LUBECK, M.D. et W. GERHARD. 1981. Topological mapping of antigenic sites on the influenza A/PR/8/34 virus hemagglutinin using monoclonal antibodies. *Virology* 113: 64-72.
- LUOH, S-M., M.W. MCGREGOR et V.S. HINSHAW. 1992. Hemagglutinin mutations related to antigenic variation in H1N1 swine influenza viruses. *J. Virol.* 66: 1066-1073.
- MAGAR, R., R. LAROCHELLE, Y. ROBINSON, C. DUBUC. 1993. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Can. J. Vet. Res.* 57: 300-304.
- MAGAR, R., R. LAROCHELLE, C. SUZANNE, G. THOMSON. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus identification in proliferative and necrotizing pneumonia cases from Ontario. *Can. Vet. J.* 35: 523-524.
- MARSH, M. et A. HELENIUS. 1989. Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* 36: 107-151.
- MARTIN, K. et A. HELENIUS. 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein: the viral matrix protéine (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67: 117-130.
- MEIER- EWERT, H. et N.J. DIMMOCK. 1970. Studies on antigenic variations of the haemagglutinin and neuraminidase of swine influenza virus isolates. *J. Gen. Virol.* 6: 409-419.

- MORIN, M., J.B. PHANEUF, R. SAUVAGEAU, E. DIFRANCO, G. MARSOLAIS et A. BOUDREAU. 1981. An epizootic of swine influenza in Quebec. *Can. Vet. J.* 22: 204-205.
- MORIN, M., C. GIRARD, Y. ELAZHARY, R. Fajardo, R. Drolet et A. Lagacé. 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. *Can. Vet. J.* 31: 837-839.
- MURPHY, B.R. et R.G. WEBSTER. 1990. " Orthomyxoviruses" dans *Virology* (ed.): Fields B. N., D.M. Knipe. 2nd Ed. Raven Press Ltd. New York: 1091-1152.
- NEUMEIER, E. et H. MEIER - EWERT. 1992. Nucleotide sequence analysis of the HA1 coding portion of the haemagglutinin gene of swine influenza viruses. *Virus Res.* 23: 107-117.
- NOBLE, S., M.S. MC GREGOR, D.E. WENTWORTH et V.S. HINSHAW. 1993. Antigenic and genetic conservation of the haemagglutinin in H1N1 swine influenza viruses. *J. Gen. Virol.* 74: 1197-1200.
- OLSEN, C.W., M.W. MC GREGOR, A.J. COOLEY, B. SCHANTZ, B. HOTZE, et V.S. HINSHAW. 1993. Antigenic and genetic analysis of a recently isolated H1N1 swine influenza virus. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1630-1636.
- OTTIS, K. et P.A. BACHMANN. 1980. Occurrence of Hsw1N1 subtype influenza A viruses in wild ducks in Europe. *Arch. Virol.* 63: 185-190.
- OUCHTERLONY, O. 1958. " Diffusion in gel methods for immunological analysis " dans Kallos. P et B.H. Waksman (ed.): *Progress in allergy*: (V) 1-78.
- PALESE P., K. TOBITA, M. UEDA et R.W. COMPANS. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61: 397-410.
- PATRIACA, P.A., A.P.KENDAL, P.C. ZAKOWSKI, N.J. COX, M.S. TRAUTMAN, J.D. CHERRY, D.M. AUERVACH, J.MC. CUSTER, R.R. BELLIVEAU et K.D. KAPPUS. 1984. Lack of significant person-to - person spread of swine influenza-like virus following fatal infection of an immunocompromised child. *Am. J. Epidemiol.* 119: 152-158.
- PENSAERT, M., K. OTTIS, J. VAN DE PUTTE, M.M. KAPLAN et P.BACHMANN. 1981. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull. World Health Organ.* 59: 75-78.

- PINTO, L.H., L.J. HOLSINGER et R.A. LAMB. 1992. Influenza virus M2 protein has an ion channel activity. *Cell* 69: 517-528.
- POSSEE, R.D., G.C. SCHILD et N.J. DIMMOCK. 1982. Studies on the mechanism of neutralization of influenza by antibody: evidence that neutralizing antibody (anti-haemagglutinin) inactivates influenza virus in vivo by inhibiting virion transcriptase activity. *J. Gen. Virol.* 58: 373-386.
- RAYMOND, F.L., A.J. CATON, N.J. COX, A.P. KENDAL et G.G. BROWNLEE. 1983. Antigenicity and evolution amongst recent influenza viruses of H1N1 subtype. *Nucleic Acids. Res.* 11: 7191-203.
- REED, L.J. et H. MUENCH. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- REKIK, M.R, D.J.S. ARORA et S. DEA. 1994. Genetic variation in swine influenza virus A isolate associated with proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J. Clin. Microbiol.* 32: 515-518.
- ROBERTS, P.C., W.GARTEN et H-D KLENK. 1993. Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *J. Virol.* 67: 3048-3060.
- ROBERTSON, J.S., J.S. BOOTMAN, R. NEWMAN, J.S. OXFORD, R.S. DANIELS, R.G. WEBSTER et G.C. SCHILD. 1987. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A(H1N1) virus. *Virology* 160: 31-37.
- ROCHA, E., N.J. COX, R.A. BLACK, M.W. HARMON, C.J. HARRISON et A.P. KENDAL. 1991. Antigenic and genetic variation in influenza A (H1N1) virus isolates recovered from a persistently infected immunodeficient child. *J. Virol.* 65: 2340-2350.
- ROTA, P.A., E.P. ROCHA, M.W. HARMON, V.S. HINSHAW, M.G. SHEERAR, Y. KAWAOKA, N.J. COX et T.F. SMITH. 1989. Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1413-1416.
- ROTT, R. 1992. The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet. Microbiol.* 33: 303-310.

- SAMBROOK, J, FRITSCH, E.F et F. MANIATIS. 1989. "Strategies for cloning in Plasmids vectors" dans: Molecular cloning. A laboratory manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. II: 89-152.
- SCHILD, G.C. et H.G. PEREIRA. 1969. Characterization of the ribonucleoprotein and neuraminidase of Influenza A viruses by immunodiffusion. *J. Gen. Virol.* 4: 355-363.
- SCHILD, G.C., J.S. OXFORD et R.W. NEWMAN. 1979. Evidence for antigenic variation in influenza A nucleoprotein. *Virology* 93: 569-573.
- SCHOLTISSEK, C., H. BURGER, P.A. BACHMANN et C. HANNOUN. 1983. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology* 129: 521-523.
- SHAPIRO, G.I et R.M. KRUG. 1988. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J. Virol.* 62: 2285-2290.
- SHEERAR, M.G., B.C. EASTERDAY et V.S. HINSHAW. 1989. Antigenic conservation of H1N1 swine influenza viruses. *J. Gen. Virol.* 70: 3297-3303.
- SHOPE, R.E. 1931. Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. *J. Exp. Med.* 54: 373-380.
- SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. 1992. A compendium of Methods from Current Protocols dans Molecular Biology (ed.): Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore D.D., J.G. Seidman, J.A. Smith, et K. Struhl, 3rd Ed. Harvard Medical School: 1-8.
- SIMKINS, R.A., L.J. SAIF et P.A. WEILNAU. 1989. Epitope mapping and the detection of transmissible gastroenteritis viral proteins in cell culture using biotinylated monoclonal antibodies in a fixed-cell ELISA. *Arch. Virol.* 107: 179-190.
- SIMKINS, R.A., P.A. WEILNAU, J. VAN COTT, T.A. BRIM et L.J. SAIF. 1993. Competition Elisa, using monoclonal antibodies to the transmission gastroenteritis virus (TEGV) S protein, for serologic differentiation of pigs infected with TEGV or porcine respiratory coronavirus. *Am. J. Vet. Res.* 54: 254-259.

SKEHEL J.J., D.J. STEVENS, R.S. DANIELS, A.R. DOUGLAS, M. KNOSSOW, I.A. WILSON et D.C. WILEY. 1984. A carbohydrate site chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1779-1783.

SMITH, T.F., E.O.Jr. BURGERT, W.R. DOWDLE, G.R. NOBLE, R.J. CAMPBELL et R.E. VAN SCOY. 1976. Isolation of swine influenza virus from autopsy lung tissue of man. *N. Engl. J. Med.* 294: 708-710.

STAHL-HENNIG, C., G. VOSS, S. NICK, H. PETRY, D. FUCHS, H. WACHTER, C. COULIBALY, W. LUKE et G. HUNSMANN. 1992. Immunization with tween-ether-treated SIV absorbed onto aluminium hydroxide protects monkeys against experimental SIV infection. *Virology* 186: 588-596.

STEINHAUSER, D.A. et J.J. HOLLAND. 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 409-433.

SUGIMURA, T., H. YONEMOCHI, T. OGAWA, Y. TANAKA et T. KUMAGAI. 1980. Isolation of a recombinant influenza virus (Hsw1N2) from swine in Japan. *Arch. Virol.* 66: 271-274.

SUGITA, S., Y. YOSHIOKA, S. ITAMURA, Y. KANEGAE, Y. OGUCHI, T. GOJOBORI, K. NEROME et A. OYA. 1991. Molecular evolution of hemagglutinin genes of H1N1 swine and human influenza A viruses. *J. Mol. Evol.* 32: 16-32.

TAYLOR, H.P. et N.J. DIMMOCK. 1985. Mechanism of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J. Exp. Med.* 161: 198-209.

THOMSON, G. et S. CARMAN. 1991. Proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) of swine: the Ontario situation. *Can. Vet. J.* 32: 313.

TOBITA, K., A. SUGIURA, C. ENOMOTE et M. FURUYAMA. 1975. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Microbiol. Immunol.* 162: 9-14.

TOP, F.H. JR. et P.K. RUSSELL. 1977. Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January - February 1976). IV. Summary and speculation. *J. Infect. Dis.* 136: S376-380.

VARGHESE, J.N., W.G. LAVER et P.M. COLMAN. 1983. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 A resolution. *Nature* 30: 35-40.

- WARD, C.W. 1981. Structure of the influenza virus hemagglutinin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 94/95: 1-74.
- WEBSTER, R.G., W.G. LAVER, G.M. AIR et G.C. SCHILD. 1982. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* 296: 115-121.
- WEBSTER, R.G., W.J. BEAN, O.T. GORMAN, T.M. CHAMBERS et Y. KAWAOKA. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56: 152-179.
- WEBSTER, R.G., S.M. WRIGHT, M.R. CASTRUCCI, W.J. BEAN et Y. KAWAOKA. 1993. Influenza-A model of an emerging virus disease. *Intervirology* 35: 16-25.
- WENSVOORT, G., C.TERPSTRA C, J.M.A. POL, EA.TER LAAK, M. BLOEMRAAD, E.P. DE KLUYVER, C. KRAGTEN, L. VAN BUITTEN, A.DEN BESTEN, F. WAGENAAR, J.M. BROEKHUIJSEN, P.L.J.M. MOONEN, T. ZETSTRA, E.A. BOER, H.J. TIBBEN, M.F. DE JOG, P. VAN'T VELD, G.J.R. GROENLAND, J.A. GENNEP VAN, M.T. VOETS, J.H.M. HEIJDEN, J. BRAAMSKAMP. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet.Q.* 1991; 13: 121-130.
- WENTWORTH, D.E., B.L. THOMPSON, X. XU, H.L. REGNERY, A.J. COOLEY, M.W. MC GREGOR, N.J. COX et V.S. HINSHAW. 1994. An influenza A (H1N1) virus, closely related to swine influenza virus, responsible for fatal case of human influenza. *J. Virol.* 68: 2051-2058.
- WEIS, W., J.H. BROWN, S. CUSACK, J.C. PAULSON, J.J. SKEHEL et D.C.WILEY. 1988. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333: 426-431.
- WHO COLLABORATING CENTERS FOR REFERENCE AND RESEARCH ON INFLUENZA. 1982. Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service / Centers for Diseases Control.
- WILEY, D.C, I.A. WILSON et J.J. SKEHEL. 1981. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong-Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature.* 289: 373-378.
- WILEY D.C. et J.J. SKEHEL. 1987. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 365-394.

WILSON, I.A., J.J. SKEHEL et D.C. WILEY. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of the influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*. 289: 366-373.

WILSON, I.A et N.J. COX. 1990. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 737-771.

WOODS, G.T. 1972. Comments on immunologic characteristics of swine influenza. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 160: 648-650.

WOOD, J.M, J.S. OXFORD, U. DUNLEAVY, R.W. NEWMAN, D. MAJOR et J.S. ROBERTSON. 1989. Influenza A (H1N1) vaccine efficacy in animal models is influenced by two amino acid substitutions in the hemagglutinin molecule. *Virology*. 171: 214-221.

WOOD, G.W., J. BANKS, J.W. MCCAULEY et D.J. ALEXANDER. 1994. Deduced amino acid sequences of the haemagglutinin of H5N1 avian influenza virus isolates from an outbreak in Turkeys in Norfolk, England. *Arch. Virol.* 134: 185-194.

WRIGHT, S.M., Y. KAWAOKA, G.B. SHARP, D.A. SENNE et R.G. WEBSTER. 1992. Interspecies transmission and reassortment of influenza A viruses in pigs and turkeys in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 138: 488-497.

YAMADA, A., E. NOBUSAWA, M-S. CAO, J. IMANISHI, S.OYAMA, A. ABE, S. KATAGIRI, D.W. KIM, K. NAKAJIMA et S. NAKAJIMA. 1991. Epitopes changes on the haemagglutinin molecule of recently isolated H1N1 influenza viruses. *J. Gen. Virol.* 72: 97-102.

YEWDELL, Y.W et W. GERHARD. 1981. Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 185-206.

YEWDELL, Y.W, A. YELLEN et T. BACHI. 1988. Monoclonal antibodies localize events in the folding, assembly and intracellular transport of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell* 52: 843-852.

YUANJI, G. et U. DESSELBERGER. 1984. Genome analysis of influenza C virus isolated in 1981/1982 from pigs in China. *J. Gen. Virol.* 65: 1857-1872.

ANNEXES

ANNEXE I.**1. PREPARATION DES TAMPONS ET SOLUTIONS POUR LES EPREUVES ELISA INDIRECTE ET DE BLOCAGE****a. Tampon PBS 10 mM pH 7,2.**

Le tampon PBS 10 mM, pH 7,2, était préparé en dissolvant 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ et 0,24 g de KH₂PO₄ dans 800 ml d'eau distillée. Le pH était ensuite ajusté à 7,2 avec de l'HCl 1N et le volume complété à 1,0 l avec de l'eau distillée.

b. Tampon de dissociation du virus: 0,6 M KCl, 0,5 M Tris pH 7,8, 0,5 % Tween-20.

La solution tampon était constituée de 40 ml de KCl 1,5 M, 50 ml de Tris 1M pH 7,8, auquel on ajoutait 0,05 ml de Tween-20. Le volume était complété à 100 ml avec du tampon PBS à pH 7,5.

c. Solution de blocage (PBS pH 7,2, 1% BSA).

La solution de blocage était préparée en dissolvant 1 g de BSA dans du PBS pH 7,2 et le volume était complété à 100 ml avec du PBS pH 7,2.

d. Solution de lavage (PBS pH 7,2, 0,05% Tween-20).

La solution consistait en du PBS pH 7,2, auquel était ajouté 0,05 % de Tween-20. Le volume était ensuite complété à 100 ml avec le PBS pH 7,2.

e. Solution de diluant pour anticorps. PBS pH 7,2 avec BSA 0,5 %, 0,05% Tween-20.

Cette solution de PBS pH 7,2 contenait 0,05 g de BSA, 0,05 ml de Tween-20 dans 100 ml.

f. Solution développante ou substrat révélateur.

Solution a: Tampon citraté: Acide citrique 0,05 M,
Phosphate de sodium dibasique anhydre
(Na_2HPO_4) 0,1 M.

Cette solution tampon était préparée en dissolvant 10 g d'acide citrique, 14 g de Na_2HPO_4 dans 500 ml d'eau distillée. Le pH était ensuite ajusté à 5 avec du HCl 1N et le volume final était complété à 1,0 l avec de l'eau distillée.

Solution b: Solution du substrat: OPD 0,4%, 0,012
% H_2O_2 .

Cette solution contenait 8×10^{-3} g d' OPD, $8 \mu\text{l}$ H_2O_2 (solution stock de 30%) dissout dans 20 ml de tampon citraté.

2. TAMPONS POUR ELISA DE BLOCAGE.

Solution tampon de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,05 M pH 9,6.

Cette solution tampon était préparée en dissolvant 1,59 g de Na_2CO_3 , 2,93 g de NaHCO_3 et 0,2 g de NaN_3 dans de l'eau distillée, puis le volume était complété à 1,0 l.

3. PRÉPARATION DES MILIEUX POUR LA FUSION CELLULAIRE.

a. Le milieu de culture complet RPMI 1640 (500 ml).

Le milieu RPMI 1640 était tamponné avec 15 mM d' Hépes, 20 mM de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et puis on y rajoutait 100 mM de pyruvate de sodium, 20 mM de L-glutamine, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'amphotéricine (fungizone^R) et 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamycine.

b. Solution ACK lysine (1,0 l).

La solution ACK lysine contenait 8,29 g de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), 1,0 g de carbonate de potassium (KHCO_3), et 0,037 g d'EDTA dissodique dans 1,0 l d'eau distillée. La solution était autoclavée avant son utilisation.

c. Solution HAT (100 ml) 100X.

Cette solution contenait $1,91 \times 10^{-3}$ g d'aminoptérine ($4,1 \times 10^{-7}$ M), $38,8 \times 10^{-3}$ g de thymidine ($1,6 \times 10^{-5}$), $136,1 \times 10^{-3}$ g d'hypoxanthine (1×10^{-4} M) dans 95 ml d'eau distillée. Les différents constituants étaient dissous à 60°C après alcalini-

sation de la solution par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 10 N. Le volume était ensuite complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

d. Solution HT (100 ml) 100 X.

La solution HT était préparée par dissolution de 38,8 X 10^{-3} g de thymidine ($1,6 \times 10^{-4}$ M), 136,1 10^{-3} g d'hypoxanthine (10^{-4} X M) dans 95 ml d'eau à 60°C, préalcalinisée comme ci-dessus.

e. Solution bleu trypan (0,5 %).

Cette solution était préparée en dissolvant 0,5 g de bleu trypan dans 100 ml de PBS pH 7,2.

4. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE POUR LE TITRAGE PAR LA TECHNIQUE DE PLAGES.

Le milieu de culture ou milieu de maintien était constitué d'une solution A (50 ml) et d'une solution B (50 ml).

La solution A était préparée extemporanément avec 45,0 ml du milieu MEM-Earle 2X concentré, 2,0 ml de BSA 10X, 2 ml de pénicilline-streptomycine 50X et 1,0 ml de glucose 20 %.

La solution B (50 ml) était constituée de 49 ml d'agar Oxoïd 1% prérefroidi à la température de 42°C avant l'addition de 1,0 ml de DEAE dextran 2%.

Après avoir mélanger la solution A à la solution B, 0,2 ml de trypsine TPCK $0,5 \times 10^{-3}$ g/ ml et 4,4 ml de NaHCO_3 5 % étaient ajoutés au mélange des 2 solutions.

Seule la solution de BSA était préparée dans du PBS.

5. PREPARATION DE SOLUTIONS ET TAMPONS POUR L'ELECTROPHORESE.

a. Solution d'acrylamide 45 % (37:1), 100 ml.

Cette solution était préparée en faisant dissoudre 43,78 g d'acrylamide, 1,22 g de bis-acrylamide dans de l'eau distillée. Le volume final de la solution était ensuite complété à 100 ml. Après filtration sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm , la solution était conservée dans une

bouteille opaque à 4°C et pouvait ainsi garder sa stabilité pour plus d'un mois.

b. Solution de SDS 10 % (p/v), 0,02 % (p/v) NaN_3 .

Cette solution était préparée en faisant dissoudre 10 g de SDS, 0,02 g de NaN_3 dans 90 ml d'eau. Le volume final de la solution était ensuite complété à 100 ml. Après filtration sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm , la solution était conservée dans une bouteille opaque à la température de la pièce.

c. Solution de persulfate d'ammonium $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ 10%.

Cette solution était préparée extemporanément en faisant dissoudre 0,1 g de $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ dans 1,0 ml d'eau distillée.

d. Tampon d'électrophorèse: 0,1 % SDS (p/v), 0,192 M glycine, 0,025 M Tris, pH 8,3.

Cette solution était préparée en faisant dissoudre dans 800 ml d'eau distillée 1,0 g de SDS, 14,41 g de glycine, 3,03 g de Tris. On complétait à un volume d'1,0 l avec de l'eau distillée, le pH se stabilisant aux environs de 8,3.

e. Tampon d'électrophorèse pour échantillon: 2% SDS (p/v), 20 % (v/v) de glycérol, 0,02 % NaN_3 , 0,250 mM Tris-HCl, pH 6,8.

Cette solution était préparée avec 50 ml d'eau distillée, 20 ml d'une solution de SDS 10%, 20 ml de glycérol, 0,02 g de NaN_3 et 3,03 g de Tris. Le pH était ajusté à 6,8 avec du HCl 1N et le volume final était complété à 100 ml avec de l'eau distillée. La solution était ensuite filtrée sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm et conservée à -20°C.

f. Tampon du gel de séparation: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,02 % (p/v), NaN_3 .

Pour une solution de 500 ml, 90,85 g de Tris Base et 0,1 g de NaN_3 étaient dissous dans 450 ml d'eau distillée. Le pH était ajusté à 8,8 avec du HCl 1N et le volume final était complété à 500 ml avec de l'eau distillée. Après filtration sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm , le tampon était conservé à 4°C.

- g. Tampon du gel de concentration: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,02 % NaN_3 .

Cette solution était préparée en faisant dissoudre 30,285 g de Tris-Base, 0,1 g de NaN_3 dans 450 ml d'eau distillée. Le pH était ajusté à 6,8 avec du HCl 1N, le volume final étant complété à 500 ml avec de l'eau distillée. Après filtration sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm , le tampon était conservé à 4°C.

- h. Préparation des gels de séparation (12,5%) et de concentration (4%) à partir de la solution stock d'acrylamide (37:1).

| Solutions | 12,5 % (ml) | 4 % (ml) |
|-----------------------------------|-------------|----------|
| Acrylamide 45 % | 4,17 | 0,89 |
| Tris-HCl, pH 8,8 | 3,75 | - |
| Tris-HCl, pH 8,6 | - | 2,5 |
| H ₂ O distillée | 6,86 | 6,46 |
| SDS 10 % | 0,150 | 0,1 |
| $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ | 0,05 | 0,1 |
| Temed | 0,015 | 0,010 |

6. PRÉPARATION DE LA SOLUTION POUR LE DOSAGE DES PROTÉINES.

Cette solution était préparée extemporanément en mélangeant une solution A à une solution B dans les proportions (50:1).

La solution A était préparée en dissolvant 10 g d'acide bicinchonique BCA, 20 g de carbonate de sodium monohydraté, 1,84 g tartrate de sodium, 4,0 g d'hydroxyde de sodium, 9,5 g de bicarbonate de sodium, 4,0 g de sulfate de cuivre dans de l'eau distillée. Le pH était ajusté à 11,25 avec du HCl 1N et le volume final était complété à 1,0 l avec de l'eau distillée.

La solution B contenait 4,0 g de sulfate de cuivre dans 100 ml d'eau distillée.

7. PREPARATION TAMPONS ET SOLUTIONS POUR L'ELECTROPHORESE SUR GELS D'AGAROSE.

- a. Tampon TAE: Ce tampon contenait 4,84 g de Tris-Base, 1,142 ml d'acide acétique glaciale, 2,0 ml d'une solution 0,5 M d'EDTA à pH 8,0 dans 1,0 l d'eau distillée.
- b. Tampon d'échantillon: Il s'agissait d'une solution contenant 0,25 % de bleu de bromophénol, 0,25 % de xylène-cyanol, 30 % p/v de glycérol dans de l'eau distillée.
- c. Tampon TNE: Il s'agissait d'une solution de 0,2 M de TBS et 0,002 M d'EDTA. La solution de TBS contenait 1,776 g de Tris-HCl, 1,06 g de Tris-base, 8,8 g de NaCl par litre.

8. PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE POUR LE CLONAGE.

- a. 2YT : Ce milieu était préparé en dissolvant 16 g de bactotryptone, 10 g d'extrait de levure, 5,0 g de NaCl par litre d'eau distillée. La solution était préalablement autoclavée.
- b. Agar 2H: Ce milieu de culture contenait 15 g de bacto-agar par litre d'eau distillée. Il était aussi autoclavé avant usage.
- c. SOC (1,0 l): Ce milieu SOC était préparé extemporanément et contenait 2 % de bacto-trypton, 0,5 % de bacto "yeast", 10 mM de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ et 10 mM MgSO₄.
- d. Les solutions stocks d'antibiotiques et d'additifs supplémentaires.

-IPTG (4mM): La solution stock contenait 0,046 g dans 0,2 ml d'eau distillée. La solution était filtrée sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μ m.

-XGAL (0,08 mg/ml): Le solvant utilisé pour la préparation de la solution stock était le N,N diméthyl formamide (DNF) (Sigma).

- Ampicilline: On utilisait une solution contenant 0,1 mg de l'antibiotique/ml d'eau distillée. La solution était préalablement filtrée sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm .
 - Tétracycline: La solution contenait 10×10^{-3} g de l'antibiotique/ml d'eau distillée et était préalablement filtrée.
 - Kanamycine: La solution contenait 10×10^{-3} g de l'antibiotique/ml d'eau distillée et était préalablement filtrée.
- e. La solution STET de lyse: Cette solution contenait 8 % de sucrose, 0,5 % Triton- X100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8 et 0,5 mg/ ml de lysozyme.

ANNEXE II.**Méthode de calcul de titre viral.****1. Par la technique des plages.**

Les préparations virales QC91 et QC81 ont été titrées par la technique des plages dans le but d'obtenir la dilution du virus donnant 100 à 200 pfu/ml. Les préparations virales étaient d'abord diluées en série de base deux et 0,2 ml de chacune des dilutions était déposée sur les feuillets de cellules MDCK préparées dans des plateaux Linbro de 6 puits à raison de 3 puits par dilution.

Le titre viral était déterminé selon le calcul suivant:
Moyenne du nombre de plages comptées dans les 3 cuvettes X volume de l'inoculum (0,2 ml) X facteur de dilution. Le titre était ensuite multiplié par 5 afin d'en permettre la conversion par ml de suspension virale.

Pour l'isolat QC91: 40 plages X 0,2 X 4,6 X 5 = 184 pfu/ml

Pour l'isolat QC81: 15 plages X 0,2 X 6,8 X 5 = 102 pfu/ml

2. Par la méthode d'effet cytopathique.

Les deux virus ont été titrés dans le but de déterminer la dilution appropriée dans les tests de séroneutralisation correspondant à 100 DICT₅₀ de virus, soit 100 fois la dose de virus induisant un effet cytopathique dans plus de 50 % des cultures cellulaires inoculées. Les suspensions virales étaient d'abord diluées en base dix et chacune des dilutions étaientensemencées (0,1 ml) sur les feuillets de cellules MDCK (4 puits/dilution) préparées dans les plateaux de microtitrage à 96 puits (Nunc). Le titre viral était estimé selon la formule de Reed-Muench (1938):

La dose infectieuse entraînant un effet cytopathique dans 50 % des feuillets cellulaires infectés (DICT₅₀) =

$$\text{Dilution où ECP} > 50\% \quad + \frac{\% \text{ dil. sup. à } 50\% - 50\%}{\% \text{ dil. sup. à } 50\% - \% \text{ dil. inf. à } 50\%} \times \log_{10} 10$$

Pour l'isolat QC81:

Dilution où ECP > 50 % = 10^{-5}

% dil. sup. à 50 % = $3/4 = 75\%$

% dil. inf. à 50 % = 0

$$TCID_{50} = 5 + \frac{75 - 50}{75 - 0} \times \log_{10} 10 = 10^{5,33} / 0,1 \text{ ml}$$

ou $10^{6,33}/\text{ml}$

3. Méthode de calcul du pourcentage de compétition de l'ELISA de blocage (Simkins et al., 1993).

Le pourcentage de compétition était calculé par la formule suivante:

1. Formule littéraire:

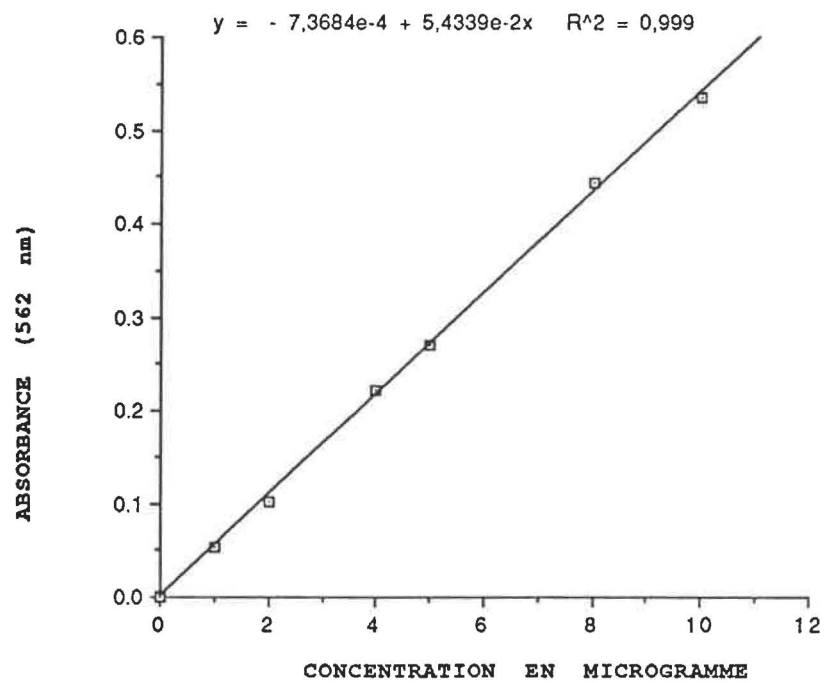
$$\left(1 - \frac{(\text{DO}_{492\text{nm}} \text{ AcMo}) - (\text{DO}_{492\text{nm}} \text{ AcMo après incubation avec le sérum de porc testé})}{(\text{DO}_{492\text{nm}} \text{ AcMo}) - (\text{DO}_{492\text{nm}} \text{ AcMo après incubation avec le sérum témoin négatif de porc})} \right) \times 100$$

2. La formule appliquée:

$$100 - \left(100 \times \frac{\text{DO du serum à tester}}{\text{DO du serum témoin négatif de même dilution}} \right)$$

4. Courbe étalon établie pour une solution d'albumine sérique bovine.

DOSAGE DES PROTÉINES COURBE DE CALIBRAGE AVEC LA PROTÉINE STANDARD BSA



ANNEXE III

Liste d'abréviation des acides aminés

| <u>Abbréviations</u> | <u>Liste des acides aminés</u> |
|----------------------|--------------------------------|
| A | Alanine |
| C | Cystéine |
| D | Aspartate |
| E | Glutamate |
| F | Phénylalanine |
| G | Glycine |
| H | Histidine |
| I | Isoleucine |
| K | Lysine |
| L | Leucine |
| M | Méthionine |
| | Asparagine |
| N | |
| P | Proline |
| Q | Glutamine |
| R | Arginine |
| S | Sérine |
| T | Thréonine |
| V | Valine |
| W | Tryptophane |
| Y | Tyrosine |