UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE DE L'OBTENTION DU GRADE

DE MAÎTRE ÈS SCIENCES (M.Sc.)

EN IMMUNOLOGIE ET VIROLOGIE

PAR

LUCIE CANUEL

CARACTÉRISTIQUES ET DIAGNOSTIC DE SOUCHES DU VIRUS DE L'ENCÉPHALOMYOCARDITE ASSOCIÉES AUX PROBLÈMES REPRODUCTEURS ET RESPIRATOIRES CHEZ LES PORCS

AVRIL 1996

À Francis,
mon fidèle compagnon,
et à mon petit coeur en sucre,
Marc-Antoine.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Les résultats obtenus au cours de ce projet de recherche ont fait l'objet des communications suivantes :

1) COMMUNICATIONS

Canuel, L., L. Wilson et S. Dea. 1992. Spécificité et sensibilité de la technique PCR appliquée au diagnostic du virus de l'encéphalomyocardite. VII[e] Conférence Annuelle en Santé Animale (MAPAQ). Sherbrooke, Québec. 6 et 7 mai. (Résumé des communications, pages 75-76).

Canuel, L., L. Wilson et S. Dea. 1992. Comparaison antigénique et moléculaire d'isolats québécois du virus EMC porcin associés à des problèmes reproducteurs. 60[e] Congrès de l'ACFAS (Association canadienne-française pour l'avancement des sciences). Montréal, Québec. 11-15 mai. (Annales de l'ACFAS. **Vol**. 60: 40).

Canuel, L., L. Wilson et S. Dea. 1992. Résultats préliminaires sur l'application des techniques PCR et d'hybridation moléculaire au diagnostic du virus de l'encéphalomyocardite. Journées de Recherche en Zootechnie. CPAQ. Saint-Hyacinthe, Québec. 9 et 10 juin. (Résumé des communications, page 146)

Canuel, L., L. Wilson et S. Dea. 1992. Detection of encephalomyocarditis virus by PCR and hybridization with non-radioactive molecular probes. 73[rd] Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD). Chicago, Illinois, É.-U. 9 et 10 novembre. (Résumé des communications, page 67: P63).

Canuel, L., L. Wilson et S. Dea. 1993. Application des techniques PCR et d'hybridation moléculaire au diagnostic du virus de l'encéphalomyocardite chez le porc. VIII[e] Conférence Annuelle en Santé Animale (MAPAQ). Orford, Québec. 5 et 6 mai. (Compte-rendu des communications, pages 1-3).

Canuel, L., L. Wilson et S. Dea. 1993. Diagnostic du virus de l'encéphalomyocardite chez les porcs et les souris par les techniques PCR et d'hybridation moléculaire. 43[ième] Conférence canadienne du personnel des laboratoires de maladies animales, Agriculture Canada. Nepean, Ontario. 1 et 2 juin. (Résumé des communications, 4 pages).

Canuel, L., L. Wilson et S. Dea. 1993. Rapid and sensitive detection of murine and porcine encephalomyocarditis virus in tissues by PCR and hybridization with non-radioactive probes. Joint Annual Meeting of the Society for Industrial Microbiology (SIM) and the Canadian Society of Microbiologists (CSM). Toronto, Ontario, Canada. 31 juillet-6 août. (P120)

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES v

LISTE DES TABLEAUX x

LISTE DES FIGURES xi

LISTE DES ABRÉVIATIONS xiv

SOMMAIRE xvii

INTRODUCTION 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 9

1. VIRUS DE L'ENCÉPHALOMYOCARDITE (EMC) 10

1.1 TAXONOMIE 10

1.1.1 Famille *Picornaviridae* 10
1.1.2 Genre Cardiovirus 10

1.2 CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU VIRION 11

1.3 CARACTÉRISTIQUES MOLÉCULAIRES DU VIRION 12

1.4 CARACTÉRISTIQUES GÉNOMIQUES 12

1.4.1 Protéine VPg 12
1.4.2 Région poly(C) du génome viral 13
1.4.3 Extrémité 5'-UTR 15

1.5 CYCLE DE MULTIPLICATION VIRALE 16

1.5.1 Réplication 16
1.5.2 Polyprotéine 17
1.5.3 Clivage protéolytique 18
1.5.4 Produits des gènes 21
1.5.5 Morphogénèse 25

1.6 STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DES CARDIOVIRUS 26

1.7 PROPRIÉTÉS DE CULTURE *IN VITRO* 28

1.8 PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES ET PATHOGÉNÈSE CHEZ LES ESPÈCES MURINES ET PORCINES 30

1.8.1 Pathogénie 30

1.8.2 Pathologie 33
1.8.3 Incidence 34

1.9 ÉPREUVES DIAGNOSTIQUES 36

1.9.1 Épreuves sérologiques 36
1.9.2 Épreuves virologiques 37
1.9.3 Épreuves moléculaires 37

MATÉRIEL ET MÉTHODES 39

1. ORIGINE DU VIRUS 40

1.1 Souches du virus EMC 40
1.2 Souches virales contrôles 40

2. CULTURES CELLULAIRES 41

2.1 Lignée cellulaire Vero 41
2.2 Lignée cellulaire BHK-21 42

3. PROPAGATION VIRALE 42

4. TITRAGE 43

4.1 Détermination des titres infectieux 43
4.2 Clonage par plages 44
4.3 Mesure de l'activité hémagglutinante 45

5. PURIFICATION DU VIRUS 46

5.1 Concentration et purification par ultracentrifugation 46
5.2 Microscopie électronique par imprégnation négative 47

6. PRODUCTION D'UN SÉRUM HYPERIMMUN 47

7. ANALYSES SÉROLOGIQUES 48

7.1 Immunofluorescence indirecte 48
7.1.1 Cellules en feuillets 48
7.1.2 Cellules en suspension 48
7.1.3 Analyse des sérums 49
7.2 Séroneutralisation 50
7.3 Test d'inhibition de l'activité hémagglutinante 51
7.3.1 Titrage de l'antigène 51
7.3.2 Inhibition de l'activité hémagglutinante 51

8. ANALYSE DES PROTÉINES VIRALES 51

8.1 Dosage des protéines 51
8.2 Électrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) 52
8.3 Radiomarquage des protéines structurales 53
8.4 Révélation des protéines par coloration au bleu de Coomassie 54
9. IMMUNOBUVARDAGE 54
9.1 Préparation des antigènes viraux 54
9.2 Détection immunologique 55
10. AMPLIFICATION DES GÈNES VIRAUX 56
10.1 Préparation des acides nucléiques viraux et cellulaires 56
10.1.1 Extraction de l'ARN génomique du virus EMC 56
10.1.2 ADN viral et cellulaire 57
10.2 Choix des amorces oligonucléotidiques 58
10.3 Amplification par la réaction de polymérisation en chaîne 61
10.3.1 Réaction de la transcriptase inverse 61
10.3.2 Amplification 61
10.4 Analyse des produits d'amplification par électrophorèse en gels d'agarose 62
11. CLONAGE DES GÈNES VIRAUX 63
11.1 Purification des produits d'amplification 63
11.2 Clonage du gène α codant pour la protéine VP1 64
11.2.1 Clonage dans le plasmide pUC19 64
11.2.2 Clonage dans le vecteur T 65
11.3 Transformation de bactéries *Escherichia coli* 66
11.4 Isolement des plasmides recombinants et confirmation de la présence de l'insert 68
11.5 Séquençage 70
12. HYBRIDATION MOLÉCULAIRE 71
12.1 Régions génomiques ciblées 71
12.2 Marquage à la digoxygénine-11-dUTP 72
12.3 Adsorption de l'ADN sur membrane de nitrocellulose 72
12.3.1 Transfert de type Southern 72
12.3.2 Transfert par microfiltration 74
12.4 Hybridation moléculaire 74
12.5 Détection immunologique 75
13. ESSAIS D'INFECTION EXPÉRIMENTALE 76

13.1 Inoculation de souris 76
13.2 Inoculation de porcelets 77
13.3 Préparation des homogénats de tissus animaux 77
13.3.1 Isolement du virus en cultures cellulaires 77
13.3.2 Extraction de l'ARN génomique et réaction PCR 78
13.3.3 Examen histopathologique 78

RÉSULTATS 79

1. ÉTUDE DE LA CROISSANCE VIRALE 80

1.1 Culture du virus EMC porcin sur la lignée Vero 80
1.1.1 Effet cytopathique 81
1.2 Culture du virus EMC porcin sur la lignée BHK-21 82
1.3 Immunofluorescence indirecte 82
1.4 Clonage par plages 85

2. PATHOGÉNICITÉ DES ISOLATS PORCINS DU VIRUS EMC 88

2.1 Étude de la virulence chez les souris 92
2.2 Essais de reproduction expérimentale chez des porcelets 93
2.3 Comparaison des diverses épreuves diagnostiques 96

3. ÉTUDE DE LA STRUCTURE POLYPEPTIDIQUE DU VIRUS EMC ET COMPARAISON ANTIGÉNIQUE 101

3.1 Concentration et purification virale 101
3.1.1 Détermination de la densité de flottation du virus EMC sur gradients de CsCl 101
3.2 Comparaison sérologique des isolats québécois du virus EMC porcin 102
3.2.1 Test d'inhibition de l'activité hémagglutinante 102
3.2.2 Réaction croisée selon le test de séroneutralisation 108
3.2.3 Comparaison des profils polypeptidiques 108

4. DÉTECTION ET CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU GÉNOME VIRAL 114

4.1 Amplification d'ADN complémentaire par RT-PCR 115
4.2 Spécificité et sensibilité des techniques RT-PCR et d'hybridation 115
4.3 Détection de fragments génomiques du virus EMC porcin au niveau de tissus murins et porcins 128
4.4 Comparaison génomique des isolats québécois du virus EMC porcin 143
4.4.1 Analyse des séquences nucléotidiques et peptidiques des fragments génomiques amplifiés 143

DISCUSSION 149

1. ÉTUDE DE LA CROISSANCE VIRALE 150
2. PATHOGÉNICITÉ DES SOUCHES PORCINES DU VIRUS EMC 152
3. ÉTUDE DE LA STRUCTURE POLYPEPTIDIQUE 156
4. DÉTECTION DES ISOLATS DU VIRUS EMC 157
5. CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES ISOLATS DU VIRUS EMC 163

CONCLUSION 165

REMERCIEMENTS 169

BIBLIOGRAPHIE 172

ANNEXE 187

ANNEXE I 188

ANNEXE II 192

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.	Origine et caractéristiques d'isolats québécois du virus EMC porcin.	89
TABLEAU 2.	Comparaison sérologique des isolats québécois du virus EMC porcin.	107
TABLEAU 3.	Comparaison des techniques d'amplification enzymatique, d'immunofluorescence indirecte, d'hybridation moléculaire et d'isolement en cultures cellulaires pour la détection du virus EMC porcin au niveau de tissus de souris infectées expérimentalement.	138

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.	Représentation schématique, synthèse et modifications post-traductionnelles des protéines du virus EMC.	23
FIGURE 2.	Représentation schématique du génome du virus EMC et localisation des amorces oligonucléotidiques utilisées lors des essais d'amplification enzymatique.	60
FIGURE 3.	Microphotographies en contraste de phase de l'effet cytopathique induit par la souche de référence ATCC VR-129 du virus EMC sur les cellules Vero.	84
FIGURE 4.	Fluorescence cytoplasmique observée dans les cellules Vero infectées avec un homogénat de la souche québécoise Q.90-890 du virus EMC.	87
FIGURE 5.	Plages typiques obtenues pour les isolats québécois du virus EMC sur les cellules Vero.	91
FIGURE 6.	Lésions de méningite et d'encéphalite non-suppuratives observées chez des souris CD-1 suite à une infection expérimentale à l'aide de la souche Q.90-890 du virus EMC porcin.	95
FIGURE 7.	Lésions histopathologiques observées au niveau du coeur de porcelets à la mamelle suite à une infection expérimentale à l'aide de la souche Q.90-890 du virus EMC.	98
FIGURE 8.	Lésions histopathologiques au niveau des poumons de porcelets à la mamelle affectés de problèmes respiratoires suite à une infection expérimentale à l'aide de la souche Q.90-890 du virus EMC.	100
FIGURE 9.	Profil de purification de la souche Q.90-890 du virus EMC après ultracentrifugation isopycnique sur gradient de CsCl.	104

FIGURE 10.	Micrographie électronique en imprégnation négative des particules virales retrouvées dans les fractions de densité de CsCl de 1,32 à 1,35 g/ml.	106
FIGURE 11.	Profils électrophorétiques et d'immunobuvardage des protéines structurales majeures d'isolats québécois du virus EMC.	111
FIGURE 12.	Comparaison des profils polypeptidiques d'isolats québécois du virus EMC porcin.	113
FIGURE 13.	Amplification de l'ARN génomique de la souche de référence EMC ATCC VR-129 et de l'isolat québécois Q.90-890 utilisant différentes paires d'amorces oligonucléotidiques.	117
FIGURE 14.	Spécificité des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification enzymatique de l'ARN génomique du virus EMC.	120
FIGURE 15.	Profil électrophorétique des fragments génomiques obtenus suite à l'amplification de l'ARN d'isolats québécois, américains et sud-américains utilisant les amorces correspondant au gène codant pour la protéine VP1.	123
FIGURE 16.	Sensibilité de la technique RT-PCR pour la détection de l'ARN génomique du virus EMC (souche ATCC VR-129).	126
FIGURE 17.	Spécificité de la sonde moléculaire marquée à la digoxygénine et effets de la concentration en formamide et de la température d'hybridation.	130
FIGURE 18.	Détection de fragments génomiques du virus EMC amplifiés par RT-PCR à partir de tissus des souris infectées expérimentalement à l'aide des amorces 3A-1B.	133

FIGURE 19.	Cinétique d'infection de souris par le virus EMC telle que déterminée par la détection de l'ARN viral par amplification enzymatique et hybridation moléculaire.	136
FIGURE 20.	Détection de l'ARN génomique du virus EMC à partir de tissus de porcelets infectés expérimentalement.	142
FIGURE 21.	Séquences nucléotidiques de la région génomique codant pour la protéine VP1 de 2 isolats québécois du virus EMC.	145
FIGURE 22.	Séquences en acides aminés de la protéine VP1 de 2 isolats québécois du virus EMC déduites de l'analyse des séquences nucléotidiques de la région génomique codant pour la protéine VP1 amplifié par RT-PCR.	147

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	acide ribonucléique
ATCC :	American Type Culture Collection
BSA :	albumine sérique bovine
BVD-MD :	virus de la diarrhée virale bovine - maladie des muqueuses
CPE :	effet cytopathique
cpm :	comptes par minute
Da :	dalton
DAB :	3,3'-diamino-benzidine tétrahydrochlorure
dATP :	2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate
$DCEP_{50}$:	dose virale induisant un effet cytopathique dans 50% des feuillets cellulaires infectés
dCTP :	2'-désoxycytidine 5'-triphosphate
DEAE :	diéthylaminoéthyl éther
DEPC :	diéthylpyrocarbonate
DIG :	digoxygénine-11-dUTP
dGTP :	2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate
DMSO :	diméthylsulfoxyde
D.O. :	densité optique
dTTP :	2'-désoxythymidine 5'-triphosphate
EDTA :	acide éthylènediamine tétraacétique disodique
ELISA :	épreuve immunoenzymatique
FITC :	isothiocyanate de fluorescéine
HAAT :	hyperthermie-anorexie-avortement chez la truie
IFA :	immunofluorescence assay
IPTG :	isopropyl-indolyl-α-galactopyranoside

kDa : kiloDalton

L : séquence leader

LB : milieu Luria-Bertani

MEM EARLE'S : milieu minimal de Eagle avec solution saline de Earle

MEM HANK'S : milieu minimal de Eagle avec solution saline de Hanks

ORF : cadre de lecture ouvert

pb : paire de bases

PBS : saline phosphatée tamponnée, sans calcium ni magnésium

PCR : amplification par réaction en chaîne de la polymérase

PEV : entérovirus porcin

PM : poids moléculaire

poly C : région riche en cytosine

PPV : parvovirus porcin

RIB : virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine

RT : transcriptase inverse

SDS : sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

SFB : sérum foetal bovin

SIV : virus de l'influenza porcin

SRRP : syndrome reproducteur et respiratoire porcin

SSC : 1 X SSC contient du NaCl (3M) et du citrate de sodium (0,3 M) $Na_3C_6H_5O_7$

TAE : tampon tris-acétate

TBE : tampon tris-borate

TBS : tampon tris-NaCl

TBS-T : tampon TBS additionné de Tween 20

TE : tampon tris-EDTA

U : unité

VEMC : virus de l'encéphalomyocardite

VPg : protéine liée au génome viral

X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

WB : épreuve d'immunobuvardage

SOMMAIRE

Le virus de l'encéphalomyocardite (EMC) appartient au genre Cardiovirus de la famille des *Picornaviridae*. Cet agent est reconnu comme étant responsable de problèmes de mort subite chez les jeunes porcelets, de même que de problèmes reproducteurs chez les truies de toutes parités en fin de gestation. Le diagnostic d'avortement associé au virus EMC n'est souvent basé que sur la mise en évidence d'anticorps neutralisants de type IgG dans les liquides foetaux, étant donné qu'il y a souvent absence de lésions spécifiques au niveau du myocarde et du cerveau et étant donné les difficultés rencontrées lors de l'isolement du virus en cultures cellulaires.

Les objectifs de ce travail étaient 1) de déterminer les caractéristiques antigéniques et moléculaires de cet agent viral, et 2) d'évaluer la sensibilité et la spécificité des techniques PCR et d'hybridation moléculaire pour la détection du virus dans les tissus de souris et de porcs infectés de façon expérimentale. Des isolats québécois du virus EMC ayant été associés à des épisodes de problèmes reproducteurs et/ou respiratoires chez des truies de toutes parités et des porcelets non-sevrés ont été comparés au cours de ces travaux.

La souche Q.90-890 du virus EMC fut propagée sur cultures cellulaires Vero et purifiée par ultracentrifugation sur gradients de densité de chlorure de césium. L'ARN génomique fut extrait et des copies d'ADNc correspondant aux régions codant pour les protéines structurales VP1 et VP4 ont été synthétisées sous l'action de la transcriptase inverse (RT).

Le choix des paires d'amorces oligonucléotidiques utilisées dans les réactions de RT et de polymérisation en chaîne par la *Taq* polymérase a été fait en se basant sur la séquence d'ADN complémentaire de la souche de référence simienne ATCC VR-129 publiée en 1984. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gels d'agarose et des fragments de 410, 434, 461 et 806 paires de base ont été révélés. Des sondes moléculaires, correspondant aux produits amplifiés par la technique PCR et clonés dans un vecteur plasmidique T, ont été synthétisées et marquées à la digoxygénine-11-dUTP, suite à une incubation en présence d'ADN polymérase T7 et d'amorces oligonucléotidiques aléatoires.

La sensibilité de la technique d'amplification enzymatique pour la détection de l'ARN viral dans les cellules Vero infectées fut estimée à 10^4 $DCEP_{50}$. Une augmentation de cette sensibilité d'un facteur de 10 (10^3 $DCEP_{50}$) fut obtenue dans les cas où le produit de la réaction PCR était révélé par hybridation à l'aide d'une sonde moléculaire homologue (technique Southern).

La spécificité des fragments génomiques amplifiés a été confirmée par hybridation moléculaire et aucune réactivité n'a été démontrée envers le parvovirus porcin (PPV), le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (RIB), les entérovirus porcins types 1, 6 et 8 (PEV) et le virus de la diarrhée virale bovine (BVD-MD).

L'ARN génomique de neuf isolats du virus EMC, provenant de fermes québécoises ayant connu une recrudescence de problèmes reproducteurs, de même que trois isolats

provenant des États-Unis et de Puerto Rico, a été amplifié en utilisant trois paires d'amorces différentes.

En parallèle, des régions génomiques spécifiques du virus EMC ont été amplifiées par PCR à partir d'homogénats de tissus de souris infectées de façon expérimentale avec la souche Q.90-890, à des doses de 10^3 et 10^4 $DCEP_{50}$, et prélevés à différents intervalles après le début de l'infection. L'étude de la cinétique d'infection a permis de démontrer la présence du virus au niveau de plusieurs organes vitaux chez la souris tels le cerveau, la rate, le coeur, les poumons et les intestins, confirmant ainsi les résultats obtenus lors d'essais d'isolement en cultures cellulaires. Comparativement, la présence d'antigènes viraux n'a pu être détectée qu'au niveau des intestins et du cerveau après 24 heures par la technique d'immunofluorescence sur coupes de tissus congelés.

La sensibilité de ces différentes techniques a aussi été évaluée pour la détection du virus dans les homogénats d'organes prélevés de porcelets ayant été infectés avec l'isolat Q.90-890 à une dose de 10^5 $DCEP_{50}$. Lors d'analyses histopathologiques, il fut possible de mettre en évidence des lésions de myocardite et d'encéphalite nécrotiques chez les porcelets dès le 4ième jour suivant l'infection. Toutefois, la présence d'antigènes viraux n'a pu être démontrée par immunofluorescence sur coupes de tissus. Lors d'essais d'isolement en cultures cellulaires, le virus fut cultivé à partir d'homogénats de coeur, de poumons, de cerveau et de rate. Les essais effectués avec les techniques PCR et

d'hybridation moléculaire ont permis de détecter la présence d'ARN viral dans les homogénats préparés à partir du coeur, du cerveau et de la rate.

La combinaison des techniques PCR et d'hybridation moléculaire s'est donc avérée d'une sensibilité supérieure aux techniques conventionnelles de détection. De plus, les résultats peuvent être obtenus en moins de 5 jours, comparativement à la période de trois semaines nécessaires à la confirmation de l'isolement en cultures cellulaires. Ces techniques moléculaires sont très spécifiques et la présence d'anticorps bloqueurs retrouvés normalement dans les tissus d'avortons ou de porcelets immunocompétents n'interfère pas au niveau de leur efficacité.

Au cours de ces travaux, 9 isolats québécois du virus EMC, ayant été associés à des épisodes de problèmes reproducteurs et/ou respiratoires et récupérés chez des truies de toutes parités et des porcelets non-sevrés, ont été analysés pour fin de comparaison du point de vue antigénique et génomique afin de vérifier la possibilité de retrouver des variants associés à des tropismes distincts. Dans un premier temps, des épreuves sérologiques ont été effectuées et n'ont permis de révéler aucune variabilité notable entre les divers isolats sauf pour les isolats respiratoire Q.90-890 et abortif Q.90-6041, qui ont démontré un titre très inférieur par le test de séroneutralisation ainsi qu'un profil d'immunobuvardage en partie différent de celui obtenu pour les autres isolats porcins québécois. Du point de vue génomique, une analyse des séquences des isolats québécois d'origine respiratoire Q.90-890 et Q.90-945 a permis de déceler quelques substitutions nucléotidiques se traduisant toutes

par des changements au niveau des peptides, pouvant être à la source des variations observées au niveau du tropisme viral.

INTRODUCTION

Au cours des 6 dernières années, plusieurs élevages porcins canadiens ont été aux prises avec deux nouveaux syndromes caractérisés par des problèmes respiratoires et reproducteurs d'origine étiologique inconnue ayant engendré des pertes considérables au niveau de la productivité des troupeaux. Les répercussions économiques ont été drastiques pour plusieurs de ces éleveurs (Bilodeau *et al.*, 1991; Dea *et al.*, 1991c; Martineau *et al*,. 1992). L'un de ces syndromes s'avère cliniquement similaire à la maladie dite «mystérieuse» rapportée aux États-Unis en 1987 et dans la plupart des pays européens en 1991 (Bilodeau *et al.*, 1991; Goyal, 1993). La seconde condition fut appelée «Pneumonie Prolifération et Nécrosante (PPN)» (Morin et Robinson, 1991). Dans la province de Québec, la condition observée a été nommée initialement «Syndrome HAAT-pneumonie interstitielle» en référence aux signes cliniques affectant les truies gestantes et le type de lésions histopathologiques observées chez les porcelets dyspnéiques (Martineau *et al.*, 1992).

Cliniquement, les truies de toutes parités manifestent en fin de gestation de l'hyper-thermie et de l'anorexie; consécutivement, on dénote une fréquence accrue d'avortements tardifs, de momifications foetales, de foetus autolysés, de mortinatalités, de mise-bas prématurées et de porcelets faibles. La période de problèmes reproducteurs est souvent suivie ou même accompagnée par des problèmes respiratoires modérés à sévères affectant les porcs de tout âge, mais plus particulièrement les porcelets à la mamelle, les porcs sevrés et les porcs à l'engraissement. Les problèmes respiratoires présentent une symptomatologie

similaire à celle rencontrée suite à l'infection par le virus influenza; cette condition persiste pour une période variant de 8 à 12 semaines avant de s'estomper. Chez les porcelets qui récupèrent, on observe fréquemment des problèmes de polyarthrite, de polysérosite et de dermatite, témoignant d'un état d'immunosuppression (Martineau *et al.*, 1992; Bilodeau *et al.*, 1991).

L'apparition simultanée ou consécutive dans un court laps de temps, de problèmes reproducteurs chez les truies de toutes parités et de symptômes respiratoires chez les porcelets de tous les âges laissait présumer qu'il s'agissait de deux formes distinctes d'une même maladie. Ces deux formes, soient reproductrice et respiratoire, semblent évoluer selon une chronologie différente dépendamment du type de production et du niveau sanitaire, ce qui rend difficile l'élaboration d'une définition clinique bien distincte et complique grandement le diagnostic différentiel.

Suite à la venue de ce nouveau syndrome, les chercheurs ont tenté de déterminer la nature de l'agent causal. Ils en sont venus à la conclusion qu'il devait s'agir d'un virus étant donné l'absence de réponse des sujets malades aux traitements par les antibiotiques, l'absence d'une augmentation anormale de neutrophiles dans la circulation lors des cas aigus, l'absence de lésions pathologiques suggérant une infection bactérienne et l'inefficacité des vaccins anti-bactériens à prévenir la maladie. L'hypothèse d'une intoxication alimentaire par les mycotoxines a de plus été rejetée puisque le syndrome a frappé des régions géographiques très éloignées où des régimes alimentaires variés sont offerts aux

animaux. De plus, le fait que ce syndrome soit présent dans plusieurs élevages de type tout plein-tout vide et dans des élevages fermés, sans contact avec des animaux d'autres sources, était une indication que la seule hypothèse encore valable était celle d'une infection virale.

Au début de l'épidémie en Amérique du Nord, l'aspect reproducteur semble avoir dominé le portrait clinique (Keffaber, 1989) tout comme en Allemagne, en Angleterre (Paton *et al.*, 1991), en Belgique (Koenen *et al.*, 1991), aux Pays-Bas (de Jong *et al.*, 1991; Pol *et al.*, 1991) et plus récemment au Japon (Shibata *et al.*, 1993). Mais depuis, la forme respiratoire a pris de l'ampleur et caractérise davantage la condition telle que rencontrée actuellement dans les élevages porcins du Québec (Martineau *et al.*, 1992; Bilodeau *et al.*, 1991; Goyal, 1993).

Au cours des deux dernières années, 135 cas provenant d'au moins 40 fermes québécoises de régions géographiques différentes ayant connu des recrudescences de problèmes reproducteurs ont été investigués. Dans le cas des avortons ou des porcelets mort-nés, les lésions macroscopiques et microscopiques étaient souvent non-significatives; toutefois, une accumulation anormale de liquides thoraciques et sous-cutanés a été observée, avec un coeur d'apparence flasque. Dans quelques cas, il a été possible, lors d'examens histopathologiques, de mettre en évidence des foyers d'infiltration de type lymphomonocytaire au niveau de l'endocarde et du myocarde, de même qu'au niveau du cerveau. Par ailleurs, au niveau des poumons des animaux malades, il fut possible à plusieurs occasions de démonter la présence de lésions de pneumonie interstitielle avec un épaississement des

septa alvéolaires causé par une infiltration massive par des cellules monocytaires, mais absence d'exsudat au niveau des alvéoles (Dea *et al.*, 1992b; Dea *et al.*, 1991c).

Au Canada, les agents ayant été les plus souvent isolés d'avortons ou de porcelets affectés de problèmes respiratoires sont le virus de l'encéphalomyocardite (EMC), le parvovirus porcin (PPV), les entérovirus porcins (PEV) et un variant antigénique du virus influenza type A porcin (SIV). Ce dernier a été associé à un nouveau type de pneumonie chez les porcs nommée pneumonie proliférative et nécrosante (PPN), une condition qui a représenté un problème clinique important au Québec au cours des cinq dernières années (Dea *et al.*, 1992b).

Le virus EMC a souvent été isolé au Québec à partir de tissus d'avortons, et des titres significatifs en anticorps ont été obtenus à partir des liquides foetaux. En effet, près de 40 % (45/105) des liquides foetaux obtenus d'avortons de plus de 28 fermes affectées de problèmes reproducteurs possédaient des titres en anticorps anti-EMCV significatifs (> 16); toutefois, les titres étaient le plus souvent non-significatifs dans le cas des virus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV), le parvovirus porcin (PPV), le virus de l'influenza porcin $H_{SW}1N1$ (SIV), et négatifs pour le virus de la peste porcine, le virus de la pseudorage, le virus respiratoire syncitial (RS), le virus de la diarrhée virale bovine, l'herpèsvirus bovin type 1 et le virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine. Chez quatre fermes suivies de façon plus particulière, 68,5 % des liquides foetaux avaient un titre supérieur à 1/16 en anticorps contre le virus EMC, des titres de l'ordre de 1/25 600 étaient

détectés à quelques occasions (Dea *et al.*, 1992c; Dea *et al.*, 1991a). D'avril 1990 à juin 1991, neuf isolats du virus EMC ont été récupérés de spécimens cliniques provenant de fermes porcines du sud du Québec. Dans huit de ces neufs élevages, les propriétaires avaient rapporté une recrudescence de problèmes reproducteurs chez les truies gestantes de toutes parités, accompagnée d'épisodes de problèmes respiratoires chez les porcelets à la mamelle, les porcelets sevrés et les porcs à l'engraissement. Quatre de ces isolats ont été récupérés d'un pool de tissus d'avortons de 90 à 100 jours, alors que trois autres isolats ont été cultivés à partir des liquides thoraciques foetaux clarifiés. Deux isolats ont été cultivés de tissus pulmonaires de porcelets à la mamelle et sevrés atteints de problèmes respiratoires sévères.

En raison de l'absence de lésions typiques au niveau du coeur des foetus et porcelets anormaux, considérant que dans certains cas seules des lésions de pneumonie interstitielle étaient manifestées, il avait été proposé de considérer qu'un variant pneumotrope du virus EMC était possiblement en cause (Dea *et al.*, 1992c). Cependant, les essais d'inoculation expérimentale ont démontré que les souches isolées initialement des poumons d'animaux malades étaient hautement virulentes pour des porcelets gnotobiotes; ces souches pouvaient induire non seulement des lésions de pneumonie interstitielle, mais aussi de sévères lésions nécrotiques au niveau du coeur, qui ne sont pas considérées comme partie intégrante du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (SRRP) (Goyal, 1993). Des lésions macroscopiques ou microscopiques significatives ne sont pas retrouvées dans le cas des

truies malades et les avortons; toutefois, chez les porcelets affectés de problèmes respiratoires, il avait été possible de diagnostiquer une pneumonie interstitielle diffuse accompagnée d'une infiltration des septa alvéolaires par des cellules lymphomonocytaires (Dea *et al.*, 1992c). D'autre part, le nouveau variant antigénique du SIV a été isolé de tissus pulmonaires de porcelets sevrés et des porcs à l'engraissement qui avaient manifesté des problèmes respiratoires associés à des lésions de pneumonie proliférative et nécrosante (Rekik *et al.*, 1994; Dea *et al.*, 1992c; Girard *et al.*, 1992; Morin et Robinson, 1991). Ce nouveau type de pneumonie retrouvée chez l'espèce porcine varie de façon significative de la pneumonie interstitielle associée au SRRP en Europe et aux États-Unis. En effet, l'hypertrophie des pneumocytes de type II n'est pas une caractéristique majeu-re pour le SRRP et les dommages causés aux voies respiratoires se limitent à quelques cellules en dégénérescence et à l'hypertrophie des cellules épithéliales bordant les bronchioles terminales. Cependant, il semble improbable qu'un de ces virus soit l'agent causal primaire des problèmes reproducteurs rapportés dans les fermes du Québec au cours des dernières années, étant donné l'absence d'une réponse sérologique significative chez les animaux malades et convalescents envers ces agents.

Au cours de l'été 1991, deux équipes européennes et une américaine réussirent à démontrer un lien causal entre le SRRP et un virus répondant aux caractéristiques morphologiques des Togavirus; ce nouveau virus fut nommé «virus de Lelystad» (LV) en raison du nom de la ville hollandaise où il fut initialement découvert (Pol *et al.*, 1991;

Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991). Un virus sérologiquement associé au virus LV fut isolé au Québec au printemps 1992 et les essais d'infection expérimentale de truies gestantes et de porcelets de moins de 8 semaines d'âge ont permis de conclure au rôle primaire de cet agent lors d'épisodes aigus de SRRP au Québec (Dea *et al.*, 1992d). Toutefois, il demeure que l'isolement du virus EMC à partir de tissus d'avortons et les hauts titres en anticorps séroneutralisants dans les liquides foetaux suggéraient que ce virus soit tout de même associé à la composante reproductrice du SRRP. Bien que le virus EMC puisse être considéré comme une cause primaire de problèmes reproducteurs chez les truies, l'absence de séroconversion chez les truies suggèrait que ce virus n'était pas l'agent primaire. Bien qu'un artérivirus soit maintenant reconnu comme l'agent étiologique primaire, le virus EMC est encore considéré comme l'un des agents secondaires les plus souvent associés à la composante reproductrice.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. VIRUS DE L'ENCÉPHALOMYOCARDITE

1.1 TAXONOMIE

1.1.1 Famille *Picornaviridae*

Les membres de la famille des *Picornaviridae* sont parmi les plus petits virus à ARN connus. On retrouve dans cette famille, plusieurs des virus les plus pathogènes pour les humains et les animaux. Les particules virales sont de symétrie icosaédrique, non-enveloppés, d'un diamètre de 25 à 30 mm et leur génome consiste en une molécule d'ARN non-segmenté monocaténaire de polarité positive d'environ 8 Kb. Cette famille est sous-divisée en 4 genres : les rhinovirus (virus commun du rhume), les entérovirus (poliovirus), les aphtovirus (virus de la fièvre aphteuse) et les cardiovirus (virus de l'encéphalomyocardite) (Rueckert, 1990; Matthews, 1982).

1.1.2 Genre Cardiovirus

Les virus faisant partie de ce genre sont tous des pathogènes des animaux et appartiennent à un seul sérotype. Ils sont sérologiquement indifférenciables des souches du virus de l'encéphalomyocardite sauf par séroneutralisation (Rueckert, 1990). Parmi ces souches, on retrouve le mengovirus, le virus Columbia SK et le virus Maus-Elberfeld (ME) (Rueckert, 1990; Cerutis *et al.*, 1989). Le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler a longtemps été classé dans le genre entérovirus, sur la base de sa stabilité en milieu acide,

mais est dorénavant considéré comme un cardiovirus étant donné ses caractéristiques communes avec le virus de l'encéphalomyocardite, et plus particulièrement à cause de l'homologie importante (85%) au niveau des séquences nucléotidiques du gène codant pour la protéine structurale majeure VP1 (Minor, 1990; Nitayaphan *et al.*, 1986). Tous les représentants des Cardiovirus sont reconnus comme étant des virus murins même si leur spectre d'hôtes inclut les bovins, les chevaux, les écureuils, les éléphants (Simpson *et al.*, 1977), les porcs (Acland et Littlejohns, 1986) et les humains (Rueckert, 1990; Cerutis *et al.*, 1989).

1.2 CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU VIRION

Les picornavirus, et plus particulièrement les cardiovirus, possèdent un spectre de stabilité de pH variant de 3 à 9, mais sont labiles à un pH de 4,5 à 6,5 lorsque mis en présence de solutions contenant 0,1 M d'ions Cl^- ou Br^-. L'infectivité virale n'est généralement pas affectée par l'utilisation de solvants organiques tels l'éther et le chloroforme (Rueckert, 1990). Les particules virales infectieuses ont une densité de flottation évaluée à 1,34 g/ml sur gradients de CsCl, alors que les particules défectives se retrouvent à 1,30 g/ml. De plus, le virion mature possède un coefficient de sédimentation de 156S tel qu'évalué sur gradients de saccharose où la force ionique variait de 0,09 à 0,15 et le pH de 7,3 à 7,6 (Rueckert, 1990).

1.3 CARACTÉRISTIQUES MOLÉCULAIRES DU VIRION

Le génome du virus EMC est composé d'un ARN monocaténaire non-enveloppé d'une masse moléculaire de 2,7 x 10^6, de polarité positive d'une longueur de 7200 bases et ne contenant qu'un seul cadre de lecture ouvert (Palmenberg *et al.*, 1984). L'acide nucléique est encapsidé dans une coque isométrique de 28 nm de diamètre constituée par l'assemblage de 60 exemplaires asymétriques de chacune des quatre protéines capsidiques non glycosylées désignées VP1, VP2, VP3 et VP4 et issues d'un précurseur polyprotéique de 255 kDa (Palmenberg *et al.*, 1984) (Figure 1). On retrouve la présence d'une protéine VPg à l'extrémité 5' de l'ARN au lieu d'une coiffe méthylée, et d'une queue polyadénylée en 3', indispensable pour l'infectivité de la molécule (Porter *et al.*, 1978).

1.4 CARACTÉRISTIQUES GÉNOMIQUES

1.4.1 Protéine VPg

La protéine VPg d'une longueur de 22 résidus d'acides aminés est codée par l'ARN viral, et est attachée de façon covalente à l'extrémité 5'-pUpUp de l'ARN par un lien phosphodiester à un groupement hydroxyl phénolique (O^4) d'un résidu tyrosine (Drygin *et*

al., 1988). Ce lien est stable aussi bien en milieu basique qu'en milieu acide, et peut être considéré comme étant de très haute énergie.

O-pUpUp-[ARN]-poly(A)
|
NH_2-Gly-Ala-Tyr-Thr-Gly-Leu-Pro-Asn-Lys

Cette protéine semble jouer un rôle dans l'initiation de la synthèse de l'ARN viral et même au niveau de son incorporation dans le virion. Étant donné que l'ARN est infectieux, il est clair que la protéine VPg n'est pas essentielle puisqu'une fois enlevée par l'action d'une protéase, l'ARN conserve toujours son pouvoir pathogène (Tobin *et al.*, 1989). Une analyse des ARN nouvellement synthétisés dans les cellules infectées a permis de découvrir que non seulement les extrémités 5' des ARN sont liés à une protéine VPg, mais aussi les brins négatifs ou intermédiaires réplicatifs, et les deux brins de l'ARN bicaténaire (forme réplicative) (Wimmer, 1982; Rothberg *et al.*, 1978). En se basant sur ces «découvertes», il a été suggéré que cette protéine puisse jouer un rôle d'amorce au cours de la synthèse d'ARN (Nomoto *et al.*, 1977).

1.4.2 Région poly(C) du génome viral

Chez les *Cardiovirus* et les *Aphtovirus*, on note la présence d'une région homopolymérique très riche en cytosine (environ 90 %) située entre la protéine VPg et la région codante du génome, soit à 250 bases pour le virus de la fièvre aphteuse (FMDV) et à 150

bases pour le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) (Brown *et al.*, 1974; Duke et Palmenberg, 1989). Sa longueur varie de 100 à 170 bases pour les aphtovirus et de 80 à 250 pour les différents isolats du virus EMC. La taille de la région poly(C) est homogène pour les isolats d'une même souche d'un virus donné, mais varie entre les diverses souches du même virus (Black *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1974). Cette région génomique n'est pas traduite, c'est ce que Sangar (1980) a pu démontrer lors d'une étude avec le FMDV. Ces longues suites de cytosine coderaient pour un peptide de type polyproline; il a toutefois été impossible de retrouver un tel polypeptide ou même de retrouver une région riche en proline dans des cellules infectées par ce virus (Duke et Palmenberg, 1989). De plus, l'absence d'un codon d'arrêt à l'extrémité 5' de la région poly(C) suggère qu'il ne s'agit pas d'une région codant pour de l'information (Black *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1974).

La distance séparant la région poly(C) de l'extrémité 5' du génome des virus appartenant aux différents genres de la famille *Picornaviridae* suggère fortement que cette région est impliquée au niveau de la réplication virale (Black *et al.*, 1979; Porter *et al.*, 1974). La longueur de cette région est très utile pour l'identification de souches virales puisque les isolats sauvages ont souvent des régions poly(C) plus longues que celles d'isolats adaptés en laboratoire; une région poly(C) dont la longueur est plus importante peut signifier une virulence accrue (Duke et Palmenberg, 1989). Un raccourcissement de cette région n'affecte pas la viabilité en culture cellulaire, mais produit un effet marqué sur la pathogénicité du virus chez la souris (Duke *et al.*, 1992; Duke et Palmenberg, 1989).

1.4.3 Extrémité 5'-UTR

La région du génome codant pour les protéines est bordée de chaque côté par des régions non traduites dont les séquences tendent à être hautement conservées (Scheper *et al.*, 1991; Evstafieva *et al.*, 1990). Ces régions non-traduites pourraient porter des signaux pour l'attachement de la réplicase nécessaire à l'initiation de la synthèse de l'ARN aux extrémités 3' des brins (+) et (-) (Oudshoorn *et al.*, 1990; Del Angel *et al.*, 1989). Cette région varie beaucoup en longueur: de 600 (rhinovirus) à 1 250 (aphtovirus) nucléotides et contient de 8 à 12 % de l'information génétique totale du virus (Rueckert, 1990). Chez les virus du même genre, cette région est généralement la partie génomique la plus conservée (Borovjagin *et al.*, 1991 et 1990; Stanway, *et al.*, 1990).

La longueur et la nature de cette région aident à définir les propriétés du virus chez l'hôte naturel. Ainsi, il a été démontré que des mutations ponctuelles effectuées au niveau de cette région se traduisaient par une neurovirulence réduite (Duke *et al.*, 1992; Stein *et al.*, 1992; Ilzuka *et al.*, 1989; Duke et Palmenberg, 1989; Skinner *et al.*, 1989; Nomoto *et al.*, 1987; Almond *et al.*, 1987), de même que par une efficacité moindre de l'initiation de la traduction (Pilipenko *et al.*, 1989a et b; Svitkin *et al.*, 1983). Il est probable que l'extrémité 5'UTR contienne des séquences vraisemblablement impliquées au niveau de l'assemblage et de la réplication de l'ARN, la structure secondaire jouant un rôle important pour la stabilité de l'ARN, voire un rôle majeur au niveau de la détermination des propriétés biologiques des *Picornavirus* (Stanway, 1990; Trono *et al.*, 1988; Vartapetian *et al.*, 1984).

1.5 CYCLE DE MULTIPLICATION VIRALE

1.5.1 Réplication

Le génome des picornavirus est constitué d'une molécule d'ARN de polarité positive et se comporte comme un ARN messager (Putnak et Phillips., 1981). L'infection virale débute par un attachement du virion à des récepteurs spécifiques situés à la surface de la membrane cytoplasmique (Colonno, 1986). Ces récepteurs médient le transfert du génome viral vers le cytoplasme par un procédé qui impliquerait la perte de la protéine VP4 et le relarguage de l'ARN viral de la capside protéique (Girard et Hirth, 1989). L'ARN viral est par la suite immédiatement traduit par l'intermédiaire des ribosomes et autres machineries de la cellule-hôte, en une polyprotéine (Macejak et Sarnow, 1991; Jackson *et al.*, 1990; Jang et Wimmer, 1990; Sonenberg et Pelletier, 1989; Jackson, 1988). Cette dernière est clivée protéolytiquement, pour former un précurseur des protéines de la capside (P1), un précurseur médian (P2) et précurseur de droite (P3). De ce précurseur (P3) résulte la protéase 3C requise pour le clivage des protéines virales et la protéine 3AB qui donnera naissance à la VPg et qui est probablement nécessaire à l'initiation de la synthèse d'ARN (Palmenberg, 1990; Kraüsslich *et al.*, 1988). Du précurseur P3 dérive en plus une ARN polymérase ARN-dépendante (3D) nécessaire pour la synthèse d'une copie du brin positif afin de former le brin complémentaire. La synthèse de l'ARN se poursuit pour mener à la formation des intermédiaires réplicatifs multi-brins dont l'extrémité poly(A) est transcrite à partir de l'extrémité poly(U) de l'ARN génomique. Les intermédiaires réplicatifs

s'associent au réticulum endoplasmique et génèrent un pool grandissant d'ARN de brins positifs, dont certains seront traduits, tandis que d'autres serviront à la synthèse de brins négatifs additionnels. À mesure que la synthèse protéique s'accentue, une fraction plus importante de brins positifs du complexe de réplication sont assemblés dans les virions (Rueckert, 1990; Girard et Hirth, 1989). L'ARN est traduit, par un mécanisme dépendant de la présence d'une coiffe, en une longue polyprotéine clivée par deux protéases virales (2A et 3C) (Colonno *et al.*, 1986; Palmenberg, 1982). Le contrôle traductionnel de l'ARN viral est médié par la région non-codante située à l'extrémité 5' (Stanway, 1990).

Un virus à ARN de polarité positive, comme le picornavirus, dirige donc la synthèse des protéines capsidiques, de même que d'autres protéines pouvant jouer un rôle au niveau de la réplication de l'ARN viral ou être impliquées, entre autres, au niveau des activités protéolytiques, dans la lyse cellulaire, et dans la suppression de la synthèse macromoléculaire de la cellule-hôte (Frankel *et al.*, 1991; Putnak et Phillips, 1981). La stratégie de réplication via une polyprotéine unique est un phénomène particulier aux picornavirus (Toyoda *et al.*, 1986).

1.5.2 Polyprotéine

Une polyprotéine virale est un très long précurseur polypeptidique contenant plusieurs domaines distincts et qui est clivée ultérieurement pour donner les protéines structurales et non-structurales fonctionnelles (Hellen *et al.*, 1989; Kraüsslich *et al.*, 1988). Dans le cas

de la polyprotéine retrouvée lors de la réplication des *Picornaviridae*, on estime sa masse moléculaire à environ 250 kDa. Cette polyprotéine génère 3 précurseurs dont un précurseur "capside" 1ABCD et un précurseur "réplicase" 3ABCD (Kraüsslich *et al.*, 1988; Nicklin *et al.*, 1986; Rueckert et Wimmer, 1984). La traduction se fait à partir d'un seul cadre de lecture ouvert avec son initiation au nucléotide 743 et sa terminaison au nucléotide 7370 dans le cas du poliovirus (Kraüsslich *et al.*, 1988). De nombreuses protéines dérivent de cette polyprotéine; on en dénombre jusqu'à 22. Conséquemment, pour qu'il y ait synthèse de toutes ces protéines, plus du double de l'information génétique pouvant être codée par le génome viral est requis, d'où la nécessité que certaines protéines virales servent de précurseurs à d'autres. Seuls les picornavirus produisent toutes leurs protéines et protéases à partir d'un précurseur polyprotéique unique (Toyoda *et al.*, 1986; Nicklin *et al.*, 1986; Putnak et Phillips, 1981).

1.5.3 Clivage protéolytique

La stratégie de traduction de l'ARN des picornavirus en une longue polyprotéine nécessite des clivages secondaires et tertaires afin d'en arriver à des protéines matures et fonctionnelles *in vivo* (Lawson et Semler, 1990; Jackson, 1989). Le processus protéolytique permet à différents domaines d'être actifs en les séparant pour que les produits clivés soient transportés au niveau de divers compartiments cellulaires (Jackson, 1986). Ce processus protéolytique intervient aussi au niveau de la régulation de la réplication virale puisqu'il est nécessaire pour la décapsidation, l'activation d'enzymes réplicatifs et la morphogénèse -

(Hellen *et al.*, 1989; Kraüsslich *et al.*, 1988). Les protéines virales matures sont issues d'un clivage progressif et post-traductionnel de la polyprotéine. Le précurseur entier n'est que très rarement observé expérimentalement puisque les étapes initiales du clivage et la synthèse des peptides au niveau des ribosomes se font de façon continue (Palmenberg, 1990; Arnold *et al.*, 1987). Les protéines virales matures et leurs précurseurs sont subdivisés en 4 groupes (L, P1, P2 et P3) en considérant leur structure, leur fonction enzymatique et la position des clivages primaires.

Donc, la première étape de clivage des protéines virales est co-traductionnelle, fort probablement intramoléculaire et doit avoir lieu avant que le précurseur capsidique ne soit transformé afin de générer les protéines des capsomères (Nicklin *et al.*, 1986). La protéase 2A est libérée et catalyse le clivage du site 1D-2A pour séparer le précurseur capsidique P1 des précurseurs P2 et P3 au site 1D-2A. Cette protéase agit au niveau de l'extrémité carboxy-terminale et ne joue pas de rôle dans le mécanisme d'arrêt (shut-off) de la synthèse protéique de la cellule-hôte (Stanway, 1990).

Les cardiovirus réussissent efficacement cette scission par un mécanisme d'auto-clivage qui a lieu expérimentalement au niveau d'un dipeptide Q-G (glutamine-glycine) et qui est dépendant de la présence d'une séquence de 4 acides aminés chevauchant la jonction 2A-2B (asparagine-proline-glycine-proline) (Palmenberg, 1990; Kraüsslich *et al.*, 1988; Arnold *et al.*, 1987). Pour le virus EMC, le clivage P1-2A n'est pas régit par la protéase 2A ($2A^{pro}$), mais est catalysé par la protéase 3C suite à une auto-excision de la polyprotéine (Lawson

et Semler, 1990). La protéase 3C, codée par le virus, est l'enzyme central de la cascade catalytique et agit en cis sur les résidus dipeptidiques Q-C, Q-S, E-S et Q-A. Au niveau structural, cette protéase est semblable aux enzymes agissant au niveau des résidus sérine comme la trypsine et la chymotrypsine (Stanway, 1990). La séquence du virus contient 12 dipeptides Q-C et seulement 7 sont clivés. La présence d'un résidu proline adjacente au dipeptide détermine le site de la coupure de cette protéase (Palmenberg, 1990; Nicklin *et al.*, 1986). Pour les cardiovirus, on assiste au largage d'un plus grand précurseur primaire soit L-P1-2A alors que dans le cas des entérovirus, on ne retrouve que le segment P1 (Palmenberg, 1990).

Les quatre polypeptides dérivant du précurseur P1 correspondent aux 4 protéines structurales VP1, VP2, VP3 et VP4 (1D, 1B, 1C, 1A) désignées selon leur ordre décroissant de masse moléculaire sur gel de polyacrylamide (30, 28, 25 et 8 kDa) (Palmenberg, 1990). La portion médiane de la polyprotéine génère les peptides 2A, 2B et 2C (16, 17 et 36 kDa). Après sa séparation d'avec P2, le précurseur P3 est clivé en produits plus petits et plus stables. Les protéines obtenues 3A, 3B, 3C et 3D (10, 2, 22, 5 kDa) sont plutôt associées à la réplication génomique (Palmenberg, 1990; Rueckert et Wimmer, 1984).

La synthèse de protéases virales confère aux virus un avantage, puisque cet aspect de la réplication ne dépend en aucun cas des enzymes cellulaires et de leur localisation intracellulaire. Conséquemment, les virus de la famille *Picornaviridae* ne sont pas restreints à un spectre d'hôtes réduit (Kraüsslich *et al.*, 1988). Le rôle de ces protéases est de

participer à la conversion des produits de traduction primaires en protéines matures et fonctionnelles (Nicklin *et al.*, 1986). La dernière étape du clivage de la polyprotéine conduit à la maturation du peptide VP0. Cette étape n'est pas catalysée par des protéases virales, mais par un processus autocatalytique qui survient suite à l'encapsidation (Arnold *et al.*, 1987). Les réactions de maturation sont généralement observées *in vivo* seulement lors des dernières étapes de la morphogénèse du virion et semblent être concomitantes avec l'association de l'ARN dans les structures d'assemblage de la capside (Stanway, 1990; Palmenberg, 1990; Palmenberg, 1982).

1.5.4 Produits des gènes

La traduction est initiée au triplet AUG à la position 205 (Palmenberg, 1990). Le cadre de lecture s'étend sur 2290 codons jusqu'à une paire de codons de terminaison à la position 7075-7080 conduisant à la synthèse d'un polypeptide de 255 kDa (Palmenberg, 1990; Drake *et al.*,1982). Les protéines de la capside matures et autres protéines virales non-structurales sont issues d'un clivage protéolytique de cette polyprotéine (Figure 1). Elle est clivée en trois précurseurs, dont le premier, 1ABCD d'une masse de 105K génère les 4 protéines de la capside isométrique VP1 (δ), VP2 (β), VP3 (γ) et VP4 (α). On dénote la présence d'acide myristique (acide N-tétradécanoïque) au niveau de la VP4 qui est lié de façon covalente par un lien amide (glycine-NH_2). Il a été démontré que cette modification a lieu au niveau post-traductionnel (Chow *et al.*, 1987). La VP4 semble jouer un rôle au niveau de l'assemblage de la capside et au niveau de l'adsorption et de la pénétration du virus dans

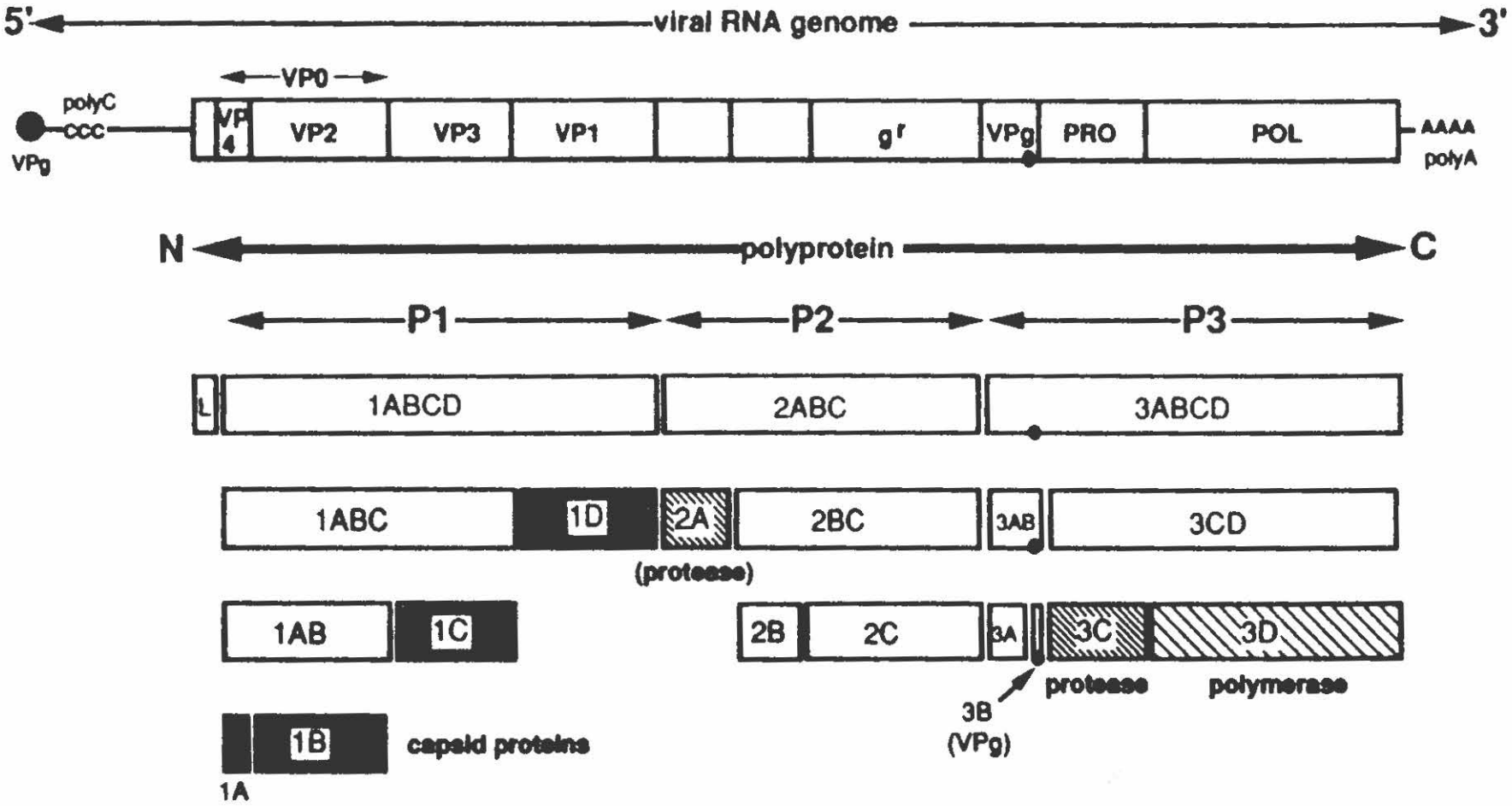
FIGURE 1. Représentation schématique, synthèse et modifications post-traductionnelles des protéines du virus EMC.

VPg : protéine liée au génome viral

L : séquence de tête (leader)

poly C: région riche en cytosine

Tiré de Palmenberg *et al.*, 1990


5'
viral RNA genome
3'
VP0
polyC
CCC
VPg
VP4
VP2
VP3
VP1
g^r
VPg
PRO
POL
AAAA
polyA
N
polyprotein
C
P1
P2
P3
L
1ABCD
2ABC
3ABCD
1ABC
1D
2A
2BC
3AB
3CD
(protease)
1AB
1C
2B
2C
3A
3C
3D
protease
polymerase
3B
(VPg)
1B
capsid proteins
1A

les cellules. Suite à l'attachement des virions à la membrane plasmique, la combinaison acide myristique-VP4 peut faciliter le largage des pentamères matures, des particules défectives et des virions au-delà des membranes (Chow *et al.*, 1987). L'extrémité 3' du génome du virus EMC code pour les 7 protéines non-structurales, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C et 3D, à l'exception de la séquence L (leader) en 5'. Ces protéines semblent être les plus conservées parmi les différentes souches virales, en comparaison avec les protéines structurales, ce qui suggère qu'elles ne subissent pas de pression de la part du système immunitaire et que leur intégrité est nécessaire pour la préservation des sites actifs pour les enzymes (Stanway, 1990). Le second précurseur, 2ABC, est une protéine de 65 kDa à partir de laquelle dérivent les protéines G(2A), I(2B) et F(2C). La protéine F est impliquée au niveau de la synthèse de l'ARN (Hodgman, 1988; Dever *et al.*, 1987). Il semble que cette protéine ait aussi une activité hélicase, activité importante dans la réplication des picornavirus. Cette protéine pourrait jouer un rôle au niveau de la détermination de l'architecture du virion (Li et Baltimore, 1990). Selon Palmenberg (1990), elle ne possède pas d'activité polymérasique et sa contribution dans le cycle réplicatif demeure inconnue. La protéine 2C serait un site génétique probable du marqueur de résistance à la guanidine, affectant l'initiation de la synthèse d'ARN (Stanway, 1990). Les protéines H (3AB), p22 ou VPg (3C) et E (3D) sont issues du clivage du peptide P3, d'une masse moléculaire de 85 kDa. La protéine 3C est une enzyme nécessaire aux clivages primaires et secondaires de la polyprotéine (Palmenberg, 1990). La protéine E (3D) est la plus conservée et possède une activité ARN polymérase ARN-dépendante (Stanway, 1990). Des préparations purifiées

de la protéine 3D peuvent catalyser l'élongation de chaînes d'ARN nouvellement formées à partir de réactions nécessitant une amorce, une activité qui identifie cette enzyme comme étant un élément central des complexes polymérasiques viraux (Stanway, 1990). La séquence leader (L) subit un auto-clivage et semble aussi être impliquée dans le clivage de la protéine p22 et dans le mécanisme d'arrêt (shut-off) de la synthèse des protéines cellulaires dans le cas de l'infection par le virus FMDV (Devaney *et al.*, 1988; Strebel et Beck, 1986). Cependant, la séquence L des cardiovirus ne semble pas posséder une activité protéasique, mais est plutôt clivée à partir des précurseurs capsidiques par la protéase 3C (Parks et Palmenberg, 1987).

1.5.5 Morphogénèse

Comme étape préliminaire à l'assemblage de la capside, le précurseur des protéines structurales P1 est clivé par une protéase d'origine virale 2A pour former un protomère immature de coefficient de sédimentation 5S composé d'une copie de chacune des protéines VP0, VP1 et VP3 (Arnold *et al.*, 1987; Palmenberg, 1982). Les protomères 5S s'assemblent par la suite sous forme de pentamères de coefficient de sédimentation 13 à 14S. Douze de ces sous-unités sont nécessaires à la formation de la capside comprenant 60 capsomères qui englobe le génome d'ARN viral (Rueckert, 1990). La capside dépourvue de l'ARN génomique a un coefficient de sédimentation de 70 à 80S (Palmenberg, 1990). La formation de virions infectieux (150 à 160S) requiert une dernière étape au cours de laquelle la majorité des chaînes VP0 sont clivées enzymatiquement pour former les 4 sous-

unités matures. Au moment de l'encapsidation de l'acide nucléique, les peptides VP0 sont déjà clivés en VP2 et VP4 terminant ainsi le processus de morphogénèse et de l'assemblage (Palmenberg, 1990). Le clivage des peptides VP0 contribue à la stabilisation de la particule virale (Stanway, 1990). Les particules virales complètes sont ensuite relâchées suite à la lyse de la cellule-hôte. La durée du cycle de multiplication des picornavirus varie de 5 à 10 heures (Rueckert, 1990; Stanway, 1990).

1.6 STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DES CARDIOVIRUS

L'étude de l'ultrastructure de certains picornavirus a permis de démontrer une très grande homologie structurale entre les chaînes polypeptidiques des sous-unités VP1, VP2 et VP3 (Cohen, 1989; Grubman *et al.*, 1987). Ces dernières sont repliées en un feuillet vrillé à huit brins anti-parallèles associés à deux segments d'hélice α; la seule variation observée est par rapport à la taille des boucles et d'autres excroissances et projections des feuillets β (Stanway, 1990; Rueckert, 1990; Acharya *et al.*, 1989; Harrison, 1989; Rossmann *et al.*, 1985). Les sous-unités VP1 sont regroupées par cinq autour des sommets de l'icosaèdre, alors que les sous-unités VP2 et VP3 alternent autour des axes. La sous-unité VP4 est localisée à la surface interne de la capside. L'architecture de base de la capside icosaédrique est composée de pentamères, caractérisée par cinq exemplaires de chaque sous-unité (VP1-VP4) (Dildine et Semler, 1992). Chaque pentamère est stabilisé par des interactions impliquant les extrémités amino- et carboxy-terminales des sous-unités VP1, VP3 et VP4. Les pentamères adjacents sont liés entre eux grâce à des ponts

hydrogène entre VP2 et VP3, et la stabilité de ces liaisons serait responsable de la décapsidation virale. La protéine VP4 est quant à elle retrouvée à la base du protomère sous les autres protéines, pouvant même être en contact avec l'ARN génomique (Stanway, 1990).

La protéine VP1 est exposée entièrement à la surface du virion et peut former des projections massives entourées par des crevasses ou "canyons" retrouvés à un rayon constant de l'axe, bordés de résidus de sous-unités VP1 et VP3 (Acharya *et al.*, 1989). Cette particularité joue un rôle important lors de l'attachement aux récepteurs, peut éliminer l'action d'anticorps non-spécifiques et permettre à des composantes spécifiques de s'attacher à la cellule (Girard et Hirth, 1989; Luo *et al.*, 1987). Au niveau des canyons, il est nécessaire de retrouver des sites spécifiques pour l'attachement d'anticorps, ce qui suggère le besoin d'avoir des domaines très conservés (Rossmann et Palmenberg, 1988). Les acides aminés qui occupent les parois et le fond du canyon sont parmi les plus conservées à la surface des virions, d'où l'hypothèse que ce canyon contient le site de fixation pour le récepteur cellulaire (Luo *et al.*, 1987; Rossmann *et al.*, 1985). Des changements d'acides aminés correspondant à des différences sérologiques du poliovirus ont été jusqu'à ce jour localisées à la fois à la superficie interne et à la superficie externe de la capside, mais jamais au niveau du domaine central en feuillets β vrillés (Stanway, 1990).

1.7 PROPRIÉTÉS DE CULTURE *IN VITRO*

La réplication du virus EMC *in vitro* se caractérise par la vacuolisation du cytoplasme et la pycnose des noyaux des cellules menant à une dégénérescence complète du feuillet cellulaire en moins de 24 à 36 heures post-inoculation. L'effet cytopathique produit est rapide, massif et peu différencié. Les cellules animales infectées par ce virus s'aggrègent en amas, puis se lysent (Girard et Hirth, 1989). Le virus EMC possède un spectre d'hôtes très large; le virus peut infecter plusieurs espèces animales dont l'homme, malgré le fait que le réservoir naturel est considéré comme étant les rongeurs (Kelly *et al.*, 1983). Les cellules murines sont aptes à supporter la réplication du virus alors que les cellules de rat sont non-permissives, ne permettant ni la réplication, ni la production d'un effet cytopathique (Donta *et al.* 1986). Cette évidence suggère fortement que le réservoir primaire naturel est la souris et non pas le rat comme certains le croyaient (Tesh et Wallace, 1978), le rat n'étant relégué qu'au rôle d'hôte terminal.

La première étape de la réplication virale est l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires. Étant donné que l'absence de récepteurs est associée avec une susceptibilité moindre des cellules à être infectées, la présence de ceux-ci ne signifie pas automatiquement une infection virale assurée (Kelly *et al.*, 1983). Plus le virus a un pouvoir pathogène élevé, moins il aura d'affinité pour les récepteurs de la cellule-hôte (McClintock *et al.* 1980). Le facteur qui semble déterminer la susceptibilité des cellules à l'infection est

l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires. Comme le mécanisme de pénétration fait intervenir un phénomène d'endocytose, il est possible que l'absence de permissivité soit associée à un problème d'endocytose ou tout au moins un phénomène survenant après la décapsidation (Girard et Hirth, 1989). Il semble que le virus attaché aux récepteurs soit entraîné dans le processus d'endocytose, mais que le manque de permissivité soit plutôt attribuable à l'absence d'interaction entre la capside et la membrane de la vacuole. Cette interaction mène éventuellement à la lyse des protéines capsidiques et de la membrane des endosomes entraînant le largage de l'ARN infectieux dans le cytoplasme (Donta *et al.* 1986).

Une étude comparative effectuée par Kelly *et al.* (1983) a permis de vérifier les conditions de réplication du virus EMC dans différentes lignées cellulaires de mammifères. Dans un premier temps, l'étude a porté sur des lignées de rongeurs, soient diverses cellules embryonnaires murines (MEC), des cellules myocardiales murines, des cellules surrénaliennes murines (Y-1), de même que, des cellules embryonnaires de cobaye (GPEC), des cellules tumorales de cobaye et quelques lignées de cellules de rat. Dans ces différents types de cellules, le cycle de réplication avait une durée approximative de 8 heures. L'infection est lytique et progresse rapidement vers la destruction complète des feuillets cellulaires, les titres infectieux maximaux étant obtenus à 24 heures post-infection. La réplication du virus EMC dans les fibroblastes humains et dans les cellules de mélanome était beaucoup moins rapide que dans le cas des cellules murines, mais le titre et le taux de

production virale augmentaient suite à des passages successifs, ce qui suggère que le virus peut s'adapter de façon significative aux cellules humaines (Kelly *et al.* 1983).

1.8 PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES ET PATHOGÉNÈSE CHEZ LES ESPÈCES MURINES ET PORCINES

1.8.1 Pathogénie

Le virus EMC est un virus exogène, qui a pour réservoir naturel la souris des champs et qui se transmet aussi bien par aérosols que par contact avec les liquides biologiques (Rueckert, 1990; Burch et Harb, 1974). L'invasion des différents organes des souris par le virus EMC est caractérisée par la formation de foyers de nécrose avec calcification, résultats des changements cytopathiques importants affectant les cellules cardiaques, pancréatiques (Burch et Harb 1974) et neurologiques (Dea *et al.*, 1991b et c). La pathogénèse de l'infection peut varier selon les souches et la cellule-cible de ces dernières. Bien qu'un seul sérotype du virus EMC soit connu (Rueckert, 1990), il existe quatre variants immunologiquement indistinguables par séroneutralisation avec un sérum hyperimmun mais qui peuvent être différenciés par inhibition de l'activité hémagglutinante (Craighead, 1966). Ces variants sont la cause de pathologies bien distinctes chez la souris (Cerutis *et al.*, 1989).

Le variant D s'attaque aux cellules pancréatiques notamment aux cellules ß, ce qui mène à l'apparition d'un syndrome qui pourrait être comparé au diabète insulino-dépendant

(Diabetes mellitus). Le variant B, moins pathogène, s'attaque aussi au pancréas en causant un oedème modéré à sévère; cependant, les ilôts de Langerhans restent essentiellement normaux. Les changements pathologiques induits par le variant K sont observés notamment au niveau du cervelet et du noeud cervical; ce variant est responsable de méningites et d'encéphalites de sévérité variable. Le variant MM semble ciblé plus particulièrement le système nerveux central provoquant des méningites et des encéphalites sévères au niveau du cervelet. Chaque variant infecte différents organes selon un degré variable de réplication. Les manifestations cliniques varient selon le tropisme cellulairedes différents variants et les changements pathologiques qu'ils induisent. (Cerutis *et al.*, 1989).

Des évidences sérologiques de l'infection par le virus EMC avaient été rapportées dans les élevages canadiens; cette infection virale était directement associée avec le syndrome de mort subite dû à une déficience du myocarde chez les jeunes porcelets et à un syndrome reproducteur chez les truies de toutes parités (Dea *et al.*, 1992b et 1991b; Sanford *et al.*, 1989a et b). Il y a quelques années, les élevages porcins canadiens ont expérimenté deux nouveaux syndromes caractérisés par des problèmes reproducteurs et respiratoires d'étiologie inconnue. L'un de ces syndromes semble cliniquement similaire au Syndrome reproducteur et respiratoire porcin, rapporté aux États-Unis en 1987 et en Europe à l'hiver 90-91 (Dea *et al.*, 1992a; Bilodeau *et al.*, 1991). L'autre syndrome a été décrit comme la pneumonie prolifération et nécrosante (PPN) (Dea *et al.*, 1992c; Morin *et al.*, 1990). Dans la province de Québec, tout comme au Manitoba et en Ontario, un syndrome similaire au

SRRP a été diagnostiqué en 1987 (Bilodeau *et al.*, 1991; Dea *et al.*, 1991a; Martineau *et al.*, 1991). Cette condition a été initialement appelée la maladie mystérieuse du porc par les Américains alors qu'au Québec, elle a été désignée sous le nom de Syndrome HAAT en référence à la période d'hyperthermie pouvant durer 7 jours (H) et les problèmes d'anorexie (A) et d'avortements (A) rencontrés chez les truies (T) de toutes parités en fin de gestation (Dea *et al.*, 1991a; Martineau *et al.*, 1991). Un taux de mortalité plus élevé que la normale a été rapporté chez les truies, de même qu'une fréquence accrue d'avortements tardifs (107-111 jours), de momifications foetales, de mise-bas prématurées, de mortinatalités et de porcelets nés-faibles. De plus, les animaux reproducteurs connaissent des périodes d'infertilité. L'ensemble des problèmes reproducteurs coïncident avec les problèmes respiratoires observés chez les porcelets à la mamelle sevrés, de même que chez les porcs à l'engraissement (Bilodeau *et al.*, 1991; Dea *et al.*, 1991a et b; Martineau *et al.*, 1991 et 1992). Les élevages naisseurs et naisseurs-finisseurs sont également touchés par ce nouveau syndrome. Dans les pouponnières et à l'engraissement, les porcelets présentent des symptômes similaires à ceux relevant d'une infection à influenza. La condition persiste de 8 à 12 semaines avant de s'estomper. Chez les porcelets qui récupérent de l'infection, on observe plusieurs maladies, attribuables à des infections bactériennes secondaires telles que des polyarthrites et des dermatites, et témoignant du développement d'un état d'immunosuppression (Martineau *et al.*, 1991 et 1992).

Des épidémies associées à ce syndrome ont aussi été décrites en Europe en 1991 (Goyal, 1993). À ce moment, aucun agent bactérien n'avait été isolé et les animaux ne possédaient pas d'anticorps dirigés contre les virus causant généralement des problèmes reproducteurs. Actuellement, la dénomination Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (SRRP) semble plus appropriée (Christianson *et al.*, 1993; Goyal, 1993). L'isolement du virus EMC à partir de foetus en fin de gestation suggérait fortement l'infection par le virus EMC comme cause principale ou secondaire de mort *in utero* (Links *et al.*, 1986). Plusieurs isolats du virus EMC ont été récupérés des liquides thoraciques foetaux et il semble que la pathogénicité varie selon la souche virale et l'âge foetal auxquels est survenue l'infection (Dea *et al.*, 1991b et c; Kim *et al.*, 1989a et b; Joo *et al.*, 1988). Certaines de ces souches possèdent un pouvoir virulent plus grand que d'autres, tout dépendant du stade de gestation où survient l'infection (Kim *et al.*, 1989a).

1.8.2 Pathologie

Chez la souris, l'infection par le virus EMC est plutôt myotrope, affectant surtout le myocarde, les valvules cardiaques, l'endocarde, l'aorte, les reins, le pancréas, le foie et le cerveau (Cerutis *et al.*, 1989; Craighead, 1966). L'effet cytopathique le plus souvent retrouvé est une prolifération intracellulaire de composants membranaires, caractérisée par une augmentation du nombre de vésicules et de vacuoles. Lors d'une infection aiguë, il est possible de retrouver, au niveau des cellules de différents tissus, une margination de la chromatine nucléaire ainsi qu'une dilatation marquée du réticulum endoplasmique rugueux

plus visible au niveau des fibroblastes du stroma valvulaire et de l'adventitice aortique. Une réaction inflammatoire variant de modérée à sévère est retrouvée au niveau des différents tissus et elle est caractérisée par une infiltration de macrophages et de cellules polymorpho-nucléaires retrouvées surtout au pourtour des nombreux foyers de nécrose (Dea *et al.*, 1991b; Burch et Harb, 1974).

Il a été possible d'isoler le virus EMC à partir de tissus d'avortons et de poumons de porcelets à la mamelle. Des foyers de nécrose blanchâtre, traduisant divers degrés de calcification, sont souvent retrouvés au niveau du myocarde et du pancréas (Acland et Littlejohns, 1986). Au niveau microscopique, on retrouve le plus souvent des lésions de myocardite et de méningo-encéphalite nécrotiques et non-suppuratives (Christianson *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1989a et b; Joo *et al.*, 1988). Dans quelques cas, il a été possible de mettre en évidence des lésions multifocales de pneumonie interstitielle caractérisée par un épaississement marqué des septa alvéolaires attribuable à une infiltration de cellules lymphomonocytaires. (Dea *et al.*, 1991b; Christianson *et al.*, 1990).

1.8.3 Incidence

Chez l'espèce murine, l'infection par le virus EMC cause une morbidité de près de 100 % et une mortalité variant de 50 % (24 heures) à 100 % (72 heures) chez des souris inoculées avec du surnageant de culture cellulaire à une dose de 10^6 $DCEP_{50}$ (Burch et Harb, 1974). Chez l'espèce porcine, le virus EMC est considéré comme une cause de mortalité

très importante notamment aux États-Unis, au Canada et en Australie (Hill *et al.*, 1985). On l'associe le plus souvent à des épisodes de mort subite chez les jeunes porcelets (Christianson *et al.*, 1990; Sanford *et al.*, 1989b; Acland et Littlejohns, 1986; Gainer, 1965). Ce virus est aussi responsable de problèmes reproducteurs majeurs qui ont entraîné et qui entraînent toujours des pertes économiques importantes pour les éleveurs (Bilodeau *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1989a et 1991; Joo *et al.*, 1988; Links *et al.*, 1986; Love et Grewal, 1986).

Des épisodes très importantes de mortalités néo-natales et des problèmes reproducteurs ont été rapporté particulièrement en Australie (Links *et al.*, 1986; Hill *et al.*, 1985; Littlejohns, 1984; Acland et Littlejohns, 1975) et aux États-Unis, mais ce n'est qu'au cours des six dernières années que l'on a pu associer l'infection par le virus EMC à des problèmes reproducteurs sévères sans toutefois pouvoir réellement les reproduire expérimentalement (Dea *et al.*, 1991b et c; Christianson *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1989a). Le diagnostic d'infection par le virus EMC a été, dans ces cas, basé sur la réponse en anticorps des foetus et dans quelques occasions, le virus a pu être isolé à partir de tissus d'avortons et de poumons de porcelets nés-faibles (Dea *et al.*, 1991c; Joo *et al.*, 1988). Il a été possible de retrouver des évidences sérologiques de l'infection de même qu'une mortalité accrue de porcelets à la mamelle. En Grande-Bretagne, aucune maladie clinique n'a été rapportée mais des anticorps anti-EMC ont été retrouvés dans les séra de presque 30 % des porcs testés (Kim *et al.*, 1989b).

1.9 ÉPREUVES DIAGNOSTIQUES

1.9.1 Épreuves sérologiques

Chez les porcelets, et en particulier chez les souris, le diagnostic d'une infection par le virus EMC peut être établie sur la base des signes cliniques. Cependant, la majorité des animaux infectés sont asymptomatiques, ce qui explique la persistance de l'infection dans les élevages sans qu'un traitement ne soit administré. L'évidence de l'infection naturelle par le virus EMC au niveau des foetus de porc est démontrée par la détection d'anticorps spécifiques dans les sérums et liquides foetaux de foetus momifiés ou morts-nés (Kim *et al.* 1989a; Joo *et al.*, 1988). Étant donné qu'il n'y a pas chez l'espèce porcine de passage transplacentaire des anticorps naturels, la détection d'anticorps spécifiques dans les liquides foetaux est très fortement suggestive d'une infection par le virus EMC (Joo *et al.*, 1988).

La technique la plus souvent employée pour la détection d'anticorps est la séroneutralisation (Kim *et al.*, 1991; Cerutis *et al.* 1989). Parmi les souches murines, il existe quelques variants indistinguables sérologiquement par les tests de séroneutralisation et de fixation du complément (Cerutis *et al.*, 1989). Cependant, à l'aide de sérums de porcs hyperimmuns, le test d'inhibition de l'activité hémagglutinante a permis de reconnaître des variants parmi les isolats porcins associés à des problèmes reproducteurs (Dea *et al.*, 1991c; Kim *et al.*, 1991c et 1989b; Joo *et al.*, 1988). Il est possible que les différents isolats du virus EMC n'appartiennent qu'à un seul sérotype, ce qui rend difficile l'identification de la

souche impliquée. D'autres méthodes doivent alors être considérées. Chez les deux espèces animales, l'identification sérologique du virus doit être confirmée par immunofluorescence indirecte et par immunobuvardage (Dea *et al.* 1991b; Cerutis *et al.*, 1989).

1.9.2 Épreuves virologiques

L'isolement du virus EMC à partir d'un échantillon clinique est la preuve définitive de l'infection. Cependant, l'isolement n'est pas la méthode de choix pour le diagnostic étant donné que l'isolement viral à partir d'homogénats de tissus ou de liquides foetaux peut nécessiter de nombreux passages sur cultures cellulaires avant que l'effet cytopathique caractéristique ne puisse être mis en évidence. Cette méthode est laborieuse et nécessite un très long délai car de plus, il est nécessaire de confirmer l'identification du virus par séroneutralisation (Kim *et al.* 1991; Joo *et al.* 1988). De plus, la présence d'anticorps bloqueurs dans les tissus ou les liquides d'avortons immunocompétents peuvent interférer lors d'essais d'isolement viral (Meng *et al.*, 1993).

1.9.3 Épreuves moléculaires

L'application de techniques moléculaires comme l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne des gènes est très efficace et très utilisée dans la détection virale au niveau des tissus de spécimens cliniques (Meng *et al.*, 1993). L'efficacité et la sensibilité de cette technique a été démontrée par Meyer *et al.* (1991) et McFarlane *et al.* (1990) pour

la détection du virus de la fièvre aphteuse (FMDV) et de la diarrhée virale bovine dans les tissus bovins (Schroeder et Balassu-Chan, 1990; Potgieter et Brock, 1989), et le parvovirus porcin dans les tissus de foetus de porcs et la semence de verrats (Oraveerakul *et al.*, 1990). Selon Meng *et al.* (1993), l'hybridation moléculaire permet une détection encore plus spécifique du virus EMC au niveau de porcelets et d'avortons.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. ORIGINE DU VIRUS

1.1 Souches du virus EMC

La souche simienne VR-129 du virus EMC, initialement isolée du liquide pleural d'un chimpanzé et adaptée sur la lignée cellulaire Vero, a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MA, É.-U.). Les 9 isolats porcins québécois du virus EMC, ont été obtenus de spécimens cliniques provenant de fermes du sud du Québec ayant connu une recrudescence de problèmes reproducteurs et respiratoires (Dea *et al.*, 1990). Quatre de ces isolats proviennent d'un pool de tissus d'avortons de 90 à 100 jours, alors que trois autres isolats ont été cultivés à partir de liquides thoraciques foetaux. Deux isolats ont été cultivés à partir d'homogénats de poumons de porcelets à la mamelle et sevrés atteints de problèmes respiratoires sévères (Dea *et al.*, 1991b et c). Les isolats porcins américains du virus EMC, soient Puerto Rico, Hawaii et Florida, ont été cultivés à partir de tissus d'avortons et nous ont été gracieusement fournis par le Dr. Merv Frey (National Veterinary Service Laboratories, Ames, Iowa, É.-U.).

1.2 Souches virales contrôles

La souche Colorado de l'herpèsvirus bovin type 1 (RIB) nous a été gracieusement fournie par le Dr. Michel Trudel (Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, Québec). Les sérotypes 1, 6 et 8 d'entérovirus porcins, initialement isolés d'intestins de foetus de porc, nous ont été gracieusement fournis par le Dr. Eduardo

DiFranco (Centre de Recherche en Médecine Comparée, Institut Armand-Frappier, Québec). La souche NADL-2 du parvovirus porcin, initialement isolée de leucocytes de porc, de même que la souche New York du virus de la diarrhée virale bovine (BVD), initialement isolée de fèces de bovins diarrhéiques, nous ont été gracieusement fournies par le Dr. Peter Tijssen (Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, Québec). La souche Purdue du virus de la gastroentérite transmissible porcine (GET), initialement isolée de l'intestin grêle de porcelets diarrhéiques, a été obtenue de l'ATCC (ATCC VR-763).

2. CULTURES CELLULAIRES

2.1 Lignée cellulaire Vero

Les cellules Vero ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC CCL 81; Rockville, MA, É.-U.). Cette lignée cellulaire a été établie à partir de cellules épithéliales du cortex rénal de singe cercopithèque (*Cercopithecus aethiops*). Les cellules étaient mises en culture à une concentration initiale de 2 x 10^5 cellules/ml dans le milieu Minimal Essentiel de Eagle préparé dans une base de sels de Earle (MEM Earle; GIBCO Lab, Grand Islands, NY, É.-U.) supplémenté de 2 mM de glutamine (GIBCO Lab), 50 μg/ml de gentamicine (GIBCO Lab), 100 Unités/ml (U/ml) de pénicilline (GIBCO Lab), 100 μg/ml de streptomycine (GIBCO Lab) et 10 % de sérum foetal bovin (SFB, GIBCO Lab). Le sérum était préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes et irradié

sous rayonnement gamma afin d'éviter l'interférence potentielle par des virus bovins endogènes. Les cellules étaient incubées à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO_2. Les passages cellulaires étaient généralement effectués 2 fois par semaine. Les feuillets cellulaires confluents étaient dispersés à l'aide d'une solution de trypsine à 0,05 % dans de la saline phosphatée, sans calcium ni magnésium (PBS), à pH 7,2.

2.2 Lignée cellulaire BHK-21

Les cellules BHK-21 ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC CCl 10). Cette lignée de cellules épithéloïdes a été établie à partir de cellules de rein de hamster. Les cellules étaient mises en culture à une densité initiale de 10^5 cellules/ml et un feuillet cellulaire confluent était formé en moins de 4 jours. Le milieu de culture consistait en du milieu MEM Earle (GIBCO Lab) additionné d'antibiotiques et de glutamine (GIBCO Lab). Les passages cellulaires étaient effectués 2 fois par semaine.

3. PROPAGATION VIRALE

Les différents isolats du virus EMC ont été inoculés sur feuillets cellulaires confluents à raison d'une multiplicité d'infection (M.O.I.) de 0,01 à 0,1 $DCEP_{50}$ (log_{10} de la dilution de la suspension virale induisant un effet cytopathique dans 50 % des feuillets inoculés) par cellule. Dans le cas des isolats cliniques, 0,5 ml d'un homogénat de tissus (10 % (p/v) préparé dans du milieu MEM Earle supplémenté d'antibiotiques), clarifié par centrifugation et filtré à travers des membranes de nitrocellulose de 0,22 μm de porosité (Nalgene, Nalge

Company, Rochester, N.Y., É.-U.), était inoculé dans un flacon de culture de 25 cm^2 de surface. Après une période d'adsorption d'une heure à température de la pièce, l'inoculum était vidangé et les feuillets cellulaires infectés étaient incubés à 37°C dans du milieu MEM Earle additionné de glutamine et d'antibiotiques. Les passages subséquents étaient effectués après une période d'incubation maximale de 5 jours ou dès l'apparition d'un effet cytopathique caractérisé par la destruction de plus de 80 % du feuillet cellulaire. Pour la récolte, les surnageants de culture et les cellules en suspension étaient congelés-décongelés à trois reprises, et les suspensions finales étaient clarifiées par centrifugation à 3 000 x g pendant 20 minutes (Centrifugeuse DPR 6000, IEC Needham Heights, MA, É.-U.). Les surnageants clarifiés étaient immédiatement utilisés pour les passages subséquents ou conservés à -70°C. La progression de l'infection par le virus EMC était évaluée selon le degré de dégénérescence induit sur les feuillets cellulaires infectés tels qu'observés à l'aide d'un microscope photonique inversé à un grossissement de 100X.

4. TITRAGE

4.1 Détermination des titres infectieux

Des dilutions décimales des surnageants de cultures infectées étaient préalablement effectuées en tubes dans le milieu MEM Earle. De ces différentes dilutions, des aliquots de 100 μl étaient déposés dans 4 à 8 puits de plateaux de microtitrage de 96 puits (Falcon Plastics; Division of Becton, Dickinson & Co., Oxnard, CA, É.-U.). Par la suite, la

suspension de cellules Vero ajustée à 2 x 10^5 cellules/ml était ajoutée à raison de 100 μl/puits. Les plateaux étaient ensuite placés à 37°C sous atmosphère humide en présence de 5 % de CO_2 pour une période de 72 à 96 heures. Les plateaux étaient observés en microscopie photonique inversée à un grossissement de 100X et le titre infectieux était calculé selon la formule élaborée par Reed et Muench (1938). Le titre était estimé selon la réciproque de la plus haute dilution de la suspension virale causant un effet cytopathique dans 50 % des feuillets cellulaires inoculés ($DCEP_{50}$/ml). Ces essais ont été réalisés en triplicata afin de vérifier la reproductibilité des résultats.

4.2 Clonage par plages

Afin de faciliter l'attachement des cellules, 1 ml de SFB (GIBCO Lab) était préalablement ajouté dans chacun des puits de plateaux de 6 puits de plastique (Falcon). Après une période d'une nuit à 4°C, le sérum était vidangé et les cellules étaient ensemencées à raison de 5 ml par puits d'une suspension cellulaire de 2 X 10^5 cellules/ml. À confluence, le milieu de culture était vidangé et les feuillets cellulaires étaient rincés à trois reprises avec du tampon PBS stérile pH 7,2; l'excédent de tampon était aspiré à l'aide d'une pipette. Les cellules étaient ensuite infectées à raison de 0,5 ml/puits de la suspension virale diluée de 10^{-1} à 10^{-7} dans le milieu MEM Earle (GIBCO Lab) auquel était ajouté 10 Unités/ml (U/ml) de trypsine (Trysine pancréatique bovine, grade XIII, Sigma Chemical Co. St-Louis, MO, É.-U.) et 0,1 % final d'albumine sérique bovine (Sigma)(solution 0,1 % dans le milieu MEM Earle filtré sur membrane de porosité 0,45 μm). La période

d'adsorption était de 90 minutes à la température ambiante avec une légère agitation à toutes les 20 minutes pour éviter l'assèchement du feuillet cellulaire. Par la suite, l'inoculum était vidangé et le feuillet cellulaire était recouvert de 5 ml/puits du milieu de culture MEM Earle supplémenté de 10 U/ml de trypsine, 25 μg/ml de DEAE-Dextran (Pharmacia; Uppsala, Suède), 25 mg/ml de gentamicine (GIBCO Lab), 100 U/ml de pénicilline, 100 μg/ml de streptomycine et 1 % d'Agar Noble (DIFCO Lab). Après gélification, les plateaux étaient placés à l'étuve à une température de 37°C sous atmosphère humide et en position inversée. Après 48 heures, un volume de 3 ml du milieu gélifié supplémenté de 0,06 % de rouge neutre était ajouté à chacun des puits. Les cultures étaient réincubées pour une période variant de 24 à 72 heures selon l'apparition de plages visibles à l'oeil nu. De 24 à 48 heures après l'apparition de plages, les feuillets cellulaires étaient recouverts de 4 ml de formaldéhyde 5 % pour 15 minutes à la température ambiante. Après rinçage à l'eau bidistillée, le milieu gélifié était ensuite enlevé avec un scalpel en prenant soin de ne pas endommager le feuillet cellulaire. Les cellules étaient finalement colorées avec du crystal violet 1 % (bleu de Gentian) dilué dans de l'eau bidistillée, pour 5 minutes. L'excès de colorant était éliminé par rinçage à l'eau et les feuillets étaient séchés à l'air libre pour observation.

4.3 Mesure de l'activité hémagglutinante

Une dilution sérielle à base 2 des échantillons était d'abord effectuée dans du tampon PBS dans des plateaux de 96 puits à fond rond (Falcon). On y ajoutait par la suite un volume égal (0,05 ml) d'une suspension de globules rouges de coq, préalablement lavés

dans une solution d'Alsever, et dilués dans du PBS à une concentration de 0,5 % (v/v). Les mélanges virus-globules rouges étaient incubés à la température de la pièce pendant 45 minutes. Le titre HA fut estimé selon la plus grande dilution de l'échantillon provoquant l'agglutination complète des globules rouges. Le test d'hémagglutination a aussi été fait avec des globules rouges de cobaye et en triplicata à trois reprises.

5. PURIFICATION DU VIRUS

5.1 Concentration et purification par ultracentrifugation

Les surnageants de culture et les feuillets de cellules Vero infectées par le virus EMC ont été congelées-décongelées à deux reprises avant d'être clarifiés à 3 000 x g pendant 30 à 45 minutes à 4°C (Centrifugeuse DPR 6000; IEC Needham Heights, MA, É.-U.). Les virions présents dans ces surnageants étaient par la suite concentrés par ultracentrifugation différentielle contre un coussin de 30 % (p/v) de saccharose pour une période de 2 1/2 heures à 100 000 x g à 4°C (Centrifugeuse L8-55, rotor T35, Beckman, San Diego, CA, É.-U.). Le virus était alors déposé au culot, tandis que les débris cellulaires étaient en grande partie retenus par le coussin de saccharose.

Afin d'augmenter le degré de pureté de la préparation virale, une ultracentrifugation isopycnique sur un gradient de densité de chlorure de césium (1,31-1,41 g/ml) était réalisée à 100 000 x g durant 16 heures à 4°C (Centrifugeuse L8-55, rotor SW27). Les bandes virales étaient par la suite prélevées à l'aide d'une pipette et diluées 1:5 à 1:10 dans du

tampon TNE (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) pH 7,4 afin d'abaisser la teneur en chlorure de césium. Le virus purifié était finalement récupéré après une dernière ultracentrifugation à 100 000 x g pendant 3 heures à 4°C (Centrifugeuse L8-55, rotor SW27). Le culot viral était dispersé dans un volume minimal de tampon TNE (200-300 μl) et congelé à -70°C.

5.2 Microscopie électronique par imprégnation négative

Des grilles de cuivre recouvertes de Formvar et de carbone étaient déposées pour 2 minutes sur une goutte de suspension virale. Le surplus de liquide était par la suite délicatement absorbé à l'aide d'un papier filtre (Whatman #1, Fisher Scientific). Après un rinçage à l'eau, les grilles étaient déposées sur une goutte d'acide phosphotungstique (PTA) à 3 % ajusté à pH 7,0. Après 30 secondes de contact, l'excès de PTA était retiré et la grille était séchée à l'air et examinée au microscope électronique Philipps EM300 (Pharmacia; Uppsala, Suède), sous une tension de 80 kV.

6. PRODUCTION D'UN SÉRUM HYPERIMMUN

Un antisérum polyvalent a été produit chez le lapin contre la souche de référence ATCC VR-129 du virus EMC purifiée tel que mentionné au point 5.1. Lors des différentes inoculations, les lapins ont reçu de 250 à 500 μg de virus pur dont la concentration a été estimée par dosage protéique. Pour la première inoculation, un mélange en quantité égale du virus et d'adjuvant complet de Freund fut donné à la fois par voie intrapéritonéale (1 ml)

et voie intradermique (10 sites à raison de 50 μl/site). Deux doses de rappel furent données aux jours 14 et 21; les lapins ont reçu alors par voies intrapéritonéale et intramusculaire un mélange égal de virus et d'adjuvant incomplet de Freund (Dea *et al.*, 1991c). Les animaux ont été saignés par ponction cardiaque avant et après immunisation.

7. ANALYSES SÉROLOGIQUES

7.1 Immunofluorescence indirecte

7.1.1 Cellules en feuillets

Les cellules étaient mises en culture à une concentration initiale de 2 X 10^5 cellules /ml dans les cupules de lames Labteck (Miles Scientific, Napierville, IL, É.-U.). Les lames étaient par la suite incubées à 37°C en atmosphère contenant 5 % de CO_2 jusqu'à l'obtention de feuillets confluents. Après deux lavages au PBS, les feuillets cellulaires étaient infectés à raison d'une M.O.I. de 1 $DCEP_{50}$/cellule et incubés pour une période variant de 8 à 12 heures post-infection. Les feuillets infectés étaient ensuite rincés 2 fois au PBS, séchés à l'air et fixés durant 30 minutes à l'acétone pré-refroidie à -20°C. Les lames étaient conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

7.1.2 Cellules en suspension

Des feuillets cellulaires confluents préparés dans des flacons de culture de 25 à 75 cm^2 de surface (Corning) étaient préalablement infectés à raison d'une M.O.I. de 1

$DCEP_{50}$/cellule. Après une période d'incubation de 8 à 12 heures à 37°C dans du milieu de culture exempt de sérum, les feuillets cellulaires étaient rincés 2 fois au PBS et les cellules étaient dispersées dans une préparation de trypsine 0,05 %. Après une centrifugation à 1 000 RPM durant 10 minutes, le culot cellulaire était resuspendu de façon à obtenir une suspension cellulaire finale de 10^5 cellules/ml. Par la suite, des gouttes contenant 50 μl étaient déposées dans chacun des puits de lames «Flow» enduites de Téflon (Multitest slides; ICN Biomedicals). La suspension était ajustée de sorte que la surface des puits soit recouverte de cellules lorsqu'observée au microscope à inversion. Après une période de séchage à la température ambiante, les lames étaient fixées à l'acétone froide pour 20 minutes à une température de -20°C. Après séchage à l'air ambiant, les lames étaient conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

7.1.3 Analyse des sérums

Les préparations cellulaires fixées à l'acétone étaient incubées en présence de différentes dilutions de sérum à tester durant 45 minutes à 37°C en atmosphère humide. Par la suite, les lames étaient rincées, puis lavées trois fois durant 10 minutes dans du PBS. Une dilution fixe (1/40-1/60) d'antisérum de chèvre anti-globuline de lapin conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Miles Scientific) était alors ajoutée et les lames étaient réincubées pour 45 minutes à 37°C en atmosphère humide. Après trois autres lavages dans du PBS, les lames étaient rincées dans une solution contenant 0,005 % (p/v) de bleu d'Evans, séchées à l'air, et finalement montées entre lames et lamelles à l'aide d'une solution de glycérol à

90 % préparée dans le tampon PBS à pH 7,4. Les lames ont été observées en microscopie sous rayonnement ultra-violet (Microscope Leyca, Leitz Canada, Ltd). Pour chaque échantillon, trois lames étaient préparées afin de confirmer les résultats.

7.2 Séroneutralisation

Dans le but de déterminer le titre en anticorps neutralisants contre le virus EMC, les sérums hyperimmuns et ceux provenant d'animaux malades étaient dilués en duplicata de 1/100 à 1/12 800 dans le milieu MEM Earle. Un volume de 100 μl des dilutions sériques était alors ajouté en duplicata dans les puits de plateaux de 96 puits (Nunc), en plus d'un volume égal de suspension virale correspondant à 400 $DCEP_{50}/100\mu l$ de virus. Après une période de contact d'une heure à 37°C, la suspension cellulaire ajustée à 2 x 10^5 cellules/ml préparée dans le milieu MEM Earle supplémenté d'antibiotiques et de 20 % de SFV était ajoutée à raison de 100 μl/puits. Les plateaux étaient ensuite incubés à 37°C sous une atmosphère humide en présence de 5 % de CO_2 pour environ 72 heures. Le titre en anticorps neutralisants pour chacun des sérums était estimé selon la réciproque de la plus haute dilution sérique inhibant l'effet cytopathique causée par une dose constante de 400 $DCEP_{50}$ de virus. Afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus, l'épreuve a été exécutée à trois reprises pour chacun des échantillons testés.

7.3 Test d'inhibition de l'activité hémagglutinante

7.3.1 Titrage de l'antigène

L'activité hémagglutinante des différentes préparations virales a été déterminée selon la méthode décrite par Craighead et Skelotov (1961). Une dilution virale correspondant à 8 unités HA a été utilisée lors des épreuves d'inhibition de l'activité hémagglutinante.

7.3.2 Inhibition de l'activité hémagglutinante

Dans la première rangée d'un microplateau de 96 puits, on déposait 50 μl d'antisérum à tester et on procèdait à une dilution sérielle à base 2 dans du PBS. On ajoutait ensuite 50 μl d'une dose fixe du virus (8 unités HA). Le mélange était incubé durant 60 minutes à 4°C puis, une suspension de 0,4% (v/v) d'érythrocytes de cobaye ou de lapin préparés dans du PBS était ajoutée à raison de 50 μl par puits. On laissait incuber le mélange pendant 45 minutes. Le titre en anticorps IHA pour chacun des sérums était estimé selon la réciproque de la plus haute dilution sérique inhibant 8 unités de virus.

8. ANALYSE DES PROTÉINES VIRALES

8.1 Dosage des protéines

La concentration en protéines totales des préparations virales purifiées était mesurée selon la microméthode de Bradford (1976). La trousse commerciale de la compagnie Bio-

Rad (Richmond, CA, É.-U.) a été utilisée telle que préconisée par le fabricant dans la microtechnique en plateaux de 96 puits (Bio-Rad Bulletin 1177EG). Les échantillons étaient d'abord dilués 1/10 dans du tampon PBS à pH 7,2 afin de diminuer la concentration des détergents présents dans le tampon RIPA pouvant interférer dans la technique. La lecture des densités optiques à 600 nm était faite à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek® Multiskan, Flow, McLean, VI, É.-U.). La teneur en protéines de l'échantillon était déterminée en fonction d'une courbe étalon établie à partir de différentes concentrations d'albumine bovine.

8.2 Électrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Les profils polypeptidiques des virus purifiés ont été analysés par électrophorèse verticale sur gels de polyacrylamide selon la méthode à pH discontinu décrite par Laemmli (1970). La concentration des gels de séparation était de 12 % d'acrylamide. Ils ont été coulés entre deux plaques de verre, à une épaisseur de 0,75 mm et d'une hauteur d'environ 6 cm (appareil Mini-Protean II®; Bio-Rad Labs). Des gels de regroupement de 0,5 cm de hauteur et comprenant 3,75 % d'acrylamide ont été utilisés. Les échantillons à analyser étaient dénaturés dans un tampon constitué de Tris 62,5 mM à pH 6,8 contenant 10 % (v/v) de glycérol, 2 % (p/v) de SDS, 5 % (v/v) de β-mercaptoéthanol et 0,0025 % (p/v) de bleu de bromophénol. Avant leur application sur les gels, les échantillons étaient chauffés de 3 à 5 minutes à 100°C. L'électrophorèse était exécutée à 60 volts pendant 30 minutes, puis à 100 volts durant une heure ou à 200 volts durant 45 minutes. Pour chacun des

échantillons obtenus, cinq essais différents ont été réalisés afin de confirmer les profils protéiques de chacun.

8.3 Radiomarquage des protéines structurales

Le milieu de croissance des cultures cellulaires infectées par le virus EMC a été vidangé et remplacé par du milieu carencé en méthionine ou en cystéine, mais additionné de 1 % de SFB irradié et décomplémenté. Après une pré-incubation d'une heure dans ce milieu, l'acide aminé marqué a été ajouté et les cellules incubées à 37°C jusqu'à l'apparition de l'effet cytopathique maximal (18 à 24 heures). Des concentrations de radioactivité de 50 et 100 μCi/ml ([^{35}S] L-méthionine [activité spécifique 1099 Ci/mmole], [^{35}S] L-cystéine [activité spécifique 1300 Ci/mmole] (Amersham, Oakville, Ontario) ont été utilisées au cours des différents essais. Les surnageants récoltés ont été clarifiés par centrifugation à basse vitesse et purifiés de la façon décrite à la section 5.1.

La radioactivité incorporée dans les protéines structurales synthétisées a été mesurée après précipitation à 4°C durant 15 minutes en présence de 10 % d'acide trichloroacétique (TCA). De l'albumine sérique bovine à 0,02 % a été ajoutée préalablement au mélange afin de faciliter la capture des protéines précipitées sur les filtres de fibres de verre GF/B (Whatman, Maidstone, Angleterre). Après avoir été rincés au TCA 5 % et à l'éthanol 70 %, les filtres ont été séchés puis déposés dans des fioles à scintillation contenant 5 ml de la solution de scintillation PPO-POPOP™ (ICN Radiochemicals, Irvine, CA, É.-U.). La

quantité de radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur d'émission β (Tri-Carb® 2200CA; Packard, Downers Grove, IL, É.-U.) et exprimée en nombre de coups par minute.

8.4 Révélation des protéines par coloration au bleu de Coomassie

Après électrophorèse, les gels de polyacrylamide étaient immergés pour une heure dans une solution contenant 10 % (v/v) d'acide acétique glacial, 50 % (v/v) de méthanol et 0,05 % (p/v) de bleu de Coomassie R-250 (Sigma, St-Louis, MO, É.-U.). Les gels étaient par la suite décolorés dans une solution de 30 % (v/v) de méthanol et de 7 % (v/v) d'acide acétique. Les gels étaient alors photographiés ou séchés sous vide sur un support de papier filtre épais après avoir été préalablement imprégnés pendant 2 à 3 heures dans une solution contenant 30 % (v/v) de méthanol et 3 % de glycérol. La taille des protéines sur les gels a été estimée en comparant leur distance de migration à celle de protéines standard de poids moléculaire connu (Rainbow™ Marker, Amersham; SDS-PAGE Standards, Bio-Rad Labs).

9. IMMUNOBUVARDAGE

9.1 Préparation des antigènes viraux

Les protéines virales du virus EMC, extraites des préparations ou de lysats de cellules infectées, étaient d'abord séparées par SDS-PAGE. Les protéines du gel étaient par la suite transférées électrophorétiquement selon la méthode de Towbin *et al.* (1979), sur une membrane de nitrocellulose (NC™, Schleicher & Schuell, Keene, NH, É.-U.) d'une porosité

de 45 μm. Le tampon de transfert consistait en du tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, pH 8,3, additionné de 20 % (v/v) de méthanol. L'appareil de transfert Trans Blot® Cell (Bio-Rad Labs, Mississauga, Ont.) a été utilisé sous une tension constante de 60 volts durant 2 heures. Par la suite, les membranes de nitrocellulose étaient déposées pour une période de 2 heures à une nuit à la température ambiante dans le tampon de blocage ou de saturation TBS (150 mM NaCl, Tris 5 mM à pH 8,0) additionné de 0,05 % (v/v) Tween-20 (TBS-T) ou 0,5 % de BSA. Après blocage des sites non-spécifiques, les membranes étaient rincées au TBS et utilisées immédiatement ou conservées à 4°C ou à -20°C dans un emballage hermétique.

9.2 Détection immunologique

Après saturation, les membranes de nitrocellulose portant les protéines transférées étaient incubées en présence de l'antisérum anti-EMC produit chez les lapins dilué dans le tampon TBS-T pendant 45 minutes à la température ambiante et sous une légère agitation constante. Les immunoempreintes étaient par la suite lavées trois fois dans du TBS-T pour des périodes de 10 minutes. L'antisérum anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase, dilué dans le TBS-Tween, était alors ajouté. Après incubation subséquente de 90 minutes à la température de la pièce, on procédait à trois lavages dans du TBS-T et deux autres au TBS. Finalement, la révélation des complexes immuns était réalisée après une incubation de 15 à 45 minutes en présence du substrat de l'enzyme qui consistait en une solution de 0,06 %

(p/v) de 4-Chloro-1-Naphthol (Sigma) préparée dans le tampon TBS contenant 20 % (v/v) de méthanol et 0,01 % (v/v) de peroxyde d'hydrogène. La réaction était arrêtée par un rinçage à l'eau bidistillée. L'essai d'immunobuvardage a été répété à cinq reprises afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus.

10. AMPLIFICATION DES GÈNES VIRAUX

10.1 Préparation des acides nucléiques viraux et cellulaires

10.1.1 Extraction de l'ARN génomique du virus EMC

L'ARN génomique a été extrait à partir de virus purifié par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de CsCl. L'ARN cellulaire a été extrait à partir de cellules en feuillets préparés en flacons de culture de 25 à 50 cm^2 de surface. La méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) a été employée pour l'extraction des différents ARNs. L'échantillon était dénaturé dans une solution contenant 4 M de thiocyanate de guanidine et 25 mM de citrate de sodium, à pH 7,0 additionné de 0,5 % de sarkosyl et 0,1 M de β-mercaptoéthanol. L'ARN total était ensuite extrait dans un mélange de phénol-chloroforme (1:1) en présence de 0,2 M d'acétate de sodium, à pH 4,0, puis précipité par l'addition d'isopropanol 50 % à -20°C pour un minimum d'une heure. Après un lavage à l'éthanol 75 %, le culot d'ARN était dissous dans 10 μl d'eau bidistillée traitée au diéthylpyro-carbonate (DEPC) contenant 40 U de RNAguard™ (Pharmacia; Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfé, Qué, Canada). La quantité d'ARN extrait était estimée en regard de la densité

optique telle que déterminée à 260 nm (Spectrophotomètre Spectronic 3000 Array; Milton Roy Co.) utilisant un coefficient d'extinction de 1,4. Toutes les solutions utilisées pour la préparation de l'ARN étaient préalablement traitées au DEPC afin d'inactiver les ribonucléases.

10.1.2 ADN viral et cellulaire

La procédure qui suit a été utilisée pour l'extraction d'ADN à partir des cultures cellulaires infectées par les différents virus servant de contrôles, soient les virus BVD-MD, PPV et RIB. Après avoir gratté les cellules infectées dans du tampon TNE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA), la suspension cellulaire était centrifugée à 2 500 RPM pour 10 minutes. Le culot cellulaire obtenu était ensuite lavé trois fois avec du PBS et les cellules resuspendues étaient recentrifugées pendant 10 minutes à 2 500 RPM. Le culot cellulaire était remis en suspension dans 2 ml de solution A contenant 100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, à pH 8,3, et 2,5 mM $MgCl_2$. Un volume égal de solution B était ensuite ajouté (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 2,5 mM $MgCl_2$, 1 % NP4O et 120 μg/ml protéinase K). Le volume total était distribué dans des tubes Eppendorf à raison de 0,5 ml par tube et incubés pour une heure à 60°C ou toute une nuit à 56°C. Afin d'inactiver l'activité de la protéinase K, les tubes étaient déposés à 95°C pour 10 minutes. L'ADN était extrait deux fois au phénol-chloroforme (1:1) et précipité suite à l'ajout d'une quantité égale d'isopropanol. Par la suite, le mélange était centrifugé pendant 30 minutes à 12 000 x g et le culot obtenu était lavé à l'éthanol 70 % préalablement refroidi à -20°C. Après une dernière centrifugation de

10 minutes, le culot était séché sous vide (DNA Speed Vac; Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, É.-U.). L'ADN ainsi obtenu était finalement resuspendu dans un faible volume de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) et conservé à -70°C.

10.2 Choix des amorces oligonucléotidiques

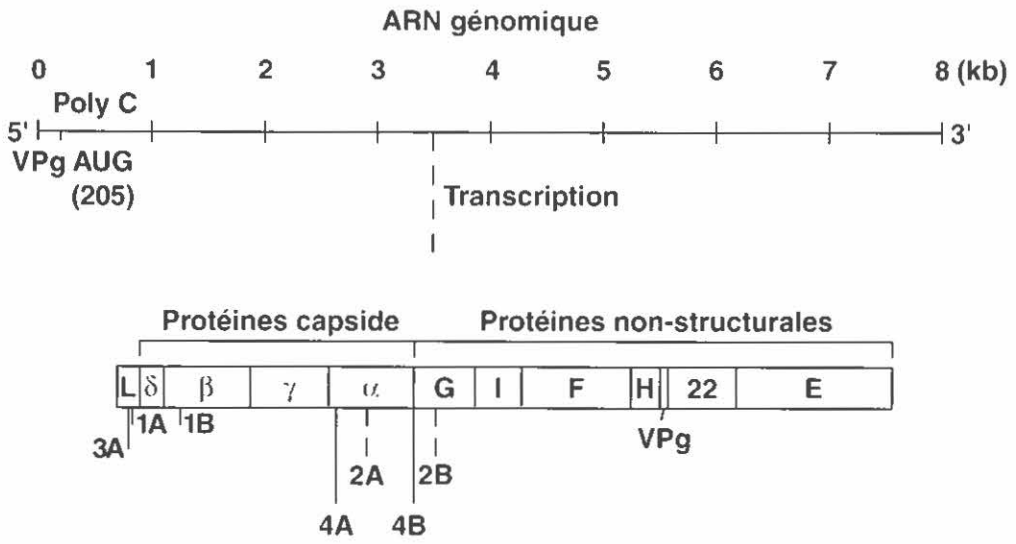
Les régions génomiques auxquelles nous nous sommes intéressés se situent au niveau de l'extrémité 5', où sont localisés les gènes codant pour les protéines structurales le plus souvent impliquées lors de variations entre les divers isolats. Les paires d'amorces sélectionnées ont été déduites de la séquence nucléotidique de la souche de référence simienne ATCC VR-129 publiée par Palmenberg *et al.* (1984). Trois paires d'amorces ont d'abord été synthétisées; deux d'entre elles destinées à l'amplification des régions génomiques codant pour les gènes δ et β, soient les paires 3A-1B et 1A-1B, et la troisième, 2A-2B, devant permettre l'amplification d'une partie du gène α codant pour la protéine de la nucléocapside VP1. Une quatrième paire d'amorces, 4A-4B, a été choisie de façon à permettre l'amplification d'un fragment génomique correspondant à la totalité du gène α. Des sites de restriction *Bam*H1 ont été insérés aux deux extrémités de ces amorces. La séquence complète des amorces utilisées, de même que leur localisation relative par rapport au génome EMC apparaît à la Figure 2. Dans certains cas, des oligonucléotides dégénérés ont été utilisés afin de tenir compte de la variabilité du code génétique.

FIGURE 2. Représentation schématique du génome du virus EMC et localisation des amorces oligonucléotidiques utilisées lors des essais d'amplification enzymatique.

A. ARN génomique et carte de transcription de la souche de référence ATCC VR-129.

B. Localisation, séquence nucléotidique et taille prévue des fragments amplifiés par chacune des paires d'amorces.

A



B

Amorce	(sens)	Séquence	Localisation	Taille du fragment
1A	+	5'-GCTCTGCTCTACAATACC-3'	269-280	434 bp
1B	–	5'-GCCGTCTTGTCGGTTATGGTAC-3'	703-724	
2A	+	5'-GTAAGTTCCCTCTCAGAAGC-3'	2554-2573	410 bp
2B	–	5'-ACCTCCAAACCTCTAGTGG-3'	2964-2982	
3A	+	5'-CTCTCACTTTTGAGGAATGCCC-3'	242-263	461 bp
1B	–	5'-GCCGTCTTGTCGGTTATGGTAC-3'	703-724	
4A	+	5'-GAGTAGAAAACGCTGAAA-3'	2072-2089	806 bp
4B	–	5'-TCGGGGTCATATCAATCT-3'	2860-2878	

D'APRÈS PALMENBERG ET AL. (NUCL. AC. RES.: VOL. 12 (6), 1984.)

10.3 Amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

10.3.1 Réaction de la transcriptase inverse

Le mélange réactionnel contenait de 100 à 500 ng d'ARN viral, 1 mM de chacun des désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia), 40 U de RNAguard™, 1 μM de chacune des amorces oligonucléotidiques à être utilisées lors de la réaction PCR et du tampon pour l'enzyme Taq 10 X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0 25°C et 1 % Triton X-100 (0,1 % final) (Bio-Can Scientific, Mississauga, Ont, Canada ou Cetus, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, É.-U.) dans un volume final de 20 μl. Le mélange était chauffé à 65°C durant 15 minutes, puis refroidi rapidement sur glace avant l'ajout de l'enzyme transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine (MuLV; Pharmacia) à raison de 20 U par réaction. Suite à une incubation sur glace de 45 minutes, le mélange était incubé à 42°C pour une heure. Finalement, le mélange était chauffé à 94°C pour 3 minutes 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.

10.3.2 Amplification (PCR)

La réaction d'amplification enzymatique a été effectuée dans un volume final de 100 μl constitué de 1 μM de chacune des amorces, 200 μM de chacun des désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia), 2,5 U de l'enzyme *Taq* ADN polymérase (5 U/μl) (Bio/Can Scientific), 20 μl du mélange RT (section 10.3.1) et 10 μl du tampon pour

l'enzyme Taq 10X. Afin de prévenir l'évaporation, de l'huile minérale était ajoutée au-dessus du mélange à raison de 70 μl par tube Eppendorf d'une capacité de 500 μl. Les échantillons étaient soumis aux divers cycles de température utilisant un thermocycleur «DNA Thermal Cycler» de Cetus (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, É.-U.). Chacun des cycles comprenait une phase de dénaturation à 94°C d'une durée de 60 secondes, une phase d'hybridation à 52°C de 2 minutes et une phase d'élongation de 3 minutes à 72°C. Toutes les réactions d'amplification étaient terminées par un cycle de 10 minutes à 72°C. Les échantillons amplifiés étaient refroidis à 4°C avant d'être analysés par électrophorèse. Le nombre de cycles, de même que les températures d'hybridation employés ont été décrits dans la section «Résultats». Pour chacun des échantillons à tester, plus d'une douzaine d'amplifications distinctes ont été effectuées afin de vérifier la reproductibilité des résultats.

10.4 Analyse des produits d'amplification par électrophorèse en gels d'agarose

Le dixième du mélange obtenu suite à la réaction RT-PCR était analysé par électrophorèse en gel d'agarose d'une concentration variant de 1,0 à 1,2 %, selon la taille prévue des fragments amplifiés. Les tampons utilisés consistaient en une solution de Tris-acétate (TAE : Tris-acétate à 40 mM, EDTA à 2 mM à pH 8,0), ou le Tris-borate (TBE : Tris-borate à 89 mM, acide borique à 89 mM et EDTA à 2 mM à pH 8,0). Les appareils d'électrophorèse GNA-100 (Pharmacia) et Wide Mini-Sub (Bio-Rad) ont été utilisés. L'étape d'électrophorèse était réalisée sous une tension d'environ 1 à 2 volts par cm^2 de gel durant

45 à 60 minutes. La taille des fragments obtenus était estimée par comparaison avec la distance de migration d'un marqueur de taille moléculaire standard (Pharmacia) suite à leur coloration au bromure d'éthidium à 0,5 μg/ml.

11. CLONAGE DES GÈNES VIRAUX

11.1 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 agarose», BRL Research) après leur migration électrophorétique. Les fragments d'ADNc ont été purifiés à l'aide de la trousse «Gene Clean» (Bio 101 Inc., La Jolla, CA, É.-U.) suivant les directives du manufacturier. Brièvement, suite à l'excision des produits d'amplification du gel d'agarose, de 2,5 à 3 volumes d'une solution stock de NaI sont ajoutés aux tubes contenant l'agarose. Suite à une incubation de 5 minutes à 45°C permettant à l'agarose de se dissoudre, une suspension de «Glassmilk» (billes de silice auxquelles adhèrent l'ADN simple et double brin) est ajoutée à raison de 5 μl de cette suspension pour des échantillons contenant 5 μg ou moins d'ADN. 1 μl est ajouté pour 0,5 μg d'ADN supplémentaire. Le complexe billes/ADN est centrifugé afin d'obtenir un culot d'ADN. Ce dernier est rincé à trois reprises avec le tampon NEW mis sur glace à raison de 10 à 50 volumes en resuspendant adéquatement le culot. Une fois resuspendue, la suspension contenant l'ADN est centrifugée pendant 5 secondes. Une fois le surnageant jetté, l'opération est répétée à

deux reprises. Le culot obtenu lors de la dernière étape est lavé au tampon TE, incubé dans un bain-marie à 45°C de 2 à 3 minutes. Après avoir centrifugé le contenu du tube pendant 30 secondes, le surnageant contenant l'ADN élué est déposé dans un autre tube. Une seconde élution peut être effectuée afin de récupérer le plus d'ADN possible.

11.2 Clonage du gène α codant pour la protéine VP1

11.2.1 Clonage dans le plasmide pUC19

Les fragments d'ADNc, extraits à partir des gels d'agarose, ont été purifiés et digérés par l'enzyme *Bam*H1 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 µl d'ADN (50 ng/µl) furent ajoutés successivement: 2 µl de tampon pour enzyme «One Phor All Plus» (10X) (Pharmacia) composé de 100 mM de Tris-Acétate à pH 7,5, 100 mM d'acétate de magnésium et 500 mM d'acétate de potassium, et 1 µl d'enzyme de restriction *EcoRI* (Pharmacia) d'une concentration de 20 000 U/ml. Après une incubation à 37°C pendant 45 minutes, la réaction de digestion fut arrêtée en augmentant la température d'incubation à 65°C pendant 20 minutes, suivie d'une seconde incubation à la température ambiante durant 20 minutes. La ligation de l'insert au vecteur a été réalisée en utilisant un ratio de 1:3. Ainsi, 100 ng d'ADN amplifié (VP1) (2 µl) furent mélangés à 300 ng d'ADN

plasmidique (6 μl). La réaction de ligation fut initiée en ajoutant successivement 1 μl du tampon de ligation (10X) (InVitrogen) composé de 660 mM Tris-HCl à pH 7,6, 66 mM de $MgCl_2$, 100 mM de DTT et 660 μM d'ATP et 0,5 μl de l'ADN ligase du phage T4 (8 500 U/ml) (Pharmacia). Le mélange réactionnel fut incubé à 15°C pendant 17 heures, puis conservé à -20°C.

11.2.2 Clonage dans le vecteur T

Le clonage dans le vecteur pCR II (InVitrogen, Co, San Diego, CA, É.-U.) a été effectué en suivant les indications du manufacturier. Le système «TA Cloning» (InVitrogen) consiste en une stratégie en une étape permettant l'insertion directe d'un produit d'amplification enzymatique dans un vecteur plasmidique. Cette méthode permet d'éliminer toutes modifications enzymatiques des produits d'amplification comme par exemple des traitements avec l'enzyme Klenow ou encore avec la polymérase T4 afin de créer des extrémités cohésives des fragments. Cette technique ne nécessite pas non plus d'amorces spécifiques contenant des sites de restriction. Il n'est pas nécessaire de purifier les produits d'amplification. Le vecteur de 3,0 kb doit être utilisé à raison de 2 μl, une fois resuspendu dans le tampon TE, à une concentration finale de 25 ng/μl. Afin d'obtenir un clonage efficace, le manufacturier suggère l'utilisation de 6 μl d'eau stérile, 1 μl de tampon de ligation 10X, 2 μl du vecteur pCRII, 1 μl de produit d'amplification enzymatique dilué à une concentration finale de 16,74 ng/μl (16,7 μl de produit RT-PCR auquel on ajoute 83,3 μl d'eau stérile). La réaction de ligation était réalisée par l'action de l'ADN ligase du phage

T4. Lors de l'amplification, la *Taq* ADN polymérase laisse une adénosine non-pairée aux extrémités 3' du produit de PCR. Le vecteur pCRII fourni par la trousse utilisée a été coupé et modifié de façon à contenir un nucléoside T non-pairé à chaque extrémité 3', ce qui permet le clonage des produits de PCR. Les produits de ligation étaient conservés à -20°C.

11.3 Transformation de bactéries *Escherichia coli*

Afin d'obtenir des bactéries compétentes permettant d'effectuer une transformation efficace, des bactéries (XL-1 Blue) ont été décongelées et mises sur boîtes de pétri contenant du milieu LB (voir annexe) auquel a été ajouté 1,5 % d'agar, d'antibiotiques sélectifs, d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (4 mM) et de bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) (0,08 mg/ml) et mises en culture à 37°C pour une nuit. Environ 12 colonies d'un diamètre approximatif de 2 à 3 mm ont été inoculées dans un flacon de 2 litres avec 250 ml de milieu SOC (voir annexe) jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO) de 0,6 à une longueur d'onde de 600 nm à 18°C. Suite à un bain de glace de 10 minutes, la culture bactérienne a été mise dans une bouteille de 500 ml et centrifugée à 2 500 x g (3 000 rpm; centrifugeuse Beckman J-6B) pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu avec 80 ml de tampon TB (voir annexe) préalablement mis sur glace et incubé dans un bain de glace pendant 10 minutes et recentrifugé 10 minutes à 2 500 x g à une température de 4°C. Le culot cellulaire ontenu a été resuspendu délicatement avec 20 ml de tampon TB auquel du DMSO a été ajouté sous agitation légère afin d'obtenir une concentration finale de 7 %. Suite à une incubation de 10 minutes sur glace, la suspension

cellulaire a été séparée à raison de 1 à 2 ml par tube de polypropylène et ces tubes ont été congelés immédiatement par immersion dans l'azote liquide. Les cellules, une fois compétentes, peuvent être gardées environ un mois sans subir une perte de compétence.

Les bactéries *Escherichia coli* (XL-1 Blue) compétentes et résistantes à la tétracycline ont été transformées par les plasmides recombinants par transfection en présence de $CaCl_2$. Brièvement, une quantité (10 ng) de l'ADN du vecteur recombinant était d'abord déposée dans un tube d'isopropylène de 5 ml (Sarsted, Montréal, Qué, Canada) placé dans un bain de glace. Puis, 0,1 ml de la suspension de cellules compétentes (XL-1 Blue) 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 secondes pour le choc thermique. Ensuite, 0,9 ml du milieu de culture SOC était rajouté et le mélange était incubé à 37°C sous une agitation constante à 250 rpm (Scientific, Edison, NJ, É.-U.) afin d'initier la croissance bactérienne. Après une période d'agitation d'une heure, 0,1 ml de cellules transformées était étalé sur des boîtes de pétri contenant le milieu 2YT supplémenté de 1,5 % d'agar, d'antibiotiques sélectifs, d'IPTG (4mM) et de X-gal (0,08 mg/ml) (Maniatis *et al.*, 1982) (voir annexe). Ces deux derniers sont les substrats qui permettent la sélection colorimétrique des bactéries recombinantes (colonies blanches), le gène de la β-galactosidase ayant été interrompu suite à l'insertion du gène étranger. Les antibiotiques utilisés étaient l'ampicilline (dans le cas du clonage dans le plasmide pUC19), ou la kanamycine (dans le cas du clonage dans le vecteur pCR II). Les bactéries recombinantes étaient identifiées selon

leur capacité à croître dans du milieu LB ou 2YT liquide ajusté à une concentration de 100 μg/ml de kanamycine. Les bactéries recombinantes étaient conservées soit à 4°C pour de courtes périodes, soit à -70°C dans du milieu contenant 30 % de glycérol.

11.4 Isolement des plasmides recombinants 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 ensemencées dans 2 ml de milieu LB ou 2YT liquide contenant 100 μg/ml de kanamycine. Après 17 heures d'incubation à 37°C sous agitation vigoureuse constante à 250 rpm, les plasmides étaient isolés suite à une lyse bactérienne en présence du lysozyme. La technique rapide «Boiling miniprep» telle que décrite dans le livre «Short protocols in Molecular Biology» (1992) a été utilisée. Brièvement, 1,5 ml de la suspension bactérienne était centrifugé à 13 000 rpm pendant 2 à 3 minutes. 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 secondes. La solution de lyse ou STET était constituée de 8 % de sucrose, 0,5 % de Triton X-100, 50 mM Tris pH8.8, 50 mM EDTA et 0,5 mg/ml de lysozyme. Après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 15 minutes, 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 minutes et resuspendu dans 40 μl d'eau. L'ADN plasmidique était finalement digéré avec l'enzyme *Eco*RI pour vérifier s'il contenait l'insert. Pour cette digestion, 10 μl du plasmide extrait

était ajouté à un volume égal du mélange réactionnel (4 μl de tampon «One Phor All Plus» (10X), 1 μl d'enzyme *Eco*RI, 4 μl de ribonucléase A à concentration finale de 200 μg/ml et 11 μl H_2O). Le mélange était incubé pendant 2 heures à 37°C.

L'extraction de l'ADN plasmidique des bactéries cultivées dans des tubes de 3 ml de bouillon de culture était faite selon le protocole «Magic™» (Miniprep DNA purification system, Promega). Une culture bactérienne *E. coli* (1-3 ml) est nécessaire pour chaque préparation. Les cellules, une fois culottées par centrifugation, sont resuspendues dans une solution de resuspension et lysées grâce à une solution de lyse cellulaire. Après neutralisation de la lyse, les cellules sont centrifugées à 12 000 x g et le surnageant décanté dans un nouveau tube. Au surnageant est ajouté de la résine, et le tout mélangé par inversion. Une colonne consistant en une seringue est préparée pour chaque échantillon à purifier. Le mélange ADN/résine est ensuite placé dans la seringue et passé dans la colonne en y appliquant le piston afin de récupérer le plus de matériel possible. Une solution de lavage est versée dans la seringue et passée à travers la colonne. La colonne est transférée dans un micro-tube de 1,5 ml et centrifugée à haute vitesse afin d'éliminer tout résidu de la solution de lavage. Suite au transfert de la colonne dans un nouveau tube, de l'eau distillée ou du tampon TE est ajouté. Après une minute, la mini-colonne est recentrifugée à haute vitesse (12 000 x g) afin d'éluer l'ADN plasmidique. L'ADN récupéré est ensuite conservé à 4°C ou à -20°C. La pureté et la concentration de l'ADN plasmidique étaient estimées par

électrophorèse en gel d'agarose par rapport à un standard de taille moléculaire de concentration prédéterminée.

11.5 Séquençage

Le séquençage des inserts clonés a été effectué selon la méthode décrite par Sanger *et al.* (1977) basée sur la terminaison de la synthèse de la chaîne d'ADN par l'ajout de didéoxynucléotides. L'enzyme T7 ADN 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 employé. Des oligonucléotides complémentaires aux séquences du phage M13 (en amont et en aval du site *Eco*RI) ont été utilisées comme amorces pour déterminer les séquences adjacentes aux régions conservées des deux extrémités du gène δ codant pour la protéine VP1 clonée dans le vecteur pUC19. Des oligonucléotides complémentaires aux séquences du phage M13 de la région du promoteur SP6 ont été employées dans le cas des fragments clonés dans le vecteur pCR II. La séquence du gène cloné a été complétée en utilisant comme amorces des oligonucléotides marqués à la fluorescéine qui sont complémentaires à des séquences internes. L'amorce désignée 4A (5'-GAGTAGAAAACGCTGAAA-3') correspondait à la séquence d'oligonucléotides localisés aux positions 2072 à 2089 du gène δ codant pour la protéine VP1, alors que l'amorce désignée 4B (5'-TCGGGGTCATATCAATCT- 3') était complémentaire et de sens inverse à la séquence oligonucléotidique localisée aux positions 2860 à 2878 du gène δ. Les séquences d'ADN obtenues de deux clones différents ont été

étudiées et analysées à l'aide du programme informatique Gene Works 2.2 (Intelligenetics Inc., Mountain View, CA, É.-U.) et la traduction en acides aminés, de même que les analyses de comparaison de séquences ont été effectuées à l'aide du programme Mac Vector (International Biotechnologies). Chaque isolat a été séquencé à lors de trois essais afin de confirmer les résultats obtenus.

12. HYBRIDATION MOLÉCULAIRE

12.1 Régions génomiques ciblées

Afin de vérifier si des variations génomiques étaient décelables entre les différents isolats, deux sondes moléculaires spécifiques, correspondant aux régions des gènes codant pour les protéines VP1 et VP4, ont été synthétisées. Pour la première sonde (VP4), un plasmide chimérique (T-Vector; Stratagene, LaJolla, CA, É.-U.) portant un fragment génomique amplifié à l'aide des amorces oligonucléotidiques 3A-1B (VP4), a été linéarisé par une digestion avec l'endonucléase de restriction *Hind*III. Pour la seconde sonde (VP1), un vecteur complet portant un fragment génomique amplifié à l'aide des amorces oligonucléotidiques 4A-4B (VP1) a été linéarisé par digestion avec l'endonucléase de restriction *Hind*III.

12.2 Marquage de fragments d'ADN à la digoxygénine-11-dUTP

Les fragments d'ADN obtenus suite à une linéarisation, ont été purifiés lors d'une extraction au phénol:chloroforme, ont été dénaturés à 95°C pour 10 minutes, puis refroidis dans un bain de glace auquel du NaCl a été ajouté. Une quantité de 3 μg d'ADN fraîchement dénaturé a été placé dans un tube à microcentrifugeuse (Eppendorf) en y ajoutant 2 μl d'un mélange d'hexanucléotides concentrés, 2 μl d'un mélange de désoxynucléotides marqués (1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 1mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP, pH 6,5) et 1μl de l'enzyme de l'ADN polymérase de *E. coli* (grand fragment (Klenow) (Bio-Can Scientific). Le mélange était ramené à un volume final de 20 μl avec de l'eau bidistillée stérile. Le mélange réactionnel était incubé dans un bain-marie à 37°C pour une nuit. Afin d'arrêter la réaction, 2 μl d'une solution EDTA (0,2 M pH 8,0) était ajoutée. L'ADN marqué était précipité pendant une nuit à -20°C en présence de LiCl 4 M et d'éthanol préalablement refroidi à -20°C. Par la suite, le mélange était centrifugé à 12 000 x g pendant 30 minutes à 4°C; le culot d'ADN obtenu était lavé à l'éthanol 70 % (v/v) et dissous en y ajoutant 50 μl de tampon TE.

12.3 Adsorption de l'ADN sur membrane de nitrocellulose

12.3.1 Transfert de type Southern

Les fragments génomiques amplifiés par la réaction de polymérisation en chaîne étaient d'abord analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et colorés dans une solution de 0,5

μg/ml de bromure d'éthidium. Après 15 minutes de coloration, l'ADN a été visualisé et photographié sous un rayonnement ultra-violet. Le gel a été ensuite déposé dans une solution de dénaturation (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) pendant 2 périodes de 15 minutes à température ambiante, et ensuite dans une solution de neutralisation (1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl) pour 2 périodes de 15 minutes à la température de la pièce. Le montage nécessaire pour le transfert Southern a été fait selon la technique décrite par Maniatis *et al.* (1982).

Les fragments génomiques retrouvés sur le gel étaient transférés par capillarité sur une membrane de nylon activé de porosité 0,22 μm chargée positivement (Nytran: Schleicher & Schuell, Keene, NH, É.-U.) dans un tampon 10 X SSC (1 X SSC contient 0,15 M NaCl, 0,015 M citrate de sodium, pH 7,0). Pour un transfert efficace des fragments, il fallait généralement allouer une période de 12 à 24 heures selon la taille de ces derniers. La membrane de nylon était à nouveau recolorée dans une solution de bromure d'éthidium. L'efficacité du transfert était confirmée par l'examen du gel sous rayonnement ultra-violet sans recoloration au préalable (Transilluminator; Fisher Biotech, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, É.-U.) et par la confirmation de l'absence de bandes signifiant que le transfert s'est bel et bien fait. Par la suite, la membrane de nitrocellulose était retirée du montage et trempée dans le tampon 5 X SSC pour une période de 5 minutes. Elle était ensuite séchée à l'air et exposée au rayonnement ultra-violet de 3 à 5 minutes.

12.3.2 Transfert par microfiltration

Des aliquots de 100 μl d'homogénats d'organes et de lysats cellulaires dilués ou prétraités en vue de l'extraction de l'ARN viral étaient déposés directement, après avoir été préalablement dénaturés par un chauffage à 72°C, sur une membrane de nitrocellulose (porosité de 22μm), à l'aide de l'appareil Minifold 72 puits (Schleicher & Schuell). La membrane était préalablement équilibrée dans l'eau bidistillée ou dans le tampon 20 X SSC. Après l'application des échantillons, la membrane était ensuite dénaturée et l'ADN était fixé selon la méthode décrite à la section 12.3.1.

12.4 Hybridation moléculaire

Une fois la membrane de nitrocellulose exposée aux rayons ultra-violets pour la fixation de l'acide nucléique, elle était placée dans un sac de plastique scellé et préhybridée pour une nuit dans un bain-marie à 42°C. La solution de préhybridation consistait en une solution 5 X SSC, 0,5 % (p/v) de caséine modifiée (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, É.-U.), 0,1 % (p/v) de N-lauroylsarcosine (sarcosyl), 0,02 % (p/v) de SDS et 50 % (v/v) de formamide (Fisher Scientific). Par la suite, la solution de préhybridation était vidangée du sac pour être remplacée par la solution d'hybridation contenant 10 picomoles de la sonde moléculaire marquée. Pour la réaction d'hybridation, les sacs scellés étaient déposés dans un bain-marie à 42°C pour une nuit. La sonde moléculaire marquée pouvait être réutilisée à quelques reprises en la retirant du sac et en l'entreposant à -20°C.

12.5 Détection immunologique

Une fois la membrane retirée du sac d'hybridation, elle était rincée à deux reprises dans un tampon 2 X SSC contenant 0,1 % SDS à température ambiante pour une période de 5 minutes, et à deux reprises dans un tampon 0,1 X SSC contenant 0,1 % SDS chauffé préalablement dans un bain-marie à 68°C pour une période de 15 minutes. Suite à un lavage de 5 minutes dans une solution Tris-HCl (100 mM), à pH 7,5, contenant 150 mM de NaCl, la membrane était immergée dans une solution composée de 0,5 % de caséine modifiée pour une période de 30 minutes à température de la pièce, lavée à trois reprises dans un tampon Tris-HCl 100 mM à pH 7,5 pour 10 minutes et incubée en présence de la préparation de fragments Fab anti-digoxygénine conjugués à la phosphatase alcaline pour 30 minutes (Boehringer-Mannheim). Les anticorps ne s'étant pas complexés à la digoxygénine de la sonde étaient éliminés suite à trois lavages de 10 minutes avec le tampon Tris-HCl. La membrane était par la suite équilibrée dans un tampon constitué de 100 mM Tris-HCl, à pH 9,5, 100 mM NaCl et de 50 mM $MgCl_2$. La révélation colorimétrique de la réaction immunologique était faite en utilisant comme substrat le produit X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) et à un sel de tétrazolium (Nitro Blue Tetrazolium). Le développement de la réaction se faisait dans l'obscurité pour une période variant de 2 à 12 heures. Tous les essais d'hybridation effectués à partir des produits d'amplification provenant des isolats faisant l'objet de mes travaux ont été répétés à trois reprises afin de vérifier la reproductibilité des résultats observés.

13. ESSAIS D'INFECTION EXPÉRIMENTALE

13.1 Inoculation de souris

Des groupes de 5 à 6 souris femelles CD-1, d'un poids approximatif de 25 g, ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 0,5 ml de surnageant de culture cellulaire infectées avec la souche Q.90-890 du virus EMC ajustée à une dose de 10^3 et 10^4 $DCEP_{50}$ de virus. Le suivi clinique était fait deux fois par jour pour une période de 4 à 5 jours. Les souris servant de contrôles négatifs ont été inoculées avec du tampon (PBS).

Les tissus des souris mortes suite à l'inoculation expérimentale, soient les intestins, le cerveau, la rate, le coeur et les poumons, ont été prélevés stérilement et broyés dans le tampon PBS,à pH 7,2, à l'aide de l'appareil Omni-Mixer® (Sorvall; Ivan Sorval Inc., Newton, CN, É.-U.). Les homogénats (0.05 %) des tissus prélevés ont été clarifiés par centrifugation à 10 000 x g pendant 15 minutes en vue de leur inoculation sur feuillets cellulaires. Deux passages consécutifs ont été réalisés en vue des essais de ré-isolement du virus sur feuillets cellulaires. Pour les essais RT-PCR et d'hybridation moléculaire, les homogénats des tissus prélevés ont été préparés selon la méthode décrite par Meyer *et al.* (1991). Cette méthode, combinant les techniques de RT-PCR et d'hybridation moléculaire, est employée afin d'évaluer le seuil de détection de fragments génomiques amplifiés enzymatiquement provenant de tissus animaux infectés par le virus de la fièvre aphtheuse.

13.2 Inoculation de porcelets

Des porcelets gnotobiotes hybrides (Landrace X Yorkshire F1), nés par césarienne et privés de colostrum ont été placés dans des isolateurs dès leur naissance. Les porcelets de 3 jours ont été inoculés par voie intrapéritonéale et intramusculaire avec 5 ml de surnageants de culture filtrés (0,22 μm) du troisième passage sur cellules Vero de l'isolat québécois EMC Q.90-890 ajusté à une dose de 10^6 $DCEP_{50}$/ml. D'autres porcelets ont été inoculés à l'aide de filtrats d'organes de souris CD-1 infectées par l'isolat québécois EMC Q.90-890 et des filtrats d'organes préparés à partir de poumons et de coeur de porcelets gnotobiotes de 3 jours infectés tel que mentionné plus haut. Des porcelets servant de contrôle ont été inoculés avec du tampon PBS. Les tissus et liquides thoraciques prélevés stérilement aux jours mentionnés dans la section «Résultats» ont été traités tel que décrit à la section 3.

13.3 Préparation des homogénats des tissus animaux

13.3.1. Isolement du virus en cultures cellulaires

Les tissus de souris et de porcelets prélevés stérilement ont été broyés à l'aide de l'appareil Omni-Mixer® (Sorvall; Ivan Sorvall Inc., Newton, CN, É.-U.) et filtrés à travers des membranes de nitrocellulose de 0,22 μm de porosité (Nalgene). Les filtrats ont ensuite été inoculés à un volume de 10 % (p/v) sur feuillets cellulaires Vero et incubés à 37°C dans du milieu Mem Earle additionné de glutamine et d'antibiotiques.

13.3.2 Extraction de l'ARN génomique et réaction PCR

L'ARN viral isolé de filtrats d'organes de spécimens cliniques a été extrait selon la méthode Chomczynski et Sacchi (1987) décrite à la section 10.1.1. Une fois extrait, l'ARN était préparé pour la réaction RT-PCR selon le protocole décrit à la section 10.3.1.

13.3.3 Examen histopathologique

Les coupes des différents tissus ont été préparées selon la méthode standard (Dea *et al.*, 1991a). Après leur fixation dans une solution tamponnée de 10 % de formaldéhyde, les morceaux de tissus de 1 cm^3 ont été enrobés dans de la paraffine et les coupes de 5 μm d'épaisseur ont été préparées à l'aide d'un microtome. Les coupes ont été par la suite colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HPS) et selon la technique de coloration von Kossa, telle que décrite dans le manuel de techniques virologiques de Payment *et al.* (1989).

RÉSULTATS

1. ÉTUDE DE LA CROISSANCE VIRALE

Le but de cette étude sur la croissance du virus EMC était d'abord de vérifier les conditions optimales de culture sur la lignée cellulaire Vero par la souche de référence ATCC VR-129, puis de déterminer le moment propice pour une récolte virale optimale. La possibilité de produire les stocks de virus sur une autre lignée cellulaire a aussi été vérifiée. Cette étude sur la croissance virale EMC a aussi porté sur l'analyse d'échantillons cliniques provenant de fermes porcines québécoises ayant été acheminés à notre laboratoire. Ces échantillons étaient constitués plus spécialement de sérums, de liquides thoraciques, de liquides foetaux et de tissus de porcelets ou de foetus autolysés.

1.1 Culture du virus EMC porcin sur la lignée Vero

Dès le deuxième passage, les cellules Vero infectées avec la souche de référence VR-129 du virus EMC montraient une dégénérescence en foyers caractérisée par un arrondissement cellulaire et débutant de 24 à 48 heures après le début de l'infection. Ces mêmes changements cytopathiques ont été observés après 1 ou 2 passages des homogénats de tissus d'avortons, de poumons de porcelets et de liquides thoraciques provenant de 4 fermes québécoises. Après 3 passages consécutifs, une dégénérescence complète des feuillets cellulaires a été obtenue 24 heures post-inoculation. Aucun effet cytopathique n'a été observé dans les cultures cellulaires inoculées avec des homogénats de rate, de coeur, d'amygdales et de cerveau de porcelets normaux.

Lors d'essais de co-cultures de cellules infectées et normales, l'utilisation d'un inoculum de cellules infectées, représentant 10 % du volume final de culture et provenant d'une culture ayant présenté un effet cytopathique 3+ ou 4+ (voir section 1.1.1) entraînait la destruction du feuillet cellulaire en moins de 3 jours. Un apport constant de cellules non infectées était donc primordial au maintien de la propagation virale.

1.1.1 Effet cytopathique

L'effet cytopathique induit dans les cultures cellulaires Vero par les différents isolats porcins du virus EMC était caractéristique. En moins de 24 heures post-infection, on pouvait observer des foyers de cellules arrondies qui progressivement se détachaient du feuillet cellulaire. Puis, il y avait vacuolisation du cytoplasme et un éclatement ou lyse des cellules. Les cellules devenaient bi-réfringentes et s'aggrégeaient en amas cristallins non-structuraux. La progression de l'effet cytopathique telle qu'observée en microscopie photonique à un grossissement de 100X était décrite comme suit. Au début de l'infection, les cellules de forme épithéloïde s'arrondissaient et on les retrouvait dispersées au niveau du feuillet cellulaire; cet effet cytopathique était désigné 1+. Lorsque l'on retrouvait plusieurs petits foyers de cellules arrondies ou en aggrégats, l'effet cytopathique était désigné 2+. Lorsqu'il était possible de mettre en évidence plusieurs foyers de lyse (plages), et qu'on observait des cellules arrondies en suspension dans le milieu de culture et que plusieurs cellules montraient un cytoplasme vacuolé, le degré de dégénérescence était qualifié de 3+. Lorsque la majorité des cellules infectées étaient observées sous forme

d'amas et qu'il y avait une destruction massive du feuillet cellulaire, l'effet cytopathique était qualifié de 4+ (Figure 3).

1.2 Culture du virus EMC porcin sur la lignée BHK-21

Les feuillets confluents de cellules BHK-21 ont été inoculés avec des liquides thoraciques et des homogénats de tissus d'avortons obtenus de fermes québécoises aux prises avec des problèmes reproducteurs et/ou respiratoires. Dans tous les cas, il n'a pas été possible de démontrer d'effet cytopathique quelconque, et ce, après 2 passages successifs. Cependant, il a été possible d'adapter 3 isolats québécois du virus EMC sur cette lignée cellulaire après leur adaptation sur cellules Vero. L'effet cytopathique induit était alors comparable à celui observé sur les cellules Vero. Dans tous les cas, des titres infectieux de 10^7 à $10^{6.6}$ $DCEP_{50}$/ml ont été obtenus après 3 ou 4 passages consécutifs sur les cellules BHK-21. La souche de référence simienne VR-129 a pu être propagée sur les deux lignées cellulaires ci-haut mentionnées sans aucune adaptation au préalable, les titres infectieux ayant été estimés à environ 10^7 $DCEP_{50}$/ml dès le 3ième passage.

1.3 Immunofluorescence indirecte

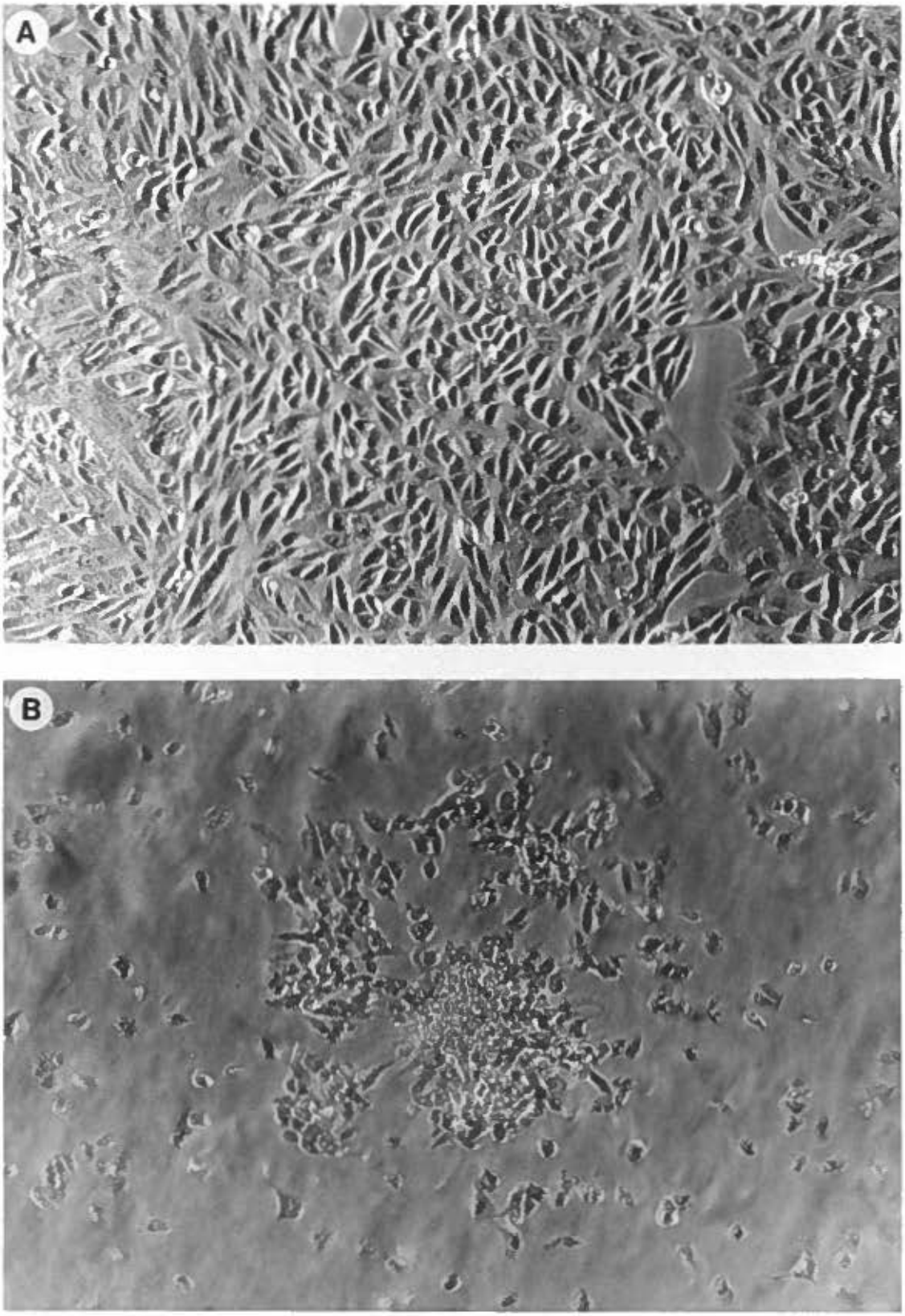
L'effet cytopathique induit sur les deux types de lignée cellulaire n'étant pas spécifique à ce virus, il était donc nécessaire de procéder à son identification sérologique. Une épreuve d'immunofluorescence indirecte, utilisant un sérum de lapin hyperimmun produit contre la souche de référence VR-129, a permis de confirmer la présence d'antigènes viraux dans

FIGURE 3. Microphotographies en contraste de phase de l'effet cytopathique induit par la souche de référence ATCC VR-129 du virus EMC sur les cellules Vero.

Effet cytopathique 4+ observé au second passage sur cellules Vero inoculées avec des homogénats de tissus foetaux ou de poumons de porcelets malades à un grossissement de 40X.

A. Feuillet cellulaire témoin montrant un tapis uni de cellules

B. Feuillet cellulaire infecté 24 heures après incubation à 37°C montrant un amas de cellules infectées.


A
B

plusieurs cellules. La fluorescence était cytoplasmique, plutôt périnucléaire, et uniforme; la plupart des cellules positives étant retrouvées sous forme d'amas. Toutefois, des cellules isolées pouvaient aussi présenter le même patron de fluorescence (Figure 4). La fluorescence observée pour les cellules isolées était de façon générale plus intense que dans le cas des cellules en amas.

Le sérum hyperimmun produit chez un lapin suite à l'infection avec la souche de référence VR-129 avait un titre de 25,600. Après 4 passages successifs du virus sur cellules Vero, il était possible de mettre en évidence la présence de cellules fluorescentes obtenues en employant des dilutions de l'antisérum jusqu'à un titre de 2 560, et ce, moins de 4 à 6 heures suivant l'inoculation. Par la suite, le nombre de cellules fluorescentes augmentait considérablement, la fluorescence optimale étant observée après 12 à 18 heures post-infection. L'intensité diminuait par la suite à mesure qu'augmentait le nombre de cellules dégénérées.

1.4 Clonage par plages

Il nous a été possible, à partir des échantillons cliniques provenant de plusieurs fermes québécoises, d'isoler 9 souches porcines du virus EMC; la confirmation a été établie par immunofluorescence indirecte à l'aide de l'antisérum produit contre la souche de référence VR-129. Deux des isolats québécois ont été cultivés à partir de poumons de porcelets à la mamelle et en post-sevrage affectés de troubles respiratoires sévères. Les autres ont été

FIGURE 4. Fluorescence cytoplasmique observée dans les cellules Vero infectées avec un homogénat de la souche québécoise Q.90-890 du virus EMC (Grossissement 400X).

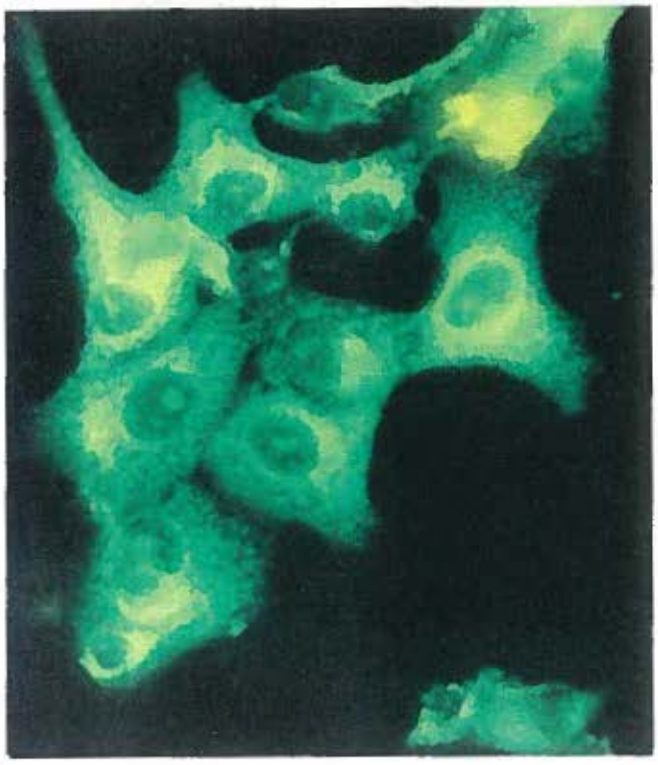
A. Feuillet cellulaire non-infecté

B. Cellules infectées présentant une fluorescence cytoplasmique intense 6 heures après l'inoculation et incubation en présence d'un sérum de lapin homologue.

La fluorescence observée est cytoplasmique et plutôt périnucléaire.

A

B



isolés des liquides ou tissus d'avortons. Du fait que les divers isolats ont été retrouvés au niveau d'organes bien distincts, nous avions toutes les raisons de croire qu'il pouvait exister plusieurs variants de ce virus, ce qui aurait pu expliquer la variation au niveau du tropisme et des organes-cibles (Tableau 1).

La technique de clonage par plages a été utilisée dans le but d'uniformiser les préparations virales et pour vérifier s'il était possible de distinguer entre les souches abortives et respiratoires selon le diamètre des plages produites sur cellules Vero. Plusieurs auteurs ont eu recours auparavant à cette technique afin de distinguer certaines souches, la taille des plages variant d'une souche ou d'un isolat à l'autre (Lipton *et al.*, 1991; Lipton, 1980). Pour tous les isolats québécois du virus EMC, les plages obtenues étaient symétriques, bien définies et d'un diamètre d'environ 2 à 5 mm, et ce, 36 à 48 heures suivant l'infection (Figure 5). Cependant, les isolats clonés ne démontraient aucune variabilité significative dans la taille des plages.

2. PATHOGÉNICITÉ DES ISOLATS PORCINS DU VIRUS EMC

Chez l'espèce porcine, le virus EMC est d'abord reconnu comme étant responsable de problèmes associés à la reproduction. Toutefois, parmi les neuf souches québécoises analysées dans cette étude, sept d'entre elles avaient été initialement isolées des tissus ou liquides thoraciques d'avortons, tandis que les deux autres avaient été isolées des poumons de porcelets dyspnéiques à l'âge post-sevrage. Les lésions macroscopiques et microscopi-

TABLEAU 1. ORIGINE ET CARACTÉRISTIQUES D'ISOLATS QUÉBÉCOIS DU VIRUS EMC PORCIN

ISOLAT	SOURCE	TITRES D'INFECTIVITÉ
ATCC	Singe	7,50
Q.90-890	Poumons de porcelets	5,00
Q.90-898	Foetus de porcelets	7,40
Q.90-945	Poumons de porcelets	7,20
Q.90-32004	Foetus de porcelets	7,00
Q.90-5105	Liquides foetaux	7,00
Q.90-5415	Liquides foetaux	7,25
Q.90-5505	Liquides foetaux	7,33
Q.90-6041	Foetus de porcelets	6,50

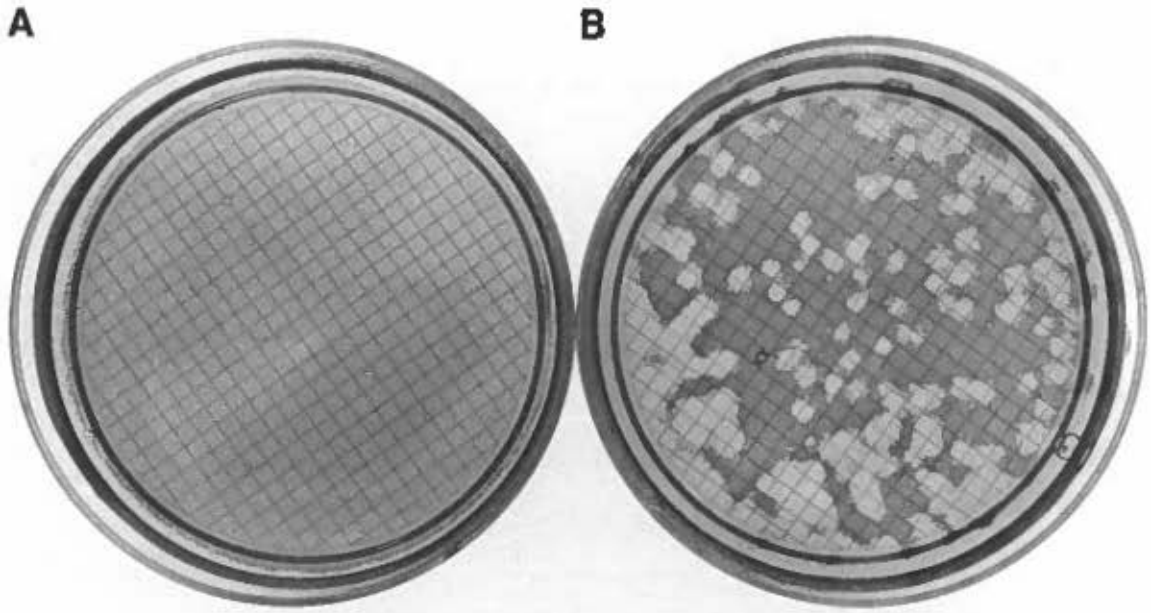
LÉGENDE :

Les titres d'infectivité sont donnés en log_{10} et ont été déterminés après le troisième passage sur cellules Vero.

FIGURE 5. Plages typiques obtenues pour les isolats québécois du virus EMC sur les cellules Vero.

A. Feuillet cellulaire non-infecté

B. Feuillet cellulaire infecté par la dilution 10^{-7} du surnageant de culture lors du troisième passage de la souche Q.90-890.


A
B

ques observées chez les avortons et les porcelets sevrés n'étant pas typiques de celles décrites dans la littérature, nous avons voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle certaines des souches isolées de fermes québécoises appartiennent à un variant pneumotrope du virus (Acland et Littlejohns, 1986; Links *et al.*, 1986; Love et Grewal, 1986). Des essais de reproduction expérimentales de la maladie chez des souris et des porcelets gnotobiotes ont été réalisés, en insistant sur les analyses histopathologiques.

2.1 Étude de la virulence chez les souris

Lorsqu'inoculés par la voie intrapéritonéale à des souris de 4 à 5 semaines d'âge, tous les isolats du virus EMC étudiés se sont avérés très virulents, causant la mort en moins de 96 heures. Dans le cas de la souche de référence VR-129, les souris inoculées avec des doses de virus correspondant à 10^4 et 10^5 $DCEP_{50}$ manifestaient les premiers signes cliniques après moins de 24 heures post-inoculation. Les souris devenaient apathiques, réagissaient très peu aux stimuli externes et leurs poils devenaient ébouriffés. Une paralysie des membres postérieurs était habituellement observée vers le deuxième ou troisième jour. La paralysie se généralisait progressivement et évoluait invariablement vers la mort. Les mêmes manifestations cliniques ont été observées lors d'infections par les neuf isolats québécois du virus.

Dans tous les cas, la dose létale (DL_{50}) fut évaluée entre 10 et 100 $DCEP_{50}$ de virus. Aucune lésion macroscopique ne fut observée chez les souris euthanasiées après 48 et 96

heures suivant l'inoculation. Les examens histologiques de différents tissus ont révélé la présence de lésions d'encéphalite et de méningo-encéphalite non-suppuratives chez les souris euthanasiées au quatrième jour de l'infection. On pouvait noter la présence d'une infiltration lymphomonocytaire autour des artérioles et au niveau des méninges (Figure 6). Les autres tissus étaient normaux.

2.2 Essais de reproduction expérimentale chez des porcelets

Des expériences de reproduction expérimentales ont aussi été réalisées chez des porcelets afin de vérifier l'existence d'un variant pneumotrope parmi les souches porcines du virus EMC. L'isolat Q.90-890 récupéré de poumons de porcelets ou de broyats de tissus de souriceaux infectés expérimentalement, a été propagé en cultures cellulaires et inoculé par voies intrapéritonéale et intramusculaire à des porcelets gnotobiotes, obtenus par césarienne de truies sérologiquement négatives gardées stérilement.

Chez les porcelets inoculés avec une dose de 10^6 $DCEP_{50}$/ml du virus, les différentes manifestations cliniques observées consistaient en de l'hyperthermie, une respiration abdominale forcée et une fatigue ou dépression plus ou moins marquée. La fièvre était diphasique; un premier pic de 40 à 41°C a été noté dans les premières 24 heures, puis la température redevenait normale, pour s'élever de nouveau à 40°C 72 heures suivant l'inoculation. Aucune mortalité ne fut observée, les porcelets récupérant de l'infection après 8 à 10 jours.

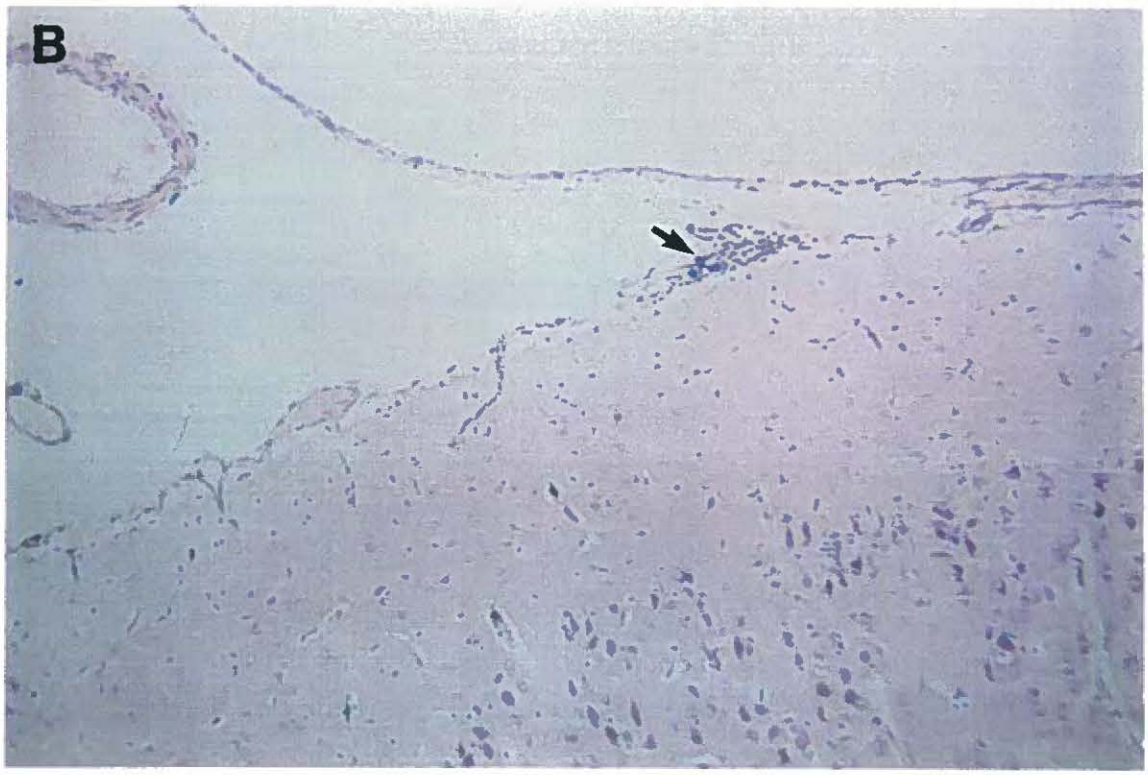
FIGURE 6. Lésions de méningite et d'encéphalite non-suppuratives observées chez des souris CD-1 suite à une infection expérimentale à l'aide de la souche Q.90-890 du virus EMC porcin 96 heures post-inoculation.

A : Présence de foyers inflammatoires (têtes de flèches) et de manchons périvasculaires (flèches) au niveau de la matière grise du cerveau.

B : Infiltration lymphomonocytaire au niveau des méninges (flèche).

Les lésions histopathologiques ont été observées à un grossissement de 40X.

A


B

Chez les porcelets euthanasiés entre les jours 3 et 5 de l'infection, il a été possible de démontrer dans quelques cas la présence de petits foyers de nécrose blanchâtres au niveau du muscle cardiaque caractérisés microscopiquement par de la pycnose cellulaire et de la dégénérescence hyaline des myocytes. Plus tard, chez quelques porcelets, il y avait accumulation au niveau de ces foyers de nécrose, d'un dépot de calcium (calcification) et les lésions devenaient circonscrites par des cellules lymphomonocytaires (Figure 7A et B). Les dépots de calcium étaient visibles après coloration von Kossa (Figure 7C). Par ailleurs, les lobes pulmonaires caudaux étaient généralement indurés et ne s'affaissaient pas. La surface des poumons était légèrement hypertrophiée, avec un aspect légèrement en mosaïque. Dans la plupart des cas, les ganglions lymphatiques médiastinaux étaient hypertrophiés. Microscopiquement, il y avait une infiltration des septa alvéolaires par des cellules lymphomonocytaires causant un épaississement, mais n'endommageant pas les alvéoles pulmonaires et ne produisant pas d'exudat. Il y avait absence de corps d'inclusion et de nécrose de l'épithélium des bronches (Figure 8).

2.3 Comparaison des diverses épreuves diagnostiques

Les tissus de porcelets et de souris infectés expérimentalement, une fois prélévés et clarifiés, ont été examinés du point de vue sérologique et virologique. Les spécimens étaient mis en culture afin de procéder à l'isolement viral. Après un seul passage sur la lignée cellulaire Vero, un effet cytopathique détruisant rapidement le feuillet cellulaire était obtenu à partir de tissus prélévés du myocarde, des amygdales et des poumons de porcelets.

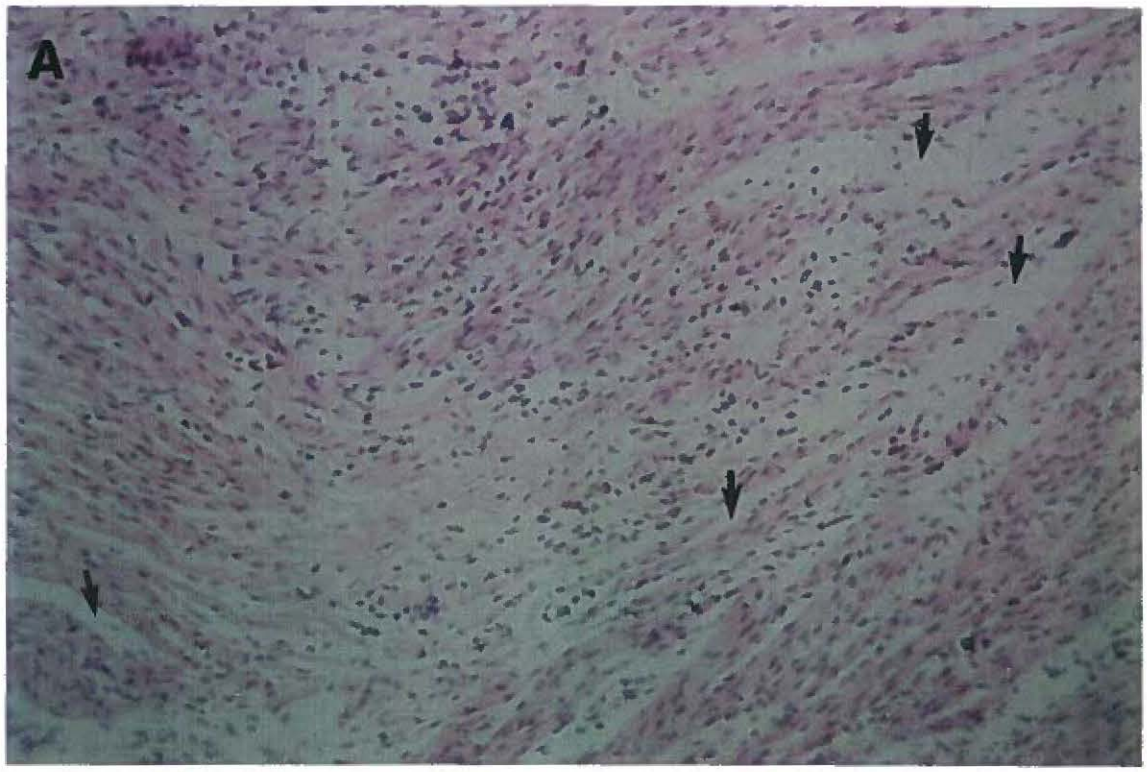
FIGURE 7. Lésions histopathologiques observées au niveau du coeur de porcelets à la mamelle suite à une infection expérimentale à l'aide de la souche Q.90-890 du virus EMC.

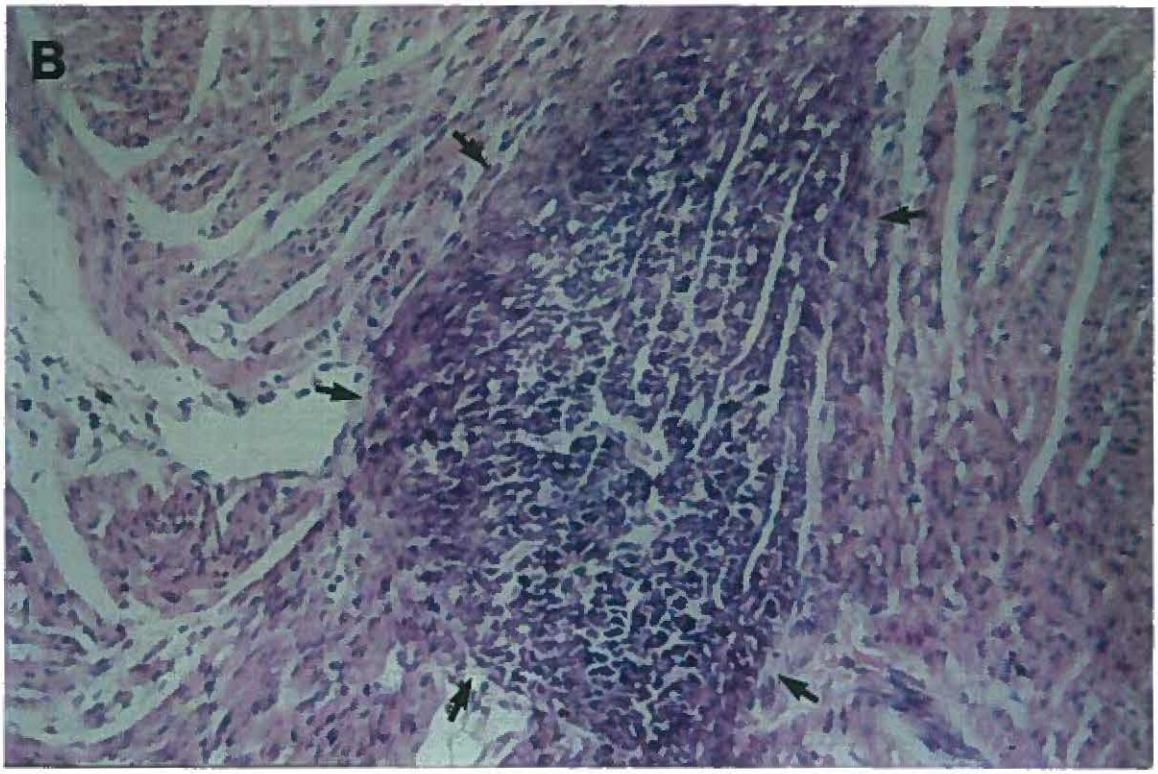
A. Foyer de myocardite interstitelle caractérisée par des cellules du myocarde dissociées par de l'oedème (flèches) et infiltration par des cellules histiocytaires et monocytaires (coloration HPS) (3 jours post-inoculation).

B. Foyers de nécrose bien circonscrits (flèches) , entourés d'un collet de cellules mononucléaires (coloration HPS) (6 jours post-inoculation).

C. Foyers de nécrose calcifiés (flèches) tels qu'observés en coloration von Kossa (6 jours post-inoculation).

Les lésions histopathologiques ont été observées à un grossissement de 40X.


A


B

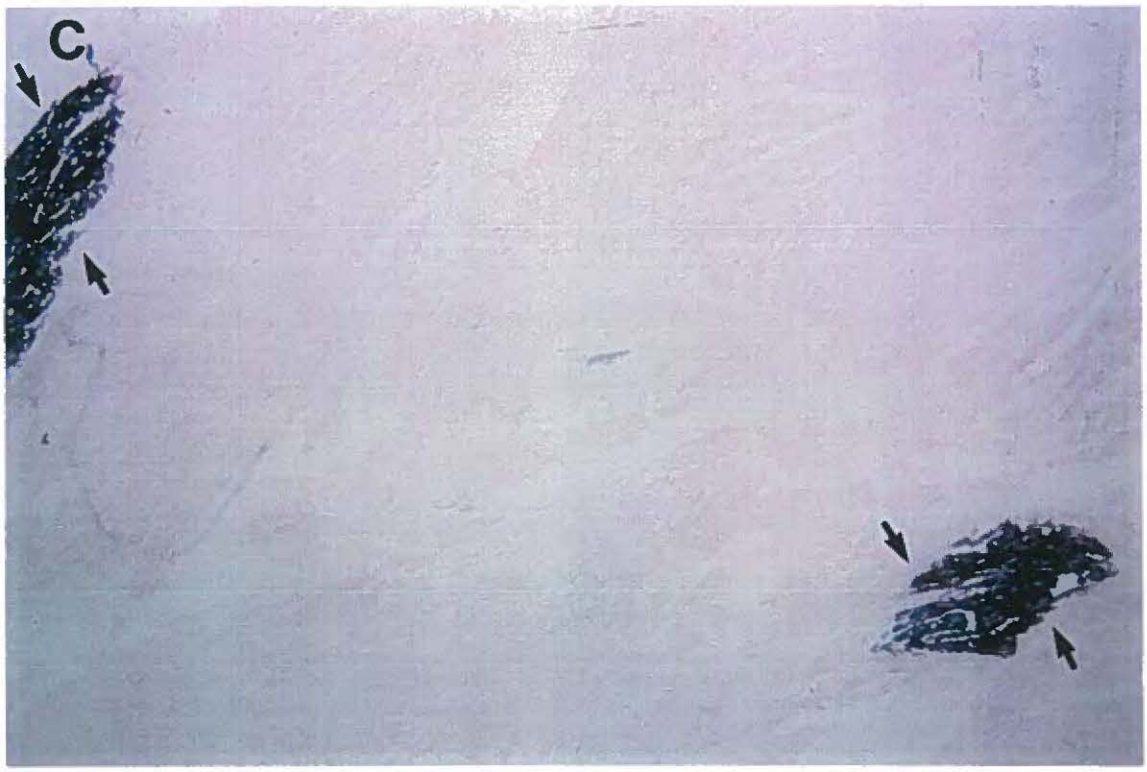
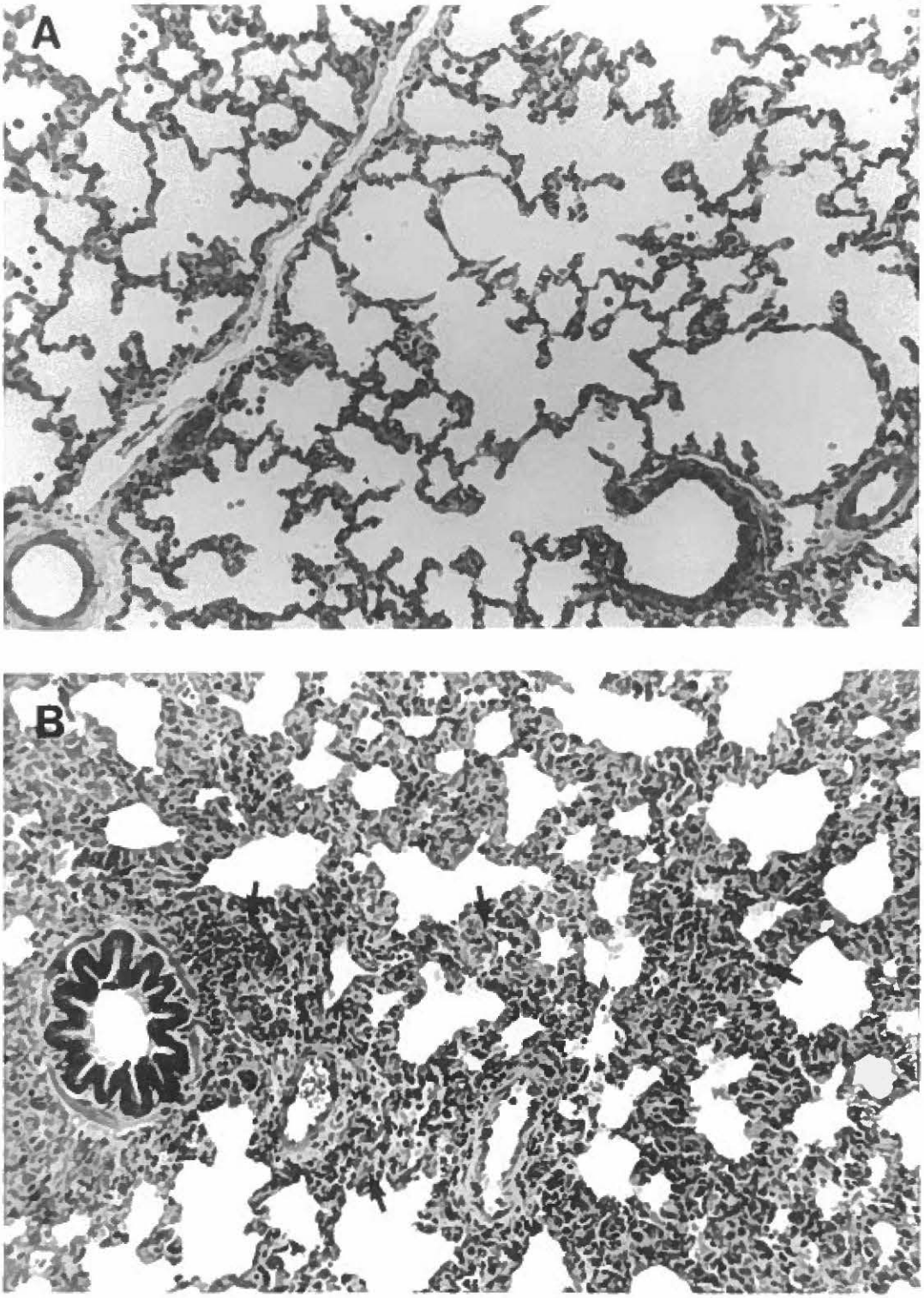

C

FIGURE 8. Lésions histopathologiques observées au niveau des poumons de porcelets à la mamelle affectés de problèmes respiratoires suite à une infection expérimentale à l'aide de la souche Q.90-890 du virus EMC.

A. Coupe de tissus pulmonaires normaux

B. Coupe de tissus pulmonaires provenant de porcelets à la mamelle affectés de pneumonie interstitielle caractérisée par un épaississement des septa alvéolaires (flèches) dû à une infiltration par des cellules lymphomonocytaires, 3 jours post-inoculation.

Les lésions ont été observées à un grossissement de 40X.


A
B

Cependant, l'isolat Q.90-890 n'a pu être cultivé à partir du cerveau des porcelets et ce, même après 2 passages successifs.

Les tissus ont aussi été soumis à une épreuve d'immunofluorescence indirecte qui s'est avérée peu efficace dans la détection; des foyers de fluorescence cytoplasmique de très faible intensité n'ont été observés qu'au niveau des amygdales et du coeur. Aucune réaction positive ne fut détectée au niveau des tissus prélevés de poumons et de cerveau. Au cours des essais de reproduction expérimentale, une réponse humorale spécifique anti-EMC n'a pu être détectée 6 jours post-inoculation, mais des titres neutralisants variant de 64 à 128 ont été obtenus 8 jours suivant l'inoculation.

3. ÉTUDE DE LA STRUCTURE POLYPEPTIDIQUE ET COMPARAISON ANTIGÉNIQUE DU VIRUS EMC

3.1 Concentration et purification virale

La détermination de la densité de flottation du virus était une étape préparatoire à la purification du virus. Le type d'épreuves auquel était destiné la préparation virale régissait les niveaux de concentration et le degré de pureté à atteindre.

3.1.1 Détermination de la densité de flottation du virus EMC sur gradients de CsCl

La densité de flottation du virus EMC ATCC VR-129 marqué à la L-méthionine [^{35}S] a été déterminée après ultracentrifugation isopycnique sur gradient de densité de CsCl. Tel

que démontré à la Figure 9, le virus a généré 2 bandes opalescentes ou 2 pics d'absorbance très rapprochées correspondant à des densités de 1,32 et 1,35 g/ml (Figure 9). L'examen des différentes fractions de ces gradients par microscopie électronique (Figure 10) a révélé que la majorité des particules virales présentes dans les fractions de densité de 1,32 g/ml étaient électro-transparentes (de coloration noire) suggérant qu'elles étaient dépourvues d'acide nucléique Fields *et al.*, 1988). Par contre, le second pic d'absorbance correspondait à des particules virales complètes, électro-opaques. Les particules virales contenues dans la fraction de densité 1,35 g/ml, observées en microscopie électronique par imprégnation négative, étaient intactes et abondantes. Il s'agissait de particules virales icosaédriques de 30 à 32 nm de diamètre, non-enveloppées (Figure 10).

3.2 Comparaison sérologique des isolats québécois du virus EMC porcin

3.2.1 Test d'inhibition de l'activité hémagglutinante

Après trois passages sur les cellules Vero, les titres infectieux des différents isolats du virus EMC, cultivés à partir des tissus ou liquides d'avortons et des tissus de porcelets dyspnéiques, variaient de $10^{5,0}$ à $10^{7,5}$ $DCEP_{50}$/ml (Tableau 2). Dans tous les cas, il a été possible d'observer une activité hémagglutinante avec les surnageants des cultures cellulaires infectées lorsque testés avec les érythrocytes de rat et de cochon d'Inde. Les titres variaient entre 32 et 256 selon le type d'érythrocytes.

FIGURE 9. Profil de purification de la souche Q.90-890 du virus EMC après ultra-centrifugation isopycnique sur gradient de CsCl.

○ : Valeur d'absorbance à 280 nm.

● : Comptes par minute (CPM) des fractions obtenues lors de la purification du virus marqué à la méthionine ^{35}S.

■ : Densité de chlorure de césium (CsCl) en g/ml.

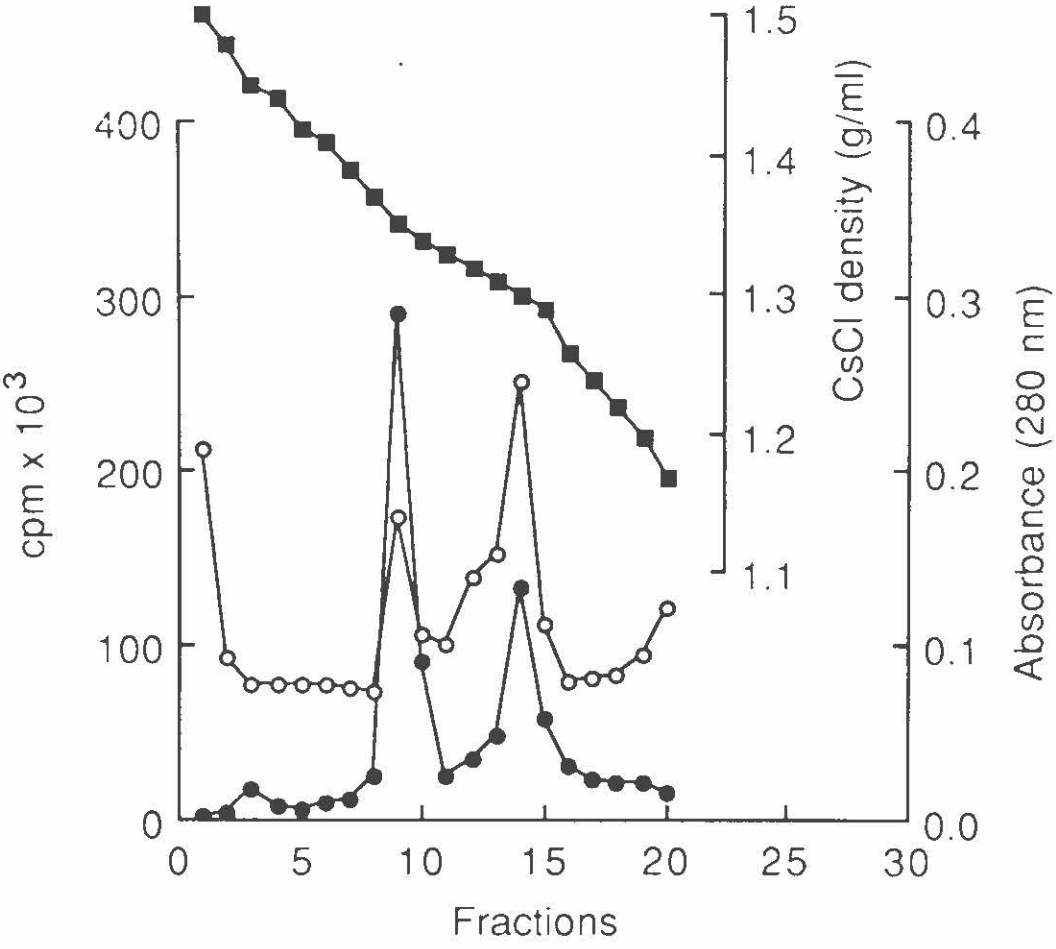

cpm x 10^3
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
Fractions
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
CsCl density (g/ml)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Absorbance (280 nm)

FIGURE 10. Micrographie électronique en imprégnation négative des particules virales retrouvées dans la fraction de densité de CsCl de 1,35 g/ml.

La barre réprésente 100 nm.

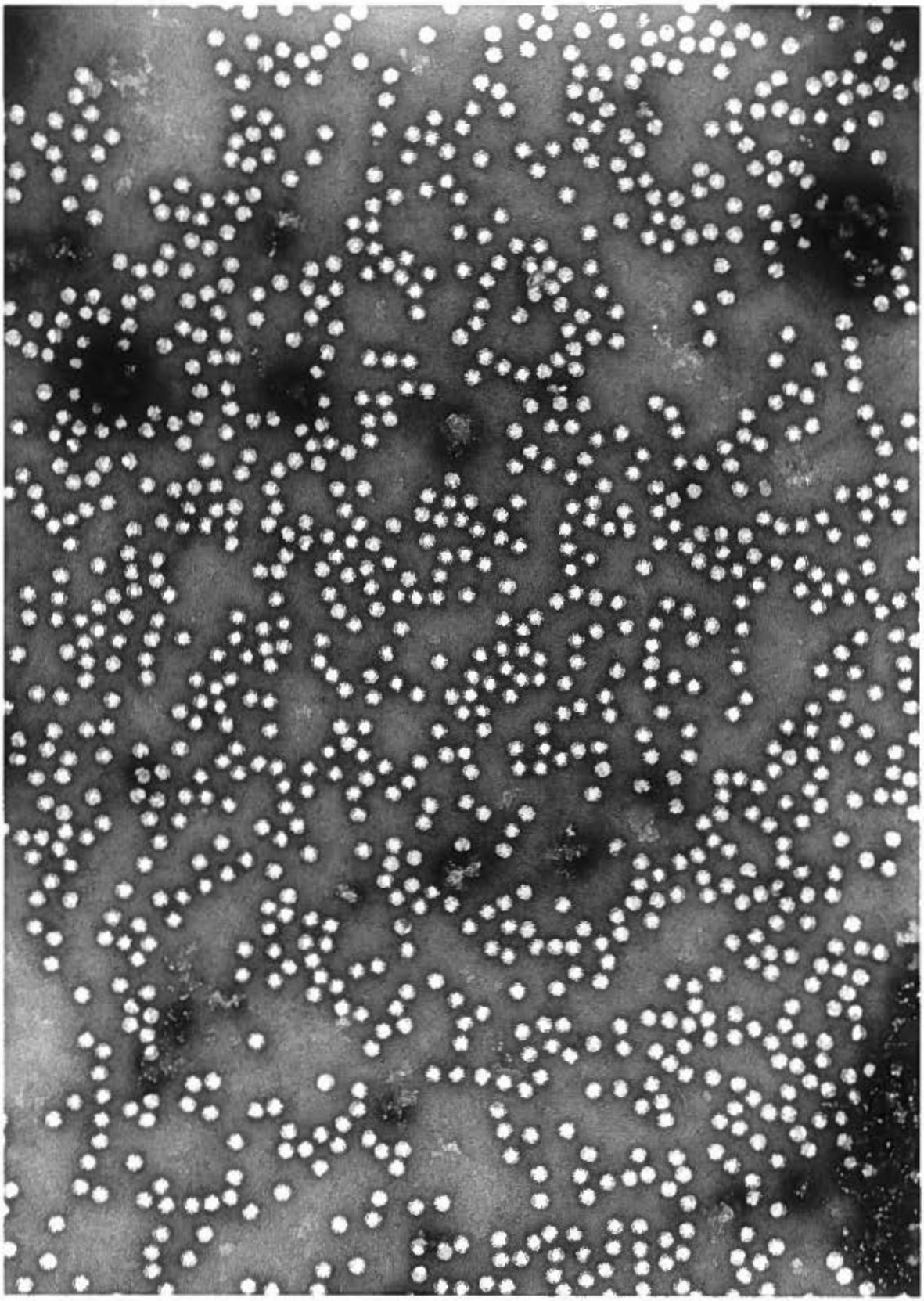

0
100 nm

TABLEAU 2. Comparaison sérologique des isolats québécois du virus EMC porcin

ISOLAT	TITRES HA RAT	TITRES HA COBAYE	TITRES SN CONTRE SÉRUM ANTI-ATCC
ATCC	256	256	>12,800 <25,600
Q.90-890	4	-	6,400
Q.90-898	32	64	>12,800 <25,600
Q.90-945	128	64	>12,800 <25,600
Q.90-32004	128	128	>12,800 <25,600
Q.90-5105	32	32	>6,400 <12,800
Q.90-5415	64	64	>12,800 <25,600
Q.90-5505	64	64	12,800
Q.90-6041	64	64	3,200

LÉGENDE :

Les titres HA (hémagglutination) sont équivalents à la réciproque de la plus haute dilution du surnageant agglutinant les érythrocytes de rat et de cobaye. Un tampon saline KCl-Borate a été utilisé pour diluer les échantillons (Joo *et al.*, 1988).

Les titres SN (séroneutralisation) sont équivalents à la réciproque de la plus haute dilution de l'antisérum produit chez le lapin contre la souche ATCC VR-129 inhibant 400 $DCEP_{50}$ de virus.

3.2.2 Réactivité croisée selon le test de séroneutralisation

Tous les isolats québécois du virus EMC étaient reconnus par l'antisérum produit chez les lapins contre la souche de référence simienne ATCC VR-129 (Tableau 2). Aucun des isolats n'étaient neutralisés suite à l'incubation en présence d'antisérum contre les sérotypes 1 à 6 des entérovirus porcins (Dea *et al.*, 1991a). Les titres de neutralisation obtenus suite à la réactivité du sérum contre la souche de référence ATCC VR-129 étaient comparables dans le cas de six des isolats porcins du virus EMC testés, les titres variant entre 12,800 et 25,600. Toutefois, des titres inférieurs dont les valeurs se situaient entre 3,200 et 12,800 ont été obtenus dans le cas de l'isolat Q.90-890, cultivé à partir de poumons d'un porcelet dyspnéique, des isolat Q.90-6041 et Q.90-5105, cultivés à partir de liquides foetaux.

3.2.3 Comparaison des profils polypeptidiques

L'objectif de cette étape était d'établir le profil protéique du virus EMC produit sur la lignée cellulaire Vero. L'identification des différentes protéines virales était essentielle afin de vérifier l'hypothèse de variants parmi les isolats récupérés à partir de tissus et de liquides thoraciques de spécimens cliniques. Des variations majeures au niveau des déterminants antigéniques de différentes protéines virales peuvent se traduire par une absence de réactivité en immunobuvardage ou radio-immunoprécipitation d'antisérums spécifiques ou par des variations au niveau de la mobilité électrophorétique de différentes protéines virales.

Les profils électrophorétiques des protéines de différents isolats du virus EMC, tel que révélés après incubation en présence du sérum hyperimmun de lapin produit contre la souche de référence simienne ATCC VR-129, sont illustrées dans la Figure 11. Cet antisérum a permis de révéler par immunobuvardage la présence de 4 ou 5 polypeptides majeurs de poids moléculaires variant de 14 000 à 39 000 à partir de lysats de cellules infectées par le virus homologue et autres isolats porcins. Les polypeptides révélés correspondaient aux 4 protéines de la capside VP1 (32 000), VP2 (29 000), VP3 (25 500) et VP4 (14 000). La protéine VP0 (39 000) correspondait au précurseur donnant naissance aux protéines VP2 et VP4. Les protéines virales sont toutes issues d'un clivage protéolytique de la polyprotéine, les protéines de la capside ne faisant pas exception. Étant donné que la dernière étape du clivage de cette polyprotéine conduit à la maturation du peptide VP0, se scindant en VP2 et VP4, il ne fut possible qu'à de très rares occasions d'observer la bande protéique correspondant à la protéine VP4. La raison étant que les réactions de maturation ne peuvent être généralement observées qu'*in vivo* et cela, seulement lors des dernières étapes de la morphogénèse.

Les résultats des analyses par immunobuvardage utilisant le sérum hyperimmun, produit chez les lapins contre la souche de référence simienne ATCC VR-129, ont démontré que tous les isolats québécois du virus EMC, à l'exception des isolats Q.90-890 et Q.90-6041, partageaient les épitopes présents sur les 5 protéines homologues à la souche ATCC VR-129 (Figure 12). Deux profils électrophorétiques distincts ont toutefois été révélés

FIGURE 11. Profils électrophorétiques et d'immunobuvardage des protéines structurales majeures d'isolats québécois du virus EMC.

Les virions présents dans les surnageants de culture clarifiés ont été concentrés par ultracentrifugation contre un coussin de 30% (p/v) de saccharose, solubilisés dans le tampon de Laemmli, et leur contenu protéique analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS. Suite à leur transfert électrophorétique sur membrane de nitrocellulose, les protéines ont été révélées à l'aide d'un sérum de lapin hyperimmun anti-EMC (ATCC) et d'une préparation d'immunoglobulines anti-IgG conjuguées à la peroxydase. Le 4-chloro-1-naphtol a été utilisé comme substrat de l'enzyme.

1. Souche de référence ATCC VR-129 concentrée sur coussin de saccharose 30 %
2. Isolat Q.90-945
3. Isolat Q.90-890
4. Isolat Q.90-898
5. Isolat Q.90-6041
6. Souche de référence ATCC VR-129 purifiée sur gradient de CsCl

St. Standard de poids moléculaire

Les chiffres retrouvés à la gauche de la figure indiquent le poids moléculaire estimé (X 10^{-3}) des protéines virales.

Tiré de l'article de Dea *et al.*, 1991 publié dans Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.

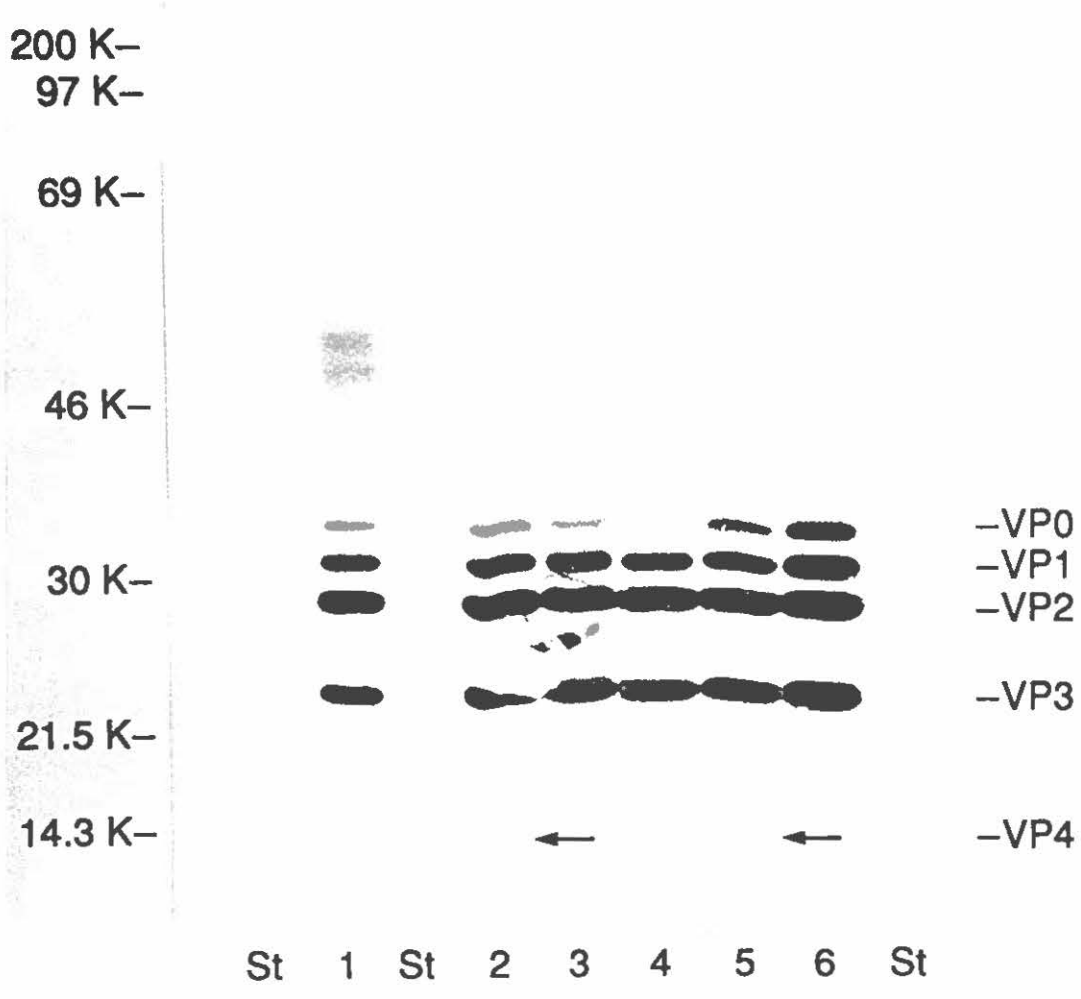
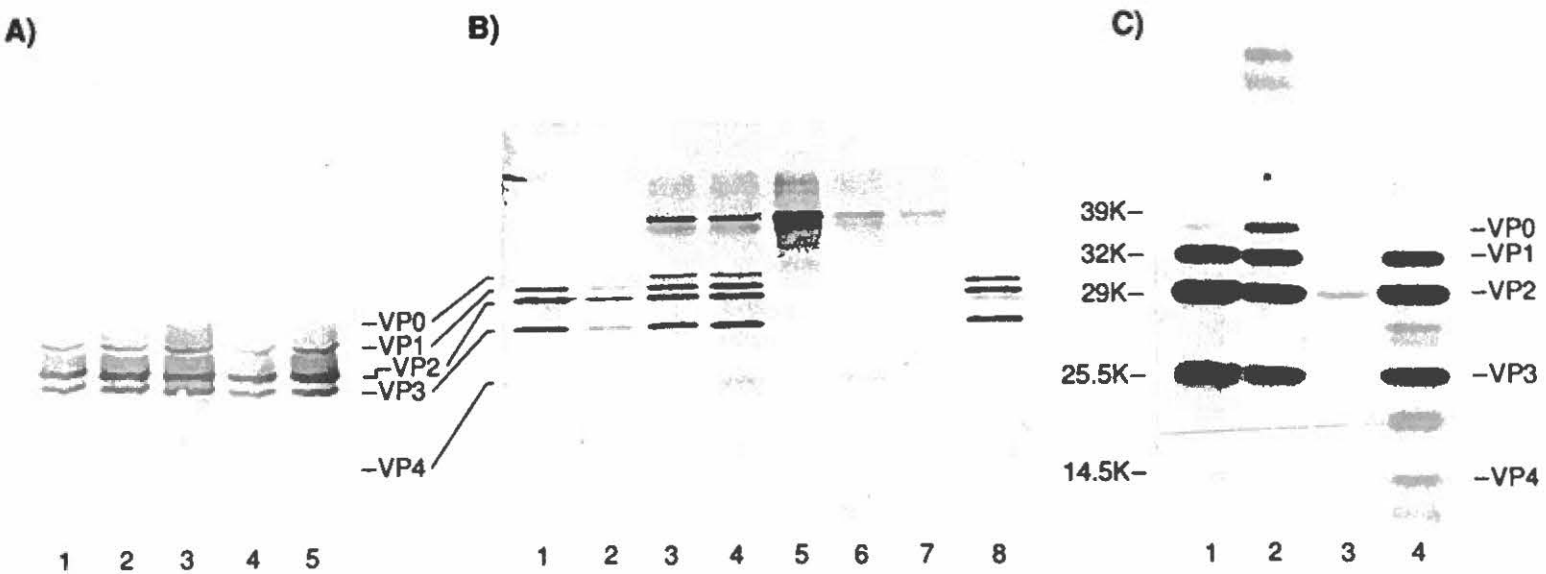

200 K–
97 K–
69 K–
46 K–
30 K–
21.5 K–
14.3 K–
–VP0
–VP1
–VP2
–VP3
–VP4
St
1
St
2
3
4
5
6
St

FIGURE 12. Comparaison des profils électrophorétiques d'isolats québécois du virus EMC porcin.

Les virions présents dans les surnageants de culture clarifiés ont été concentrés par ultracentrifugation contre un coussin de 30% (p/v) de saccharose (A et B) et contre un gradient de CsCl (C), solubilisés dans le tampon de Laemmli, et leur contenu protéique analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% en présence de SDS. Suite à leur transfert électrophorétique sur membrane de nitrocellulose, les protéines ont été révélées à l'aide d'un sérum de lapin hyperimmun anti-EMC (ATCC) et d'une préparation d'immunoglobulines anti-IgG de lapin conjuguées à la peroxydase. Le 4-chloro-1-naphtol a été utilisé comme substrat de l'enzyme.

Isolat Q.90-945 (puits A1)
Isolat Q.90-5505 (puits A2, B3)
Isolat ATCC VR-129 (puits A3, C4)
Isolat Q.90-5415 (puits A4)
Isolat Q.90-6041 (puits A5, B2, C3)
Isolat Q.90-5105 (puits B4)
Isolat Q.90-898 (puits C1)
Isolat Q.90-890 (puits B1, B8, C2)
Isolat Q.90-2459 Entérovirus porcin type 1 (puits B5)
Isolat ONT. 12835 Entérovirus porcin type 6 (puits B6)
Isolat ONT. 11296 Entérovirus porcin type 6 (puits B7)

Les chiffres retrouvés à la gauche de la figure indiquent le poids moléculaire estimé (X 10^{-3}) des protéines virales.


A)
B)
C)
–VP0
–VP1
–VP2
–VP3
–VP4
1 2 3 4 5
1 2 3 4 5 6 7 8
39K–
32K–
29K–
25.5K–
14.5K–
–VP0
–VP1
–VP2
–VP3
–VP4
1 2 3 4

considérant la réactivité du sérum anti-VR-129 envers la protéine VP4 des souches hétérologues d'origine porcine. Alors que l'on croyait avoir obtenu 3 autres isolats, ceux-ci se sont révélés comme étant des Entérovirus porcins de type 1 (Q.90-2459) et 6 (ONT. 12835 et ONT. 11296) (Figure 12; B5, B6, B7). La bande observée dans la partie supérieure des gels en début de migration correspondait à une protéine cellulaire détectée par l'antisérum non-bloquée par l'addition d'albumine sérique bovine au tampon de blocage et de dilution. À deux reprises, ces profils ont été observés. Pour les isolats Q.90-890 (Figure 12; B1, B8, C2) et Q.90-6041 (Figure 12; A5, B2, C3), on remarque l'absence de la protéine VP4 au niveau de leur profil d'immunobuvardage.

4. DÉTECTION ET CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU GÉNOME VIRAL

Cette étape du travail avait pour but d'étudier le virus EMC au niveau moléculaire et d'évaluer l'efficacité des techniques d'amplification enzymatique et d'hybridation moléculaire pour la détection du virus à partir des tissus d'animaux infectés. Les analyses ont porté plus particulièrement sur les séquences nucléotidiques des gènes α et δ codant pour les protéines structurales VP1 et VP4, les plus sujettes à des variations antigéniques. La protéine VP1 est aussi impliquée dans la réponse immunitaire humorale protectrice et le tropisme cellulaire. Des essais d'amplification enzymatique de régions de ces deux gènes ont été réalisés en utilisant différentes combinaisons de paires d'amorces oligonucléotidiques. Certains fragments amplifiés de divers isolats ont été clonés et séquencés.

4.1 Amplification d'ADN complémentaire par RT-PCR

Les résultats préliminaires de l'analyse par électophorèse des fragments amplifiés à partir de l'ADN complémentaire (ADNc) du virus EMC ATCC VR-129 et de l'isolat québécois Q.90-890 sont présentés à la Figure 13. Ces différents fragments ont été obtenus en utilisant, pour la réaction PCR, des températures de dénaturation, d'appariement et d'élongation de 94, 37 et 72°C pour les 5 premiers cycles, alors que les 25 cycles suivants ont été réalisés à des températures de 96, 52 et 72°C, respectivement. Une augmentation au niveau de la température d'appariement dans le deuxième cas a semblé nécessaire afin d'en maximiser l'efficacité. Quatre paires d'amorces oligonucléotidiques ont été synthétisées afin d'étudier les isolats sur une base moléculaire. Ce premier essai avait pour but de vérifier si la mobilité des fragments amplifiés correspondait bien à celle prévue théoriquement. Les amorces 4A-4B permettaient l'amplification du fragment le plus long, d'une mobilité apparente de 806 pb. Des fragments de 410, 434 et 461 pb ont été obtenus à l'aide des trois autres paires d'amorces 2A-2B, 1A-1B et 3A-1B, respectivement.

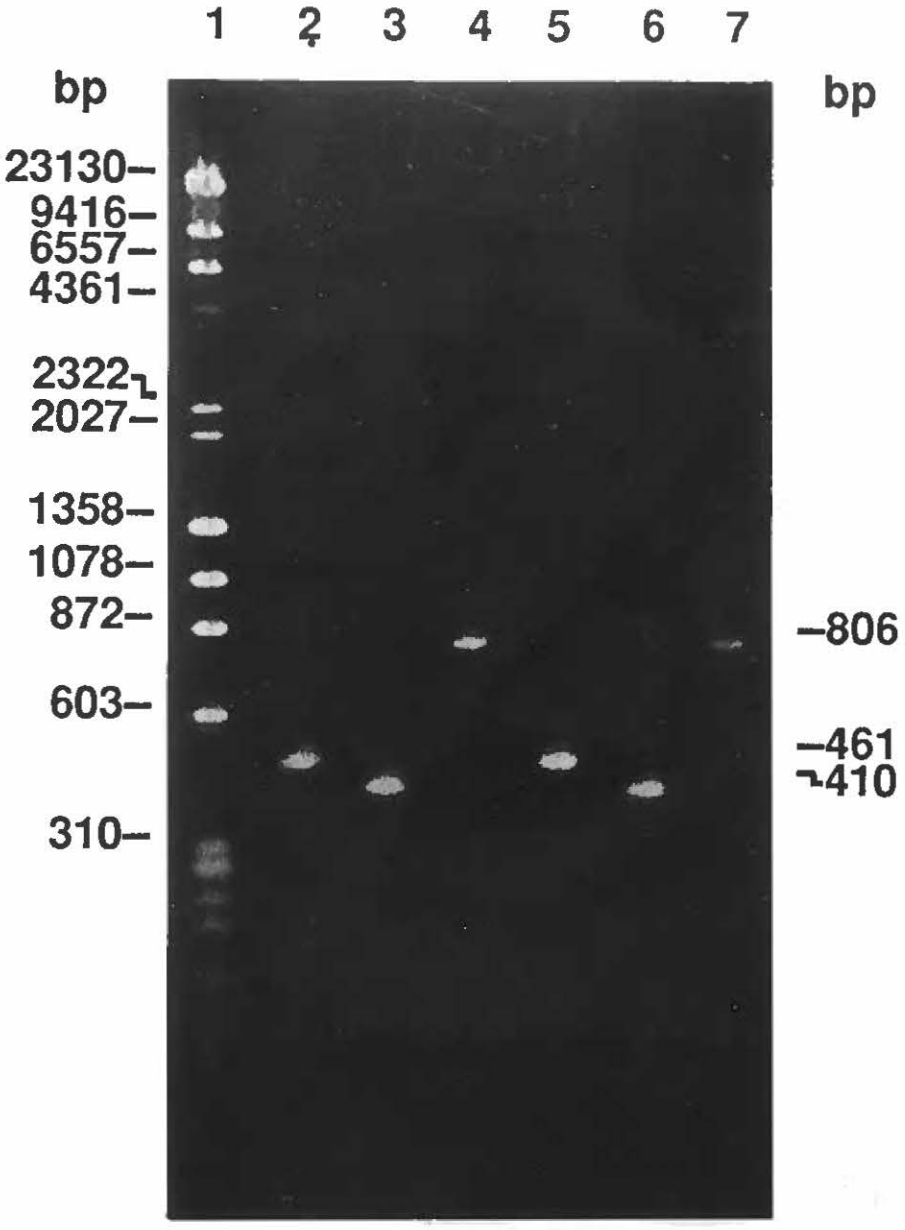
4.2 Spécificité et sensibilité des techniques PCR et d'hybridation

Afin de vérifier la spécificité de la méthode PCR, un second essai a été tenté avec les paires d'amorces 3A-1B et 2A-2B. Initialement, des fragments génomiques ont été amplifiés à partir de la souche de référence EMC ATCC VR-129 et de l'isolat québécois Q.90-890, mais une fausse réactivité a été obtenue envers un entérovirus porcin type 1 (non

FIGURE 13. Amplification de l'ARN génomique de la souche de référence EMC ATCC VR-129 et de l'isolat québécois Q.90-890 utilisant différentes paires d'amorces oligonucléotidiques.

L'ADN complémentaire a été généré par transcriptase inverse à partir de l'ARN génomique du virus purifié par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de densité de CsCl. Pour la réaction d'amplification par la *Taq* polymérase, 30 cycles ont été réalisés à une température d'hybridation de 37°C pour les 5 premiers cycles alors que 25 cycles ont été effectués à une température de 52°C. Les produits amplifiés ont été analysés sur gel d'agarose 1 % et colorés au bromure d'éthidium.

1. Marqueur de taille moléculaire
2-4. Fragments génomiques amplifiés à partir de la souche EMC ATCC VR-129 à l'aide des amorces 3A-1B (2), 2A-2B (3) et 4A-4B (4).
5-7. Fragments génomiques amplifiés à partir de la souche EMC Q.90-890 à l'aide des amorces 3A-1B (5), 2A-2B (6) et 4A-4B (7).


1
2
3
4
5
6
7
bp
bp
23130–
9416–
6557–
4361–
2322–
2027–
1358–
1078–
872–
603–
310–
–806
–461
–410

illustré). Un nouveau protocole expérimental a donc été élaboré pour pallier à cette non-spécificité; la température d'appariement a été augmentée pour produire 30 cycles à des températures de 94, 52 et 72°C. Tel qu'observé à la Figure 14, les paires d'amorces 3A-1B et 2A-2B ont permis d'amplifier les régions génomiques correspondant respectivement aux gènes δ et α des souches ATCC VR-129 et Q.90-890 alors qu'elles n'ont montré aucune réactivité envers les entérovirus porcins types 1 et 6, de même qu'avec le parvovirus porcin, l'herpèsvirus bovin type 1 et l'ADN cellulaire, ce qui démontre la spécificité de ces amorces pour le virus EMC.

Après avoir vérifié l'efficacité de la technique RT-PCR à permettre l'amplification des différentes régions du génome du virus EMC, une autre paire d'amorces a été synthétisée afin de permettre l'amplification de la région correspondant au gène entier codant pour la protéine VP1 (amorce 4A-4B). Cette protéine est la plus exposée de toutes les protéines de la capside et est la plus sujette à des variations antigéniques. Elle possède entre autres les déterminants antigéniques permettant de distinguer les sous-types du virus et elle serait impliquée dans les variations associées au tropisme. La paire d'amorces 2A-2B initialement synthétisée ne correspondait qu'à une partie du gène, l'amorce 2B correspondant à une région des gènes non-structuraux. La spécificité de la paire d'amorces 4A-4B a été confirmée par des analyses d'hybridation moléculaire.

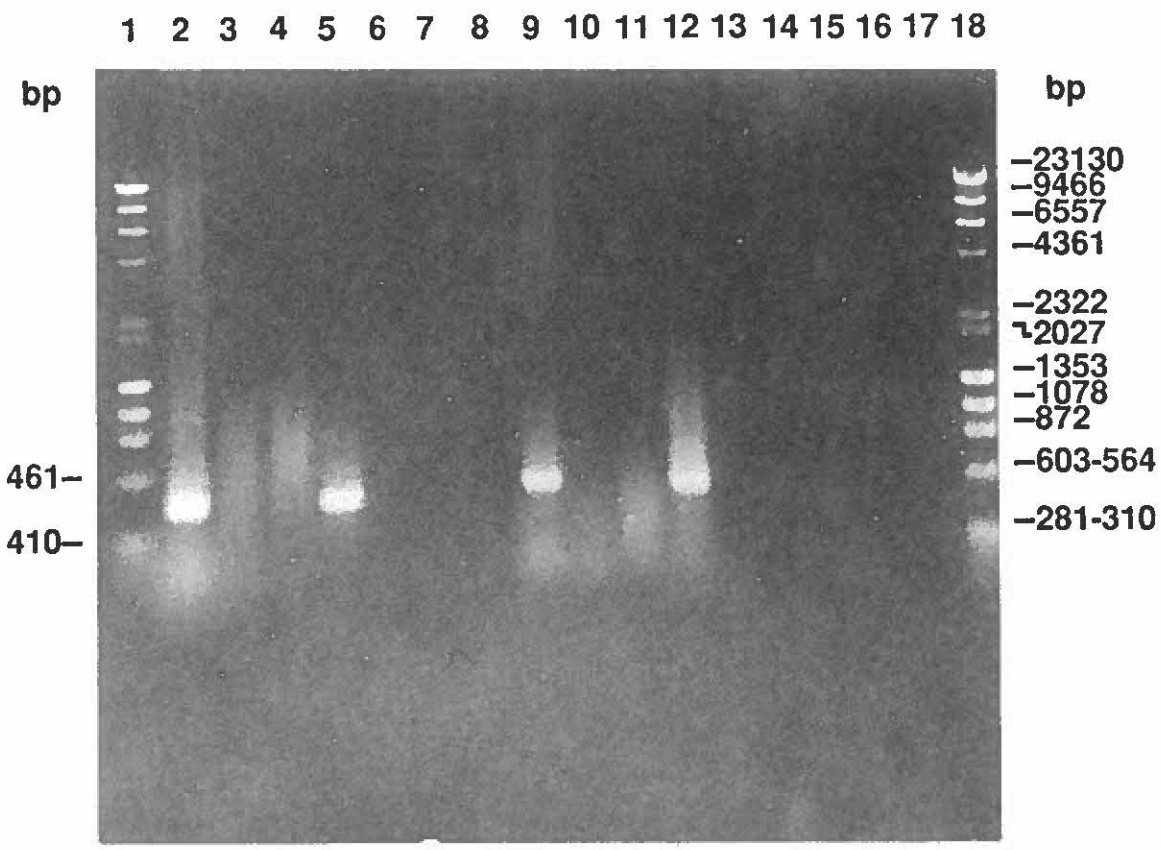
Puisque la spécificité de la nouvelle paire d'amorces codant pour la totalité de la protéine VP1 a été vérifiée, un essai d'amplification a été tenté avec tous les isolats québécois,

FIGURE 14. Spécificité des amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification enzymatique de l'ARN génomique du virus EMC.

Les produits amplifiés correspondent à l'ARN ou à l'ADN génomique de virus bovins ou porcins reconnus comme étant des agents causant des problèmes reproducteurs chez l'espèce porcine.

1, 18 : Marqueurs de taille moléculaire
2, 9 : Virus EMC ATCC VR-129
3, 10 : Entérovirus porcin type 1
4, 11 : Entérovirus porcin type 6
5, 12 : Virus EMC Q.90-890
6, 13 : ADN cellulaire Vero
7, 14 : Parvovirus porcin
8, 15 : Herpèsvirus bovin type 1

Les puits 2 à 8 correspondent aux produits obtenus par amplification enzymatique avec les amorces 2A-2B (situées dans le gène codant pour la protéine VP1).
Les puits 9 à 15 correspondent aux produits obtenus par amplification enzymatique avec les amorces 3A-1B (situées dans le gène codant pour la protéine VP4).


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
bp
bp
461–
410–
–23130
–9466
–6557
–4361
–2322
–2027
–1353
–1078
–872
–603-564
–281-310

américains et sud-américain afin de prouver que ces amorces pouvait aussi amplifier le même gène chez tous les isolats porcins du virus EMC. Il a été possible d'amplifier des fragments génomiques correspondant au gène δ ou protéine VP1 de tous les isolats du virus EMC testés (Figure 15). Il a été possible d'amplifier un fragment génomique à l'aide des amorces 4A-4B dans le cas de la souche de référence et des isolats américain Hawaii et québécois Q.90-5505, Q.90-890, Q.90-898, Q.90-5105, Q.90-5415, Q.90-32004, de même que pour les isolats américain et sud-américain Florida et Puerto Rico, respectivement. Dans le dernier cas, on remarque que le fragment amplifié est polymorphique, montrant une amplification supplémentaire à environ 750 pb. La présence de ce dimère pourrait être dû au fait que l'échantillon n'ait pas été chauffé au préalable. Cependant, aucun fragment génomique n'a été amplifié par RT-PCR pour l'isolat québécois Q.90-6041 d'origine abortive. Les résultats obtenus ont été observés à trois reprises.

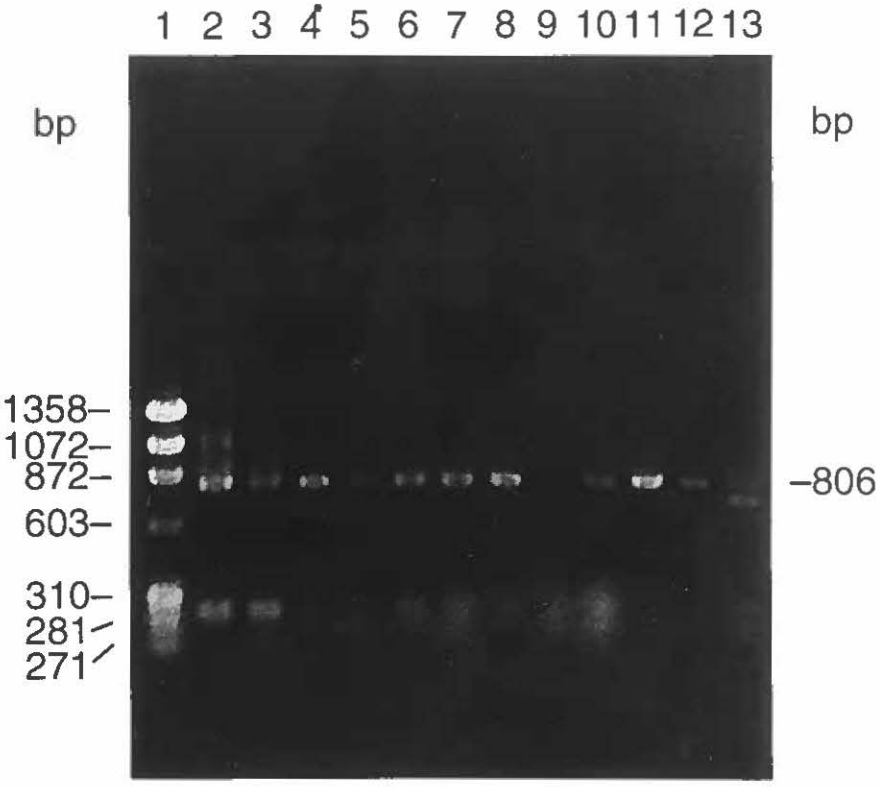
Les essais préliminaires nous avaient permis de démontrer la grande spécificité de cette technique. Afin d'appliquer cette technique à des fins de diagnostic, il fallait en plus démontrer la sensibilité de cette technique, les essais précédents n'ayant été réalisés qu'avec des préparations concentrées des différentes souches du virus EMC. Pour ce faire, l'ARN de la souche de référence du virus EMC (VR-129) a été extrait selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) et des dilutions décimales de cette préparation d'ARN génomique ont été réalisées avant de procéder à la réaction de transcriptase inverse. Par la suite, un essai PCR a été réalisé en utilisant les amorces 3A-1B correspondant au gène

FIGURE 15. Profil électrophorétique des fragments génomiques obtenus suite à l'amplification de l'ARN d'isolats québécois, américains et sud-américains utilisant les amorces correspondant au gène codant pour la protéine VP1.

L'amplification génomique a été obtenue avec les amorces 2A-2B; les produits amplifiés ont été analysés sur gel d'agarose 1 % et colorés au bromure d'éthidium.

1. Marqueur de taille moléculaire
2. Virus EMC ATCC VR-129
3. Virus EMC Q.90-890
4. Virus EMC Q.90-898
5. Virus EMC Q.90-945
6. Virus EMC Q.90-5105
7. Virus EMC Q.90-5415
8. Virus EMC Q.90-5505
9. Virus EMC Q.90-6041
10. Virus EMC Q.90-32004
11. Virus EMC Hawaii
12. Virus EMC Florida
13. Virus EMC Puerto Rico

Les chiffres de gauche correspondent à l'emplacement des marqueurs de taille moléculaires en paires de bases (pb). Les chiffres de droite indiquent la taille prévue des fragments amplifiés en pb.


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
bp
bp
1358–
1072–
872–
603–
310–
281–
271–
–806

codant pour la protéine VP4. Deux paires d'amorces ont été utilisées principalement pour l'ensemble des analyses génomiques, soient les amorces 3A-1B, dans un premier temps, ciblant la protéine VP4 et permettant une mise au point des techniques et enfin, les amorces 4A-4B, dirigées particulièrement au niveau de la protéine VP1, la plus sujette à des variations pouvant mener à un tropisme distinct entre les divers isolats récupérés. Cette étude nous a permis de démontrer que le niveau de détection de la technique correspondait à une concentration de 10^4 $DCEP_{50}$ de virus (Figure 16A), ce qui a été confirmé par analyses en hybridation moléculaire. Pour se faire, les sondes moléculaires correspondant aux produits amplifiés par PCR à l'aide des amorces 3A-1B et clonés dans un vecteur d'amplification T ont été synthétisées et marquées à la digoxygénine suite à une incubation en présence d'ADN polymérase T7 et d'amorces oligonucléotidiques aléatoires. Après avoir répété cette expérience à plusieurs reprises, il a été possible de vérifier à quelques occasions, qu'un très faible signal correspondant au fragment amplifié du virus dilué à 10^3 $DCEP_{50}$ était obtenu suite à une hybridation de type Southern. D'autres expériences réalisées par la suite ont aussi permis d'observer ce même phénomène ce qui permet d'affirmer que le jumelage des techniques RT-PCR et d'hybridation moléculaire permettait d'augmenter la sensibilité de la technique RT-PCR d'un facteur de 10, à quelques reprises, sans pour autant être confirmée. Le fait que le signal obtenu par hybridation moléculaire semble le même au niveau des échantillons 10^8-10^4 $DCEP_{50}$ pourrait être expliqué par une saturation de la sonde. Ayant été quantifiée au préalable, il avait été possible de détecter jusqu'à 0,1 ng d'ADN. Les signaux obtenus par hybridation dans les deux premiers puits sont très intenses

FIGURE 16. Sensibilité de la technique RT-PCR pour la détection de l'ARN génomique du virus EMC (souche ATCC VR-129).

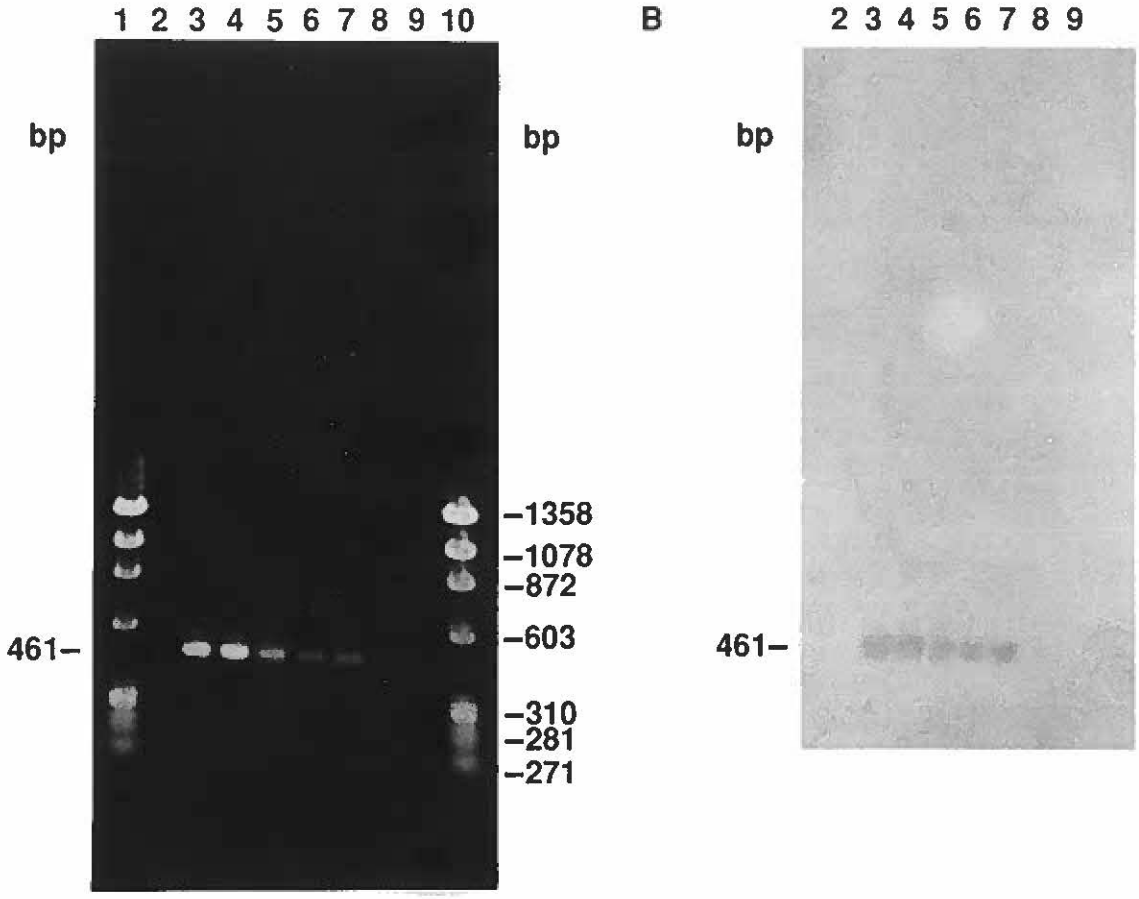
Profil électrophorétique des fragments génomiques obtenus par l'amplification enzymatique utilisant les amorces 3A-1B correspondant au gène codant pour la protéine VP4. La préparation virale avait été ajustée au préalable à 10^8 $DCEP_{50}$ (puits 3), 10^7 $DCEP_{50}$ (puits 4), 10^6 $DCEP_{50}$ (puits 5), 10^5 $DCEP_{50}$ (puits 6), 10^4 $DCEP_{50}$ (puits 7), 10^3 $DCEP_{50}$ (puits 8) et 10^2 $DCEP_{50}$ (puits 9).

A. Fragments amplifiés analysés sur gel d'agarose 1% et révélés suite à une exposition au bromure d'éthidium.

1, 10. Marqueurs de taille moléculaire;

2. Contrôle négatif (sans acide nucléique);

B. Profils électrophorétiques des fragments génomiques amplifiés par la *Taq* ADN polymérase et révélés suite à un transfert de type Southern sur membrane de nitrocellulose en utilisant une sonde moléculaire marquée à la digoxygénine correspondant au fragment génomique amplifié dans la région de la protéine VP4.


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
bp
–1358
–1078
–872
461–
–603
–310
–281
–271
B
2 3 4 5 6 7 8 9
bp
461–

et diffus, témoignant d'une quantité importante d'ADN. En diluant le produit de PCR de départ, il a été possible d'obtenir un signal plus clair et distinct mais encore très intense, la sonde étant encore saturée. L'utilisation de la technique d'hybridation moléculaire permet d'augmenter l'intensité du signal de détection, de confirmer la présence de la protéine VP4 au niveau des échantillons et de confirmer la spécificité de la bande obtenue par électrophorèse en gels d'agarose. Afin d'éviter un excès du bruit de fond (background), la réaction immunologique de révélation était arrêtée dès l'apparition d'un signal. Dans le cas où le développement de la révélation était plus long, où un bruit de fond était obtenu, il était possible d'observer une bande au puits correspondant à 10^3 $DCEP_{50}$ de virus (non illustré).

D'autres essais d'hybridation moléculaire ont été réalisés afin d'améliorer les paramètres de cette technique dans le but de permettre une détection optimale et spécifique du virus EMC à partir de spécimens cliniques. En utilisant les amorces spécifiques à la région génomique α du virus EMC, les produits amplifiés par PCR à partir de préparations d'ADN ou d'ARN de différents virus ont été adsorbées sur membrane de nylon chargée positivement. Ces derniers avaient été mis en cause lors d'épisodes de problèmes reproducteurs et respiratoires au niveau de fermes porcines québécoises, dont le parvovirus porcin et les entérovirus porcins de type 1 et 6. Après dénaturation, les réplicats ont été incubés en présence de la sonde correspondant au gène α du virus EMC et couplée à la digoxygénine. Une seconde incubation en présence d'un antisérum anti-digoxygénine couplé à phosphatase alcaline a été effectuée, puis la réaction immunologique a été révélée

suite à l'addition du substrat enzymatique. Plusieurs essais d'hybridation ont été réalisés dans des conditions expérimentales variées afin de déterminer celles qui seraient les plus optimales pour la détection du virus. Différentes températures d'hybridation et concentrations de formamide ont été testées dans le but d'éliminer toute fausse réactivité envers d'autres virus et tout bruit de fond. À une température d'hybridation de 42°C et une concentration en formamide de 50 %, une fausse réactivité a été révélée envers l'entérovirus porcin type 1 et l'herpèsvirus bovin type 1. L'augmentation de la température d'hybridation et de la concentration en formamide permettait d'éliminer le signal obtenu envers ces deux virus hétérologues (Figure 17B, C et D). Nous avons déterminé que les conditions optimales nécessaires pour une hybridation efficace sont : une température d'hybridation de 50°C et une concentration en formamide de 60 %, étant donné l'élimination de tout bruit de fond et de toute non-spécificité venant interférer au point de vue de l'efficacité de la technique de même que l'obtention d'un signal d'intensité maximale.

4.3 Détection de fragments génomiques du virus EMC au niveau de tissus murins et porcins

La mise au point de ces techniques était nécessaire en vue de leur application pour des fins de détection du virus dans les tissus provenant d'animaux infectés. Suite aux essais préliminaires confirmant l'efficacité des deux techniques combinées, nous avons tenté une amplification enzymatique à partir de tissus de souris infectées expérimentalement. Les tissus ciblés étaient les intestins, le cerveau, la rate, le coeur et les poumons. Préalable-

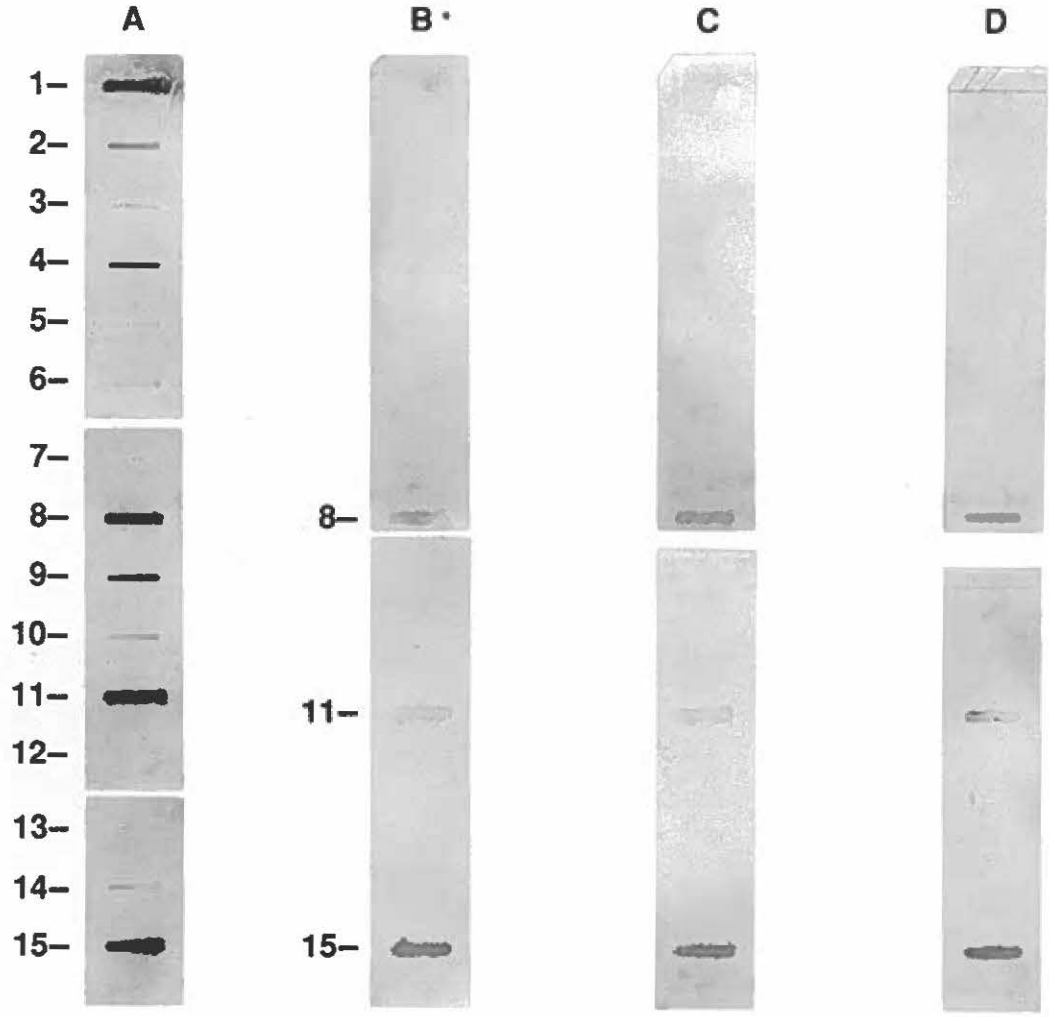
FIGURE 17. Spécificité de la sonde moléculaire (3A-1B) marquée à la digoxygénine et effets de la concentration en formamide et de la température d'hybridation.

Les produits amplifiés correspondent à l'ARN ou à l'ADN génomique de virus bovins ou porcins reconnus comme étant des agents causant des problèmes reproducteurs chez l'espèce porcine.

1, 8 : Virus EMC ATCC VR-129
2, 9 : Entérovirus porcin type 1
3, 10 : Entérovirus porcin type 6
4, 11 : Virus EMC Q.90-890
5, 12 : ADN cellulaire Vero
6, 13 : Parvovirus porcin
7, 14 : Herpèsvirus bovin type 1
15 : Sonde moléculaire non-marquée

A : 42°C ; 50 % Formamide
B : 50°C ; 50 % Formamide
C : 50°C ; 60 % Formamide
D : 50°C ; 70 % Formamide

Les produits 1 à 7 correspondent à l'amplification de l'acide nucléique avec les amorces 2A-2B.
Les produits 8 à 14 correspondent à l'amplification de l'acide nucléique avec les amorces 3A-1B.


A
B
C
D
1–
2–
3–
4–
5–
6–
7–
8–
9–
10–
11–
12–
13–
14–
15–
8–
11–
15–

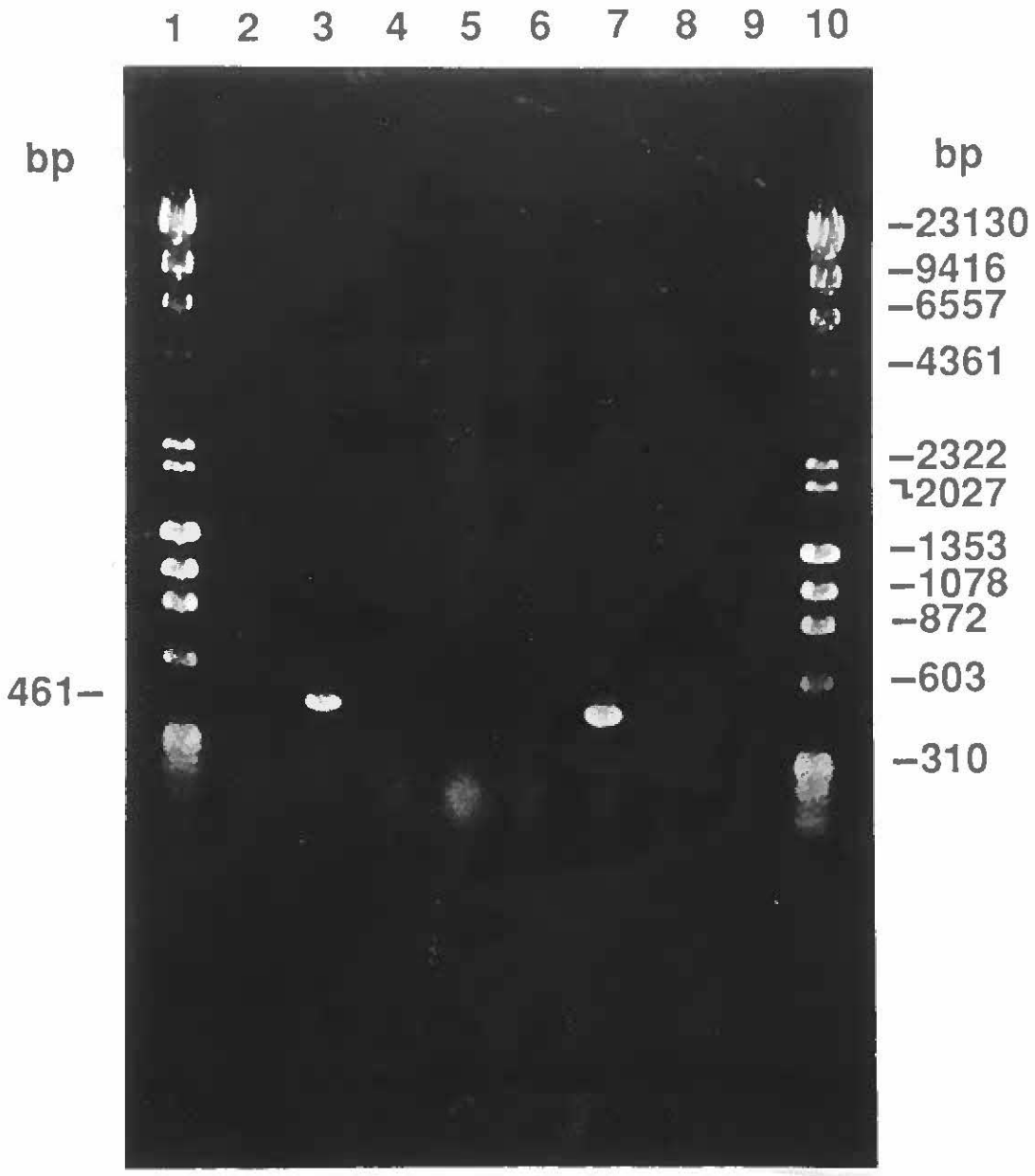
ment, des souris avaient été inoculées par voie intrapéritonéale avec du surnageant de cultures cellulaires Vero infectées avec l'isolat Q.90-890 du virus EMC à des doses de 10^3 et 10^4 $DCEP_{50}$/ml. Les tissus ont été prélevés stérilement pour éviter toute contamination. La technique de Chomczynski et Sacchi (1987) a été utilisée pour l'extraction de l'ARN, et ces préparations ont été utilisées pour les essais d'amplification de l'ARN viral par RT-PCR à l'aide des amorces spécifiques 3A-1B, selon la technique décrite dans la section Matériel et Méthodes (section 10.1.1). Les produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en présence de bromure d'éthidium. Tel que démontré à la Figure 18, il a été possible de détecter le génome du virus au niveau du cerveau de souris ayant été infectées avec une dose de 10^4 $DCEP_{50}$. Comme il a été mentionné un peu plus haut, l'hybridation moléculaire s'est avérée être une technique complémentaire confirmant la spécificité des fragments amplifiés par RT-PCR et augmentant la sensibilité. Les réplicats ont donc été transférés sur membrane de nitrocellulose selon la méthode Southern et hybridés à la sonde marquée à la digoxygénine. Suite à la réaction d'hybridation, des signaux de faible intensité ont été révélés dans le cas des fragments amplifiés à partir du cerveau, de la rate et du coeur des souris ayant été inoculées avec une dose de 10^3 $DCEP_{50}$ de virus, alors que des signaux d'une plus grande intensité ont été observés au niveau de tous les tissus testés (intestins, cerveau, rate, coeur et poumons) prélevés de souris ayant été infectées avec une dose virale de 10^4 $DECP_{50}$ (Figure 19).

FIGURE 18. Détection de fragments génomiques du virus EMC amplifiés par RT-PCR à partir de tissus des souris infectées expérimentalement à l'aide des amorces 3A-1B.

L'ARN génomique a été extrait à partir de broyats de tissus prélevés de souris CD-1 96 heures suivant leur inoculation par voie intrapéritonéale avec l'un des deux isolats québécois ajusté une dose de 10^4 $DCEP_{50}$/ml. Les amorces oligonucléotidiques 3A-1B ont été utilisées pour l'essai PCR.

1, 10 : Marqueurs de taille moléculaire
2, 6 : Poumons
3, 7 : Fragments amplifiés à partir de cerveau
4, 8 : Coeur
5, 9 : Rate

Les produits 2 à 5 ont été obtenus de souris infectées avec l'isolat du virus EMC Q.90-5505.
Les produits 6 à 9 ont été obtenus de souris infectées avec l'isolat du virus EMC Q.90-5415.


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
bp
bp
461–
–23130
–9416
–6557
–4361
–2322
–2027
–1353
–1078
–872
–603
–310

Une étude de cinétique de l'infection par le virus EMC chez la souris a par la suite été réalisée afin d'identifier les organes-cibles. Au total, 20 souris CD-1 ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec du surnageant de cellules préalablement infectées avec des doses de 10^3 et 10^4 $DCEP_{50}$/ml de l'isolat Q.90-890. À chaque jour, pendant 4 jours, 5 souris étaient euthanasiées afin de prélever les divers organes. Des homogénats des intestins, du cerveau, de la rate, du coeur et des poumons ont été préparés pour les fins d'isolement en cultures cellulaires et pour l'extraction de l'ARN viral pour les essais d'amplification enzymatique et d'hybridation moléculaire. Les ARN viraux ont été extraits selon la méthode décrite à la section Matériel et Méthodes (section 10.1.1) et l'amplification enzymatique a été réalisée dans les mêmes conditions qu'auparavant en utilisant la paire d'amorces 3A-1B.

Les profils électrophorétiques des fragments amplifiés à partir des tissus prélevés 3 jours après l'inoculation sont illustrés dans la Figure 19A. Un fragment génomique de 461 pb a pu être amplifié à partir des homogénats du cerveau et du coeur de souris infectées avec 10^3 $DCEP_{50}$ de virus, alors que pour les souris infectées avec une dose supérieure, les mêmes produits d'amplification ont pu être obtenus à partir d'homogénats des intestins, du cerveau et de la rate. L'hybridation de type Southern à l'aide de la sonde correspondant au gène α a permis de confirmer la spécificité des fragments amplifiés. Il a été possible de détecter la présence du virus au niveau de tous les organes testés, soient les intestins, le cerveau, la rate, le coeur et les poumons, après 72 heures d'infection (Figure 19B).

FIGURE 19. Cinétique d'infection de souris par le virus EMC telle que déterminée par la détection de l'ARN viral par amplification enzymatique et hybridation moléculaire.

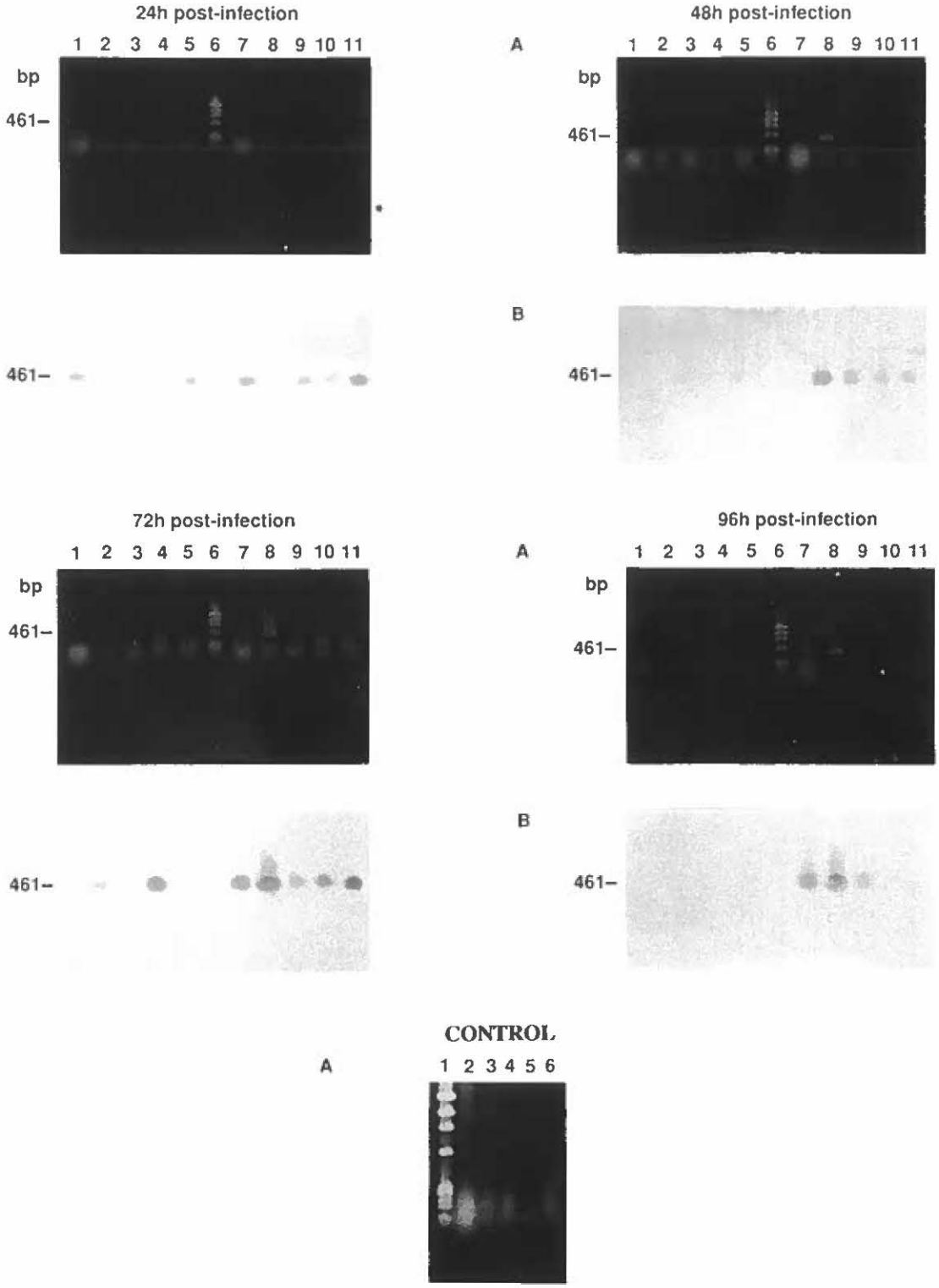
Profils électrophorétiques de produits de PCR obtenus suite à l'amplification enzymatique de l'ARN extrait de tissus de souris inoculées avec l'isolat québécois EMC Q.90-890 par voie intrapéritonéale 24, 48, 72 et 96 heures après l'infection. Les amorces 3A-1B ont été utilisées lors de l'amplification génomique.

A. Fragments électrophorétiques analysés sur gels d'agarose 1 % et colorés au bromure d'éthidium.

1, 7 : Fragments amplifiés à partir d'intestins
2, 8 : Fragments amplifiés à partir de cerveau
3, 9 : Fragments amplifiés à partir de rate
4, 10 : Fragments amplifiés à partir de coeur
5, 11 : Fragments amplifiés à partir de poumons
6 : Marqueur de taille moléculaire

B. Hybridation de type Southern des fragments amplifiés à l'aide d'une sonde non-radioactive (3A-1B).

Les produits 1 à 5 ont été obtenus de tissus de souris inoculées avec 10^3 $DCEP_{50}$ de virus.
Les produits 7 à 11 ont été obtenus de tissus de souris inoculées avec 10^4 $DCEP_{50}$ de virus.


24h post-infection
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
bp
461–
461–
48h post-infection
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
bp
461–
B
461–
72h post-infection
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
bp
461–
461–
96h post-infection
A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
bp
461–
B
461–
CONTROL
A
1 2 3 4 5 6

Donc, au terme des quatre jours qu'a duré la cinétique, on a d'abord observé la présence du virus au niveau des poumons et des intestins, l'excrétion au niveau des selles ayant été détectée pour toute la durée de la période d'observation. L'infection s'est ensuite propagée vers les organes lymphoïdes, la rate, les poumons et vers les organes qui sont reconnus comme étant les organes-cibles soient le coeur et le cerveau (Tableau 3). Le résultat est intéressant puisqu'il n'avait pas été possible de reproduire expérimentalement de myocardite chez la souris auparavant.

J'ai réalisé cette cinétique d'infection dans un premier temps afin de suivre la progression du virus dès son inoculation chez des souriceaux, mais aussi dans le but de vérifier le potentiel de détection de techniques couramment utilisées en diagnostic, comme l'isolement en cultures cellulaires et l'immunofluorescence indirecte en les comparant aux techniques mises au point au cours de mes travaux. Les essais de RT-PCR et d'hybridation moléculaire ont permis de déceler la présence du virus au niveau de tous les organes prélevés des souris, et ce, tout au long de la durée de la cinétique. La technique d'isolement en cultures cellulaires s'est avérée d'une efficacité mitigée au point de vue de la détection virale étant donné sa non-spécificité. Cette méthode a permis d'observer la croissance virale au moment où l'infection était à son maximum, soit à 72 heures post-inoculation au niveau de tous les organes testés sauf au niveau de l'organe lymphoïde, la rate. Il semble que la détection, par cette technique, se soit faite où l'infection s'est concentrée, soit au niveau du cerveau, considérant que les souris ont toutes démontré l'apparition d'une paralysie des

TABLEAU 3. **COMPARAISON DES TECHNIQUES D'AMPLIFICATION ENZYMATIQUE, D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE, D'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE ET D'ISOLEMENT EN CULTURE CELLULAIRE DANS LA DÉTECTION DU VIRUS EMC AU NIVEAU DE TISSUS DE SOURIS INFECTÉES**

JOURS POST-INFECTION	TEST	CERVEAU		COEUR		INTESTINS		POUMONS		RATE		CELLULES VERO INFECTÉES
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
JOUR 1	RT-PCR	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
	IFI	ND	ND	ND	-	ND	+	ND	ND	-	-	+
	HYBR	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	ICC	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
JOUR 2	RT-PCR	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
	IFI	-	+	ND	ND	+	+	ND	-	-	ND	+
	HYBR	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
	ICC	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
JOUR 3	RT-PCR	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+
	IFI	-	-	-	-	+	+	-	ND	ND	ND	+
	HYBR	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	ICC	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

Les souris ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec l'isolat québécois Q.90-890 à des doses de 10^3 et 10^4 $DCEP_{50}$ de virus.

A: tissus de souris inoculées avec une dose virale de 10^3 $DCEP_{50}$
B: tissus de souris inoculées avec une dose virale de 10^4 $DCEP_{50}$

RT-PCR: amplification enzymatique
IFI: immunofluorescence indirecte
HYBR: hybridation moléculaire
ICC: isolement en culture cellulaire

+: présence du virus
-: absence du virus
ND: non disponible

TABLEAU 3. **COMPARAISON DES TECHNIQUES D'AMPLIFICATION ENZYMATIQUE, D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE, D'HYBRIDATION MOLÉCULAIRE ET D'ISOLEMENT EN CULTURE CELLULAIRE DANS LA DÉTECTION DU VIRUS EMC AU NIVEAU DE TISSUS DE SOURIS INFECTÉES**

JOURS POST-INFECTION	TEST	CERVEAU		COEUR		INTESTINS		POUMONS		RATE		CELLULES VERO INFECTÉES
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
JOUR 4	RT-PCR	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	IFI	+	+	ND	ND	+	+	-	ND	ND	ND	+
	HYBR	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
	ICC	-	+	-	ND	+	+	+	ND	-	ND	+
CONTROLE	RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IFI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HYBR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ICC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Les souris ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec l'isolat québécois Q.90-890 à des doses de 10^3 et 10^4 $DCEP_{50}$ de virus.

A: tissus de souris inoculées avec une dose virale de 10^3 $DCEP_{50}$
B: tissus de souris inoculées avec une dose virale de 10^4 $DCEP_{50}$

RT-PCR: amplification enzymatique
IFI: immunofluorescence indirecte
HYBR: hybridation moléculaire
ICC: isolement en culture cellulaire

+: présence du virus
- : absence du virus
ND: non disponible

membres postérieurs témoignant d'une atteinte massive du système nerveux central. De plus, cette technique s'est avérée capable d'une détection au niveau des intestins tout au long de la durée de l'expérience, la raison étant l'excrétion virale continue par la voie intestinale.

Quant à la technique d'immunofluorescence indirecte, cette dernière a pu être jugée comme étant très peu efficace étant donné le très faible taux de réussite au niveau de la détection du virus, même au niveau des organes qui s'étaient montrés comme étant les plus susceptibles à l'infection, soient le cerveau et le coeur. Les intestins se sont révélés comme étant l'organe où les résultats obtenus en immunofluorescence indirecte furent les plus satisfaisants, ceci étant probablement dû à la très forte concentration virale retrouvée à ce niveau, au moment où l'infection était à son apogée, soit à 72 heures. Dans la majorité des cas, la présence du virus EMC a été décelée, par isolement en cultures cellulaires et en immunofluorescence indirecte, au niveau des organes de souris ayant été inoculées avec la dose virale supérieure, 10^4 $DCEP_{50}$/ml.

Il est évident que les coupes effectuées sur les tissus ont pu être faites dans une portion de l'organe où le virus s'était moins propagé, mais la même raison pourrait être évoquée en ce qui a trait aux autres techniques utilisées, comme le RT-PCR ou l'hybridation moléculaire. Malgré tout, un taux de réussite nettement supérieur a été obtenu pour ces deux dernières techniques, ce qui se traduit en termes pratiques par une détection supérieure, beaucoup plus spécifique et nettement plus sensible. Aucune des méthodes utilisées ne pourrait être éliminée quant à leur potentiel de détection éventuel, mais il est important de

considérer l'efficacité et la rapidité d'exécution de chacune et à ce niveau, la combinaison RT-PCR-hybridation est nettement supérieure aux deux autres méthodes employées.

Comme l'utilisation simultanée des techniques d'amplification enzymatique et d'hybridation moléculaire nous ont permis de détecter la présence du virus au niveau de tissus de souris infectées expérimentalement, il était important de vérifier si l'efficacité était similaire dans le cas des tissus de porcelets infectés par le même virus. Des porcelets gnotobiotes de 3 jours, nés par césarienne, de truies exemptes d'agents pathogènes spécifiques, ont été inoculés par les voies intrapéritonéale et intramusculaire à l'aide de filtrats d'organes de souris CD-1 infectées avec une dose de 10^6 $DCEP_{50}$ de l'isolat Q.90-890. Six jours suivant l'inoculation, les porcelets étaient sacrifiés et leurs organes prélevés en vue de l'essai de détection par les deux techniques pré-citées. L'utilisation simultanée des deux techniques a permis de détecter la présence de fragments génomiques amplifiés avec les amorces 4A-4B dans les homogénats préparés à partir du coeur, du cerveau et de la rate, le contrôle positif employé, aussi faible soit-il suite à son amplification plus faible, étant la souche américaine Florida. Suite à la réaction RT-PCR, il n'avait été possible de détecter la présence du génome viral qu'au niveau des homogénats du coeur (Figure 20A). L'hybridation moléculaire réalisée sur les produits d'amplification a permis de révéler aussi la présence de fragments génomiques du virus à partir des broyats de cerveau et de rate (Figure 20B). La raison pour laquelle la sonde moléculaire utilisée lors de cette expérience a été 4A-4B est qu'au cours de mes travaux, nous avons porté une attention plus particulière à la région

FIGURE 20. Détection de l'ARN génomique du virus EMC à partir de tissus de porcelets infectés expérimentalement.

Profil électrophorétique des fragments génomiques amplifiés par PCR à partir de l'ARN extrait d'homogénats de tissus de porcelets 6 jours suivant l'inoculation par voie intrapéritonéale avec l'isolat québécois EMC Q.90-890 ajusté à une dose de 10^5 $DCEP_{50}$/ml. Les amorces 4A-4B ont été utilisées pour l'amplification génomique.

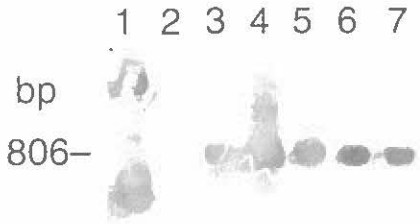
A. Fragments électrophorétiques analysés sur gels d'agarose 1 % et colorés au bromure d'éthidium.

1: Marqueur de taille moléculaire
2: Contrôle négatif (sans acide nucléique)
3: Coeur du porcelet 160.2
4: Coeur du porcelet 167.2
5: Cerveau du porcelet 167.3
6: Rate du porcelet 167.3
7: Contrôle positif (ARN génomique de la souche Puerto Rico du virus EMC)

B. Hybridation de type Southern des fragments électrophorétiques en utilisant une sonde moléculaire marquée à la digoxygénine correspondant au gène codant pour la protéine VP1.

A)

B)



génomique codant pour la protéine VP1, la plus antigéniquement sujette à des variations pouvant mener à l'apparition de variants au niveau du tropisme tissulaire.

4.4. Comparaison génomique des isolats québécois du virus EMC porcin

4.4.1 Analyse des séquences nucléotidiques et peptidiques des fragments génomiques amplifiés

Les fragments génomiques correspondant à la région du génome viral codant pour la protéine VP1 de virus propagés sur lignée cellulaire Vero ont été obtenus par la réaction d'amplification enzymatique de leur ADN complémentaire à l'aide des amorces 4A-4B. Ces fragments ont été obtenus pour deux isolats québécois provenant de poumons de porcelets, Q.90-890 et Q.90-945, de même que pour la souche américaine porcine abortive Florida et la souche diabétogène (B) murine du virus EMC. Ces fragments génomiques ont été clonés dans le vecteur pCR II et séquencés par la technique de Sanger (1977). Les séquences nucléotidiques obtenues, de même que les séquences en acides aminés déduites sont illustrées aux Figures 21 et 22 et comparées aux séquences de la souche de référence ATCC VR-129 publiées par Palmenberg *et al.* (1984).

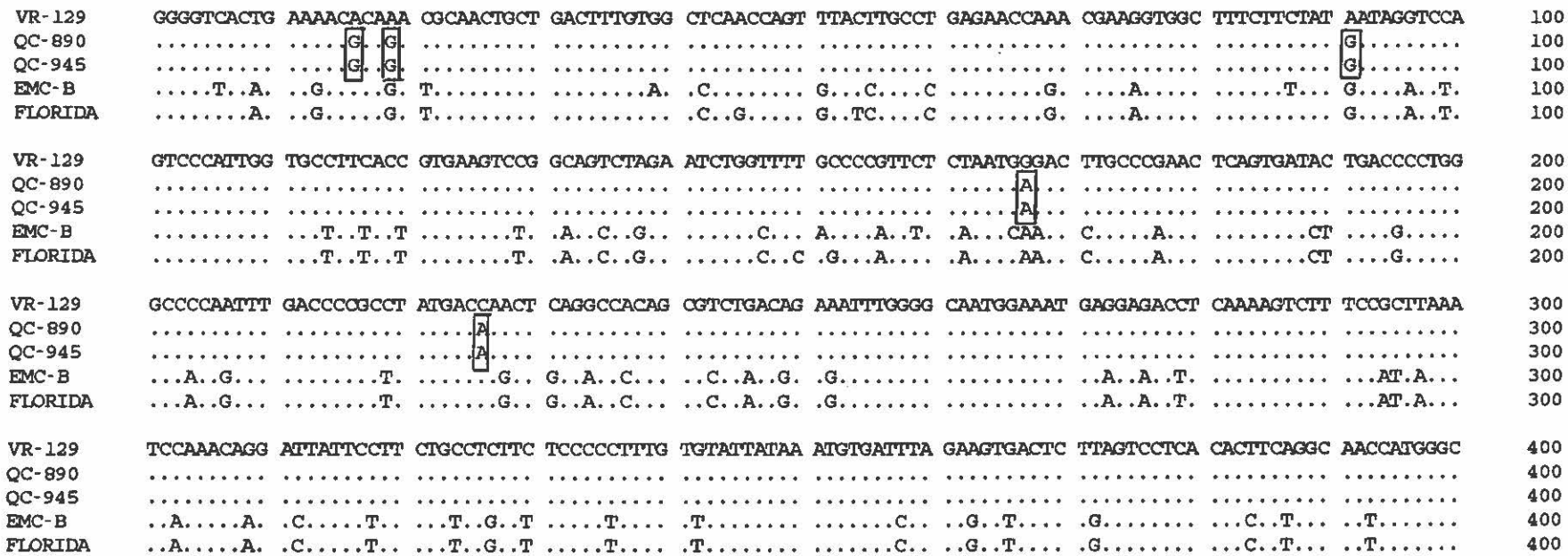
Au niveau des 2 isolats québécois, 8 substitutions nucléotidiques ont été observées en comparaison avec la souche de référence VR-129, en position 16, 19, 91, 177, 226, 571 et 712. Ces substitutions correspondaient à des changements en acides aminés dont 5 étaient communs à ceux observés dans le cas de la souche porcine américaine du virus EMC et de

FIGURE 21. Séquences nucléotidiques de la région génomique codant pour la protéine VP1 de 2 isolats québécois du virus EMC.

La région correspondant au gène codant pour la protéine VP1 a été amplifiée par RT-PCR en utilisant les amorces 4A-4B et clonée dans le vecteur pCR II. Les séquences obtenues ont été comparées à celles décrites pour la protéine VP1 de souches de référence simiennes, murines et porcines.

ATCC VR-129	:	Souche de référence d'origine simienne
Q.90-890,		
Q.90-945	:	Souches porcines québécoises d'origine respiratoire
EMC-B	:	Souche de référence murine non-diabétogène
Florida	:	Souche de référence porcine d'origine abortive

Seules les variations en nucléotides observées par rapport à la séquence de la souche de référence ATCC VR-129 sont identifiées.


VR-129 GGGGTCACTG AAAACACAAA CGCAACTGCT GACTTTGTGG CTCAACCAGT TTACTTGCCT GAGAACCAAA CGAAGGTGGC TTTCTTCTAT AATAGGTCCA 100
QC-890 ....G..G. .... G..... 100
QC-945 ....G..G. .... G..... 100
EMC-B .....T..A. ..G.....G. T..... ....A. .C..... G...C....C ....G. ....A..... ......T... G....A..T. 100
FLORIDA ....A. ..G.....G. T..... ..... .C..G..... G..TC....C ....G. ....A..... ..... G....A..T. 100
VR-129 GTCCCATTGG TGCCTTCACC GTGAAGTCCG GCAGTCTAGA ATCTGGTTTT GCCCCGTTCT CTAATGGGAC TTGCCCGAAC TCAGTGATAC TGACCCCTGG 200
QC-890 ....A.. 200
QC-945 ....A.. 200
EMC-B ....T..T..T ....T. .A..C..G.. ......C... A....A..T. .A...CAA.. C.....A... ....CT ....G..... 200
FLORIDA ....T..T..T ....T. .A..C..G.. ......C..C .G...A.... .A....AA.. C.....A... ....CT ....G..... 200
VR-129 GCCCCAATTT GACCCCGCCT ATGACCAACT CAGGCCACAG CGTCTGACAG AAATTTGGGG CAATGGAAAT GAGGAGACCT CAAAAGTCTT TCCGCTTAAA 300
QC-890 ....A.... 300
QC-945 ....A.... 300
EMC-B ...A..G... ....T. ....G.. G..A..C... ..C..A..G. .G..... ....A..A..T. ....AT.A... 300
FLORIDA ...A..G... ....T. ....G.. G..A..C... ..C..A..G. .G..... ....A..A..T. ....AT.A... 300
VR-129 TCCAAACAGG ATTATTCCTT CTGCCTCTTC TCCCCCTTTG TGTATTATAA ATGTGATTTA GAAGTGACTC TTAGTCCTCA CACTTCAGGC AACCATGGGC 400
QC-890 400
QC-945 400
EMC-B ..A.....A. .C.....T.. ...T..G..T .....T.... .T..... .....C.. ..G..T.... .G..... ...C..T... ..T..... 400
FLORIDA ..A.....A. .C.....T.. ...T..G..T .....T.... .T..... .....C.. ..G..T.... .G..... ...C..T... ..T.....

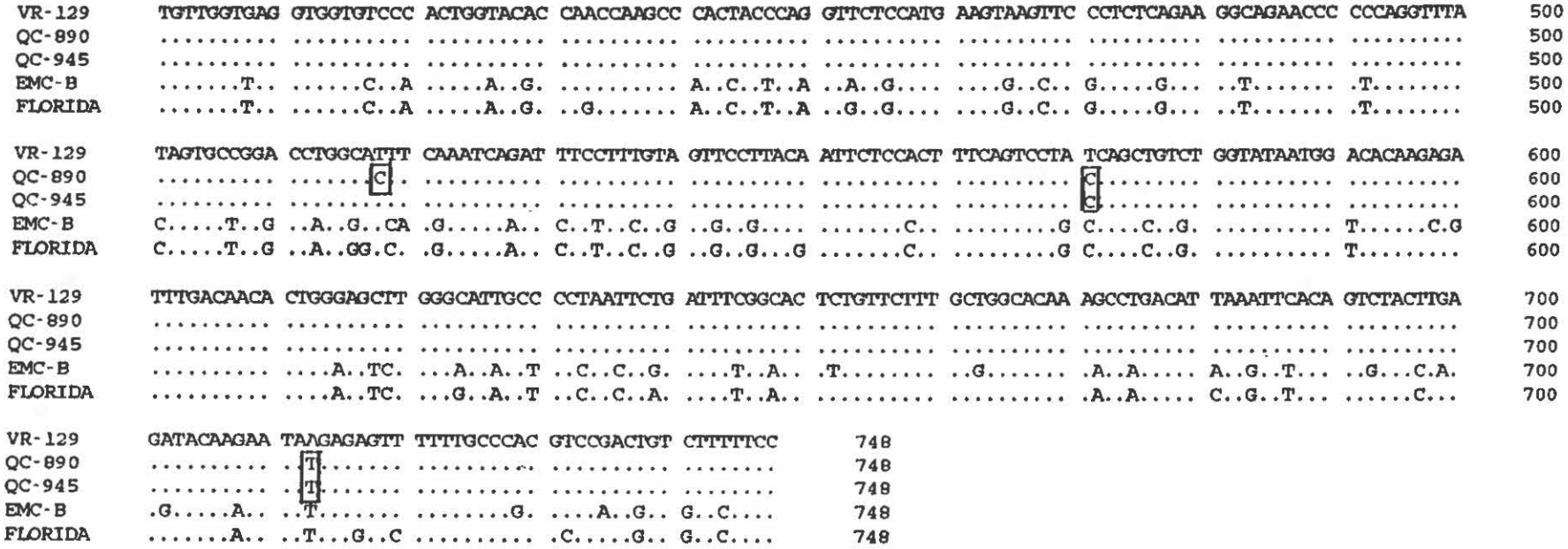

VR-129 TGTTGGTGAG GTGGTGTCCC ACTGGTACAC CAACCAAGCC CACTACCCAG GTTCTCCATG AAGTAAGTTC CCTCTCAGAA GGCAGAACCC CCCAGGTTTA 500
QC-890 500
QC-945 500
EMC-B .....T.. .....C..A .....A..G. ..... A..C..T..A ..A..G.... ....G..C.. G.....G... ..T..... .T..... 500
FLORIDA .....T.. .....C..A .....A..G. ..G..... A..C..T..A ..G..G.... ....G..C.. G.....G... ..T..... .T..... 500
VR-129 TAGTGCCGGA CCTGGCATTT CAAATCAGAT TTCCTTTGTA GTTCCTTACA ATTCTCCACT TTCAGTCCTA TCAGCTGTCT GGTATAATGG ACACAAGAGA 600
QC-890 ....C..... .... C..... 600
QC-945 .... C..... 600
EMC-B C.....T..G ..A..G..CA .G.....A.. C..T..C..G ..G..G.... .....C.. .....G C....C..G. ..... T.....C.G 600
FLORIDA C.....T..G ..A..GG.C. .G.....A.. C..T..C..G ..G..G...G .....C.. .....G C....C..G. ..... T..... 600
VR-129 TTTGACAACA CTGGGAGCTT GGGCATTGCC CCTAATTCTG ATTTCGGCAC TCTGTTCTTT GCTGGCACAA AGCCTGACAT TAAATTCACA GTCTACTTGA 700
QC-890 700
QC-945 700
EMC-B ....A..TC. ...A..A..T ..C..C..G. ....T..A.. .T..... ..G..... .A..A..... A..G..T... ..G...C.A. 700
FLORIDA ....A..TC. ...G..A..T ..C..C..A. ....T..A.. .... .A..A..... C..G..T... ......C... 700
VR-129 GATACAAGAA TAAGAGAGTT TTTTGCCCAC GTCCGACTGT CTTTTTCC 748
QC-890 ..... .T..... 748
QC-945 ..... .T..... 748
EMC-B .G.....A.. ..T..... .....G. ....A..G.. G..C.... 748
FLORIDA .....A.. ..T...G..C ..... .C.....G.. G..C.... 748

FIGURE 22. Séquences en acides aminés de la protéine VP1 de 2 isolats québécois du virus EMC déduites de l'analyse des séquences nucléotidiques de la région génomique codant pour la protéine VP1 amplifié par RT-PCR.

Les séquences obtenues ont été comparées à celles décrites pour la protéine VP1 de souches de référence simiennes, murines et porcines.

ATCC VR-129	:	Souche de référence d'origine simienne
Q.90-890,		
Q.90-945	:	Souches porcines québécoises d'origine respiratoire
EMC-B	:	Souche de référence murine non-diabétogène
Florida	:	Souche de référence porcine d'origine abortive

Seules les variations en acides aminés observées par rapport à la séquence de la souche de référence ATCC VR-129 sont identifiées.

```
VR-129    GVTENTNATA DFVAQPVYLP ENQTKVAFFY NRSSPIGAFT VKSGSLESGF     50
QC-890    .....AD... .......... .......... D......... ..........     50
QC-945    .....AD... .......... .......... D......... ..........     50
EMC-B     ....D.D... .......... .......... D......... ..........     50
FLORIDA   ....D.D... .......... .......... D......... ..........     50

VR-129    APFSNGTCPN SVILTPGPQF DPAYDQLRPQ RLTEIWGNGN EETSKVFPLK    100
QC-890    .....E.... .......... .....K.... .......... ..........    100
QC-945    .....E.... .......... .....K.... .......... ..........    100
EMC-B     T....Q.... .......... .......... .......... ..........    100
FLORIDA   G....E.... .......... .......... .......... ..........    100

VR-129    SKQDYSFCLF SPFVYYKCDL EVTLSPHTSG NHGLLVRWCP TGTPTKPTTQ    150
QC-890    .......... .......... .......... .......... ..........    150
QC-945    .......... .......... .......... .......... ..........    150
EMC-B     .......... .......... .......... .......... ..........    150
FLORIDA   .......... .......... .......... .......... ....A.....    150

VR-129    VLHEVSSLSE GRTPQVYSAG PGISNQISFV VPYNSPLSVL SAVWYNGHKR    200
QC-890    .......... .......... ..T....... .......... P.........    200
QC-945    .......... .......... .......... .......... P.........    200
EMC-B     .......... .......... ...T...... .......... P.........    200
FLORIDA   .......... .......... ..V....... ...D...... P.........    200

VR-129    FDNTGSLGIA PNSDFGTLFF AGTKPDIKFT VYLRYKNKRV FCPRPTVFFP    250
QC-890    .......... .......... .......... .......M.. ..........    250
QC-945    .......... .......... .......... .......M.. ..........    250
EMC-B     .......... .......... .......... .......M.. ..........    250
FLORIDA   .......... .......... .......... .......M.. ..........-   250
```

la souche diabétogène B murine. Deux substitutions nucléotidiques, en position 16 et 226, se sont avérées particulières aux deux isolats québécois, et se traduisaient par des changements en acides aminés; le codon GCA codant pour une alanine au lieu d'une thréonine et le codon AAA codant pour une lysine au lieu d'une glutamine. Les deux isolats québécois se différenciaient par la présence d'une substitution nucléotidique en position 518 pour l'isolat Q.90-890. Cette substitution amenait un changement au niveau peptidique, le codon ACT codant pour une thréonine au lieu d'une isoleucine.

La souche EMC porcine d'origine abortive, Florida, présentait de nombreuses substitutions nucléotidiques qui étaient silencieuses dans la presque totalité des cas. Le degré d'homologie des séquences nucléotidiques pour la région de la protéine VP1 entre les deux isolats québécois a été évalué comme étant supérieur à 99 % et entre les isolats québécois et la souche américaine Florida, ce degré était de 83 %. La comparaison des séquences obtenues pour les isolats québécois d'origine respiratoire et de la souche abortive américaine a permis de constater qu'elles étaient bien différentes. Les isolats québécois porcins s'étant avérés plus proches, au point de vue séquences, de la souche de référence simienne VR-129, alors que dans le cas de la souche abortive, cette dernière s'est avérée plus près de la souche murine que des autres souches porcines.

DISCUSSION

1. ÉTUDE DE LA CROISSANCE VIRALE

L'étape initiale du projet consistait en la production de virus en quantité suffisante pour l'obtention des antigènes et des acides nucléiques nécessaires aux diverses études. La lignée cellulaire simienne Vero a été choisie pour les hauts titres pouvant être obtenus suite à l'infection par la souche de référence simienne VR-129 et les différents isolats porcins du virus EMC isolés à partir des liquides foetaux (ascite, liquides thoraciques), des tissus d'avortons et des homogénats des poumons de porcelets affectés de problèmes respiratoires. Le cycle de multiplication virale observé était lytique et conduisait à la destruction massive du feuillet cellulaire précédée d'une dégénérescence en foyers. L'infection était productive puisque plusieurs particules matures extracellulaires ont pu être observées en microscopie électronique à partir des surnageants des cultures présentant un effet cytopathique avancé, caractérisé par une vacuolisation marquée du cytoplasme des cellules infectées (Girard et Hirth, 1989).

La lignée cellulaire BHK-21 s'est avérée peu sensible pour l'isolement initial des différentes souches québécoises à partir des divers échantillons cliniques. De plus, un effet cytopathique très mitigé était observable après 2 ou 3 passages successifs. Toutefois, il a été possible d'obtenir une infection productive sur ces cellules suite à l'adaptation et la propagation au préalable sur la lignée cellulaire Vero de tous les isolats étudiés, y compris la souche de référence simienne VR-129. Les titres infectieux étaient alors comparables à ceux obtenus avec la lignée cellulaire Vero. Ces résultats diffèrent de ceux publiés par

d'autres auteurs qui ont réussi antérieurement à isoler le virus à partir des tissus d'avortons sur les cellules BHK-21 (Kim *et al.*, 1991; Joo *et al.*, 1988). Ces résultats pourraient être attribuables au tropisme particulier des différentes souches.

L'immunofluorescence indirecte s'est avérée une méthode relativement sensible pour détecter la présence des antigènes du virus dans les cellules infectées. Le type de fluorescence observée dans les cellules infectées, après incubation en présence de l'antisérum produit contre la souche de référence simienne, était très intense ce qui reflète la production d'antigènes viraux en grande quantité. Cette fluorescence était restreinte au niveau du cytoplasme. Seul le sérum hyperimmun anti-EMC a réagi contre les cellules infectées confirmant ainsi le diagnostic. Le profil de fluorescence observé sur les cellules BHK-21 infectées à l'aide d'isolats du virus ayant été préalablement propagés sur les cellules Vero, était identique à celui décrit sur les cellules Vero infectées par la souche de référence. Cependant, l'épreuve d'IFA s'est avérée inefficace pour la détection du virus dans les coupes congelées de tissus d'animaux infectés de façon naturelle ou expérimentale. La présence d'anticorps bloqueurs au niveau des tissus pourrait être responsable de l'inefficacité de la technique.

La technique de clonage par plages est souvent utilisée pour la différenciation de variants ou sous-types d'un virus. Lipton (1980) a été en mesure de distinguer des souches du virus de l'encéphalomyélite de Theiler par la taille des plages obtenues. Ces souches étaient toutes neurotropiques, mais variaient selon leur virulence. Plusieurs essais ont été

effectués avec chacun des isolats québécois et il a été impossible de démontrer des variations significatives au niveau de la taille des plages. Ces dernières avaient généralement un diamètre variant entre 2 et 5 mm. De plus, il ne nous a pas été possible de différencier entre les isolats québécois et la souche de référence en utilisant les épreuves de séroneutralisation et d'inhibition de l'activité hémagglutinante sauf dans le cas de l'isolat Q.90-890 ayant donné une réactivité plus faible vis-à-vis de l'antisérum produit contre la souche de référence simienne.

2. PATHOGÉNICITÉ DES SOUCHES PORCINES DU VIRUS EMC

Des porcelets à la mamelle ont été infectés par voie intrapéritonéale avec des préparations clarifiées de l'isolat québécois Q.90-890. Chez les animaux ayant été inoculés avec une dose de 10^6 $DCEP_{50}$ de virus, des signes cliniques de difficultés respiratoires se sont manifestés au 6^e jour. Lors de l'autopsie, les seules lésions macroscopiques significatives ayant été observées sont la présence de petits foyers blanchâtres, d'aspect crayeux, au niveau de la surface du myocarde, une induration des lobes pulmonaires caudaux et une lymphoadénopathie médiastinale. L'examen histopathologique a permis de mettre en évidence des lésions de pneumonie interstitielle et prolifération au niveau des poumons, de myocardite et de méningite non-suppurative nécrotique.

Tous les isolats cultivés à partir des tissus ou liquides d'avortons, de même qu'à partir des homogénats de poumons de porcs affectés de problèmes respiratoires, se sont avérés très

virulents pour les souris. Des signes cliniques et des lésions histopathologiques d'encéphalomyélite ont été diagnostiquées dans tous les cas. Ceci confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs suggérant que le virus EMC est d'abord un virus murin (Kim *et al.*, 1989). Le fait que tous les isolats québécois se soient révélés identiquement virulents pour les souris, qu'ils aient été associés à des problèmes reproducteurs ou respiratoires chez les porcs, suggère que les souris ou autres rongeurs sauvages peuvent représenter des hôtes intermédiaires ou sources de virus importantes entre les épidémies dans les élevages de porcs (Zimmerman, 1990). Cette hypothèse est d'autant plus appuyée par les résultats obtenus lors des essais d'infection expérimentale réalisés chez des porcelets gnotobiotes.

Au cours des essais préliminaires, il avait été démontré que la reproduction de la maladie était beaucoup plus facile dans le cas de porcelets inoculés avec des homogénats de tissus de souris infectés, en comparaison avec ceux ayant été inoculés avec les surnageants de culture de cellules Vero ou BHK-21. Même à des doses de 10^6 $DECP_{50}$ de virus, peu de lésions ont été observées dans le cas de porcelets inoculés avec du surnageant de culture. Le passage au préalable chez la souris semble donc avoir influencé de façon significative la pathogénicité du virus pour l'espèce porcine. Bien que la majorité des isolats porcins du virus EMC aient été associés à des problèmes de la reproduction, peu d'auteurs ont réussi à reproduire les problèmes chez des truies à différents moments de la gestation (Kim *et al.*, 1989; Joo *et al.*, 1988). Toutefois, l'inoculation des foetus *in utero* conduit presqu'invariablement à la mort et à la momification foetale (Kim *et al.*, 1989; Joo *et al.*,

1988). Dans notre étude et celles d'auteurs précédents, les lésions reproduites chez les porcelets gnotobiotes se sont avérées très différentes de celles qui ont été rapportées depuis 1986 dans les élevages nord-américains et européens (Goyal, 1993; Collins *et al.*, 1991; Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991). En effet, les lésions ayant été décrites dans le cas du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) sont surtout restreintes au système respiratoire supérieur. Les auteurs ont décrit, en particulier, des lésions de pneumonie interstitielle à pneumonie proliférative et nécrosante (Goyal, 1993; Morin *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991) où il y a notamment invasion des septa alvéolaires par des cellules de la lignée lymphomonocytaire avec habituellement aucun dommage à l'endothélium vacuolaire. Dans le cas de la pneumonie proliférative et nécrosante, les autres composantes sont l'hyperplasie des pneumocytes de type II, et la présence de macrophages, de cellules multinucléées et débris nécrotiques dans la lumière alvéolaire. (Girard *et al.*, 1992; Dea *et al.*, 1992b et c; Morin *et al.*, 1991 et 1990).

Les lésions reproduites au cours de cette étude diffèrent considérablement de celles qui sont associées au syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) et sont plutôt similaires à celles ayant été décrites antérieurement par d'autres auteurs (Acland et Littlejohns, 1986). La présence de foyers de nécrose au niveau du myocarde est plutôt pathognomonique de l'infection par le virus EMC. Toutefois, la présence d'une composante respiratoire n'a pas auparavant été décrite dans la littérature. Pour ces raisons, l'hypothèse

selon laquelle les souches québécoises du virus EMC appartiennent à un variant pneumotrope doit être considérée.

En 1990, un nouveau virus porcin possédant les caractéristiques des artérivirus, a été reconnu comme l'agent responsable du syndrome SRRP (Terpstra *et al.*, 1991; Pol *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991). Les enquêtes sérologiques ont démontré que l'infection par ce virus était très répandue dans les élevages porcins du Québec et d'autres provinces canadiennes (Dea *et al.*, 1992a,b et d). À présent, plus de 70 % de nos élevages sont séropositifs, une situation comparable à celle existant aux États-Unis (Goyal, 1993; Collins *et al.*, 1991). Les essais d'infection expérimentale chez des truies gestantes et des porcelets ont permis de reproduire les deux composantes du syndrome, de même que les lésions macroscopiques et microscopiques décrites précédemment (Dea *et al.*, 1992d). Toutefois, le fait que plusieurs élevages aient été diagnostiqués séropositivement au virus EMC, notamment la détection d'anticorps spécifiques dans les liquides foetaux, suggère que ce virus représente probablement l'un des principaux agents secondaires associés à la composante reproductrice (Dea *et al.*, 1992b; Dea *et al.*, 1991a, c). Le développement de techniques de diagnostic plus sensibles devraient permettre de mieux évaluer l'importance de cette infection dans nos élevages.

3. ÉTUDE DE LA STRUCTURE POLYPEPTIDIQUE

La caractérisation de la structure polypeptidique des différents isolats du virus EMC a été investiguée afin de vérifier si les différences observées au niveau de la pathogénicité et de la réactivité dans les tests de séroneutralisation, notamment des isolats Q.90-890 et Q.90-6041, se traduisaient par des différences au niveau des protéines structurales. Dans les expériences d'immunobuvardage faites avec du virus concentré à partir des surnageants de cultures infectées, il a été possible de mettre en évidence 5 protéines majeures correspondant aux protéines de la capside virale; leur poids moléculaire variaient de 14 à 35 kDa en accord avec les profils ayant été établis auparavant par d'autres auteurs (Palmenberg *et al.*, 1984). Les immunoempreintes révélées à l'aide du sérum hyperimmun produit contre la souche de référence ATCC VR-129 ont permis de mettre en évidence les 4 protéines structurales composant la capside de même que le précurseur VP0, clivé en fin de synthèse pour donner naissance aux protéines VP2 et VP4. À l'exception des isolats Q.90-890 et Q.90-6041, tous les isolats partageaient les épitopes présents sur les 5 protéines homologues. Par ailleurs, ces deux isolats se différenciaient des autres tant qu'à l'absence de réactivité de l'antisérum de la souche de référence envers leur protéine VP4. Ce résultat suggère qu'il pourrait s'agir de variants antigéniques du virus. L'isolat Q.90-890 a été récupéré de poumons de porcelets à la mamelle affectés de problèmes respiratoires sévères, tandis que l'isolat Q.90-6041 a été isolé d'un avorton. Au niveau du tropisme du virus, plusieurs études ont été réalisées. Burch et Harb (1974) ont décrit le tropisme du virus

EMC chez la souris comme étant majoritairement cardiotrope, mais pouvant être aussi retrouvé au niveau des reins, du foie et du pancréas. Des variants du virus EMC sont indistinguables immunologiquement alors qu'ils produisent des syndromes distincts chez la souris (Cerutis *et al.*, 1989). En effet, qu'ils s'agissent de souches neurotropes, diabétogéniques ou myotropes, toutes s'avérent sérologiquement identiques.

4. DÉTECTION DES ISOLATS DU VIRUS EMC

Étant donné qu'aucune des méthodes utilisées précédemment avaient permis d'établir de façon évidente la preuve de la présence de variants antigéniques parmi les isolats québécois provenant de porcelets à la mamelle affectés de problèmes respiratoires et les isolats provenant de tissus ou liquides foetaux de porcelets associés à des problèmes reproducteurs, une approche plutôt moléculaire a été préconisée. L'approche RT-PCR a été choisie pour sa rapidité d'exécution, pour son potentiel à être utilisée comme outil de diagnostic et sa grande sensibilité (Meyer *et al.*, 1991).

L'utilisation d'amorces oligonucléotidiques correspondant aux régions génomiques des protéines structurales majeures ont été choisies pour la détection spécifique du virus dans les spécimens cliniques et pour vérifier si les différences observées au niveau des séquences nucléotidiques des fragments amplifiés pourraient se traduire par des changements au niveau des déterminants antigéniques majeurs. Ces amorces ont été déduites de la séquence nucléotidique de la polyprotéine de la souche simienne de référence publiée par Palmenberg

et al. (1984), à l'aide du programme d'analyses de séquences de Purstell. Les régions génomiques analysées correspondaient aux régions codant pour les protéines de la capside, localisées au niveau de l'extrémité 5' de l'ARN génomique, les plus susceptibles d'être impliquées dans les variations entre les isolats. Notre étude a porté plus particulièrement sur la protéine VP1 ou δ, la plus prédisposée à des variations antigéniques (Stanway, 1990) et celle qui a été décrite comme étant associée au tropisme (Cerutis *et al.* 1989).

L'utilisation des amorces choisies a permis l'amplification de 4 fragments à partir de préparations du virus EMC. Les amorces 3A-1B et 1A-1B correspondaient aux régions génomiques codant pour une partie de la protéine VP2 ou β et pour la protéine VP4, et permettait l'amplification d'un fragment d'une mobilité de 461 et 434 pb, respectivement. Les amorces 2A-2B et 4A-4B avaient été générées afin d'amplifier des fragments génomiques correspondant à la protéine VP1 ou δ, d'une taille de 410 et 806 pb, respectivement. Ces amorces ont, dans un premier temps, permis d'amplifier des régions du génome de l'isolat Q.90-890 et de la souche de référence simienne. La taille des fragments obtenus correspondait à celle prédite selon l'analyse des séquences par le programme Purstell.

La spécificité de la technique d'amplification enzymatique pour la détection du virus a été testée en utilisant différentes souches du virus EMC, de même que d'autres virus ayant été associés à des problèmes reproducteurs chez les truies de toutes parités en fin de

gestation. Dans ces expériences, seules les souches du virus EMC ont réagi positivement aux diverses amorces utilisées.

Une fois que la spécificité des amorces avait été vérifiée, la technique RT-PCR a été utilisée pour l'amplification de fragments génomiques de 806 pb correspondant à la protéine VP1 ou δ de tous les isolats québécois, américains et sud-américain propagés dans notre laboratoire. Des amplicons ont été obtenus pour tous les isolats à l'exception de l'isolat Q.90-6041 pour lequel une faible réponse a été obtenue, et ce, à trois reprises, ce qui pourrait être dû à un mauvais isolement viral, à une quantité insuffisante de virus dans l'aliquot ou à l'existence d'une variation au niveau de la protéine de la capside de cet isolat provenant d'un avorton.

La sensibilité de la technique d'amplification enzymatique a été déterminée vis-à-vis de la souche de référence ATCC VR-129 diluée sériellement et en utilisant la paire d'amorces 3A-1B. Il a été possible de détecter le génome à partir de préparations contenant au moins 10 000 $DCEP_{50}$ de virus. Aucun fragment n'a été amplifié à partir de préparations d'acides nucléiques extraits de cellules non infectées. Ces résultats indiquent que pour augmenter la sensibilité de la technique pour la détection du virus à partir d'échantillons cliniques contenant des anticorps ou des échantillons où la concentration virale est très faible, comme par exemple les liquides et tissus d'avortons, une méthode alternative était nécessaire. Selon Oraveerakul *et al.* (1990), l'utilisation simultanée des techniques RT-PCR et d'hybridation moléculaire augmenterait grandement les possibilités de détection du virus à partir de tels

échantillons. Tel que montré précédemment par Hertig *et al.* (1991), la spécificité et la sensibilité pouvaient être améliorées par hybridation moléculaire des fragments amplifiés transférés sur membrane de nitrocellulose selon la technique de Southern.

Une sonde moléculaire marquée à la digoxygénine a été préparée dans le but d'être utilisée pour la révélation des produits de la réaction d'amplification enzymatique. Les oligonucléotides synthétiques utilisés correspondaient à des séquences courtes, mais bien conservées chez différentes souches de la région codant pour la protéine VP1 ou α. Bien qu'une réaction positive ait été obtenue initialement avec l'entérovirus porcin de type 1, ce signal fut éliminé suite à l'établissement des conditions optimales de stringence soient une température d'hybridation de 50°C et une concentration de formamide de 60%.

L'hybridation moléculaire a été combinée à la technique RT-PCR pour augmenter le seuil de détection virale. Cette combinaison a permis d'augmenter le seuil de détectabilité d'un facteur de 10 par rapport à la technique RT-PCR seule. Ce seuil est identique à celui obtenu par Meyer *et al.* (1991) dans le cas du virus de la fièvre aphteuse des bovins, un autre membre de la famille *Picornaviridae*.

L'efficacité des techniques combinées a par la suite été vérifiée pour la détection du virus à partir des tissus de souris infectées expérimentalement par l'isolat porcin Q.90-890 récupéré des poumons de porcelets manifestant des problèmes respiratoire. Puisque le tropisme de cet isolat variait de celui décrit pour la majorité des souches porcines (Kim *et*

al., 1989; Acland et Littlejohns, 1986; Links et Whittington, 1983), il était intéressant de vérifier au niveau de quels organes des souriceaux le virus pouvait être retrouvé. Deux fragments ont été amplifiés à partir d'homogénats de cerveau des souris inoculées. La présence du virus au niveau du cerveau n'était toutefois pas une surprise puisque des lésions d'encéphalite avaient déjà été observées lors de l'évaluation de la virulence des différents isolats québécois. Cependant, aucune lésion n'avait été décelée au niveau du coeur, à partir duquel il a été possible de détecter la présence du virus par l'approche moléculaire. Le coeur est aussi reconnu comme étant un organe-cible de l'infection par le virus EMC (Kim *et al.* 1989b; Joo *et al.*, 1988).

Le fait que certains organes soient plus susceptibles que d'autres semble attribuable à la présence de récepteurs spécifiques nécessaires à l'infection. Par exemple, chez les souris, les souches B (diabétogène) et D (non-diabétogène) s'attaquent de préférence au pancréas alors que les souches MM et K attaquent de préférence le cerveau et le système nerveux central (Kim *et al.*, 1991; Cerutis *et al.*, 1989; Joo *et al.*, 1988). D'après des études visant à caractériser les variants B et D, il a été démontré que la seule différence entre ces souches est la présence d'une séquence de 24 bases dans la séquence nucléotidique de la protéine VP1 de la souche D qui n'est pas retrouvée dans la séquence de la souche B (Eun *et al.*, 1988).

Les méthodes de diagnostic les plus couramment employées pour la détection virale, soient l'isolement en cultures cellulaires et l'immunofluorescence indirecte en coupes

congelées, ont été mises à l'épreuve afin de comparer leur efficacité à celle de la technique PCR combinée à l'hybridation moléculaire. Ces différentes techniques ont été utilisées pour suivre la progression de l'infection du virus EMC chez la souris. L'efficacité de la technique d'isolement sur cultures cellulaires peut être comparée à celles de l'amplification enzymatique et de l'hybridation moléculaire, mais elle n'est pas aussi spécifique. La plupart des tissus à partir desquels il a été possible d'isoler le virus en cultures cellulaires se sont avérés positifs par PCR et hybridation. Dans aucun cas, il a été possible de cultiver le virus à partir d'organes s'étant révélés négatifs par RT-PCR et hybridation moléculaire. Toutefois, une période de deux semaines était nécessaire pour confirmer l'isolement en cultures cellulaires, comparativement à moins de 5 jours dans le cas de l'approche moléculaire. Le délai est attribuable au fait que l'effet cytopathique induit sur les cellules Vero n'est pas spécifique au virus EMC, d'où la nécessité de confirmer l'infection par des analyses sérologiques comme l'immunofluorescence indirecte et la séroneutralisation.

Après avoir vérifié l'efficacité de l'approche moléculaire pour la détection du virus de l'encéphalomyocardite, cette dernière fut évaluée dans le cas de spécimens provenant de porcs malades. Les analyses histopathologiques réalisées antérieurement suite à la nécropsie de porcs venant d'élevages ayant expérimenté des épisodes de problèmes reproducteurs et respiratoires, avaient permis de mettre en évidence des lésions de myocardite et d'encéphalite nécrotiques (Dea *et al.*, 1991a, b). Toutefois, la présence d'antigènes viraux n'avaient pas pu être démontrée par immunofluorescence indirecte sur coupes de tissus. Des résultats

similaires avaient été rapportés par d'autres auteurs à partir de cas de l'état du Minnesota (Zimmerman *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1989a; Joo *et al.*, 1988). Lors d'essais d'isolement sur cultures cellulaires, le virus avait été cultivé à partir d'homogénats de coeur, de poumons, de cerveau et de rate. La technique RT-PCR-hybridation a permis de détecter un fragment génomique de 806 pb correspondant à l'ARN viral au niveau du coeur, du cerveau et de la rate de porcelets gnotobiotes ayant été infectés de façon expérimentale, confirmant ainsi la plus grande sensibilité de l'approche moléculaire.

5. CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES ISOLATS DU VIRUS EMC

L'analyse des séquences du fragment amplifié, correspondant à la région génomique de la protéine VP1, et cloné dans le vecteur d'amplification a montré qu'il s'agissait bien de séquences spécifiques du virus EMC. L'utilisation de la technique d'amplification par PCR pour la détection des clones possédant la séquence virale recherchée s'est révélée être une méthode rapide et fiable pour la sélection des clones recombinants. L'amplification de l'ADNc des deux isolats québécois par des amorces spécifiques 4A-4B a permis d'obtenir des fragments de 806 pb. L'analyse comparative des séquences de la portion clonée du gène codant pour la protéine VP1 du virus EMC produit par la lignée Vero-EMC des isolats québécois Q.90-890 et Q.90-945, récupéré de poumons de porcelets affectés de problèmes respiratoires, a démontré un degré d'homologie supérieur à 99 % par rapport à la séquence de la souche de référence simienne VR-129 publiée par Palmenberg *et al.* (1984). Les substitutions nucléotidiques obtenues se traduisaient toutes par un changement en acides

aminés. Ces derniers pourraient être responsables de la pathologie particulière de ces isolats, soit un tropisme particulier pour le système respiratoire. L'analyse des séquences nucléotidiques et peptidiques de ces isolats a permis de conclure qu'ils se rapprochent davantage de la séquence de la souche de référence simienne plutôt que de la souche abortive Florida. La majorité des substitutions observées sont silencieuses et un degré d'homologie de 84 % a été démontré en comparaison avec la souche de référence simienne. Cette souche abortive porcine semble plus près, au niveau moléculaire de la souche B diabétogène murine que des souches porcines respiratoires et simienne.

CONCLUSION

Le présent travail nous a permis de déterminer les conditions de croissance du virus de l'encéphalomyocardite (EMC) sur la lignée cellulaire Vero d'origine simienne. Cette lignée pourrait être employée pour la production d'antigènes EMC à des fins de diagnostic. Son usage n'est pas limité puisque même après de nombreux passages, l'effet cytopathique caractéristique est toujours retrouvé, et les titres infectieux supérieurs à $10^{7,0}$ $DECP_{50}$/ml. La lignée cellulaire BHK-21 provenant de hamster n'a pas permis l'isolement initial du virus à partir des cas cliniques. Toutefois, après isolement et propagation sur cellules Vero, l'effet cytopathique induit sur les cellules BHK-21 était similaire. La lignée cellulaire Vero s'est donc avérée plus sensible pour l'isolement à partir des spécimens cliniques. L'identification sérologique des différents isolats a pu être confirmée par immunofluorescence indirecte utilisant un antisérum produit contre la souche de référence simienne. Il n'a pas été possible de différencier les divers isolats selon le type de plages produites sur les feuillets cellulaires Vero. Les profils polypeptidiques des isolats québécois propagés sur cultures cellulaires Vero étaient similaires aux profils obtenus pour la souche de référence.

L'amplification par PCR, à l'aide de paires d'amorces oligonucléotidiques correspondant aux séquences consensus des régions génomiques codant pour les protéines structurales VP1, VP3 et VP4, a permis de confirmer l'appartenance au virus EMC de tous les isolats québécois provenant de foetus, de liquides foetaux et de porcelets affectés de problèmes associés au syndrome reproducteur et respiratoire porcin. La sensibilité de la technique d'amplification enzymatique pour la détection du virus dans les spécimens

cliniques a été évaluée à 10 000 $DECP_{50}$ par électrophorèse en gel d'agarose, alors qu'elle était de 1 000 $DCEP_{50}$, à quelques reprises, lorsque combinée à l'hybridation moléculaire en utilisant une sonde spécifique marquée à la digoxygénine. La spécificité des différentes amorces a été confirmée par le fait qu'aucune amplification de fragments génomiques n'a pu être obtenue à partir de préparations purifiées d'autres virus associés à des problèmes de reproduction ou respiratoire chez l'espèce porcine. Par cette technique, il a été possible de détecter le génome du virus EMC au niveau des tissus de souris et de porcelets infectés expérimentalement, plus particulièrement au niveau des organes-cibles de l'infection, soient le cerveau et le coeur, mais aussi au niveau des intestins, de la rate et des poumons.

L'établissement de mesures de contrôles de l'infection par le virus de l'encéphalo--myocardite a été jusqu'à présent rendu difficile étant donné les difficultés démontrées pour l'isolement du virus dans les tissus d'animaux infectés. Les méthodes classiques de détection virale, telles l'isolement en cultures cellulaires, et d'anticorps, telles la séroneutralisation et l'inhibition de l'activité hémagglutinante, sont bien sûr efficaces mais il faut beaucoup de temps avant d'obtenir un résultat positif ou une confirmation. La combinaison des techniques PCR et d'hybridation moléculaire s'est avérée d'une sensibilité supérieure aux techniques conventionnelles de détection. De plus, les résultats peuvent être obtenus en moins de 5 jours, comparativement à la période de deux semaines nécessaire à la confirmation de l'isolement en cultures cellulaires. Ces techniques sont par ailleurs très

spécifiques et la présence d'anticorps bloqueurs retrouvés normalement dans les tissus d'avortons ou de porcelets immunocompétents n'interfère pas au niveau de leur efficacité.

La comparaison de séquences des souches respiratoires porcines obtenues par PCR, de 748 nucléotides correspondant à la région codant pour la protéine capsidique VP1, a montré l'existence de 7 substitutions nucléotidiques, se traduisant toutes par des modifications au niveau peptidique, en comparaison à la séquence publiée du virus de l'encéphalomyocardite. Ces deux isolats semblent plus près de la souche de référence simienne, alors que la souche abortive américaine Florida semble plus rapprochée de la souche diabétogène B du virus EMC. Il serait intéressant de poursuivre les travaux au niveau de l'aspect moléculaire en utilisant la mutagénèse dirigée afin de vérifier si les modifications observées au niveau des séquences nucléotidiques et peptidiques sont associées aux différents tropismes du virus EMC porcin, et en particulier des souches abortives québécoises.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, en premier lieu, le docteur Serge Dea, mon directeur de recherche, de m'avoir accueillie au sein de son équipe et d'avoir supervisé mon projet de recherche. Je tiens à le remercier aussi pour l'enthousiasme qu'il a su me communiquer, pour sa compréhension, sa grande disponibilité, sa patience et pour toutes les connaissances acquises à son contact. J'en ressors mieux formée et empreinte du désir d'aller plus loin.

Je remercie aussi le docteur Robert Bilodeau pour son implication au niveau de l'inoculation expérimentale de truies et de porcelets.

Je remercie aussi tous les gens qui ont participé de près ou de loin à mon travail de maîtrise et en particulier, les techniciennes Louise Wilson et Nicole Sawyer, mes conseillères et amies, pour leur collaboration à mon projet, pour leur disponibilité et pour les conversations inoubliables entretenues au cours des trois dernières années et aussi pour leurs bons conseils. Elles resteront pour moi des compagnes de route irremplaçables.

Je veux remercier Joanne Roger du service de séquençage ainsi que le docteur François Shareck pour la synthèse des amorces oligonucléotidiques.

Je suis reconnaissante envers les docteurs Jean Bergeron, Ridha Rekik, Samir Mounir, ainsi qu'à Helmi Mardassi et Roger Dubuc pour les conseils judicieux qu'ils ont su me donner et pour les discussions scientifiques qui m'ont permis d'agrandir mes connaissances. Je les remercie aussi du fait qu'ils ont toujours été disponibles pour répondre à mes questions.

Je tiens à remercier le personnel du Service de l'audio-visuel, soit André Levac et Ginette Larose pour leur efficacité et pour leur excellent travail effectué pour les montages graphiques, les photographies et les diapositives.

Un gros merci à tous les techniciens et techniciennes, professeurs, étudiants et tout le personnel de l'édifice 27 pour leur accueil chaleureux, leur compagnie, leur amitié et tous les bons moments partagés avec eux.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers la Fondation Armand-Frappier et aussi au Centre de Recherche en Virologie (Centre de Médecine comparée) pour leur soutien financier au cours des trois dernières années.

Je tiens à remercier le Conseil des Recherches en Pêches et Agro-Alimentaire du Québec, la Fédération des Producteurs de porcs du Québec et Vetrepharm Research Inc., sans qui, ce projet n'aurait pu voir le jour.

Finalement, je dois remercier d'une façon particulière mes parents, Lise et Jacques Canuel, qui ont toujours su croire en moi, m'apprendre à persévérer et m'apporter amour, soutien et encouragements dont j'ai tant eu besoin au cours des moments difficiles.

Merci à toi Francis, qui a su me redonner le sourire et qui, à travers tes gestes, a su m'apporter le soutien, les encouragements et la motivation nécessaire pour atteindre des sommets que je croyais inatteignables. Merci à toi, Marc-Antoine, pour tes beaux sourires.

BIBLIOGRAPHIE

ACHARYA, R., E. FRY, D. STUART, G. FOX, D. ROWLANDS et F. BROWN. 1989. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. Nature **337**: 709-716.

ACLAND, H.M. ET I.R. LITTLEJOHNS. 1986. «Encephalomyocarditis virus». Tiré de A.D. Leman (éd): Diseases of swine, Sixième édition. Iowa State University Press, Ames, IA: 399-402.

ACLAND, H.M. ET I.R. LITTLEJOHNS. 1975. Encephalomyocarditis virus infection in pigs. I. An outbreak in New South Wales. Aust. Vet. J. **51**: 409-415.

ALMOND, J.W. (1987). The attenuation of poliovirus neurovirulence. Ann. Rev. Microbiol. **41**: 153-180.

ARNOLD, E., M. LUO, G. VRIEND, M.G. ROSSMANN, A.C. PALMENBERG, G.D. PARKS, M.J.H. NICKLIN et E. WIMMER. 1987. Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **64**: 21-25.

BAE, Y.-S., H.-M. EUN, R.T. PON, D. GIRON et J.-W. YOON. 1990. Two amino acids, Phe 16 and Ala 776, on the polyprotein are most likely to be responsible for the diabetogenicity of encephalomyocarditis virus. J. Gen. Virol. **71**: 639-645.

BAE, Y.-S., H.-M. EUN et J.-W. YOON. 1989. Genomic differences between the diabetogenic and nondiabetogenic variants of encephalomyocarditis virus. Virology **170**: 282-287.

BELL, J. 1989. The polymerase chain reaction. Immunol. Today **10**: 351-355.

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

BLACK, D.N., P.STEPHENSON, D.J. ROWLANDS et F. BROWN. 1979. Sequence and location of the poly C tract in aphtho- and cardiovirus RNA. Nucl. Ac. Res. **6**: 2381-2390.

BOROVJAGIN, A.V., M.V. EZROKHI, V.M. ROSTAPSHOV, T.Y. UGAROVA, T.F. BYSTROVA et I.N. SHATSKY. 1991. RNA-protein interactions within the internal translation initiation region of encephalomyocarditis virus RNA. Nucl. Ac. Res. **19**: 4999-5005.

BOROVJAGIN, A.V., A.G. EVSTAFIEVA, T.Y. UGAROVA et I.N. SHATSKY. 1990. A factor that specifically binds to the 5'-untranslated region of encephalomyocarditis virus RNA. FEBS letters **261**: 237-240.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.

BROWN, F., J. NEWMAN, J. STOTT, A. PORTER, D. FRISBY, C. NEWTON, N. CAREY et P. FELLNER. 1974. Poly (C) in animal viral RNAs. Nature **251**: 342-344.

BRUCE, C., W. Al-NAKIB, M. FORSYTH, G. STANWAY et J.W. ALMOND. 1989. Detection of enteroviruses using cDNA and synthetic oligonucleotide probes. J. Virol. Meth. **25**: 233-240.

BURCH, G.E. ET J.M. HARB. 1974. Characteristic ultrastructure changes in organs of newborn mice infected with EMC. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **146**: 1076-1086.

CAROL SHIEH, Y.-S., R.S. BARIC, M.D. SOBSEY, J. TICEHURST, T.A MIELE, R. DELEON et R. WALTER. 1991. Detection of hepatitis A virus and other enteroviruses in water by ssRNA probes. J. Virol. Meth. **31**: 119-136.

CERUTIS, D.R., R.H. BRUNER, D.C. THOMAS et D.J. GIRON. 1989. Tropism and histopathology of the D, B, K, and MM variants of encephalomyocarditis virus. J. Med. Virol. **29**: 63-69.

CHIRNSIDE, E.D. et W.J.M. SPAAN. 1990. Reverse transcription and cDNA amplification by the polymerase chain reaction of equine arteritis virus (EAV). J. Virol. Meth. **30**: 133-140.

CHOMCZYNSKI, P. et N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162**: 156-159.

CHOW, M., J.F.E. NEWMAN, D. FILMAN, J.M. HOGLE, D.J. ROWLANDS et F. BROWN. 1987. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. Nature **327**: 482-486.

CHRISTIANSON, W.T., CHOI, C. ET J.E. COLLINS. 1993. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mid-gestation sows and fetuses. Can. J. Vet. Res.

CHRISTIANSON, W.T., KIM, H.S. ET H.S. JOO. 1990. Porcine reproductive and neonatal losses associated with possible encephalomyocarditis virus infection. Vet. Record **126**: 54-57.

COHEN, J.I. 1989. «Toward understanding the molecular basis for attenuation of picornaviruses.» dans Advances in Virus Research. Academic Press. **36**: 153-180.

COHEN, S.H., R.K. NAVIAUX, K.M. VANDEN BRINK et G.W. JORDAN. 1988. Comparison of the nucleotide sequences of diabetogenic and nondiabetogenic encephalomyocarditis virus. Virology **166**: 603-607.

COLLINS, J.E., D.A. BENFIELD ET W. CHRISTIANSON. 1991. Swine infertility and respiratory syndrome (mystery swine disease). Proc. Minn. Swine Conf. Vet. **1**: 200-205.

COLONNO, R.J. 1986. Cell surface receptors for picornaviruses. Bioessays **5**: 270-274.

CRAIGHEAD, J.E. 1966. Pathogenicity of M and E variants of the encephalomyocarditis virus. I. Myocardiotropic and neurotropic properties. Am. J. Pathol. **48**: 333-343.

CRAIGHEAD, J.E. ET A. SKELOKOV. 1961. Encephalomyocarditis virus hemagglutination test using antigens prepared in HeLa cell cultures. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. **108**: 823-826.

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

DEA, S., R. BILODEAU, R. ATHANASSIOUS, R. SAUVAGEAU et G.P. MARTINEAU. 1992b. Porcine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: virological and pathological aspects. ASSP Newsletter **4**: 2-7.

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

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

DEA, S., R. BILODEAU et G.P. MARTINEAU. 1991a. Isolation of encephalomyocarditis virus among stillborn and post-weaning pigs in Quebec. Arch. Virol. **117**: 121-128.

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

DEA, S., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU et G.P. MARTINEAU. 1991c. Caractéristiques d'isolats des virus influenza et de l'encéphalomyocardite murine associés au Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (SRRP) au Québec. Le Médecin Vétérinaire du Québec. **21**: 170-175.

de JONG, M.F., CROMWIJK, W. ET P. VELD. 1991. The new pig disease - epidemiology and production losses in the Netherlands. Proc. Meet PRRS - the New Pig Dis. Comm. Eur. Commun **1**: 9-19.

DEL ANGEL, R.M., A.G. PAPAVASSILIOU, C. FERNANDEZ-TOMAS, S.J. SILVERSTEIN et V.R. RACANIELLO. 1989. Cell proteins bind to multiple sites within the 5' untranslated region of poliovirus RNA. Proc. Natl. Acad. Sc. USA. **86**: 8299-8303.

DEVANEY, M.H., VAKHARIA, V.N., LLOYD, R.E., EHRENFELD, E. ET M.J. GRUBMAN. 1988. Leader of foot-and-mouth-disease virus is required for cleavage of p220 component of the cap-binding complex. J. Virol. **62**: 4407-4409.

DEVER, T.E., GLYNIAS, M.J. ET W.C. MERRICK. 1987. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**: 1814-1818.

DILDINE, S.L. et B.L. SEMLER. 1992. Conservation of RNA-protein interactions among picornaviruses. J. Virol. **66**: 4364-4376.

DONTA, S.T., J.D. SHANLEY et P. DAMIANO-BURBACH. 1986. Encephalomyocarditis virus can bind to and transfect non-permissive cells. Arch. Virol. **88**: 301-304.

DRAKE, N.L., A.C. PALMENBERG, A. GHOSH, D.R. OMILIANOWSKI et P. KAESBERG. 1982. Identification of the polyprotein termination site on encephalomyocarditis viral RNA. J. Virol. **41**: 726-729.

DRYGIN, Y., A. SHABANOV et A. BOGDANOV. 1988. An enzyme which specifically splits a covalent bond between picornaviral RNA and VPg. FEBS **239**: 343-346.

DUKE, G.M., M.A. HOFFMAN et A.C. PALMENBERG. 1992. Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation. J. Virol. **66**: 1602-1609.

DUKE, G.M. et A.C. PALMENBERG. 1989. Cloning and synthesis of infectious cardiovirus RNAs containing short, discrete poly(C) tracts. J. Virol. **63**: 1822-1826.

EUN, H.-M., Y.-S. BAE et J.-W. YOON. 1988. Amino acid differences in capsid protein, VP1, between diabetogenic and nondiabetogenic variants of encephalomyocarditis virus. Virology **163**: 369-373.

EVSTAFIEVA, A.G., T.Y. UGAROVA, B.K. CHERNOV et I.N. SHATSKY. 1990. A complex RNA sequence determines the internal initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation. Nucl. Ac. Res. **19**: 665-671.

FIELDS, B.N., D.M. KNIPE, R.M. CHANOCK, M.S. HIRSCH, J.L. MELNICK, T.P. MONATH ET B. ROIZMAN. Virology : Second edition. Raven Press. New York, États-Unis. Volume **1**.

FRANKEL, A.D., I.W. MATTAJ et D.C. RIO. 1991. RNA-protein interactions. Cell **67**: 1041-1046.

GAINER, J.M. 1967. Encephalomyocarditis virus infection in Florida, 1960-1966. J. Am. Vet. Med. Assoc. **151**: 421-425.

GIRARD, C., M. MORIN ET Y. EL AZHARY. 1992. Experimentally-induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia with an influenza A virus. Vet. Record **130**: 206-207.

GIRARD, M. ET L. HIRTH. 1989. Virologie moléculaire. Doin Éditeurs. Paris, France.

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

GRUBMAN, M.J., M. ZELLNER et J. WAGNER. 1987. Antigenic comparison of the polypeptides of foot-and-mouth disease virus serotypes and other picornaviruses. Virology **158**: 133-140.

HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**: 557-580.

HARRISON, S.C. 1989. Finding the receptors. Nature **338**: 205-506.

HELLEN, C.U.T., H.-G. KRÄUSSLICH et E. WIMMER. 1989. Proteolytic processing of polyproteins in the replication of RNA viruses. Biochemistry **28**: 9881-9889.

HERTIG, C., U. PAULI, R. ZANONI et E. PETERHANS. 1991. Detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. **26**: 65-76.

HILL, B.D., P.J. KETTER ET B.J. RODWELL. 1985. Encephalomyocarditis virus infection and pig disease in Queensland. Aust. Vet. J. **62**: 433-434.

HODGMAN, T.C. 1988. A new superfamily of replicative proteins. Nature **333**: 22-23.

IISUKA, N. S. KUGE ET A. NOMOTO. 1987. Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackievirus B1. Virology **156**: 64-73.

INOUE, H., H. NOJIMA ET H. OKAYAMA. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene **96**: 23-28.

JACKSON, R.J., M.T. HOWELL et A. KAMINSKI. 1990. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. TIBS **15**: 477-483.

JACKSON, R.J. 1989. An unusual coordinated cleavage event in the processing of encephalomyocarditis virus polypeptides. Virology **172**: 363-366.

JACKSON, R.J. 1988. Picornaviruses break the rules. Nature **334**: 292-293.

JACKSON, R.J. 1986. A detailed kinetic analysis of the *in vitro* synthesis and processing of encephalomyocarditis virus products. Virology **149**: 114-127.

JANG, S.K. et E. WIMMER. 1990. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. Genes & Development **4**: 1560-1572.

JOO, H.S., H.S. KIM et A.D. LEMAN. 1988. Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified or stillborn pigs. Arch. Virol. **100**: 131-134.

KEFFABER, K.K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. Am. Assoc. Swine Pract. News **1**: 1-10.

KELLY, P.M., J.D. SHANLEY et J. SEARS. 1983. Replication of encephalomyocarditis virus in various mammalian cell types. J. Med. Virol. **11**: 257-264.

KIM, H.S., H.S. JOO, W.T. CHRISTIANSON et R.B. MORRISON. 1991. Evaluation of serologic methods for the detection of antibodies to encephalomyocarditis virus in swine fetal thoracic fluids. J. Vet. Diagn. Invest. **3**: 283-286.

KIM, H.S., W.T. CHRISTIANSON et H.S. JOO. 1989. Pathogenic properties of encephalomyocarditis virus isolates in swine fetuses. Arch. Virol. **109**: 51-57.

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

KOENEN, F., K. DE CLERCK ET R. STROBBE. 1991. Isolation of encephalomyocarditis virus in the offspring of swine with reproductive failure in Belgium.

KRÄUSSLICH, H.-G., M.J.H. NICKLIN, C.-K. LEE et E. WIMMER. 1988. Polyprotein processing in picornavirus replication. Biochimie **70**: 119-130.

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

LAWSON, M.A. et B.L. SEMLER. 1990. «Picornavirus protein processing - enzymes, substrates and genetic regulation.» dans de Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag (éd.) **161**: 49-84.

LI, J.P. ET D. BALTIMORE. 1990. An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating defect. J. Virol. **64**: 1102-1107.

LINKS, I.J., R.J. WHITTINGTON, D.J. KENNEDY, A. GREWAL ET A.J. SHARROCKS. 1986. An association between encephalomyocarditis virus infection and reproductive failure in pigs. Aust. Vet. J. **63**: 150-152.

LINKS, I.J. ET R.J. WHITTINGTON. 1983. Pathogenic properties of encephalomyocardfitis virus in swine fetuses. Arch. Virol. **109**: 51-57.

LIPTON, H.L., M. CALENOFF, P. BANDYOPADHYAY, S.D. MILLER, M.C. DAL CANTO, S. GERETY et K. JENSEN. 1991. The 5' noncoding sequences from a less virulent Theiler's virus dramatically attenuate GDVII neurovirulence. J. Virol. **65**: 4370-4377.

LIPTON, H.L. 1980. Persistent Theiler's murine encephalomyelitis virus infection in mice depends on plaque size. J. Gen. Virol. **46**: 169-177.

LITTLEJOHNS, I.R. 1984. Encephalomyocarditis virus from stillborn pigs. Aust. Vet. J. **61**: 93.

LOVE, R.J. ET A.S. GREWAL. 1986. Reproductive failure in pigs caused by encephalomyocarditis virus. Aust. Vet. J. **63**: 128.

LUO, M., G. VRIEND, G. KAMER, I. MINOR, E. ARNOLD, M.G. ROSSMANN, U. BOEGE, D.G. SCRABA, G.M. DUKE et A.C. PALMENBERG. 1987. The atomic structure of Mengo virus at 3.0 Å resolution. Science **235**: 182-191.

MACEJAK, D.G. et P. SARNOW. 1991. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. Nature **353**: 90-94.

MANIATIS, T., F.F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

MARTINEAU, G.P., R. BILODEAU, R.SAUVAGEAU, C. MOORE et S. DEA. 1992. Le Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (SRRP) au Québec : Données cliniques pathologiques et virologiques. Journées Rech. Porcine en France. **24**: 127-136.

MARTINEAU, G.P., BILODEAU, R., SAUVAGEAU, R. ET S. DEA. 1991. Le Syndrome «Hyperthermie-anorexie-avortement de la truie» (HAAT) et pneumonie interstitielle du porc. Journées Rech. Porcine en France. **23**: 179-188.

MATTHEWS, R. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Quatrième rapport du comité sur la taxonomie des virus (ICTV). Intervirology **17**: 1-200.

McCLINTOCK, P.R., L.C. BILLUPS et A.L. NOTKINS. 1980. Receptors for encephalomyocarditis virus on murine and human cells. Virology **106**: 261-272.

McFARLANE, R.G., T.W. MOLITOR et V.N. VAKHARIA. 1990. The detection and differenciation of foot-and-mouth disease viruses using solid-phase nucleic acid hybridization. J. Virol. Meth. **27**: 175-188.

MENG, X.-J., P.S. PAUL, E.M. VAUGHN et J.J. ZIMMERMAN. 1993. Development of a radiolabeled nucleic acid probe for the detection of encephalomyocarditis virus of swine. J. Vet. Diagn. Invest. **5**: 254-258.

MEYER, R.F., C.C BROWN, C. HOUSE, J.A. HOUSE et T.W. MOLITOR. 1991. Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. J. Virol. Meth. **34**: 161-172.

MINOR, P.D. 1990. «Antigenic structure of picornaviruses.» dans de Current topics in microbiology and immunology. Springer-Verlag (éd.) **161**: 122-154.

MORIN, M. ET Y. ROBINSON. 1991. Porcine reproductive and respiratory syndrome in Quebec. Vet. Record **129**: 367-368.

MORIN, M., C. GIRARD, Y. EL AZHARY, 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.

NICKLIN, M.J.H., H. TOYODA, M.G. MURRAY et E. WIMMER. 1986. Proteolytic processing in the replication of polio and related viruses. Biotechnology **4**: 33-42.

NITAYAPHAN, S., D. OMILIANOWSKI, M.M. TOTH, G.D. PARKS, R.R. RUECKERT, A.C. PALMENBERG et R.P. ROOS. 1986. Relationship of Theiler's murine encephalomyelitis viruses to the cardiovirus genus of picornaviruses. Intervirology **26**: 140-148.

NOMOTO, A. ET E. WIMMER. 1987. «Genetic studies of the antigenicity and the attenuation phenotype of poliovirus» tiré M.C. Russel et J.W. Almond (éd): Molecular basis of virus disease. Cambridge University Press, Cambridge. Soc. Gen. Microbiol. Symp. **40**: 107-134.

NOMOTO, A., B. DETZEN, R. POZZATTI ET E. WIMMER. 1977. The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. Nature **268**: 208-213.

OUDSHOORN, P., A. THOMAS, G. SCHEPER et H.O. VOORMA. 1990. An initiation signal in the 5' untranslated leader sequence of encephalomyocarditis virus RNA. Biochimica et Biophysica Acta **1050**: 124-128.

ORAVEERAKUL, K., C.-S. CHOI et T.W. MOLITOR. 1990. Detection of porcine parvovirus using nonradioactive nucleic acid hybridization. J. Vet. Diagn. Invest. **2**: 85-91.

PALMENBERG, A.C. 1990. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. Ann. Rev. Microbiol. **44**: 603-623.

PALMENBERG, A.C., E.M. KIRBY, M.R. JANDA, N.L. DRAKE, G.M. DUKE, K.F. POTRATZ et M.S. COLLETT. 1984. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the encephalomyocarditis viral polyprotein coding region. Nucl. Ac. Res. **12**: 2969-2985.

PALMENBERG, A.C. 1982. In vitro synthesis and assembly of picornaviral capsid intermediate structures. J. Virol. **44**: 900-906.

PARKS, G.D. et A.C. PALMENBERG. 1987. Site-specific mutations at a picornavirus VP3/VP1 cleavage site disrupt *in vitro* processing and assembly of capsid precursors. J. Virol. **61**: 3680-3687.

PATON, D.J., I.H. BROWN ET S. EDWARDS. 1991. Blue ear disease of pigs. Vet. Record **128**: 617.

PAYMENT, P. ET M. TRUDEL. 1989. Manuel de techniques virologiques. Universités francophones (éd). Presses de l'Université du Québec/AUPELF. 354 pages.

PILIPENKO, E.V., V.M. BLINOV et V.I. AGOL. 1990. Gross rearrangements within the 5'-untranslated region of the picornaviral genomes. Nucl. Ac. Res. **18**: 3371-3375.

PILIPENKO, E.V., V.M. BLINOV, B.K. CHERNOV, T.M. DIMITRIEVA et V.I. AGOL. 1989a. Conservation of the secondary structure elements of the 5'-untranslated region of cardio- and aphtovirus RNAs. Nucl. Ac. Res. **17**: 5701-5711.

PILIPENKO, E.V., V.M. BLINOV, L.I. ROMANOVA, A.N. SINYAKOV, S.V. MASLOVA et V.I. AGOL. 1989b. Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. Virology **168**: 201-209.

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

PORTER, A.G., P. FELLNER, D.N. BLACK, D.J. ROWLANDS, T.J.R. HARRIS et F. BROWN. 1978. 3'-terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. Nature **276**: 298-301.

PORTER, A., N. CAREY et P. FELLNER. 1974. Presence of a large poly (rC) tract within the RNA of encephalomyocarditis virus. Nature **248**: 675-678.

POTGIETER, L.N.D. et K.V. BROCK. 1989. Detection of bovine viral diarrhea virus by spot hybridization with probes prepared from cloned cDNA sequences. J. Vet. Diagn. Invest. **1**: 29-33.

PUTNAK, J.R. et B.A. PHILLIPS. 1981. Picornaviral structure and assembly. Microbiol. Rev. **45**: 287-315.

REED, J.L. 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. Microb. **32**: 515-518.

ROSSMANN, M.G. et A.C. PALMENBERG. 1988. Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses. Virology **164**: 373-382.

ROSSMANN, M.G., E. ARNOLD, J.W. ERICKSON, E.A. FRANKERBERGER, J.P. GRIFFITH, H.-J. HECHT, J.E. JOHNSON, G. KAMER, M. LUO, A.G. MOSSER, R.R. RUECKERT, B. SHERRY et G. VRIEND. 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. Nature **317**: 145-153.

ROTHBERG, P.G., T.J.R. HARRIS, A. NOMOTO et E. WIMMER. 1978. O^4-(5'-uridylyl) tyrosine is the bond between the genome-linked protein and the RNA of poliovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **75**: 4868-4872.

RUECKERT, R.R. ET E. WIMMER. 1984. Systematic nomemclature of picornavirus proteins. J. Virol. **50**: 957-959.

RUECKERT, R.R. 1990. «Picornaviridae and their replication» tiré de B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.* (éd) : Virology, Deuxième édition. Raven Press Ltd., New York: 507-548.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH ET F. MANIATIS. 1989. «Strategies for cloning in plasmid vectors» dans: Molecular cloning. A laboratory manual. 2ième édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press **II**: 89-152.

SANFORD, S.E., A.J. REHMTULLA ET G.K.A. JOSEPHSON. 1989a. Encephalomyocarditis virus outbreak among suckling pigs. Can. Vet. J. **30**: 178.

SANFORD, S.E., G.K.A. JOSEPHSON, A.J. REHMTULLA ET P.S. CARMAN. 1989b. Antibodies to encephalomyocarditis virus in aborted and stillborn pigs. Can. Vet. J. **30**: 757.

SANGAR, D.V., D.N. BLACK, D.J. ROWLANDS, T.J.R. HARRIS ET F. BROWN. 1980. Location of the initiation site for protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA by in vitro translation of defined fragments of the RNA. J. Virol. **33**: 59-68.

SANGAR, D.V., D.J. ROWLANDS ET F. BROWN. 1977. Encephalomyocarditis virus antibodies in sera from apparently normal pigs. Vet. Record **100**: 240-241.

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

SCHEPER, G.C., A.A.M. THOMAS et H.O. VOORMA. 1991. The 5' untranslated region of encephalomyocarditis virus contains a sequence for very efficient binding of eukaryotic initiation factor eIF-2/2B. Biochemica et Biophysica Acta **1089**: 220-226.

SCHROEDER, B.A. et T.C. BALASSU-CHAN. 1990. Specific sequence amplification of bovine viral diarrhea virus nucleic acid. Arch. Virol. **111**: 239-246.

SHIBATA, I., M. OGAWA, Y. SAMEGAI ET T. ONODERA. 1993. A serological survey of encephalomyocarditis virus infection in pigs in Japan. J. Vet. Med. Sci. **55**: 117-118.

SIMPSON, C.F., A.L. LEWIS ET J.M. GASKIN. 1977. Encephalomyocarditis virus infection of captive elephants. J. Am. Vet. Med. Assoc. **171**: 902-905.

SKINNER, M.A., V.R. RACANIELLO, G. DUNN, J. COOPER, P.D. MINOR et J.W. ALMOND. 1989. New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA structure is important in neurovirulence. J. Mol. Biol. **207**: 379-392.

SONENBERG, N. et J. PELLETIER. 1989. Poliovirus translation: a paradigm for a novel initiation mechanism. Bioessays **11**: 128-132.

STANWAY, G. 1990. Structure, function and evolution of picornaviruses. J. Gen. Virol. **71**: 2483-2501.

STEIN, S.B., L. ZHANG et R.P. ROOS. 1992. Influence of Theiler's murine encephalomyelitis virus 5' untranslated region on translation and neurovirulence. J. Virol. **66**: 4508-4517.

STREBEL, K. ET E. BECK. 1986. A secod protease of foot-and-mouth disease virus. J. Virol. **58**: 893-899.

SVITKIN, Y.V. et V.I. AGOL. 1983. Translational barrier in central region of encephalomyocarditis virus genome : modulation by elongation factor (eEF-2). Eur. J. Biochem. **133**: 145-154.

TESH, R.B. ET G.D. WALLACE. 1978. Observations on the natural history of encephalomyocarditis virus. Am. J. Trop. Med. Hyg. **27**: 133-143.

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

TOBIN, G.J., D.C. YOUNG et J.B. FLANEGAN. 1989. Self-catalysed linkage of poliovirus terminal protein VPg to poliovirus RNA. Cell **59**: 511-519.

TOYODA, H., M.J.H. NICKLIN, M.G. MURRAY, C.W. ANDERSON, J.J. DUNN, F.W. STUDIER ET E. WIMMER. 1986. A second virus-encoded proreinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. Cell **45**: 761-770.

TRONO, D., R. ANDINO et D. BALTIMORE. 1988. An RNA sequence of hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis. J. Virol. **62**: 2291-2299.

VARTAPETIAN, A.B., E.V. KOONIN, V.I. AGOL et A.A. BOGDANOV. 1984. Encephalomyocarditis virus RNA synthesis *in vitro* is protein-primed. EMBO Journal **3**: 2593-2598.

WENSVOORT, G., C. TERPSTRA, J.M.A. POL, E.A. ter LAAK, M. BLOEMRAAD, E.P. de KLUYVER, C. KRAGTEN, L. van BUITEN, A. den BESTEN, F. WAGENAAR, J.M. BROEKHUIJSEN, P.L.J.M. MOONEN, T. ZETSTRA, E.A. de BOER, H.J. TIBBEN, M.F. de JONG, P. van't VELD, G.J.R. GROENLAND, J.A. van GENNEP, M.TH. VOETS, J.H.M. VERHEIJDEN et J. BRAAMSKAMP. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Quart. **13**: 121-129.

WIMMER, E. 1982. Genome-linked proteins of viruses. Cell **28**: 199-201.

YOON, J.-W., A.K.C. WONG, Y.-S. BAE et H.-M. EUN. 1988. An apparent deletion of an oligonucleotide detected by RNA fingerprint in the nondiabetogenic B variant of encephalomyocarditis virus is caused by a point mutation. J. Virol **62**: 637-640.

ZIMMERMAN, J.J., H.T. HILL, G.W. BERAN ET M.C. MEETZ. 1990. Serologic diagnosis of encephalomyocarditis virus infection in swine by the microtiter serum neutralization test. J. Vet. Diagn. Invest. **2**: 347-350.

ANNEXE

ANNEXE I.

1. PRÉPARATION DE SOLUTIONS ET TAMPONS POUR L'ÉLECTROPHORÈ - SE.

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 membrane 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 $NH_4S_2O_8$ 10 %.

Cette solution était préparée extemporanément en faisant dissoudre 0,1 g de $NH_4S_2O_8$ 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'un litre 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 % de glycérol (v/v), 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 Trsi-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 étant alors 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,% %) 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 6,8	-	2,5
Eau distillée	6,86	6,46
SDS 10 %	0,150	0,1
$NH_4S_2O_8$	0,05	0,1
Temed	0,015	0,01

2. PRÉPARATION DE TAMPONS ET SOLUTIONS POUR L'ÉLECTROPHORÈSE SUR GELS D'AGAROSE.

a. Tampon TAE: Ce tampon contenait 4,84 g de Tris-Base, 1,142 ml d'acide acétique glacial, 2,0 ml d'une solution 0,5 M d'EDTA pH 8,0 dans un litre 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 % de glycérol (p/v) 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.

3. PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE POUR LE CLONAGE.

a. 2YT : Ce milieu était préparé en dissolvant 16 g de bacto-tryptone, 10 g d'extrait de levure, 5,0 g de NaCl par litre d'eau distillée. La solution était préalablement autoclavée.

b. LB (1,0 l): Ce milieu était composé de 10 g de bacto-tryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl qui était ajouté à 950 ml d'eau déionisée. Après avoir mélangé jusqu'à dissolution complète, le pH était ajusté à 7,0 avec du NaOH 5N (environ 0,2 ml). Après avoir ajusté le volume de la solution à 1,0 l avec de l'eau déionisée, la solution était stérilisée à l'autoclave.

c. SOC (1,0 l): Ce milieu était préparé extemporanément et contenait 2 % de bacto-tryptone, 0,5 % de bacto «yeast», 10 mM de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ et 10 mM $MgSO_4$.

d. Les solutions stock d'antibiotiques et d'additifs supplémentaires.

- IPTG (4 mM) : 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 μm.

- X-gal (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'antibioti que/ml d'eau distillée. La solution était préalablement filtrée sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm.

- Kanamycine : La solution contenait 10 x 10^{-3} de l'antibiotique/ml d'eau distillée et était préalablement filtrée.

e. Solution STET de lyse : Cette solution contenait 8 % de sucrose, 0,5 % de Triton X-100, 50 mM d'EDTA, 50 mM Tris pH 8,0 et 0,5 mg/ml de lysozyme.

4. PRÉPARATION DES SOLUTIONS POUR LA PURIFICATION DE L'ADN PLASMIDIQUE.

a. Solution de resuspension cellulaire :

50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM d'EDTA et 100 μg/ml RNase A.

b. Solution de lyse :

0,2 M NaOH et 1 % de SDS.

c. Solution de neutralisation :

2,55 M KOAc, pH 4,8

d. Tampon TE : 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 et 1 mM d'EDTA

e. Solution de lavage (colonne) :

200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 et 5 mM EDTA, dilué 1:1 avec de l'éthanol 95 %.

ANNEXE II. TABLEAU DES ACIDES AMINES

Acide aminé	Abréviation	Symbole
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Asparagine ou Acide aspartique	Asx	B
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Glutamine ou Acide glutamique	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V