

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

**Cartographie antigénique et immunogénicité de la nucléoprotéine
du Circovirus Porcin de type 2**

par

Sébastien Racine

**Mémoire
présenté pour l'obtention
du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Virologie et Immunologie**

Membres du jury :

Dr. Peter Tijssen	(co-directeur)
Dr. Max Arella	(président du jury)
Dr. Martin Lessard	(examineur externe)

*À mes parents et ma famille,
Merci de m'avoir soutenu toutes ces années*

*Aux amis du laboratoire,
Pour avoir égayé ma vie durant plus de trois ans*

*Ce mémoire est dédié au Dr Serge Dea
Décédé le 3 janvier 2003 à l'âge de 49 ans
Merci pour tout*

SOMMAIRE

Le circovirus porcin de type 2 (CVP2) est un petit virus à ADN circulaire simple brin infectant les jeunes porcs. Découvert en 1997, il serait impliqué dans le développement du syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage (SDMPS) chez le porc, affliction qui entraîne des retards de croissance, l'émaciation, le dépérissement et des problèmes respiratoires chez les porcelets nouvellement sevrés. Le syndrome engendre des pertes économiques importantes pour les producteurs de porcs dans de nombreuses parties du globe. Cependant personne n'est encore parvenu à contrôler la progression du syndrome, et son mode précis de transmission ainsi que les facteurs précis qui provoquent l'apparition des symptômes sont encore inconnus. L'objectif de ce projet était de cloner l'ORF2 du CVP2 dans un vecteur d'expression eucaryote afin de produire une protéine de nucléocapside virale recombinante permettant d'identifier les épitopes principaux du virus et de mettre au point un test de diagnostic fiable et sensible pour la détection sérologique du virus.

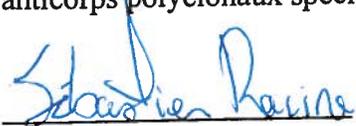
La séquence de l'ORF2 du virus a été amplifiée par PCR et clonée dans un vecteur d'expression eucaryote de type pCEP5 pour produire le plasmide pCEP5-6H-ORF2. Des cellules de type HEK 293 ont été transfectées avec le plasmide et l'expression de la protéine a été confirmée par immunofluorescence et par immunobuvardage. La protéine de la nucléocapside recombinante porte une séquence polyhistidine ce qui a permis de la purifier par chromatographie d'affinité sur colonne.

Les cellules transfectées avec le plasmide et exprimant la nucléocapside recombinante ont été utilisées pour mettre au point un nouveau test diagnostique par immunofluorescence indirecte permettant la détection de très petites quantités d'anticorps dirigés contre le CVP2 dans le sérum des porcs. La sensibilité du test a été vérifiée par l'analyse de 44 sérums de champs de porcs provenant de fermes porcines touchées par le CVP2. Les résultats ont été comparés avec le test de diagnostic classique utilisant des cellules PKA infectées par le CVP2, ce qui a confirmé que le test avec les cellules transfectées permettant la détection d'un plus grand nombre d'animaux positifs.

Afin de déterminer si la seule infection au CVP2 est suffisante pour induire l'apparition du SDMPS chez les porcs, de caractériser la réponse sérologique des porcs à cette infection et d'obtenir des stocks de sérum contenant des anticorps polyclonaux contre le virus, un groupe de quatre porcelets âgés de cinq semaines ont été infectés avec du CVP2 concentré et purifié. Deux porcelets ont été gardés comme témoins négatifs. Des anticorps contre le CVP2 sont apparus chez les porcs infectés environ une semaine post-infection, ainsi que chez les porcs témoins environ deux semaines après l'infection initiale. Chez les deux groupes de porcelets les concentrations d'anticorps dans le sérum ont été à leur maximum entre les 5^e et 6^e semaines, et ont par la suite légèrement diminuées pour atteindre un plateau jusqu'au sacrifice des animaux au 74^e jour de l'expérience. Des symptômes très légers du SDMPS ont été observés chez les animaux mais se sont résorbés avant la fin de l'expérience. Les organes des animaux sacrifiés ne portaient aucune trace des lésions caractéristiques du SDMPS.

Des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la nucléocapside virale ont été produits en immunisant des souris Balb/c avec du CVP2 concentré et purifié. La souris ayant réagi le plus fortement après six injections a été sacrifiée et ses splénocytes ont été fusionnés avec des cellules Sp2/0 et mis en culture. Les hybridomes ont été criblés par ELISA, immunobuvardage et par immunofluorescence. Six anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la nucléocapside ont été obtenus.

La séquence d'acides aminés de l'ORF2 a été analysée par ordinateur afin d'identifier trois régions de la protéine susceptibles de porter des épitopes majeurs. Les régions N-terminale, interne et C-terminale ont été amplifiées par PCR et clonées dans le vecteur pCEP5. Des cellules HEK 293 ont par la suite été transfectées avec chacun des trois plasmides et l'expression de chacun des fragments de la protéine a été observée par immunofluorescence. Seul le fragment C-terminal de la nucléocapside a réagit avec des anticorps polyclonaux spécifiques au CVP2.



Étudiant : Sébastien Racine


Codirecteur : Peter Tijssen

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	i
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations.....	viii
Introduction.....	1
Objectifs	3
Revue bibliographique	5
1. Historique.....	5
2. Structure des circovirus.....	6
2.1. Caractéristiques morphologiques.....	6
2.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	6
2.3. Organisation génomique	8
2.3.1. Origine de réplication.....	13
2.3.2. ORF1	13
2.3.3. ORF2.....	15
3. Tropisme cellulaire et réplication virale	18
4. Taxonomie	21
5. Syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage (SDMPS)	25
5.1. Historique.....	25
5.2. Distribution et épidémiologie.....	26
5.3. Symptômes.....	28
5.3.1. Symptômes cliniques	28
5.3.2. Lésions macroscopiques.....	30
5.3.3. Lésions microscopiques	31
5.4. Caractéristiques immunologiques.....	33
5.5. Reproduction de la maladie.....	36
5.6. Diagnostic	40
5.7. Traitement et prévention	44

6.	Autres pathologies associées au CVP2	46
6.1.	Syndrome de la dermatite et néphropathie porcine (SDNP).....	46
6.2.	Tremblement congénital	46
6.3.	Avortements spontanés et porcelets mort-nés.....	47
	Article	49
1.	Accusé de réception	49
2.	Résumé de l'article	50
3.	Contribution des auteurs	51
4.	Article	52
5.	Materials and Methods.....	56
	Discussion	76
1.	Clonage, expression et purification de la nucléoprotéine du CVP2	76
2.	Étude de l'immunogénicité du CVP2	79
3.	Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la nucléocapside.....	82
4.	Topographie des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux	84
	Remerciements.....	86
	Annexe I : Infection expérimentale de porcs avec le CVP2	87
1.	Introduction.....	87
2.	Matériel et méthodes.....	88
2.1.	Production de stocks viraux	88
2.2.	Provenance des porcs.....	88
2.3.	Injections de virus	88
2.4.	Suivi des animaux	88
2.5.	Évaluation de la réponse sérologique	89
3.	Résultats.....	89
3.1.	Sérologie	89
3.2.	Observations cliniques et post-mortem.....	91
	Annexe II : Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la nucléocapside.....	92
1.	Introduction.....	92
2.	Matériel et méthodes.....	92
2.1.	Provenance des souris	92

2.2.	Immunisation des souris	92
2.3.	Prélèvement et mise en culture des cellules de la rate	92
2.4.	Criblage des hybridomes.....	93
2.5.	Caractérisation des anticorps monoclonaux.....	93
2.5.1.	Isotypage par ELISA.....	93
2.5.2.	Isotypage par IFI	94
2.5.3.	Caractérisation par immunobuvardage de type Western.....	94
3.	Résultats.....	94
3.1.	Réponse des souris à l'immunisation.....	94
3.2.	Criblage des hybridomes.....	96
3.3.	Caractérisation des anticorps monoclonaux.....	96
Annexe III : Topographie des épitopes de la nucléocapside.....		99
1.	Introduction.....	99
2.	Matériel et méthodes.....	99
2.1.	Étude de la structure et de l'immunogénicité théoriques de l'ORF2.....	99
2.2.	Élaboration des amorces	100
2.3.	Clonage des fragments de l'ORF2 dans pCEP5	100
2.4.	Expression des plasmides contenant les fragments de l'ORF2	100
3.	Résultats.....	103
3.1.	Structure et immunogénicité de l'ORF2	103
3.2.	Expression des fragments d'ORF2 par transfection	103
Annexe IV : Liste des communications et publications.....		106
1.	Communications scientifiques	106
2.	Publication scientifique.....	106
Bibliographie.....		107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Caractéristiques des principales régions génomiques du CVP2.....	12
Tableau II: Isotypage des anticorps monoclonaux par ELISA.	97
Tableau III: Caractérisation des anticorps monoclonaux.....	98
Tableau IV: Amorces utilisées pour l'amplification des fragments de l'ORF2.....	102

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Micrographie électronique des particules virales du CVP2.	7
Figure 2. Séquence nucléotidique du CVP1	10
Figure 3. Séquence nucléotidique du CVP2, souche IAF-2897	11
Figure 4. Organisation génomique du CVP2.....	12
Figure 5. Promoteurs et origine de répliation du CVP2.....	14
Figure 6. Épissage alternatif des protéines Rep du CVP1.	14
Figure 7: Organigramme illustrant les familles <i>Circoviridae</i> et <i>Nanoviridae</i>	22
Figure 8: Réponse humorale des porcs dirigée contre le CVP2.	90
Figure 9: Réponse immune de la souris no. 5 après chaque immunisation avec le CVP2.....	95
Figure 10: Isotypage des anticorps monoclonaux par IFI.....	97
Figure 11: Caractérisation des anticorps mono. par immunobuvardage de type Western.....	98
Figure 12: Disposition des fragments de l'ORF2 à amplifier.	101
Figure 13: Analyse du potentiel hydrophile/hydrophobe de la nucléocapside du CVP2.....	104
Figure 14: Analyse du potentiel antigénique de la nucléocapside du CVP2.	105
Figure 15: Expression du fragment C-terminal de l'ORF2 par transfection.	105

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénosine
Acide aminé	aa
ADN	Acide désoxyribonucléique
BBTV	Banana bunchy top virus
BFDV	Beak and feather disease virus
C	Cytosine
CAV	Chicken anemia virus
CsCl	Chlorure de césium
CFDV	Coconut foliar decay virus
CsCl	Chlorure de césium
CVP	Circovirus porcin
CVP1	Circovirus porcin de type 1
CVP2	Circovirus porcin de type 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dsDNA	ADN double brin
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
FBNYV	Faba bean necrotic yellow virus
G	Guanine
GALT	Tissu lymphoïde associé à l'intestin
GCV	Goose circovirus
HIS	Hybridation in-situ
ICTV	Comité international de taxonomie virale
IFI	Immunofluorescence indirecte
IHC	Immunohistochimie
IPA	Immunoperoxydase
MEM-E	Minimal Essential Medium with Earle's Salts
MET	Microscopie électronique
MVDV	Milk vetch dwarf virus

nt	Nucleotide(s)
ORF	Cadre de lecture ouvert
PALS	Feuillets lymphoïdes para-artériolaires
PBMC	Cellules mononucléaires du sang périphérique
PBS	Tampon salin phosphaté
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PFT	Cellules de la trompe de Fallope de truie
pH	Potentiel hydrogène
PiCV	Pigeon circovirus
PMWS	Post-weaning multisystemic wasting syndrome
pi	Post-infection
POD	Peroxydase
PPV	Parvovirus porcin
Rep	Réplicase
RF	Forme intermédiaire de réplication
rpm	Rotations par minute
SCSV	Subterranean clover stunt virus
SDMPS	Syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage
SDNP	Syndrome de la dermatite et néphropathie porcine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
SPF	Libres de pathogènes spécifiques (Specific-pathogen-free)
SRRP	Syndrome respiratoire et reproducteur porcin
SVF	Sérum de veau fœtal
ssDNA	ADN simple brin
T	Thymidine
TC	Tremblement congénital
TLMV	TT-like mini virus
TTV	TT virus
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick end labelling

INTRODUCTION

Parmi toutes les activités commerciales liées au domaine de l'agriculture, l'élevage des porcs est l'une des plus profitables, avec un impact économique de plusieurs milliards de dollars annuellement à l'échelle de la planète. Au cours des dernières décennies, l'industrie a cherché à augmenter la rentabilité, l'efficacité et la productivité des fermes porcines, ce qui a mené à la prolifération d'immenses fermes regroupant une quantité astronomique d'animaux dans un espace restreint. Ces modifications aux techniques d'élevage ont favorisé l'apparition de plusieurs nouvelles maladies porcines, engendrées par des pathogènes qui se transmettent facilement entre les animaux d'une même ferme.

Vers 1991, les vétérinaires E. Clark et J. Harding ont documenté les cas de jeunes porcs âgés de deux à trois mois souffrant de symptômes apparentés à ceux causés par la fièvre porcine dans des fermes de l'Ouest Canadien. De plus, ces animaux souffraient de dépérissement généralisé, et de problèmes respiratoires. La cause de cet état n'a pas été identifiée. Quelques années plus tard, cette maladie a resurgi dans des élevages porcins en Amérique du Nord, en Europe et en Asie, ce qui a suscité beaucoup d'intérêt chez les chercheurs, qui ont baptisé l'affliction sous le nom de Syndrome de dépérissement en post-sevrage des porcs (SDMPS). Les porcelets atteints du SDMPS présentent soudainement un état léthargique associé à de l'anorexie et de l'hyperthermie. Ils apparaissent pâles et développent des difficultés respiratoires. Les animaux présentent un aspect triste, une ligne du dos prononcée et des flancs creux. À l'examen *post-mortem*, on peut discerner la présence de plusieurs lésions caractéristiques au niveau des poumons, du foie, et en particulier dans les tissus lymphatiques. C'est à partir de ces mêmes lésions que des chercheurs sont parvenus en 1998 à isoler un virus apparenté au Circovirus porcine, qui est maintenant désigné sous le nom de Circovirus Porcine de type 2 (CVP2).

Les circovirus porcins forment une famille de très petits virus non enveloppés, caractérisés par la faible taille de leur génome et des virions, qui ne mesurent que 17 nm de diamètre. Ils possèdent un génome à ADN circulaire ambisens d'environ 1,7 kb

comportant deux ORFs majeurs, codant pour une réplicase ainsi que la capsid virale. Le premier membre de la famille, aujourd'hui appelé Circovirus Porcine de type 1 (CVP1), fut découvert en 1974 en tant que contaminant d'une lignée de cellules de rein de porc. De plus amples analyses ont révélé que l'infection par le CVP1 était endémique chez les porcs de plusieurs pays. Cependant les animaux infectés ne souffraient d'aucun mal apparent, et des infections expérimentales de porcs sains avec le virus ne réussirent pas à induire de maladie. Il a alors été conclu que le virus était non pathogène. Toutefois, la découverte en 1998 du CVP2 a relancé la recherche sur les circovirus.

Le séquençage du CV2 a révélé que ce dernier ne possède qu'environ 68 à 76% d'homologie avec le CVP1. On a observé 82 à 85% d'homologie au niveau de l'ORF1, qui code pour la réplicase, et seulement 66% d'homologie pour l'ORF2. Les différences importantes dans la séquence de l'ORF2 pourraient aider les chercheurs à identifier la région responsable de la pathogénicité du CVP2. D'autres études ont confirmé l'importance de ces différences en déterminant que la capsid virale codée par l'ORF2 est la protéine qui porte les épitopes principaux reconnus par les anticorps des porcs infectés par le CVP2.

OBJECTIFS

Les nouvelles découvertes concernant l'importance possible de l'ORF2 du CVP2 dans la pathogénie du SDMPS ont conduit à l'élaboration d'un projet de recherche visant à mieux définir le rôle de l'ORF2. Dans le cadre de ce projet de recherche, plusieurs objectifs avaient été fixés. Le premier objectif consistait à cloner le gène de l'ORF2 du CVP2 dans un vecteur d'expression eucaryote, ainsi que d'exprimer la protéine recombinante et d'obtenir un stock purifié de la capsid virale. Cette démarche permet de réaliser trois choses. L'utilisation d'un vecteur d'expression permettra de facilement obtenir une grande quantité de la capsid virale, ce qui est problématique en temps normal avec le CVP2 en raison de son faible niveau de réplication *in vitro*. De plus, la protéine recombinante sera utilisée pour mettre au point des tests de détection par immunofluorescence, ELISA ou immunobuvardage de type Western spécifiques au CVP2. Finalement, la protéine recombinante peut être utilisée pour immuniser des animaux et étudier leur réaction contre la capsid seule.

Le deuxième objectif du projet était d'étudier l'immunogénicité du CVP2 chez les porcelets, par le biais d'infections expérimentales des animaux avec le virus purifié. Ceci permet de mesurer la réponse humorale des porcelets après l'infection par le virus, d'observer et de décrire l'apparition des signes cliniques de la maladie, ainsi que de vérifier la présence des lésions macroscopiques et microscopiques du SDMPS lors d'un examen post-mortem.

Le troisième objectif était de produire des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la protéine de la capsid virale du CVP2. Les anticorps monoclonaux permettront l'étude de la topographie de la capsid, qui constitue la dernière étape du projet.

Ce quatrième objectif, l'étude de la topographie des épitopes de la capsid, nécessite la production de plusieurs plasmides contenant différentes régions tronquées de la séquence de l'ORF2 du CVP2. L'expression des protéines de capsid tronquées sera

visualisée à l'aide des anticorps monoclonaux produits précédemment, et servira à identifier les régions portant les épitopes majeurs reconnus par les anticorps.

Le but visé par l'ensemble de ce projet de recherche est l'avancement des connaissances sur le rôle de l'ORF2 du CVP2 dans le développement du SDMPS, la mise au point d'outils de diagnostic sérologique du CVP2 peu coûteux, rapides, sensibles et spécifiques basés sur l'ORF2, ainsi que l'identification d'épitopes qui pourraient éventuellement être utilisés pour le développement d'un vaccin contre le CVP2.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Historique

La toute première description d'un circovirus remonte à 1974, lorsque Tischer a isolé et décrit une particule virale contaminant la lignée de cellules de rein de porc PK-15 (Tischer *et al.*, 1974). Le virus a tout d'abord été comparé aux *Picornaviridae* en raison de la faible taille des virions, mais des études plus poussées dans les années suivantes ont permis de déterminer qu'il s'agissait d'un nouveau virus à ADN comportant un très petit génome circulaire (Tischer *et al.*, 1982). C'est en raison de cette organisation génomique que le nouveau virus a été baptisé Circovirus Porcin (CVP) et assigné à la nouvelle famille des *Circoviridae* (Lukert *et al.*, 1995). À l'époque de sa découverte, le CVP était le plus petit virus animal connu (Todd *et al.*, 2001a).

La mise au point d'une méthode de propagation du virus efficace (Tischer *et al.*, 1987) a permis d'élaborer les premiers tests permettant de détecter la présence d'anticorps au CVP dans le sérum des porcs. Ces tests ont révélé la présence d'anticorps dirigés contre le CVP chez 77 à 95% des porcs analysés lors de l'étude (Tischer *et al.*, 1986). Aucun des animaux n'était malade et aucun symptôme n'était apparent, mêmes chez ceux qui possédaient un titre élevé d'anticorps contre le CVP. L'infection expérimentale de porcs avec du CVP purifié (Tischer *et al.*, 1986; Allan *et al.*, 1995) a engendré la production d'anticorps spécifiques et de virémie chez les animaux, mais aucun de ceux-ci n'ont développé des symptômes de maladie. D'autres études épidémiologiques ont confirmé ces premières observations (Dulac et Afshar, 1989), et les chercheurs ont conclu que le CVP ne causait pas de maladie chez le porc.

L'isolation en 1997 d'un nouveau variant du CVP (Nayar *et al.*, 1997; Allan *et al.*, 1998a; Allan *et al.*, 1998b; Ellis *et al.*, 1998) chez des porcelets atteints du syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage (SDMPS) a contribué à raviver l'intérêt scientifique pour les circovirus. Le séquençage du nouvel isolat (Ellis *et al.*, 1998; Hamel *et al.*, 1998) a confirmé qu'il s'agissait d'un virus distinct du CVP déjà connu. Le CVP

associé au SDMPs a été désigné CVP2, tandis que le CVP non pathogène a été renommé CVP1. Plusieurs études ont depuis tenté de caractériser le fonctionnement des CVP ainsi que de définir la relation entre le CVP2 et le SDMPs (Pasick, 2002).

2. Structure des circovirus

2.1. Caractéristiques morphologiques

Les circovirus porcins sont de petits virus non enveloppés (Tischer *et al.*, 1982) présentant une conformation en forme d'icosaèdre. Les virions possèdent un diamètre évalué de 16,8 à 20,7 nm, et ne portent aucune structure évidente à leur surface (Todd *et al.*, 1991). La petite taille des virions du CVP en fait encore aujourd'hui le plus petit virus infectant les mammifères capable de se répliquer de façon autonome (Mankertz *et al.*, 1997; Niagro *et al.*, 1998). Les virions du CVP2, tels qu'observés en microscopie électronique (figure 1), sont en tout point identiques à ceux du CVP1.

2.2. Caractéristiques physico-chimiques

Le CVP possède un gradient de densité dans le CsCl de 1,36-1,38 g/ml ainsi qu'un coefficient de sédimentation de 57S (Allan *et al.*, 1994c). Le virus ne possède pas d'activité hémmaglutinante sur les érythrocytes de plusieurs espèces mammifères (Spillane *et al.*, 1998). L'infectivité du CVP2 n'est pas affectée par des traitements au chloroforme ou à l'éther. Il conserve encore ses propriétés infectieuses après une exposition à un pH de 3 ou après une incubation à 70°C pendant 15 minutes (Allan *et al.*, 1994c). Le virus peut aussi résister à plusieurs désinfectants commerciaux à base de chlorhexidine, de formaldéhyde, d'iode ou d'alcool. Cependant, les désinfectants contenant comme agent actif du phénol, des ammoniums quaternaires, de l'hydroxyde de sodium ou des agents oxydants peuvent inactiver le CVP2 lorsqu'ils sont utilisés adéquatement (Royer *et al.*, 2001).

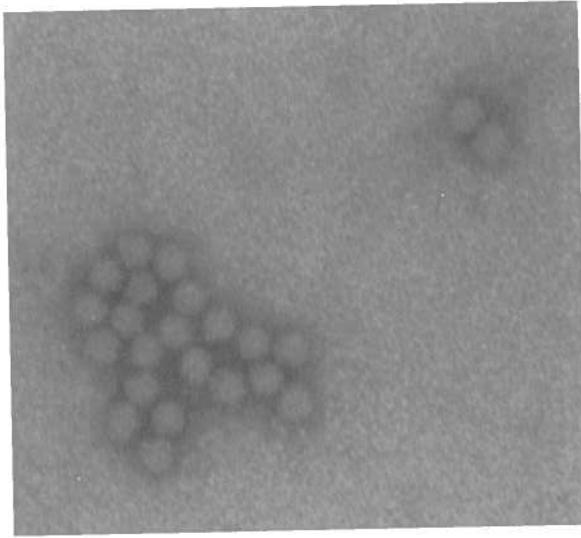


Figure 1. Micrographie électronique des particules virales du CVP2.

Les capsides virales purifiées ont été photographiées à un grossissement d'environ 300,000x. Leur diamètre réel est de 18,8 à 20,7 nm. Photo réalisée par Robert Alain (Service de MET de l'IAF).

2.3. Organisation génomique

L'organisation génomique des CVP est particulièrement remarquable pour deux raisons. Il constitue le premier virus animal composé d'une seule molécule circulaire d'ADN simple brin à avoir été découvert (Tischer *et al.*, 1982; Todd, 2000). De plus, la faible taille de son génome en fait l'un des plus petits virus capables d'infecter des vertébrés (Allan et Ellis, 2000).

L'isolation d'ADN viral du circovirus à partir de feuillettes cellulaires infectées a permis de démontrer que des formes alternatives du virus étaient présentes *in vivo* lors de l'infection. Ces deux formes sont composées d'ADN double brin (dsDNA) relaxé et surenroulé, respectivement. Il a été proposé que ces formes dsDNA jouent le rôle d'intermédiaires dans la réplication du virus (Tischer et Buhk, 1988). Cette théorie s'appuie sur le fait que des séquences de polyadénylation ont été retrouvées sur les deux brins, mais que seul le brin de sens positif (+) est présent dans les virions encapsidés (Meehan *et al.*, 1997). Ainsi, les deux brins de la forme intermédiaire de réplication (RF) possèdent la capacité de coder pour des protéines virales, ce qui signifie que le génome des CVP est ambisens.

Le génome des deux types de circovirus a été séquencé (figures 2 et 3). Le CVP1 et le CVP2 comportent 1759 (Meehan *et al.*, 1997) et 1768 nucléotides (nt) (Allan *et al.*, 1998a; Hamel *et al.*, 1998) respectivement et possèdent des taux d'homologie de 68-76% entre eux (Hamel *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1998). Il y a toutefois peu de variation entre les différentes souches d'une même espèce, qui ont un taux d'homologie supérieur à 96% entre-elles dans le cas du CVP2 (Meehan *et al.*, 1998). Les circovirus possèdent un génome très compact, qui ne comporte aucune région non codante. Des analyses informatiques du génome du CVP2 ont révélé la présence de 6 ORFs potentiels codant pour des protéines d'une taille théorique de plus de 5 kDa (figure 4) (Hamel *et al.*, 1998). Les régions les plus étudiées jusqu'à présent sont celles qui correspondent à l'origine de réplication, à l'ORF1 et à l'ORF2 (tableau 1).

Il est à noter que toutes les études portant sur l'origine de réplication et l'ORF1 des CVP se sont limitées au CVP1 seulement, tandis que l'essentiel de nos connaissances sur l'ORF2 provient de l'étude du CVP2. Cependant, les indications présentes nous portent à croire que les deux virus partagent un mode de réplication identique, tandis que les particularités de l'ORF2 du CVP2 seraient responsables des différences au niveau de la pathogénicité des virus (Fenaux *et al.*, 2003; Mankertz *et al.*, 2003).

```

1 accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcgtca gtgaaaatgc caagcaagaa
61 aagcggcccg caaccccata agaggtgggt gttcaccctt aataatcctt ccgaggagga
121 gaaaaacaaa atacgggagc ttccaatctc cctttttgat tattttgttt gcggagagga
181 aggtttgaa gagggtagaa ctctcacct ccagggggtt gcgaattttg ctaagaagca
241 gacttttaac aaggtgaagt ggtattttg tgcccgtgc cacatcgaga aagcgaagg
301 aaccgaccag cagaataaag aatactgcag taagaaggc cacatactta tcgagtgtgg
361 agtccgctc aaccagggga agcgcagcga cctgtctact gctgtgagta cccttttggg
421 gacggggtct ttggtgactg tagccgagca gttccctgta acgtatgtga gaaatttccg
481 cgggctggct gaacttttga aagtgagcgg gaagatgcag cagcgtgatt ggaagacagc
541 tgtacacgtc atagtgggcc cgcccgttg tgggaagagc cagtgggccc gtaattttgc
601 tgagcctagc gacacctact ggaagcctag tagaaataag tggtaggatg gatatcatgg
661 agaagaagtt gttgttttgg atgattttta tggctggta cctgggatg atctactgag
721 actgtgtgac cggtatccat tgactgtaga gactaaaggg ggtactgttc cttttttggc
781 ccgagctatt ttgattacca gcaatcaggc ccccaggaa tggtagctct caactgctgt
841 cccagctgta gaagctctct atcggaggat tactactttg caattttgga agactgctgg
901 agaacaatcc acggaggtac ccgaaggccg atttgaagca gtggaccac cctgtgccct
961 tttcccatat aaaataaatt actgagtctt tttgtttatc acatcgtaat ggtttttatt
1021 tttatattt tagagggctct ttaggataa attctctgaa ttgtacataa atagtcagcc
1081 ttaccacata attttgggct gtggctgcat tttggagcgc atagccgagg cctgtgtgct
1141 cgacattggt gtgggtattt aaatggagcc acagctgggt tcttttatta tttgggtgga
1201 accaatcaat tgtttggctc agctcaggtt tgggggtgaa gtacctggag tggtaggtaa
1261 agggctgcct tatgggtgtg cgggaggagt agttaatata ggggtcatag gccaaagtgg
1321 tggagggggt taaaagttg gcatccaaga taacaacagt ggaccaaca cctctttcct
1381 tagaggtgat ggggtctctg gggtaaaatt catatattag ctttctaata cggtagtatt
1441 ggaaaggtag gggtagggg ttggtgccgc ctgagggggg gaggaactgg ccgatgttga
1501 atctgaggtg gttaacatgc caagatggct gcgagaatcc tccttttatg gtgagtacaa
1561 attctgtaga aaggcggcaa ttgaagatac ccgtctttcg gcgccatctg taacggtttc
1621 tgaaggcggg gtgtgccaaa tatggtcttc tccggaggat gtttccaaga tggctgcggg
1681 ggcgggtcct tcttctgcgg taacgcctcc ttggccacgt catcctataa aagtgaagaa
1741 agtgcgctgc tgtagtatt

```

Figure 2. Séquence nucléotidique du CVP1.

(Genbank no AY184287). La séquence correspondant à l'ORF1 est en rose, tandis que la séquence correspondant à l'ORF2 est en orange.

```

1 accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgccagca
61 agaagaatgg aagaagcggg cccaaccac ataaaagggt ggtgttcacg ctgaataatc
121 cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg agtcccaat ctccctattt gattatttta
181 ttgttgcgga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt
241 ttgtgaagaa gcaaactttt aataaagtga agtgggtattt gggtgcccgc tgccacatcg
301 agaaagccaa aggaactgat cagcagaata aagaatattg cagtaaagaa ggcaacttac
361 ttattgaatg tggagctcct cgatctcaag gacaacggag tgacctgtct actgctgtga
421 gtaccttggt ggagagcggg agtctgggta cggttgcaga gcagcaccct gtaacgtttg
481 tcagaaatth cgcgggctg gctgaacttt tgaaagtgag cgggaaaatg cagaagcgtg
541 attggaagac caatgtacac gtcattgtgg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaattggg
601 ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtggg
661 atggttacc a tgggaagaa gtggttggtta ttgatgactt ttatggctgg ctgccgtggg
721 atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg
781 tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gacctcgttg gaatgggtact
841 cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tctatcggag gattacttcc ttgggtatttt
901 ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc
961 catgccttga atttccatat gaaataaatt actgagctct ttttatcact tcgtaatggg
1021 ttttattatt cat ttaggggt ttaagtgggg ggtctttaag attaaattct ctgaattgta
1081 catacatggt tacacggata ttgtagtctt ggtagtattt actgttttcg aacgcagtgc
1141 cgaggcctac gtggtccaca tttctagagg tttgtagcct cagccaaagc tgattccttt
1201 tgttatttgg ttggaagtaa tcaatagtgg agtcaagaac aggtttgggt gtgaagtaac
1261 gggagtggta ggagaagggt tgggggattg tatggcggga ggagtagttt acatatgggt
1321 cataggttag ggctgtggcc tttgttaca agttatcatc tagaataaca gcagtggagc
1381 ccaactccct atcgccttgg gtgatggggg agcagggcca gaattcaacc ttaacctttc
1441 ttattctgta gtattcaaag ggtagagaga ttttgttggg cccccctccc gggggaacaa
1501 agtcgtcaag tgtaaacttc atcatgtcca ctgcccagga gggcgttctg actgtggtag
1561 ccttgacagt atatccgaag gtgcgggaga ggcgggtggt gaagatgcca tttttccttc
1621 tccaacggta gcggtggcgg ggggtggacga gccaggggcg gcggcggagg atctggccaa
1681 gatggctgcg ggggcgggtg cttcttctgc ggtaacgcct ccttggatac gtcatagctg
1741 aaaacgaaag aagtgcgctg taagtatt

```

Figure 3. Séquence nucléotidique du CVP2, souche IAF-2897.

(Genbank no. AF408635). La séquence correspondant à l'ORF1 est en rose, tandis que la séquence correspondant à l'ORF2 est en orange.

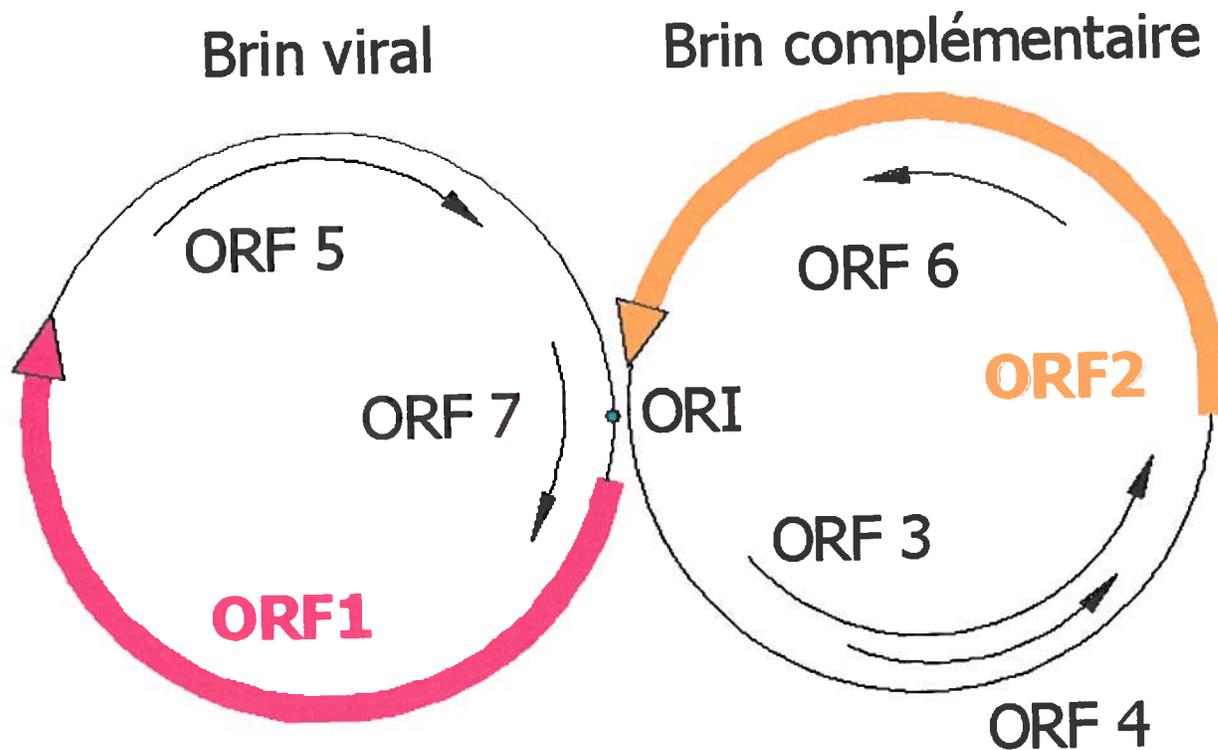


Figure 4. Organisation génomique du CVP2.

Tableau I. Caractéristiques des principales régions génomiques du CVP2.

Région	Brin	Position (nt)	Taille (nt)	Protéine (kDa)
ORF1	V	51-995	945	35,8
ORF2	C	1735-1034	702	27,8
ORF3	C	671-357	315	11,9
ORF4	C	565-386	180	6,5
ORF5	V	1016-1177	162	6,2
ORF6	C	1611-1530	82	2,8
ORI	V	1730-091	120	----

ORF : Cadre de lecture ouvert ; ORI : Origine de réplication ; V : Brin viral ; C : Brin complémentaire ; Protéine : Taille théorique de la protéine attendue. Tableau adapté à partir de (Hamel *et al.*, 1998).

2.3.1. Origine de réplication

L'origine de réplication du CVP1 a été séquencée, et serait localisée dans la région comprenant les nucléotides 1730 à 071 (Mankertz *et al.*, 1997). Elle est composée de plusieurs éléments dont certains partagent de fortes homologies avec l'origine de réplication des Géminivirus. Elle comporte deux régions de neuf nucléotides se complétant et formant la tige d'une structure en tête d'épingle à cheveux (« *hairpin loop* »). À l'apex de la structure, on retrouve une série de neuf nucléotides très conservés formant la région d'initiation de la réplication du virus. Toute mutation à cet endroit empêche la réplication. Des études plus poussées ont révélé la présence de quatre régions répétées de cinq nucléotides situées en aval de la région en tête d'épingle (figure 5). Ces motifs serviraient de sites de liaison pour les répliques du virus (Steinfeldt *et al.*, 2001).

2.3.2. ORF1

L'ORF1, avec ses 945 nt localisés au début du brin positif du virus (51-995), constitue le gène à la taille la plus importante du virus. Cette séquence est très conservée chez les deux espèces de circovirus, avec un taux d'homologie d'environ 82 à 85% (Hamel *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1998; Mankertz *et al.*, 2000a). La comparaison avec des séquences nucléotidiques d'autres virus a révélé que le gène de l'ORF1 partage des caractéristiques des protéines répliques (Rep) du *beak and feather disease virus* (BFDV) et des géminivirus (Niagro *et al.*, 1998). Des études plus poussées ont confirmé que la protéine de 312 aa codée par l'ORF1 du CVP1 était essentielle à la réplication du virus (Mankertz *et al.*, 1998a). L'analyse des produits de transcription a révélé la présence de deux protéines codées à partir du gène via un épissage alternatif (Mankertz et Hillenbrand, 2001) (figure 6); les protéines Rep et Rep' se lient toutes deux à l'origine de réplication pour initier la réplication par cercle roulant. Chez le CVP1, elles sont toutes deux sous le contrôle d'un promoteur P_{rep} situé dans une région de 166 b localisée des nucléotides 1621 à 028 (Mankertz et Hillenbrand, 2002), en bordure de l'origine de réplication.

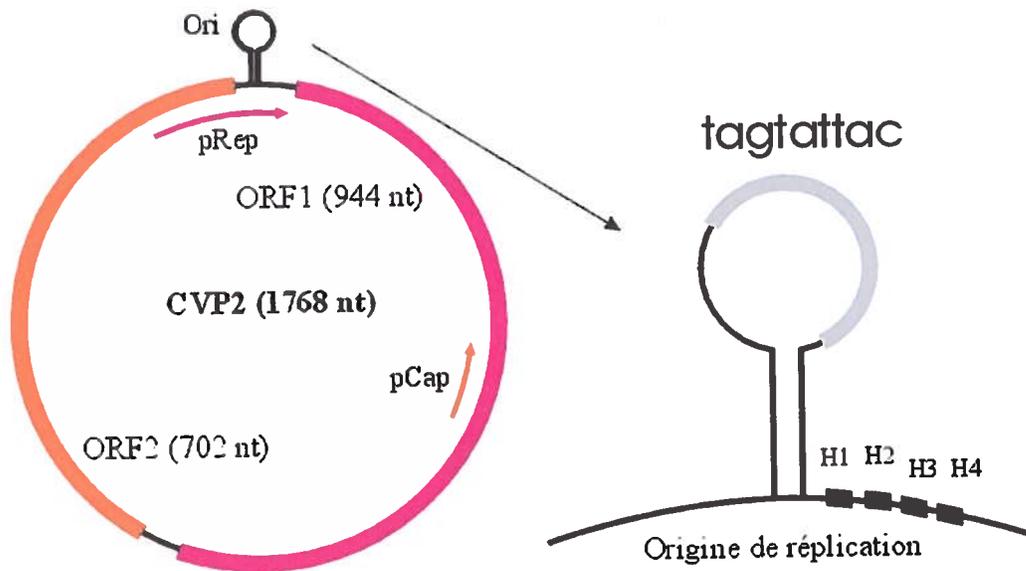


Figure 5. Promoteurs et origine de répliation du CVP2. Image adaptée de (Mankertz *et al.*, 1997; Mankertz et Hillenbrand, 2002).

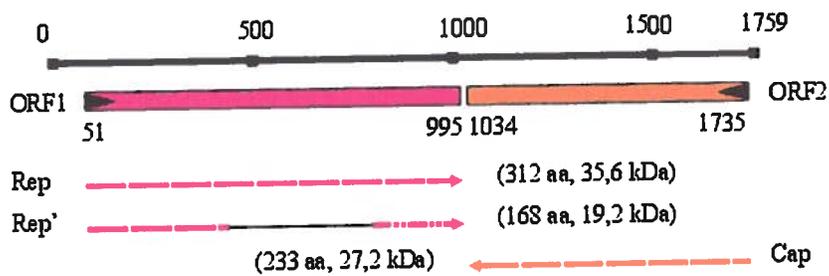


Figure 6. Épissage alternatif des protéines Rep du CVP1. Données tirées de (Mankertz et Hillenbrand, 2001).

2.3.3. ORF2

L'ORF2 du CVP constitue le deuxième gène en importance du virus et est orienté dans le sens inverse de l'ORF1. Chez le CVP2, le gène est situé des nucléotides 1735 à 1034 et possède une taille de 702 bases, codant pour une protéine de 233 aa avec une masse théorique de 27,8 kDa. La séquence de l'ORF2 diffère de façon significative chez le CVP2 par rapport au CVP1, et les deux virus ne possèdent qu'un taux d'homologie de 66% au niveau de cette région (Hamel *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1998). Chez le CVP1, la transcription est régulée par le promoteur P_{cap}, situé dans la région des nucléotides 560 à 484, qui est localisée à l'intérieur de la séquence codant pour l'ORF1, mais dans le sens inverse (Mankertz et Hillenbrand, 2002). L'analyse des ARN messagers synthétisés par le CVP révèle que l'ORF2 est le produit de transcription le plus abondant lors d'infections par le CVP1 (Mankertz *et al.*, 1998b) autant que pour le CVP2 (Cheung, 2003).

Malgré les similarités entre la séquence de l'ORF2 et celle de la protéine structurale du CAV, le rôle de celle-ci demeura inconnu pendant plusieurs années (Meehan *et al.*, 1998; Allan et Ellis, 2000). Afin de déterminer le rôle exact de la protéine codée par l'ORF2, le gène fut amplifié par PCR à partir de l'ADN du CVP2, et cloné dans un vecteur de transfert. Ce dernier fut utilisé pour produire un baculovirus recombinant exprimant le gène de l'ORF2. Ce baculovirus recombinant fut utilisé pour infecter des cellules d'insectes de la lignée Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). La présence dans le lysat des cellules infectées d'une protéine de 30 kDa a été confirmée par SDS-PAGE et par immunobuvardage de type Western à l'aide de sérum polyclonal de lapin anti-CVP2. La protéine fut récupérée à partir du lysat de cellules infectées, par ultracentrifugation sur un gradient de chlorure de césium. La visualisation de cette protéine concentrée et purifiée par microscopie électronique a révélé que celle-ci s'auto-assemblait en capsides virales vides (Nawagitgul *et al.*, 2000). Cette expérience a permis de confirmer que l'ORF2 code pour une protéine d'environ 30 kDa qui constitue la protéine structurale principale du circovirus. Ce résultat a été réaffirmé par d'autres travaux. Une équipe est subséquentement parvenue à exprimer l'ORF2 comme protéine de fusion avec une séquence polyhistidine chez la bactérie *E. coli* (Liu *et al.*, 2001b). La

protéine a pu être purifiée par colonne d'affinité et caractérisée par immunobuvardage et immunoprécipitation, ce qui a révélé qu'elle réagissait de façon spécifique avec le sérum de porcs atteints du SDMPS.

Jusqu'à maintenant, peu d'études ont été rapportées spécifiquement sur les propriétés immunologiques de l'ORF2. Une équipe en particulier a tenté de comparer les différents épitopes présents sur l'ORF2 du CVP1 et du CVP2 (Mahe *et al.*, 2000). Ils ont cloné l'ORF2 du CVP2 dans un plasmide pcDNA3.1 avec lequel ils ont immunisé des porcs. Ils ont par la suite prélevé le sérum des porcs pour obtenir des anticorps polyclonaux spécifiques à l'ORF2 du CVP2. Ils ont utilisé ce sérum pour réaliser un test d'immunoperoxydase (IPA) sur des cellules de porc transfectées en parallèle avec l'ADN du CVP1 ou du CVP2. Ils ont observé que les anticorps spécifiques à l'ORF2 du CVP2 réagissait fortement avec les cellules transfectées avec le CVP2, mais pas du tout avec les cellules transfectées avec le CVP1. Ceci permet d'établir que la nucléocapside virale codée par l'ORF2 porte les épitopes principaux reconnus par les anticorps retrouvés dans le sérum des animaux infectés par le virus (Nawagitgul *et al.*, 2000; Pogranichnyy *et al.*, 2000), mais que ces épitopes diffèrent entre le CVP1 et le CVP2. Ces résultats justifient l'utilisation de la séquence de l'ORF2 pour l'élaboration de tests de diagnostic par PCR multiplex permettant de distinguer entre les deux virus (Laroche *et al.*, 1999a; Ouardani *et al.*, 1999).

L'équipe ayant réalisé le travail précédent a tenté d'identifier les épitopes précis de l'ORF2 qui sont reconnus par les anticorps de porcs via une analyse PEPSCAN. La technique consiste à synthétiser *in vitro* une série de peptides se chevauchant entre eux et correspondant à la séquence d'acides aminés (aa) de la protéine. Les peptides sont synthétisés sur une membrane de nitrocellulose qui est par la suite incubée avec un sérum polyclonal de porc anti-CVP2. Cette expérience a permis d'identifier quatre régions de l'ORF2 du CVP2 réagissant fortement avec les anticorps (Mahe *et al.*, 2000). Les régions sont situées respectivement des aa 25 à 39, 73 à 87, 121 à 147 et 169 à 183 lorsque la membrane est incubée avec un sérum provenant d'un porc SPF inoculé expérimentalement avec le CVP2. La membrane réagit différemment lorsqu'elle est

incubée avec du sérum provenant d'un porc non SPF inoculé avec le CVP2, puisque ce sérum ne réagit qu'avec les trois derniers épitopes. La même expérience a été réalisée en parallèle avec une membrane portant les peptides de l'ORF2 du CVP1. Tout comme pour l'ORF2 du CVP2, les résultats diffèrent selon le sérum utilisé. Deux régions réagissent avec le sérum de porc SPF, et aucune ne réagit avec le sérum de porc non SPF. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude avec PEPSCAN qui a identifié deux épitopes de l'ORF2 réagissant fortement avec des anticorps polyclonaux anti-CVP2, localisés des aa 69 à 83, et 117 à 131 (Truong *et al.*, 2001). Ces épitopes correspondent à deux des épitopes identifiés précédemment (Mahe *et al.*, 2000). L'épitope 117-131 en particulier réagit fortement aux anticorps présents dans le sérum de porcs atteints du SDMPS.

D'autres chercheurs ont entrepris de découvrir d'autres motifs présents dans la séquence de l'ORF2 afin de mieux comprendre le rôle de la protéine dans la pathogénicité du virus. Des anticorps de lapin dirigés contre l'ORF2 du CVP2 ont été utilisés lors de tests d'immunofluorescence indirecte (IFI) pour confirmer que la protéine s'accumule spécifiquement dans le noyau des cellules infectées (Liu *et al.*, 2001a; Liu *et al.*, 2001b). L'ORF2 a par la suite été cloné dans un vecteur sous le contrôle du promoteur CMV. Des cellules de porcs transfectées avec le plasmide exprimaient toujours la nucléocapside du CVP2 dans leur noyau. La technique de mutagenèse dirigée a ensuite été utilisée pour induire plusieurs mutations dans la séquence de l'ORF2 afin de déterminer si celles-ci pouvaient perturber l'expression de la protéine. L'expérience a révélé que la délétion des 41 aa N-terminaux de la protéine entraînait le déplacement de la fluorescence intranucléaire vers le cytoplasme. La mutagenèse dirigée a permis de confirmer que les aa aux positions 12 à 18 et 34 à 41 étaient essentiels à la localisation intra-nucléaire du virus (Liu *et al.*, 2001a). Ces résultats ont par la suite été confirmés par d'autres études (Cheung et Bolin, 2002). Ainsi, la présence de séquences de localisation nucléaire dans région N-terminale de la protéine (Liu *et al.*, 2001a) permet au virus de se diriger vers le noyau de la cellule-hôte pour permettre la réplication virale.

3. Tropisme cellulaire et réplication virale

Depuis l'isolement en 1974 du CVP1 comme contaminant chronique de la lignée de cellules de rein de porc PK-15 (ATCC CCL-33) (Tischer *et al.*, 1974), cette dernière est presque toujours utilisée pour la propagation *in vitro* du virus (Todd *et al.*, 2001a). Le CVP1 n'entraîne pas d'effets cytopathiques marqués chez les cellules PK-15 et n'occasionne pas de mortalité cellulaire visible, ce qui le rend très difficile à détecter par microscopie conventionnelle. Le virus peut être visualisé dans la cellule par IFI en utilisant du sérum de porc infecté, ou par microscopie électronique (MET). Observé en IFI, le CVP se distingue par une fluorescence intranucléaire spécifique (Allan *et al.*, 1994a; Tischer *et al.*, 1995c). Par MET, il est possible de distinguer la présence d'agrégats de capsides virales cristallisées dans des corps d'inclusion nucléaires, ainsi que dans des corps d'inclusion cytoplasmiques localisés dans la zone péri-nucléaire (Stevenson *et al.*, 1999). Ce type d'inclusion est semblable dans le cas du CVP1 et du CVP2.

La découverte du CVP2 a nécessité l'élaboration de lignées de PK-15 dites « *virus-free* », où le CVP1 n'est pas un contaminant. Ces nouvelles lignées se font parfois octroyer des noms différents, mais sont toutes dérivées et sélectionnées à partir de la lignée originale PK-15 par la technique de dilution-limite (Meehan *et al.*, 1998). Elles conservent toutes les autres propriétés de la lignée cellulaire originale.

Les CVP se répliquent par le mode de réplication en cercle roulant (« *rolling-circle replication* ») via une forme répllicative à double-brin (Mankertz *et al.*, 1997; Meehan *et al.*, 1997). Les deux brins de cette forme répllicative portent des signaux de polyadénylation (Meehan *et al.*, 1997), et chacun sera transcrit. Le brin sens ou positif est défini comme étant le « brin viral », et il porte le gène de l'ORF1 qui code pour les deux réplicases, Rep et Rep'. La fixation de ces deux protéines à un site voisin de l'origine de réplication est nécessaire pour l'initiation de la réplication (Mankertz et Hillenbrand, 2001; Steinfeldt *et al.*, 2001). Le brin anti-sens ou négatif nouvellement synthétisé afin de former la forme répllicative est appelé « brin complémentaire », et porte l'ORF2 du CVP, qui code pour la protéine de la capsid.

Le principal obstacle à la propagation du CVP2 *in vitro* est le faible rendement de l'infection, puisque les cellules infectées produisent relativement peu de virions qui viendront réinfecter d'autres cellules. Ainsi, il a été démontré expérimentalement que la réplication du CVP2 est dépendante de la cellule hôte, qui doit être en phase S de son propre cycle de réplication (Tischer *et al.*, 1987). En raison de la faible taille de son génome, le CVP2 ne serait pas en mesure de synthétiser l'ensemble des enzymes nécessaires à sa réplication et, comme plusieurs autres virus à ADN simples tels les Parvovirus (Watson *et al.*, 1988), il ne peut surmonter le manque d'enzymes et de précurseurs nécessaires à la réplication de l'ADN qu'en se répliquant exclusivement dans des cellules en division. Cette restriction contribue à réduire considérablement la production virale. Dans le but de maximiser l'infection, certains chercheurs traitent les cellules PK-15 avec de la glucosamine immédiatement après l'infection, ce qui aurait pour effet de permettre l'entrée du virus dans le noyau de la cellule-hôte et d'induire l'initiation de la mitose, entraînant ainsi le déclenchement de la réplication virale (Tischer *et al.*, 1987). Cet effet peut aussi être obtenu en traitant les cellules au DEAE-dextran. Il faut noter que l'incubation des cellules avec la glucosamine entraîne une dégénérescence cellulaire qui peut s'avérer très importante (Stevenson *et al.*, 1999; Allan et Ellis, 2000).

La cinétique de réplication du virus lors de l'infection d'un feuillet cellulaire de PK-15, sans l'utilisation de glucosamine, a été étudiée (Cheung et Bolin, 2002). Immédiatement après l'infection, le virus entre dans une phase de latence pendant laquelle il pénètre dans le noyau des cellules (Tischer *et al.*, 1987). Le virus demeure par la suite inactif jusqu'à ce que la cellule entre en phase S de la mitose. Les premiers transcrits d'ARN apparaissent généralement vers 18h post-infection (pi). Le produit de transcription le plus abondant est une séquence d'ARN de 950 nt qui correspond à la capsid virale. Deux produits de transcription de 750 et 450 nt correspondant respectivement aux réplicases Rep et Rep' peuvent aussi être détectés. Il est aussi possible de détecter de faibles quantités d'antigène dans le noyau de certaines cellules à 18h pi, mais les premiers virions assemblés apparaissent à 30h pi (Cheung et Bolin, 2002). L'infection peut se poursuivre jusqu'à ce que le feuillet cellulaire atteigne la confluence et les cellules ne se divisent plus.

Plusieurs chercheurs ont tenté de propager le CVP2 dans d'autres types de cellules afin d'améliorer le rendement de la production ou d'expliquer certaines facettes du SDMPs. Un groupe a utilisé avec succès une lignée de cellules de rétine de porc fœtal exprimant le gène E1 de l'adénovirus humain de type 5, dénommée VIDO R1 (Liu *et al.*, 2001a). Ils ont suggéré que puisque le gène E1 peut induire la phase S du cycle de réplication cellulaire, il pourrait stimuler la réplication du CVP2. Le virus peut se répliquer dans plusieurs autres lignées cellulaires d'origine porcine, telles les cellules de la trompe de Fallope de truie (PFT) (Ouardani, 2001), entre autres (Allan *et al.*, 1994c). Le virus est aussi capable de pénétrer et de se répliquer dans les cellules Vero, lignée dérivée des cellules de rein de primates (« *African green monkey kidney* »). Le virus est capable d'infecter des cellules provenant de bovins et d'ovin *in vitro* mais il ne peut s'y répliquer, et demeure confiné au cytoplasme (Dulac et Afshar, 1989; Edwards et Sands, 1994). D'autres études *in vitro* ont démontré que le CVP2 est capable d'infecter et de se répliquer dans des macrophages alvéolaires porcins (PAM) (Ouardani, 2001), des monocytes (Allan *et al.*, 1994b), ainsi que dans des lymphocytes B et T (Sarli *et al.*, 2001; Bassaganya-Riera *et al.*, 2003; Kim et Chae, 2003a). Il pourrait infecter les cellules dendritiques (Vincent *et al.*, 2003) mais ne peut pas s'y répliquer. Il est particulièrement intéressant de constater que le CVP2 peut se répliquer *in vitro* dans les lymphocytes, puisque cela pourrait expliquer la déplétion des tissus lymphoïdes observée chez les porcs atteints du SDMPs (Shibahara *et al.*, 2000; Sarli *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2003).

L'autopsie des porcs atteints du SDMPs fournit plusieurs indices sur le tropisme du CVP2 *in vivo*. Des traces d'ADN viral sont détectées dans les poumons (Rosell *et al.*, 1999), les nœuds lymphatiques, la rate, le foie (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 2000a), les reins, le pancréas et les intestins (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999; Krakowka *et al.*, 2000). Une équipe a tenté de reproduire ces lésions chez la souris en inoculant celle-ci avec plusieurs doses de CVP2 purifié. Plusieurs souris ont développé des lésions, et l'ADN du virus a été détecté dans le noyau et le cytoplasme des histiocytes et d'autres cellules localisées dans les centres germinatifs, ainsi que dans le noyau des hépatocytes, dans les cellules des tubules rénales et dans des lymphocytes du thymus (Kiupel *et al.*, 2001).

4. Taxonomie

Le Circovirus porcine fut assigné à la nouvelle famille *Circoviridae* (Lukert *et al.*, 1995) en vertu de son génome d'ADN circulaire simple brin. Il était au moment de sa découverte le seul virus infectant les mammifères portant un génome d'ADN simple brin (Tischer *et al.*, 1982). Depuis quelques années, plusieurs nouveaux virus à ADN circulaire simple brin partageant certaines propriétés du circovirus porcine ont été découverts. Ce sont presque tous des petits virus non-enveloppés de 15 à 25 nm de diamètre avec des génomes variant entre 1,7 et 2,3 kb (Todd *et al.*, 2000) se répliquant par la méthode du cercle roulant (Niagro *et al.*, 1998). Le génome de tous les circovirus comprends un motif en forme d'épingle à cheveux portant à son apex une séquence de neuf nucléotides très conservés essentiels à la réplication (figure 5) (Mankertz *et al.*, 1997; Meehan *et al.*, 1997). Tous les membres du genre *Circoviridae* ainsi que les anciens circovirus de plantes sont illustrés à la figure 7.

Le genre *Circovirus* de la famille *Circoviridae* comprend le circovirus porcine de type 1 et 2, ainsi que le *Psittacine beak and feather disease virus* (BFDV). Plusieurs isolats de BFDV sont répandus mondialement, particulièrement en Australie où plusieurs espèces d'oiseaux indigènes sont gravement atteintes par la maladie (Bassami *et al.*, 2001). Une vaste gamme de symptômes sont associés à l'infection par le BFDV chez les oiseaux, mais l'infection par le virus entraîne le plus souvent des déformations du bec, un plumage anormal et un mauvais toilettage. Tout comme le circovirus porcine, on croit maintenant que l'infection par le BFDV pourrait causer une déplétion lymphocytaire qui entraîne une immunosuppression chez l'animal, ce qui le laisse vulnérable à des infections secondaires opportunes (Todd, 2000). On retrouve des inclusions cytoplasmiques basophiles dans les cellules lymphatiques, et en particulier chez les macrophages. (Rosell *et al.*, 1999). Au niveau moléculaire, le BFDV possède une organisation génomique très similaire à celle du CVP avec un génome ambisens de 1993 nt et deux ORF principaux codant pour une protéine Rep de 34,5 kDa dont le gène est situé sur le brin viral et une capsid de 28,7 kDa dont le gène est situé sur le brin complémentaire (Niagro *et al.*, 1998). Par ses caractéristiques physiques et génomiques, le BFDV serait le virus le plus proche du CVP.

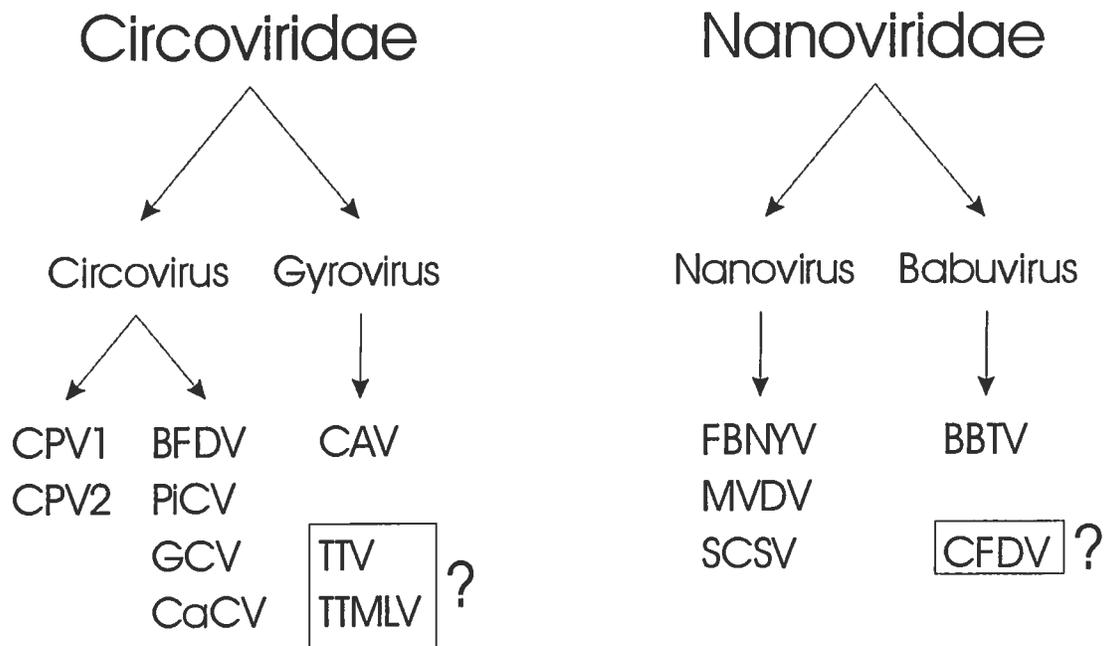


Figure 7: Organigramme illustrant les familles *Circoviridae* et *Nanoviridae*. Informations tirées de (Pringle, 1999; Todd *et al.*, 2001a; Mayo, 2002).

Plusieurs virus récemment isolés à partir de diverses espèces d'oiseaux partagent les caractéristiques morphologiques du circovirus et produisent des lésions histopathologiques similaires. Les *Pigeon circovirus* (PiCV) et *Goose circovirus* (GCV) possèdent un génome ambisens de 2036-2037 et 1821 nt respectivement, un motif de neuf nucléotides conservé ainsi que deux ORF principaux localisés sur les brins viraux et complémentaires respectivement, codant pour la protéine Rep et la capsid virale (Todd *et al.*, 2001b). Le PiCV, aussi appelé *Colombid circovirus* (CoCV) (Mankertz *et al.*, 2000b) possède une homologie de séquence de 55% avec le BFDV et 40% avec CVP. Un autre circovirus aviaire, le *Canary circovirus* (CaCV) a été séquencé. Son génome a été évalué à 1952 nt, et possède une homologie d'environ 58% avec le CoCV et de 47-51% avec le GCV. Sur la base de ces données ces nouvelles espèces de circovirus sont classées de façon non-officielle dans le genre *Circovirus* avec le BFDV et le CVP (Todd *et al.*, 2001b).

Longtemps groupé avec le CVP dans le genre *Circovirus*, le *Chicken anemia virus* (CAV) a récemment été assigné au nouveau genre *Gyrovirus* (Pringle, 1999). Découvert au Japon et caractérisé au début des années 1980, le CAV frappe les élevages de poulets à l'échelle mondiale et occasionne des pertes économiques importantes (McNulty *et al.*, 1991). Le CAV partage la morphologie caractéristique des autres circovirus, ainsi qu'un génome circulaire à ADN simple brin. L'infection par le CAV peut entraîner une grave anémie, l'atrophie du thymus, le jaunissement de la moelle osseuse, et la mort. Son génome de 2319 nt possède cependant une organisation génomique relativement différente de CVP et BFDV, comprenant trois ORF principaux dans le sens (+) dont une protéine Rep de 51,7 kDa qui compose la capsid du virion et qui porte aussi les séquences et motifs impliqués dans la réplication par cercle roulant (Noteborn *et al.*, 1991; Niagro *et al.*, 1998).

En 1997, un petit virus à ADN circulaire simple brin a été isolé à partir du sérum d'un patient atteint d'hépatite (Nishizawa *et al.*, 1997) et baptisé *TT virus* (TTV). À sa découverte, il a été suggéré que le TTV puisse être responsable de certaines formes

d'hépatites ou d'autres maladies du foie (Nishizawa *et al.*, 1997; Okamoto *et al.*, 1999), mais des recherches subséquentes ont démontré qu'aucun lien statistique n'existait entre les deux conditions (Naoumov *et al.*, 1998). On a constaté que le TTV était très répandu chez l'homme, et qu'on pouvait détecter une virémie importante même chez des individus apparemment sains (Bendinelli *et al.*, 2001). La séquence de 3800 à 3900 nt du virus est caractérisé par sa très grande variabilité : certaines souches ont aussi peu que 57% d'homologie entre elles. Le virus possède cependant plusieurs motifs très similaires au CAV (Hijikata *et al.*, 1999). Un nouveau virus, nommé *TT-like mini virus* (TLMV) possédant un génome de 1,2 kb et partageant aussi plusieurs motifs avec le TTV et le CAV pourrait selon certains constituer un intermédiaire entre les deux virus (Takahashi *et al.*, 2000). À ce jour, aucune pathologie particulière n'a pu être associée à l'infection par TTV chez l'homme (Hino, 2002; Hsu *et al.*, 2003).

Plusieurs virus ont longtemps été connus sous le nom de *plant circoviruses* et étaient classés temporairement dans la famille *Circoviridae*, en vertu de la ressemblance entre leur génome à ADN simple brin circulaire ainsi qu'entre leurs protéines *Rep*, et en vertu du motif conservé de neuf nucléotides essentiel à leur réplication (Meehan *et al.*, 1997). Il a été suggéré que les circovirus d'animaux tels le CVP, le BFDV et le CAV auraient évolué à partir des circovirus de plantes (Niagro *et al.*, 1998; Gibbs et Weiller, 1999). Les circovirus de plantes partagent aussi certaines caractéristiques des *Geminivirus*, dont un génome multipartite composé de petites séquences circulaires d'environ 1000 nucléotides (Boevink *et al.*, 1995). Ces virus infectent généralement plusieurs espèces de légumes via un vecteur insecte aphidien chez lequel le virus ne se réplique pas. On a décrit et caractérisé le *Faba bean necrotic yellow virus* (FBNYV), un virus qui cause le jaunissement et la nécrose des feuilles de certains légumes en Afrique du Nord et au Moyen-Orient (Katul *et al.*, 1997) ; le *Subterranean clover stunt virus* (SCSV) peut infecter le trèfle *Trifolium subterraneum L.* et plusieurs autres espèces de légumineuses australiennes, causant des pertes de 65% des récoltes (Boevink *et al.*, 1995) ; le *Milk vetch dwarf virus* (MVDV) entraîne le jaunissement et le flétrissement de plants de fèves et de soya au Japon (Sano *et al.*, 1998). Les autres membres du groupe ayant été caractérisés incluent le *Coconut foliar decay virus* (CFDV) (Merits *et al.*, 2000) et le

Banana bunchy top virus (BBTV) (Burns *et al.*, 1995). En 1999, le Comité International de Taxonomie Virale (CITV) a constitué un nouveau genre au sein de la famille *Circoviridae* pour ces virus infectant les plantes, le genre *Nanovirus* (Pringle, 1999). Plus récemment en 2002, la nouvelle famille *Nanoviridae* a été créée (Mayo, 2002), rassemblant le genre *Nanovirus* (FBNYV, MVDV, SCSV), ainsi que le nouveau genre *Babuvirus* (BBTV). Le CFDV n'est toujours pas assigné.

5. Syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage (SDMPS)

5.1. Historique

Vers 1991, plusieurs animaux provenant de fermes porcines de Saskatchewan souffrant de symptômes apparentés à ceux des fièvres porcines ont été examinés. Cependant, les animaux portaient des lésions spécifiques jamais observées auparavant (Clark, 1997; Harding, 1997). La maladie affectait les jeunes porcelets en fin de phase de post-sevrage ainsi qu'au début de la période d'engraissement, et engendrait chez ceux-ci un dépérissement généralisé ainsi qu'un retard de croissance important, ce qui a valu au nouveau syndrome l'appellation *Post-weaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS), ou *Syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage des porcs* (SDMPS). En France, le syndrome a récemment été rebaptisé sous le nom de *Maladie d'amaigrissement du porcelet* (MAP) (Truong *et al.*, 1999), ou circovirose. La découverte n'a initialement pas suscité de vives réactions, et ces premières observations n'ont été publiées que vers 1997. L'agent responsable du syndrome n'avait pas encore été identifié.

À partir du milieu des années 90, le nombre de cas de SDMPS s'est multiplié à travers le monde, et le syndrome a commencé à susciter plus d'intérêt de la part des chercheurs. En 1997, tandis que le syndrome faisait son apparition aux États-Unis et en Europe (LeCann *et al.*, 1997; Segalés *et al.*, 1997; Allan *et al.*, 1998a), un nouveau virus similaire au CVP fut pour la première fois isolé à partir de tissus provenant de porcs atteints du SDMPS (Nayar *et al.*, 1997; Allan *et al.*, 1998a; Ellis *et al.*, 1998; Hamel *et al.*, 1998; Kiupel *et al.*, 1998). L'analyse de la séquence (Ellis *et al.*, 1998; Hamel *et al.*, 1998) a confirmé qu'il s'agissait d'un nouveau virus, qui a été nommé CVP2. La relation

entre le CVP2 et le SDMPS a fait l'objet de plusieurs études qui ont permis d'établir avec certitude que l'infection d'un porcelet par le virus est nécessaire au développement du syndrome (Allan et Ellis, 2000; Segalés et Domingo, 2002). Cependant dans un grand nombre de cas, la présence du virus seul ne semble pas être suffisante pour entraîner l'apparition des signes cliniques de la maladie (Allan *et al.*, 1999a; Balasch *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 1999; Magar *et al.*, 2000; Pogranichnyy *et al.*, 2000; Calsamiglia *et al.*, 2002). Certains chercheurs soupçonnent que la présence d'autres agents pourrait être nécessaire pour que la totalité des symptômes et lésions apparaissent (Krakowka *et al.*, 2002; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002; Segalés et Domingo, 2002). La recherche sur le mécanisme précis du SDMPS se poursuit et la mise au point d'un vaccin contre le syndrome est maintenant envisageable.

5.2. Distribution et épidémiologie

Depuis les premiers cas décrits dans l'Ouest Canadien en 1991 (Harding, 1997), la progression du SDMPS à l'échelle mondiale a été particulièrement rapide et imprévisible. Le syndrome est apparu chez les porcs au Canada (Illanes *et al.*, 2000), aux États-Unis (Allan *et al.*, 1998a; Fenaux *et al.*, 2000) et dans plusieurs pays d'Europe, dont l'Espagne (Segalés *et al.*, 1997; Plana-Duran *et al.*, 1999; Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2003), la France (Madec *et al.*, 2000), la Hongrie, l'Allemagne (Allan *et al.*, 1998a; Mankertz *et al.*, 2000a), le Danemark (Allan *et al.*, 1999b), la Belgique (Labarque *et al.*, 2000), les Pays-Bas (Wellenberg *et al.*, 2000), l'Irlande (Spillane *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 1999b) et le Royaume-Uni (LeCann *et al.*, 1997). Récemment, le SDMPS a aussi fait son apparition au Mexique (Trujano *et al.*, 2001), au Costa Rica (Liu *et al.*, 2002) en Argentine, en Corée (Choi *et al.*, 2000), en Thaïlande (Kiatipattanasakul-Banlunara *et al.*, 2002) et au Japon (Onuki *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2000). Dans tous ces cas, aucun lien n'a pu être établi pour expliquer l'apparition simultanée de la maladie dans plusieurs pays au même moment. Certains ont proposé que des changements dans les pratiques sanitaires ou de biosécurité auraient pu contribuer à l'émergence rapide du SDMPS. Cependant, le syndrome apparaît couramment chez des fermes dites « exemptes de pathogènes spécifiques » (SPF) et parfois, le syndrome est apparu chez des fermes où

aucun porcelet n'avait été introduit depuis au moins deux ans (Segalés et Domingo, 2002).

Des études récentes ont tenté d'identifier la date d'apparition exacte du syndrome en examinant les tissus et le sérum de porcs décédés dans les années 80 et au début des années 90 et dont l'autopsie avait révélé des lésions semblables à celles du SDMPs. La présence de traces de CVP2 dans les tissus lymphoïdes de porcs décédés depuis au moins 1985 au Japon (Mori *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2000) et en Espagne (Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2003) a confirmé que le CVP2 et le SDMPs sont apparus beaucoup plus tôt que ce que l'on avait précédemment cru. D'autres chercheurs ont réussi à isoler un CVP à partir des tissus de porcs décédés de tremblement congénital dans les années 60. Le séquençage de ce nouvel isolat a révélé qu'il possédait 98% et 72% d'homologie avec le CVP1 et le CVP2, respectivement (Choi *et al.*, 2002).

La prévalence des cas de SDMPs chez les fermes porcines est toujours associée à la présence du CVP2 chez les porcs, mais par contre tous les porcs infectés par le virus ne développent pas l'ensemble des symptômes associés à la maladie (Larochelle *et al.*, 1999b; Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2000; Larochelle *et al.*, 2003). Selon une étude, 36% des porcs dont le sérum contient un titre faible d'anticorps contre le CVP2 souffraient de SDMPs, tandis que 89% des porcs dont le sérum contenait un titre très élevé d'anticorps contre le CVP2 étaient atteints par la maladie (Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2000). Des tests par PCR ont démontré que 94% des porcs portant les signes cliniques associés au SDMPs étaient infectés par le CVP2 (Ouardani *et al.*, 1999). Selon plusieurs autres études, une proportion élevée des porcs souffrants du syndrome seraient co-infectés par d'autres virus porcins tels le Parvovirus Porcin (PPV) (Choi et Chae, 2000; Ellis *et al.*, 2000a; Kim et Chae, 2002a; Pallares *et al.*, 2002), le virus du SRRP (Sirinarumitr *et al.*, 2001; Pallares *et al.*, 2002; Segalés *et al.*, 2002; Drolet *et al.*, 2003) ou le virus de l'influenza porcine (Pallares *et al.*, 2002; Pogranichnyy *et al.*, 2002; Drolet *et al.*, 2003). La relation entre ces différents virus et le développement du SDMPs demeure nébuleuse.

Très peu d'informations ont été publiées concernant le mode de transmission ou le profil d'excrétion du CVP2 chez les porcelets atteints du SDMP. D'après une étude récente effectuée sur un groupe de 313 porcs de groupes d'âge divers, il est possible de détecter des traces de CVP2 dans environ 30% des échantillons de sérum, et dans 19 et 20% des échantillons de fèces et d'écouvillons nasaux (Shibata *et al.*, 2003a; Yang *et al.*, 2003). La mise au point de tests de diagnostic par PCR a aussi permis de détecter la présence de virus dans l'urine, ainsi dans les amygdales et les bronches (Segalés et Domingo, 2002). La présence de virus dans les fèces, l'urine et les muqueuses nasales permettrait d'envisager un mode de transmission par voie fécale-orale (Sato *et al.*, 2000), ou oro-nasale. Ainsi, la plupart des infections expérimentales de porcs avec le CVP2 se font de préférence par voie intra-nasale (Balasch *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 1999; Krakowka *et al.*, 2000; Magar *et al.*, 2000), mais toutes les hypothèses n'ont pas encore été confirmées par des études expérimentales sur le terrain. Le CVP2 a aussi été détecté chez plusieurs fœtus obtenus à la suite d'avortements spontanés et chez des porcelets mort-nés, ce qui pourrait indiquer que le virus serait capable de traverser la barrière transplacentaire et d'infecter un fœtus en gestation (West *et al.*, 1999; Bogdan *et al.*, 2001; Meehan *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2001). Anticorps dirigé contre le virus n'a pu être détecté dans le sérum de bovins et de chevaux (Ellis *et al.*, 2001), mais d'autres ont répertorié quelques cas de transmission du virus chez des porcs sauvages (Kim *et al.*, 2001b), chez d'autres animaux de ferme ou à l'être humain (Tischer *et al.*, 1995a; Allan *et al.*, 2000d; Ellis *et al.*, 2000b). Cependant, il n'existe pas d'information suggérant que ces infections entraînent des effets néfastes pour l'hôte.

5.3. Symptômes

5.3.1. Symptômes cliniques

En termes médicaux, un syndrome est défini comme étant un ensemble de plusieurs symptômes dont la cause est commune. Dans le cas spécifique du SDMP, les porcelets sont affligés par plusieurs symptômes généralement qualifiés de « non spécifiques ». Individuellement, chacune des manifestations cliniques du syndrome pourrait être causée par une multitude de facteurs, mais le regroupement des diverses

afflictions est spécifique au SDMPS. Ce serait possiblement en raison de la diversité et de la nature non-spécifique de ses symptômes que le SDMPS aurait échappé à la détection pendant plusieurs années (Segalés et Domingo, 2002).

Les symptômes principaux retrouvés chez les animaux diagnostiqués avec le SDMPS sont des problèmes respiratoires (chez plus de 90% des animaux), tels la dyspnée et la tachypnée, qui peuvent provoquer des troubles respiratoires. Ces porcs montrent aussi des signes marqués de dépérissement (« *wasting* »), ce qui entraîne des retards de croissance ainsi qu'une réduction de l'appétit, de la consommation alimentaire et de l'énergie chez l'animal (Harding, 1997; Ellis *et al.*, 1998). Les porcelets souffrant du SDMPS se distinguent souvent par rapport aux porcelets sains en raison de leur faible poids, ainsi que par leur aspect émacié. La colonne vertébrale est souvent très visible. Moins fréquemment, les porcelets peuvent souffrir de diarrhée (dans 20% des cas), de jaunisse ou d'ictère (environ 10%) (Segalés et Domingo, 2002).

Le SDMPS frappe particulièrement les jeunes porcelets, et les premiers symptômes visibles commencent généralement à apparaître lorsqu'ils atteignent 5 à 8 semaines et peuvent perdurer jusqu'à l'âge de 3 à 6 mois (Harding, 1997; Allan *et al.*, 1998a; Ellis *et al.*, 1998). La sévérité des signes cliniques semble varier pour chaque animal. Souvent, seuls quelques-uns des porcelets d'un enclos particulier développent la maladie tandis que les autres, bien qu'infectés par le CVP2, demeurent asymptomatiques. Certaines études indiquent que les porcelets provenant d'une même portée (Madec *et al.*, 2000), ainsi que ceux qui ont un poids plus faible à la naissance et à la fin de l'allaitement (Corrégé *et al.*, 2001) sont plus susceptibles d'être victimes du syndrome et de mourir de ses suites. L'incidence du SDMPS serait aussi plus élevée chez les porcelets mâles castrés à un jeune âge (Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2002).

La sévérité des manifestations du SDMPS chez les porcs semble fortement varier chez différents élevages frappés par le syndrome. Certains compte-rendus font état de niveau de morbidité de 4 à 30% et de niveau de mortalité de 70 à 80% (Segalés et Domingo, 2002) tandis que d'autres rapportent un niveau de mortalité de seulement 11%

(Madec *et al.*, 2000). L'environnement influencerait grandement la sévérité des épidémies de SDMPs. La mortalité dans des troupeaux affectés de façon aiguë est toujours plus élevée que dans les troupeaux où le syndrome est endémique. De même, les conditions sanitaires de la ferme porcine serait un facteur déterminant dans la sévérité de la maladie (Madec *et al.*, 2000). Plusieurs facteurs de stress tels le surpeuplement, la mauvaise qualité de l'air, le mélange de porcs de différents groupes d'âges et le manque de nourriture peuvent aussi contribuer à exacerber les effets du syndrome (Allan et Ellis, 2000).

5.3.2. Lésions macroscopiques

Les porcs atteints de SDMPs souffrent de plusieurs pathologies qui peuvent être examinées en détail au moment de la nécropsie. Tout comme pour les signes cliniques, les lésions macroscopiques sont très diverses, et plusieurs d'entre elles ne sont pas retrouvées chez la totalité des porcs malades.

Les animaux malades ont généralement des poumons pesants et caoutchouteux non collapsés tachetés de lésions brun clair. La plupart des animaux montrent des signes de consolidation pulmonaire, et d'induration des lobes pulmonaires (Allan et Ellis, 2000).

L'hypertrophie généralisée des ganglions lymphatiques périphériques est une observation dominante chez la majorité des porcs malades. Dans certains cas ces ganglions, particulièrement les ganglions inguinaux, peuvent voir leur taille multipliée par cinq. Ils sont alors facilement décelables à la palpation. De même, les ganglions mésentériques et trachéobronchiques peuvent présenter le même aspect. Il faut cependant souligner que certains des porcs peuvent porter des ganglions de taille normale ou atrophiée (Segalés et Domingo, 2002).

De multiples autres lésions sont parfois observées à l'examen macroscopique des organes sans qu'il n'y ait un organe cible privilégié. Ainsi, certains animaux malades possèdent un foie décoloré et atrophié, et des points blancs sur reins (Allan et Ellis, 2000; Segalés et Domingo, 2002). Les porcs souffrent souvent d'ulcères à l'estomac qui peut

être causée par divers facteurs. Ces ulcères sont responsables en partie de la perte d'appétit des porcs malades ainsi que de la pâleur de leur peau, un des symptômes cliniques les plus distinctifs. Elles peuvent parfois causer des hémorragies internes qui entraînent la mort de plusieurs des porcs atteints de SDMPS (Segalés *et al.*, 2000).

Des analyses bactériologiques réalisées après l'autopsie démontrent fréquemment l'émergence d'une flore bactérienne opportuniste incluant *Actinobacillus*, *Pasteurella*, Staphylocoque et Streptocoque (Truong *et al.*, 1999). Spécifiquement, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Pallares *et al.*, 2002), *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus* spp., *Chlamydia* spp. (Carrasco *et al.*, 2000) et *Cryptosporidium parvum* (Nunez *et al.*, 2003) ont été retrouvés dans les poumons et les intestins de porcs gravement malades, provoquant des coliques et des diarrhée chez ces animaux (Allan et Ellis, 2000). Les pathogènes *Pasteurella multocida* (Pallares *et al.*, 2002) et *Haemophilus parasuis* peuvent occasionnellement entraîner des infections pulmonaires ou septicémiques (Madec *et al.*, 2000). De telles infections bactériennes opportunistes constituent une cause importante des décès liés au SDMPS, et viennent renforcer les suspicions que le SDMPS serait une immunopathologie exprimée à des degrés variables dans le cadre d'une immunosuppression virale (Krakowka *et al.*, 2002; Segalés et Domingo, 2002). Cette hypothèse est supportée par la présence d'importantes déplétions lymphocytaires au niveau des organes lymphatiques.

5.3.3. Lésions microscopiques

Contrairement aux signes cliniques et aux lésions macroscopiques qui sont de nature non-spécifiques et souvent multifactoriels, les lésions microscopiques observées chez les porcs atteints du SDMPS sont généralement spécifiques à la maladie. En particulier, on observe une sévère déplétion lymphoïde caractéristique dans les tissus lymphatiques au niveau des ganglions, de la rate, des amygdales et des plaques de Peyer (Sarli *et al.*, 2001), ainsi que des inclusions cytoplasmiques dans les cellules des tissus lymphoïdes (Segalés et Domingo, 2002).

Spécifiquement, un examen approfondi des tissus et organes lymphoïdes des porcs malades peut souvent révéler d'importantes perturbations morphologiques. Il est possible d'observer la présence de déplétions lymphocytaires généralisées, en particulier dans les follicules et les régions paracorticales des nœuds lymphatiques, ainsi que dans les feuillets lymphoïdes para-artériolaires (PALS, « *peri-arteriolar lymphoid sheets* ») de la rate. Les déplétions sont particulièrement marquées dans les nœuds lymphatiques hypertrophiés. Ces déplétions lymphocytaires sont généralement accompagnées d'infiltrations d'histiocytes surtout localisées dans le sinus cortical des nœuds. Ces histiocytes portent très souvent des corps d'inclusion basophiles dans leur cytoplasme. La présence de ces corps d'inclusion cytoplasmiques constitue un indice distinctif de SDMPS (Segalés et Domingo, 2002). On observe fréquemment la présence de syncytiums multinucléés dans les tissus lymphoïdes, particulièrement dans les nœuds lymphatiques, la rate, et le tissu lymphatique associé aux intestins (GALT, « *gut associated lymphoid tissue* ») (Clark, 1997; Allan *et al.*, 1998a; Ellis *et al.*, 1998; Kiupel *et al.*, 1998; Allan *et al.*, 1999b; Rosell *et al.*, 1999; Todd *et al.*, 2001a; Darwich *et al.*, 2002).

La nécropsie des poumons démontre souvent la présence d'une pneumonie interstitielle lymphohistiocytaire entraînant la destruction de l'épithélium des bronches et des bronchioles ainsi que la présence de cellules inflammatoires dans les alvéoles. On peut souvent observer d'autres infiltrations lymphohistiocytaires dans le foie, les reins et le pancréas. Certains animaux peuvent développer d'importantes lésions du foie, caractérisées par la nécrose des hépatocytes, entraînant l'effondrement du parenchyme (Rosell *et al.*, 2000a). Les reins sont fréquemment atteints de néphrite interstitielle multifocale, et aussi de vasculite dans certains cas. Les glandes et repliements de l'estomac, du colon, du cæcum et du duodénum montrent des signes de nécrose, et d'infiltration par des cellules mononucléées (Clark, 1997; Allan *et al.*, 1998a; Ellis *et al.*, 1998; Kiupel *et al.*, 1998; Rosell *et al.*, 1999; Todd *et al.*, 2001a).

5.4. Caractéristiques immunologiques

Bien que de nombreux aspects du cycle d'infection du CVP2 chez les porcs soient encore obscurs, plusieurs outils diagnostiques permettent maintenant d'évaluer la réponse humorale des porcelets contre le virus suite à une infection. La progression de la séroconversion chez les porcs nouvellement infectés reste relativement semblable chez la majorité des animaux. Lors d'infections expérimentales de porcelets, ceux-ci séroconvertissent environ 14 à 28 jours pi, autant chez les animaux qui développeront le SDMPS que chez ceux qui demeureront asymptomatiques (Pogranichnyy *et al.*, 2000; Bolin *et al.*, 2001). Plusieurs études sur le terrain ont démontré que les animaux dans les fermes porcines séroconvertissent généralement entre l'âge de 7 et 12 semaines, et peuvent demeurer séropositifs pour le virus jusqu'à l'âge de 28 semaines (Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2002). Une étude similaire a cherché à comparer le profil de séroconversion au CVP2 dans des fermes affectées par le SDMPS comparativement d'autres où le CVP2 est présent sans engendrer de maladie. Les chercheurs ont trouvé que les animaux des deux fermes montrent un profil de séroconversion différent : les animaux qui ont par la suite développé la maladie séroconvertissaient vers 11 à 13 semaines, tandis que ceux qui demeurent asymptomatiques avaient séroconverti vers l'âge de 18 semaines (Blanchard *et al.*, 2003b). Ces résultats pourraient indiquer que les porcs asymptomatiques peuvent résister plus longtemps à l'infection du CVP2, peut-être en raison de la présence résiduelle d'anticorps maternels dans le sérum de ces animaux. Malgré l'apparition d'anticorps dirigés contre le virus chez tous les porcs infectés, plusieurs de ceux-ci deviennent par la suite virémiques, ce qui indique que la réponse humorale seule n'est pas suffisante pour produire une immunité protectrice (Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2002).

En dépit de ces indications suggérant que la réponse immune humorale n'est pas suffisante pour protéger les porcs contre l'infection par le virus, aucune étude n'a tenté à ce jour de caractériser la réponse immune cellulaire dirigée spécifiquement contre le CVP2. Cependant, la déplétion lymphocytaire généralisée observée chez les porcs qui ont développé le SDMPS se traduit par des modifications importantes au niveau des populations de lymphocytes en circulation (Allan et Ellis, 2000; Segalés *et al.*, 2000; Segalés et Domingo, 2002). Plusieurs études ont tenté de déterminer l'étendue de ces

modifications. Ainsi, la caractérisation par cytométrie en flux des population de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) des porcs gravement atteints de SDMP3 révèle une augmentation des monocytes, une réduction du nombre des lymphocytes B et T CD4+ ainsi que la présence accrue de granulocytes immatures, comparativement à des animaux sains (Segalés *et al.*, 2001). Une autre étude a analysé par cytométrie en flux, chez des groupes de porcs atteints de SDMP3 et des porcs sains, les populations de cellules CD4+, CD8+, CD4+/CD8+ (doubles positives), ainsi que les cellules IgM+ (lymphocytes B) à l'aide d'anticorps monoclonaux. Les animaux malades montrent une diminution marquée des populations de cellules CD8+ et CD4+/CD8+. De plus, il a été observé que le degré de déplétion cellulaire dans les organes lymphoïdes ainsi que la diminution des cellules CD8+ en circulation étaient proportionnels à la quantité d'ADN du CVP2 présent dans les tissus lymphoïdes (Darwich *et al.*, 2002).

La caractérisation par immunohistochimie des nœuds lymphoïdes à l'aide d'anticorps spécifiques aux CD4, CD8, IgM, MAC387 (Sarli *et al.*, 2001), CD3, CD79alpha, CD45Ra, lysozyme (Chianini *et al.*, 2003), entre autres, a permis de confirmer la forte réduction des les population de lymphocytes B et T, ainsi que l'augmentation du nombre de macrophages. Les chercheurs ont aussi noté une diminution de la capacité de présentation des antigènes chez les cellules des tissus lymphatiques des porcs malades (Sarli *et al.*, 2001; Chianini *et al.*, 2003).

L'examen par immunohistochimie de tissus lymphatiques provenant de porcs atteints du SDMP3 à l'aide d'un test TUNEL (« *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick end labelling* ») permet de visualiser les cellules apoptotiques. Ces tests ont confirmé la diminutions importante du nombre de lymphocytes B dans les tissus lymphatiques. De plus, plusieurs des lymphocytes B restants étaient en cours d'apoptose. Les chercheurs ont suggéré que la réduction du nombre de lymphocytes B observés chez les porcs souffrant du SDMP3 serait due à l'induction de la mort cellulaire suite à l'infection des cellules par le CVP2 (Shibahara *et al.*, 2000). Les chercheurs ont aussi suggéré que la phagocytose des débris des cellules apoptotiques infectées par les macrophages pourrait permettre au virus d'infecter ces derniers. Tous les indices récoltés

par ces expériences tendent à indiquer que la déplétion des tissus lymphoïdes entraînerait une immunosuppression chez les animaux, et ce mécanisme serait en grande partie responsable de la pathogénicité du SDMPS (Todd, 2000; Segalés et Domingo, 2002).

Afin de vérifier cette hypothèse, une équipe de chercheurs a tenté de déterminer l'effet d'une immunosuppression chimique artificielle sur la réplication du CVP2 chez les porcs et sur le développement du SDMPS (Krakowka *et al.*, 2002). Plusieurs groupes de porcelets ont été infectés avec du CVP2 purifié, et deux de ces groupes ont reçu pendant la durée entière de l'expérience des doses de cyclosporine ou de corticostéroïde, des immunosuppresseurs chimiques très efficaces. Après l'infection, les porcelets immunodéprimés à la cyclosporine développent une lymphopénie aiguë, tandis que les autres groupes demeurent normaux. Les résultats des nécropsies indiquent que chez les porcelets infectés ayant subi une immunosuppression aiguë due à la cyclosporine, la réplication du CVP2 est stimulée, et le virus peut se propager aux cellules dendritiques et aux macrophages, mais aussi aux hépatocytes et aux cellules de Kupffer, ce qui ne se produit pas dans des conditions normales. Cependant, les infiltrations de cellules inflammatoires lymphocytaires et histiocytaires qui causent les diverses lésions généralement observées sont presque totalement absentes. Ceci indique que les lésions inflammatoires caractéristiques du SDMPS seraient causées par des mécanismes dépendants du système immunitaire, tels des réactions immunes humorales ou cellulaires dirigées contre les épitopes viraux (Krakowka *et al.*, 2002).

En vertu de ces observations, les chercheurs ont suggéré que le virus pourrait pénétrer via les macrophages des amygdales, et se disséminer dans l'organisme en se répliquant dans les monocytes du sang périphériques, ce qui leur permettrait d'atteindre et d'infecter plusieurs organes ainsi que les tissus lymphatiques de l'animal (Kim *et al.*, 2003). L'apparition d'infections secondaires chez des porcelets sévèrement atteints par le SDMPS serait due à une immunosuppression du système immunitaire des animaux résultant de la déplétion lymphocytaire causée par la réplication du CVP2 dans les centres germinatifs des tissus lymphatiques (Todd, 2000; Krakowka *et al.*, 2002).

5.5. Reproduction de la maladie

L'accroissement rapide des nouveaux cas de SDMPs à travers le monde a contribué à stimuler la recherche sur les différents aspects du CVP2 et du syndrome, mais ce dernier est toujours mal connu. Les causes et les facteurs déclencheurs ont longtemps mystifié les vétérinaires. Cependant, depuis les dernières années les chercheurs ont fait beaucoup de progrès dans l'identification des différents facteurs qui influencent la sévérité du syndrome chez les animaux. Pour ce faire, une grande variété d'études *in vivo* ont été menées chez le porc afin d'étudier les interactions entre le virus et les animaux.

Les premières infections expérimentales de porcs ont été réalisées en inoculant les animaux avec des extraits de tissus provenant de porcs atteints du SDMPs (Balasch *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 1999; Albina *et al.*, 2001). De jeunes porcelets SPF ont été inoculés avec des homogénats de tissus lymphatiques et de poumons en jeune âge, et ils furent euthanasiés de 21 à 35 jours pi. Les signes cliniques observés chez les porcelets se limitaient à une croissance ralentie, en vertu de laquelle les porcelets infectés avec un poids de 30% inférieur à celui des porcelets témoins, et à des signes de fièvre chez certains animaux. Environ 80 à 100% des animaux inoculés dans ces expériences ont seroconverti au CVP2, mais aucun des animaux ne sont décédés avant l'euthanasie. La nécropsie a révélé la présence de légères lésions au niveau des poumons, des organes lymphoïdes et du foie, ainsi que la diminution du nombre de lymphocytes et une pneumonie interstitielle (Ellis *et al.*, 1999). Ces expériences ont constitué un succès mitigé, puisque bien que les animaux ont été infectés par le virus et ont développé des lésions caractéristiques du SDMPs, l'ensemble des effets cliniques du syndrome, y compris le taux élevé de mortalité, ne furent pas obtenus (Segalés et Domingo, 2002). Des expériences semblables ont été réalisées en infectant des porcelets SPF avec du virus purifié à partir d'échantillons tissus provenant de cas cliniques (Magar *et al.*, 2000; Pogranichnyy *et al.*, 2000). Plus récemment, des chercheurs ont construit un clone moléculaire du virus. La séquence d'ADN complète du CVP2 a été clonée en tandem dans un vecteur pBluescript SK, et ce nouveau plasmide a la capacité d'infecter des cultures cellulaires *in vitro* et de produire des virions de CVP2 normaux. Un groupe de jeunes porcelets a été infecté avec le plasmide recombinant, et la réponse clinique et

sérologique a été étudiée. La majorité des porcs infectés ont séroconverti au virus mais, tout comme pour les infections avec le virus purifié, l'infection est demeurée asymptomatique et aucun des animaux n'a développé le SDMPS (Fenaux *et al.*, 2002). Les résultats de ces essais ont été semblables à ceux des inoculations avec des tissus provenant de porcs malades. L'infection permet d'induire la séroconversion ainsi que quelques symptômes et lésions mineures, mais aucun porcelet ne développe la maladie.

En contraste aux essais décrits précédemment, quelques chercheurs sont parvenus à reproduire la gamme complète des symptômes et lésions associés au SDMPS en infectant des porcelets avec le virus purifié (Bolin *et al.*, 2001; Harms *et al.*, 2001; Allan *et al.*, 2002; Okuda *et al.*, 2003). Les porcelets infectés avec le virus devenaient rapidement moribonds, anorexiques, et montraient des signes de dépression. Quelques animaux sont morts avant la fin des expériences, vers 21 jours pi. Les animaux ont tous séroconverti au CVP2, et ont été euthanasiés vers le 35^e jour pi. Les lésions typiques du SDMPS, telles la déplétion des organes lymphoïdes et la pneumonie interstitielle, ont été retrouvées chez tous les porcs infectés. Ces résultats indiquent que le CVP2 serait possiblement capable d'engendrer à lui seul le SDMPS clinique chez les animaux. Cependant, ces expériences n'ont pour la plupart par été répétées afin de vérifier si les résultats sont reproductibles. Plusieurs facteurs différents tels que l'âge des porcelets au moment de l'infection, la provenance des animaux et leur susceptibilité génétique à la maladie, l'isolat et le dosage du CVP2, entre autres, pourraient expliquer la variabilité des résultats des diverses infections expérimentales (Segalés et Domingo, 2002).

Afin de mieux reproduire les conditions sanitaires retrouvées dans les porcheries commerciales, plusieurs études ont tenté de reproduire la maladie chez les animaux en co-infectant ces derniers avec le CVP2 et avec d'autres virus porcins communément retrouvés chez les porcs souffrant de SDMPS, tels le PPV, le SRRP et le CVP1 (Choi et Chae, 2000; Ellis *et al.*, 2000a; Kim *et al.*, 2002; Pallares *et al.*, 2002; Pogranichnyy *et al.*, 2002; Segalés *et al.*, 2002; Drolet *et al.*, 2003). Ainsi, des chercheurs ont co-infecté des groupes de porcs avec du CVP2 purifié et du PPV (Allan *et al.*, 1999a; Kennedy *et al.*, 2000; Krakowka *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003). Pour les fins de l'expérience, trois

groupes de porcs ont été infectés avec le CVP2, le PPV, et le CVP2 avec le PPV, respectivement. Un quatrième groupe a été gardé comme témoin non-infecté. Dans l'ensemble des expériences, les porcelets du groupe infecté avec CVP2 ont développé des signes cliniques légers du SDMPS et seulement quelques lésions, mais ils n'ont pas présenté la gamme complète des signes cliniques et lésions, et aucun porc n'est mort. Les porcs infectés avec le PPV seulement n'ont développé aucun signe clinique ou lésion. Par contre, les porcelets infectés avec les deux virus montraient des symptômes sévères de SDMPS incluant le dépérissement et la jaunisse. Le niveau de mortalité de ces animaux atteignait 50 à 100% (Allan *et al.*, 1999a). Les lésions observées à la nécropsie correspondaient à celles observées chez les animaux atteints de SDMPS dans les fermes porcines. L'ADN du CVP2 et du PPV fut détecté dans les monocytes et les macrophages ainsi que les cellules nœuds lymphatiques, des amygdales, du thymus, de la rate, des reins, du foie, du cœur et des poumons. Il est à noter que la quantité d'ADN du CVP2 détectée dans les tissus lymphatiques est beaucoup plus importante que la quantité de PPV (Kim *et al.*, 2003).

D'autres expériences de co-infection ont été réalisées avec le CVP2 et le SRRP (Allan *et al.*, 2000b; Harms *et al.*, 2001; Rovira *et al.*, 2002). Les résultats observés sont sensiblement les mêmes que pour les co-infections avec le CVP2 et le PPV. Les porcs infectés avec le CVP2 seul ne développent que des signes cliniques légers et quelques lésions, tandis que les porcelets co-infectés avec les deux virus présentent des signes cliniques sévères ainsi que des lésions généralisées et un niveau de mortalité élevé.

Puisque la co-infection des porcs avec d'autres virus pouvait augmenter drastiquement les effets de l'infection par le CVP2, certains chercheurs ont spéculé que la stimulation du système immunitaire par un adjuvant ou un immunogène non-infectieux pourrait potentialiser les symptômes du SDMPS (Allan *et al.*, 2000c; Krakowka *et al.*, 2001). Plusieurs études expérimentales ont été réalisées afin de vérifier cette hypothèse. Dans l'une de celles-ci, des porcs furent infectés avec le CVP2 et immunisés avec du keyhole limpet hemocyanin dans l'adjuvant de Freund incomplet, avec ou sans l'ajout de thioglycolate. Tous les porcs infectés ayant reçu l'adjuvant ont développé des symptômes

cliniques sévères ainsi que les lésions caractéristiques du SDMPs. Le titre viral présent chez ces porcs était 10 à 10,000 fois plus élevé chez les porcs ayant reçu l'adjuvant que chez les porcs témoins qui ont reçu le CVP2 sans adjuvant (Krakowka *et al.*, 2001). Ces derniers sont demeurés asymptomatiques. Toutefois, une autre étude utilisant un protocole presque identique n'est pas parvenue aux mêmes résultats. Trois des cinq porcs infectés avec le CVP2 mais n'ayant pas reçu l'adjuvant montraient des signes de SDMPs, tandis qu'un seul des porcelets infecté ayant reçu l'adjuvant a développé la maladie (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002).

Afin de tester l'hypothèse de l'immunostimulation dans des conditions plus proches des conditions de champs, des chercheurs ont séparé 84 porcelets, provenant d'une ferme porcine commerciale qui avait eu plusieurs cas de SDMPs le mois précédent, en trois groupes de 28 animaux. Les porcelets du premier groupe ont reçu un vaccin contre *Mycoplasma hyopneumoniae* à l'âge de 7 et 28 jours, ainsi qu'une injection de PBS à 42 jours. Le deuxième groupe a reçu une injection de PBS à 7 jours, et des injections d'un immunostimulateur chimique à 28 et 42 jours. Le troisième groupe a reçu des injections de PBS à 7, 28 et 42 jours. Environ 42,9% des porcelets du premier et 50% des porcelets du deuxième groupe ont développé le SDMPs. En contraste, seulement 10,7% des porcelets témoins ont été victimes du syndrome (Kyriakis *et al.*, 2002). Une expérience similaire fut menée sur une autre ferme ayant récemment subi d'importantes pertes dues au CVP2. Durant une période de quatre mois, la moitié des porcelets furent vaccinés contre *Mycoplasma hyopneumoniae*, tandis que l'autre moitié ne fut pas vaccinée. Quelques mois plus tard l'incidence du SDMPs chez les animaux non vaccinés était significativement plus faible que chez les animaux vaccinés (Allan *et al.*, 2001). Les études de champs tendent à confirmer la théorie que l'infection par CVP2 n'est pas suffisante pour engendrer le SDMPs chez les porcs, et qu'une immunostimulation non spécifique serait nécessaire pour reproduire l'ensemble des symptômes attribués au syndrome. Certains auteurs ont spéculé que la stimulation du système immunitaire stimulerait la prolifération des cellules des centres germinatifs des tissus lymphoïdes, ce qui permettrait aussi la réplication du CVP2 puisque ce dernier ne peut se répliquer que dans des cellules en mitose (Allan *et al.*, 2000c; Krakowka *et al.*, 2001).

D'autres études expérimentales ont permis de clarifier certains aspects encore nébuleux du syndrome. Bien que le CVP2 soit répandu dans plusieurs pays, certains sont très touchés par le SDMPS alors que d'autres sont épargnés. Des chercheurs ont émis l'hypothèse qu'il existerait des souches de CVP2 semblables au point de vue antigénique, mais différant quant à leur capacité d'engendrer le syndrome. Cependant, une équipe est parvenue à reproduire expérimentalement le SDMPS chez des porcs infectés avec une souche de CVP2 provenant de la Suède, pays où le SDMPS n'est pas présent (Allan *et al.*, 2002), ce qui indiquerait que toutes les souches de CVP2 sont capables d'induire la maladie. De plus, des chercheurs ont tenté de déterminer si le simple contact entre les porcs était suffisant pour la transmission de la maladie. Ils ont infecté un groupe de porcs avec le CVP2, et ils ont placé un groupe de porcs sains dans une cage voisine. Quelques jours après l'infection tous les porcs non-infectés ont séroconverti contre le CVP2 (Bolin *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2003).

5.6. Diagnostic

Le SDMPS est en grande partie caractérisé par le nombre important de symptômes qu'il peut engendrer chez les porcs ainsi que la variabilité de ces symptômes, qui peuvent différer de ferme à ferme. Ces facteurs contribuent à rendre le processus de diagnostic très complexe, ce qui peut probablement expliquer pourquoi le syndrome n'a pas été reconnu officiellement avant 1997, bien qu'il sévissait déjà depuis plusieurs années (Clark, 1997). Le diagnostic du SDMPS repose ainsi sur trois éléments clés qui doivent être présents chez tout animal soupçonné d'être atteint par la maladie. En premier lieu, on doit être en mesure d'identifier plusieurs des signes cliniques associés au syndrome ; problèmes respiratoires, dépérissement, retards de croissance, etc. Par la suite, il doit y avoir présence des lésions microscopiques caractéristiques du SDMPS : déplétion lymphocytaire généralisée, inclusions basophiles dans le cytoplasme des cellules mononucléaires, infiltration d'histiocytes. Finalement, on doit être en mesure de détecter la présence du CVP2 dans les lésions (Segalés et Domingo, 2002). Puisque ce processus est très lourd et ne peut évidemment pas être appliqué pour tous les porcs d'un troupeau, seulement quelques porcs sont sacrifiés et nécropsiés. Généralement, on vérifie la

présence des signes cliniques chez les autres animaux, et ont analysé leur sérum afin de déterminer s'il y a présence de virémie ou d'anticorps spécifiques au CVP2. Afin de répondre aux besoins des vétérinaires, cliniciens et chercheurs oeuvrant dans le milieu, une variété d'outils de diagnostic ont été développés pour la détection du virus dans le sérum et les tissus, et la détection des anticorps dans le sérum.

Il faut souligner que des outils de détection du CVP1 sont disponibles depuis déjà plusieurs années. Des tests permettent de détecter la présence des anticorps dans le sérum des porcs par immunofluorescence (Tischer *et al.*, 1986), ou par ELISA (Tischer *et al.*, 1995b), ou pour la détection du virus avec des anticorps monoclonaux (Allan *et al.*, 1994a). Cependant, bien qu'ils peuvent aider à éliminer la possibilité d'une contamination par le CVP1, ces tests ne sont toutefois d'aucune utilité pour la détection du CVP2, puisque l'épitope principal de ce dernier, la capside virale codée par l'ORF2, n'est pas reconnu par les anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre le CVP1.

Plusieurs études ont déterminé que la sévérité du SDMPS chez les porcs est proportionnelle à la quantité de virus détectée dans les lésions (Rosell *et al.*, 1999; Quintana *et al.*, 2001). La technique privilégiée par plusieurs pour la détection du virus directement à partir des échantillons de tissus est l'hybridation in-situ (HIS), qui consiste à l'utilisation d'une sonde moléculaire marquée dans des conditions qui entraîneront sa fixation à l'ADN viral. Les tout premiers tests d'HIS mis au point utilisaient des sondes composées de l'ADN génomique complet du CVP1, qui sont plus faciles à réaliser, mais moins spécifiques (Allan *et al.*, 1998a). D'autres ont utilisé des sondes d'ARN élaborées à partir de la séquence du CVP1 (Morozov *et al.*, 1998). Les deux types de sondes, bien que établies à partir de la séquence du CVP1, se sont avérées adéquates pour la détection du CVP2. Cependant, le séquençage du CVP2 a permis à plusieurs équipes de mettre au point des sondes d'ADN spécifiques au nouveau virus (Choi et Chae, 1999; Rosell *et al.*, 1999; Kim et Chae, 2001), plus faciles à utiliser que les sondes à ADN et plus spécifiques que les sondes composées de l'ADN entier du virus. Jusqu'à récemment, aucune étude n'avait tenté de mesurer la spécificité des diverses amorces pour CVP1 ou CVP2, mais

une technique d'HIS double permettant de distinguer entre les deux virus a nouvellement été perfectionnée (Kim et Chae, 2002b).

La technique d'immunohistochimie (IHC) constitue une alternative très populaire à l'HIS (Ellis *et al.*, 1998; Rosell *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2000; Sarli *et al.*, 2001; Chianini *et al.*, 2003). La technique nécessite l'utilisation d'anticorps spécifiques au CVP2 afin de visualiser la présence du virus dans des échantillons de tissus. La sensibilité des techniques d'HIS et d'IHC pour la détection du CVP2 a été comparée, ce qui a révélé que les deux méthodes sont très adéquates, mais que l'IHC serait légèrement plus sensible (McNeilly *et al.*, 1999).

De nombreuses techniques de PCR sont couramment utilisées pour la détection du CVP2 dans le sérum (Allan *et al.*, 1999a; Truong *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Calsamiglia *et al.*, 2002) et dans les tissus (Morozov *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2000a; Bolin *et al.*, 2001; Kiupel *et al.*, 2001; Calsamiglia *et al.*, 2002; Kiatipattanasakul-Banlunara *et al.*, 2002) de divers animaux. L'utilisation du PCR pour la détection du virus dans les tissus est problématique, puisque la plupart des tests PCR ne sont pas quantitatifs (Segalés et Domingo, 2002). Pour pallier à ce désavantage, il existe des tests de c-PCR quantitatifs spécifiquement pour les tissus (Liu *et al.*, 2000). Une étude a toutefois suggéré que la technique d'IHC, bien que moins sensible que le PCR, permet de mieux évaluer l'association entre le CVP2 et les lésions chez l'animal (Choi *et al.*, 2000). Par contre, le PCR est un moyen rapide et peu coûteux de détecter la présence du virus dans le sérum des animaux, et est fréquemment le premier outil de diagnostic employé. Depuis plusieurs années, diverses méthodes de PCR multiplex permettent de distinguer rapidement et simultanément la présence de CVP1 et de CVP2 dans un même échantillon (Larochelle *et al.*, 1999a; Ouardani *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001b). Cette différenciation peut aussi se faire par PCR-RFLP (Fenaux *et al.*, 2000). D'autres tests similaires permettent de détecter en même temps la présence du CVP2 et d'autres virus tels le PPV (Kim *et al.*, 2001a; Kim et Chae, 2003b) ou le SRRP (Segalés *et al.*, 2002). La sensibilité de divers tests de PCR a aussi été comparée (McNeilly *et al.*, 2002).

La technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) est doublement utile. En premier lieu, elle permet de détecter la présence du virus dans des monocouches de cellules lors de l'isolement viral ou de la propagation *in vitro*, si l'on possède des anticorps spécifiques au CVP2. Puisque la réplication virale ne produit pas d'effets cytopathiques chez la cellule hôte, l'IFI peut permettre de visualiser le virus afin d'effectuer le titrage. Inversement, la technique d'IFI est couramment utilisée dans des laboratoires de diagnostic afin de titrer les anticorps présents dans le sérum d'animaux soupçonnés d'être atteints de SDMPs, si l'on possède déjà des plateaux avec des cellules infectées et fixées. Bien que la technique soit fréquemment utilisée, peu de tests commerciaux sont disponibles, et la plupart des laboratoires préparent leurs propres plateaux de virus (Allan et Ellis, 2000).

L'optimisation de la culture du virus, et les nouvelles avancées sur la découverte des épitopes principaux ont permis le développement d'une grande variété de tests ELISA pour la détection rapide, automatisée et à grande échelle des anticorps contre le CVP2. Les premiers tests développés utilisaient le virus complet comme antigène (Truong *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2000), mais l'identification de la protéine de la nucléocapside du CVP2 comme antigène majeur du virus a entraîné la mise au point de test ELISA utilisant la protéine de la nucléocapside produite et purifiée *in vitro* comme antigène (Mahe *et al.*, 2001; McNeilly *et al.*, 2001; Nawagitgul *et al.*, 2002; Blanchard *et al.*, 2003b)

Bien que plusieurs approches différentes sont utilisés pour le diagnostic et la recherche dans différents laboratoires, très peu d'entre elles ont été commercialisées. Il n'existe pas encore à ce jours de méthode standardisée pour la détection du CVP2 et le diagnostic du SDMPs.

5.7. Traitement et prévention

Il n'existe à ce jour aucune méthode de traitement permettant de guérir les animaux atteints du SDMPs. En raison des coûts associés au développement et à l'application de médicaments thérapeutiques, il serait probablement peu rentable d'entreprendre une telle démarche pour une maladie porcine comme le SDMPs. Ainsi, l'avenue de recherche privilégiée est le développement de techniques de prévention de la maladie, soit par zootechnie ou par la mise au point d'un vaccin.

Les découvertes récentes sur le CVP2 et son rôle dans le syndrome ont permis de proposer des mesures zootechniques de lutte afin de réduire la pression d'infection microbienne dans les élevages (Madec *et al.*, 1999; Madec *et al.*, 2000). Plusieurs stratégies ont été appliquées à petite échelle pour tenter d'améliorer les conditions hygiéniques des enclos et des aires de travail des fermes porcines. Afin de réduire les facteurs de stress auxquels sont soumis les animaux, il est recommandé de veiller à la bonne qualité de l'air ambiant et de l'eau potable, de diminuer le nombre d'animaux dans chaque enclos, d'éviter les échanges entre les porcelets de différents groupes d'âge, et d'assurer le confort des animaux. Il est primordial d'isoler les animaux malades dès l'apparition des premiers signes cliniques du SDMPs, afin d'éviter tout contact avec les animaux sains. La mise en œuvre de mesures similaires a permis dans plusieurs cas une réduction des pertes chez les élevages les plus touchés. Cependant, dans le cas d'infections persistantes, il peut parfois être nécessaire de remplacer la population porcine entière (Segalés et Domingo, 2002).

L'utilisation éventuelle de porcs génétiquement modifiés comme source d'organes pour la transplantation chez l'humain représente un défi important à la fois pour les chercheurs et pour les vétérinaires. Les porcs destinés à servir à la xénotransplantation doivent répondre à des normes sécuritaires exceptionnellement strictes, et doivent être exempts de tout virus qui pourrait être transmissible à l'humain, dont le CVP2. Ainsi, des méthodes d'élevages très strictes ont été mises au point spécifiquement pour obtenir des lignées de porcs exemptes de CVP2 (Yoo et Giulivi, 2000; Tucker *et al.*, 2003).

Bien que les méthodes zootechniques soient généralement utilisées pour endiguer les épidémies de SDMPs dans les fermes porcines, une méthode alternative appelée la thérapie sérique (« *serum-therapy* ») a été utilisée avec succès dans certains cas. La méthode consiste à récolter le sérum hyperimmun de porcs SPF commerciaux ayant été injectés avec du CVP, et à inoculer les porcs à risque du SDMPs par des injections sous-cutanées environ 7 jours après le sevrage. Les résultats préliminaires de deux études similaires suggèrent que la thérapie sérique serait parvenue à diminuer de façon substantielle le risque de développement du SDMPs chez ces porcs (Ferreira *et al.*, 2001; Waddilove et Marco, 2002). Cependant, l'utilisation de sérum provenant d'autres porcs pourrait permettre la transmission d'autres agents pathogènes (Segalés et Domingo, 2002).

Des études récentes ont souligné l'importance de la protéine de la capsid virale du CVP2, codée par l'ORF2, qui serait l'épitope principal reconnu par les anticorps des porcelets souffrant de SDMPs (Mahe *et al.*, 2000; Nawagitgul *et al.*, 2000; Blanchard, 2002; Nawagitgul *et al.*, 2002). Plusieurs ont suggéré que cette protéine pourrait être utilisée comme agent immunogène afin de solliciter une réponse humorale protectrice chez les porcs (Krakowka *et al.*, 2002; Segalés et Domingo, 2002). À ce jour, une seule étude a tenté d'évaluer dans une étude *in vivo* la réponse immunitaire porcine face à une protéine de capsid recombinante. La vaccination de porcs avec la protéine recombinante a été suivie d'une infection expérimentale visant à reproduire le SDMPs (Albina *et al.*, 2001). Selon des résultats préliminaires, la vaccination aurait permis de protéger plusieurs des porcelets contre le développement du SDMPs (Jestin *et al.*, 2001). Une autre étude très récente a réussi à protéger des groupes de porcs en les vaccinant avec la protéine de la nucléocapsid virale (Blanchard *et al.*, 2003a). Il est cependant plausible de penser que plusieurs autres études plus détaillées seront nécessaires à la mise au point d'un vaccin efficace.

6. Autres pathologies associées au CVP2

6.1. Syndrome de la dermatite et néphropathie porcine (SDNP)

Le SDNP (« *porcine dermatitis and nephropathy syndrome* ») fut identifié pour la première fois au Royaume-Uni en 1993 (Smith *et al.*, 1993; Allan *et al.*, 2000a), et a depuis été détecté aux Etats-Unis (Ramos-Vara *et al.*, 1997), en Grèce (Saoulidis *et al.*, 2002) et en Autriche (Schmoll *et al.*, 2003). La maladie est caractérisée par la présence de lésions macroscopiques et microscopiques au niveau de la peau et de certains organes, particulièrement les reins. Dans les cas plus sévères, les porcs souffrent de vasculite (« *vasculitis* ») grave qui entraîne la nécrose de la peau, l'inflammation des veines et des artères, ainsi que l'apparition d'ulcères et d'hémorragies dermiques (Drolet *et al.*, 1999). Plusieurs de ces lésions seraient causées par un dérèglement du système immunitaire, mais le mécanisme exact demeure inconnu. Cependant, plusieurs études ont détecté la présence de CVP2 dans les tissus lymphatiques et souvent aussi dans les reins, les poumons, les amygdales, la rate et le foie de la grande majorité des porcs souffrant de SDNP qui ont été analysés (Allan *et al.*, 2000a; Rosell *et al.*, 2000b; Meehan *et al.*, 2001). Plusieurs des porcelets souffrant du syndrome et infectés par le CVP2 seraient aussi infectés par le SRRP (Choi et Chae, 2001). Ainsi, bien que très peu d'information soit disponible sur le mécanisme du SDNP, toutes les études réalisées à ce jour laissent croire que le CVP2 pourrait être impliqué dans le développement de la maladie.

6.2. Tremblement congénital

Le tremblement congénital (TC ou « *congenital tremors* »), est une maladie affligeant les porcelets nouveau-nés depuis plusieurs décennies. Les symptômes occasionnés par le TC seraient dus à la perte de myéline dans le système nerveux de l'animal au moment de la gestation. Plusieurs types de TC ont été décrits, dont certains ont été associés à un agent en particuliers, tels des anomalies génétiques de l'animal, la présence de l'agent chimique trichlorfon dans l'utérus ou l'infection du fœtus par le virus de la fièvre porcine (« *classical swine fever virus* ») ou par le virus d'Aujeszky (« *Aujeszky's virus* », ou virus de pseudorage). Le TC de type A2 sévit depuis plus de 25 ans en Amérique du Nord, et peut occasionner des épidémies qui dureront de 1 à 8

semaines dans des fermes porcines. Plusieurs porcelets d'une même portée peuvent être affectés par la maladie, qui entraîne chez ceux-ci des contractions involontaires et répétées des muscles squelettiques d'intensité variable. Les contractions diminuent lorsque l'animal est au repos, et s'exacerbent lorsqu'il est dans un état de stress. Le niveau de mortalité peut atteindre 50%, puisque plusieurs porcelets malades sont incapables de s'allaiter normalement. Généralement, les symptômes disparaissent graduellement lorsque les porcs atteignent 4 semaines d'âge, mais dans certains cas ils peuvent perdurer pendant plusieurs mois (Bolin, 1992).

Des chercheurs spéculent depuis plusieurs années que le TC de type A2 serait causé par un virus, et récemment du CVP2 a été isolé à partir de tissu rénal provenant de porcelets atteints de la maladie. Une étude a réussi à détecter la présence de CVP2 dans plusieurs tissus des porcelets malades et asymptomatiques, mais il était particulièrement abondant dans le système nerveux central et dans le foie (Stevenson *et al.*, 2001). Les animaux souffrant de TC possèdent une quantité beaucoup plus élevée de virus dans le cerveau et la colonne vertébrale que les porcs asymptomatiques. Une souche de CVP2 isolée à partir de porcs souffrant de CT a été séquencée et possède 99% d'identité avec les souches de CVP2 qui causent le SDMPs (Choi *et al.*, 2002). Toutefois, une étude récente vient mettre en doute le lien entre le TC et le CVP2. L'analyse des tissus de 40 porcs atteints de TC en Espagne n'a pu détecter la présence de CVP2 (Kennedy *et al.*, 2003). De plus amples recherches sont donc nécessaires pour vérifier l'implication du CVP2 dans la pathologie du TC chez le porc.

6.3. Avortements spontanés et porcelets mort-nés

Dans les dernières années, plusieurs études ont rapporté la présence de CVP2 dans les tissus de fœtus avortés ou de porcelets mort-nés. Cette découverte s'est répétée dans plusieurs fermes porcines dont les porcs ont des taux d'avortement anormalement élevés (West *et al.*, 1999; Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2001; Meehan *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2001; Farnham *et al.*, 2003). Ainsi, plusieurs auteurs ont suggéré que le CVP2 pourrait possiblement infecter les fœtus en gestation et entraîner l'avortement. Afin de vérifier cette hypothèse, des chercheurs ont directement inoculé des fœtus de porcs à

différent stades de gestation (Sanchez *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002). Les 37 fœtus de trois truies au 86^e, 92^e et 93^e jour de gestation respectivement ont été inoculés avec du CVP2 à travers la paroi intra-utérine. À la naissance, 24 porcelets étaient relativement normaux, tandis que 13 étaient mort-nés ou momifiés. Des anticorps dirigés contre le CVP2 ont été détectés dans le sérum de ces porcelets, et la présence de virus a été décelée dans plusieurs organes de porcelets mort-nés. Une autre étude a analysé la distribution du CVP2 dans les tissus de fœtus inoculés à différents stades de la gestation, et dans les tissus de porcelets inoculés une journée après la naissance (Sanchez *et al.*, 2003). Les résultats ont révélé que chez les fœtus, le CVP2 se réplique principalement dans les cardiomyocytes, et un peu dans les hépatocytes et les macrophages. Tout juste après la naissance, les macrophages devenaient la principale cellule cible du virus, et les cellules cardiaques étaient totalement ignorées. Ainsi, plusieurs preuves expérimentales indiquent que le CVP2 pourrait infecter les fœtus et engendrer des lésions potentiellement mortelles. Cependant, on ignore toujours si ce processus serait une cause importante de mortalité *in vivo*.

ARTICLE

1. Accusé de réception

**You have successfully submitted your manuscript
via the Rapid Review system.**

Your Manuscript Number (MS #) is: CDLI00289-03, Version 1

Take note of these numbers for future reference.
You can log on to Rapid Review at any time to see the current status of your
manuscript(s).

If you wish to contact the journal office, here's how:
Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (CDLI)

Journals Department
American Society for Microbiology
1752 N St., NW
Washington, DC 20036

Phone: 1-202-942-9215
FAX: 1-202-942-9355
Email: tthomasian@asmusa.org

Thank You for Using the Rapid Review System!

Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of PMWS in pigs.

MS # CDLI00289-03 - Version 1

Submitted Date: 12/12/2003

Journal Name: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology
(CDLI)

Editor/Sub Editor: -Unassigned- / -Unassigned-

MS Status: MS at Check-In

Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs

MS # CDLI00289-03 - Version 2

Submitted Date: 03/15/2004

Journal Name: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology
(CDLI)

Editor/Sub Editor: Specter, Steven C.

MS Status: MS Accepted

2. Résumé de l'article

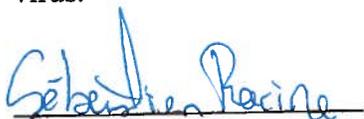
L'objectif de cette étude était de développer un test d'immunofluorescence indirecte (IFI) sensible, rapide et peu coûteux utilisant une protéine de nucléocapside recombinante du circovirus porcine de type 2 (CVP2) pour la détection des anticorps spécifiques au CVP2 dans le sérum de porcs.. Il a récemment été déterminé que la nucléocapside du CVP2 constitue la protéine la plus immunogène du virus, portant les principaux déterminants antigéniques spécifiques au CVP2. La séquence de l'ORF2 de la souche IAF-2897 du CVP2 a été clonée dans un vecteur d'expression eucaryote pCEP5, sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus, et en aval d'une séquence polyhistidine. Des cellules d'épithélium de rein humain 293 furent transfectées avec le plasmide recombinant, et le niveau d'expression de la nucléocapside virale recombinante fut évalué par IFI et immunobuvardage de type Western. Une fluorescence forte et spécifique fut observée dans le noyau des cellules transfectées. La spécificité du test par rapport au test d'IFI classique utilisant des cellules infectées par le virus fut évaluée à l'aide de plusieurs agents infectieux apparentés au CVP2. La sensibilité du test par rapport au test d'IFI classique fut comparée par l'évaluation de la réactivité de 44 sérums de champ provenant des porcs de fermes ayant souffert d'épidémies récurrentes du syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage. Le test utilisant la protéine de la nucléocapside recombinante fut en mesure de détecter 15 porcs positifs qui avaient échappé au test utilisant les cellules infectées par le virus. Ainsi, la sensibilité de ce dernier n'était que de 57,1% comparativement au test utilisant la nucléocapside recombinante. Finalement, la protéine de la nucléocapside recombinante a pu être purifiée par chromatographie à l'aide d'une colonne d'affinité, et d'autres tests diagnostics spécifiques utilisant cette protéine sont présentement en développement.

3. Contribution des auteurs

Le mérite de la conception du projet ainsi que de plusieurs des éléments clés de l'article, tels l'élaboration d'un vecteur plasmidique pour l'expression eucaryote de l'ORF2 du CVP2 ainsi que son utilisation pour la conception d'outils pour le diagnostic sérologique du CVP2 chez les porcs revient au Dr Serge Dea. Plusieurs des détails plus fins du travail, tel l'utilisation du vecteur pCEP5 et du PEI, ont été suggérés par Ali Kheyar. Ce dernier a aussi contribué à superviser le déroulement des travaux tout au long du projet, et il a aussi collaboré à la rédaction de l'article.

Toutes les manipulations décrites dans cet article ont été réalisées par moi-même. J'ai élaboré les amorces qui m'ont servi à amplifier la séquence de l'ORF2, et j'ai effectué toutes les étapes du clonage du gène dans le vecteur pCEP5, ainsi que le criblage des clones. Par la suite, j'ai optimisé la méthode de transfection des cellules HEK 293 avec le plasmide pCEP5-6H-ORF2 à l'aide du PEI. La protéine de la nucléocapside recombinante a par la suite été récupérée, concentrée et purifiée par chromatographie sur colonne d'affinité, et elle a été caractérisée par immunobuvardage de type Western. Il a aussi été nécessaire de produire de grande quantités de CVP2 et de le concentrer afin qu'il serve de témoin positif pour les différentes expériences, et de préparer toutes les cellules, les infection et les transfections utilisées pour les tests d'immunofluorescence. C'est moi qui ai testé les 44 sérums porcins de champ utilisés pour vérifier la fiabilité du test diagnostic par immunofluorescence.

J'aimerais finalement souligner les contributions importantes de Carl Gagnon pour son expertise vétérinaire lors de l'infection expérimentale des porcs et de Benoît Charbonneau pour son assistance technique lors de certaines manipulations. Mourad Ouardani a aidé à mettre au point certaines des techniques utilisées pour la culture du virus.



Étudiant : Sébastien Racine



Codirecteur : Peter Tijssen

4. Article

Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs.

Authors (in order):

Sébastien Racine

Ali Kheyar

Carl Gagnon

Benoît Charbonneau

Serge Dea*

*In memoriam. Deceased January 2003.

Institution :

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

Short title:

Use of PCV2 recNC for diagnosis of PMWS by IFA

Corresponding address:

Dr. Peter Tijssen

INRS-Institut Armand-Frappier

Université du Québec

531, boul. Des Prairies

Laval, Québec, Canada

H7V 1B7

E-Mail: peter.tijssen@inrs-iaf.quebec.ca

Keywords : Circovirus, nucleocapsid, immunofluorescence assay, eucaryotic expression, diagnosis

Abstract

The purpose of this study was to develop a sensitive, rapid and inexpensive immunofluorescence assay (IFA) based on a recombinant porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid protein for the serological detection of PCV2-specific antibodies in pig sera. The viral nucleocapsid protein encoded by the PCV2 ORF2 gene has recently been identified as the most immunoreactive viral protein that carries type-specific antigenic determinants. The ORF2 sequence of the IAF-2897 strain of PCV2 has been cloned into a pCEP5 eucaryotic expression vector under the control of the cytomegalovirus promoter, downstream of a polyhistidine sequence tag. The recombinant plasmid was used in transfection experiments of human epithelial kidney-293 cells that were further tested and positive expression of the viral nucleocapsid protein was confirmed by IFA and western blotting. Strong, specific fluorescence was observed in the nucleus of transfected cells. Test specificity to PCV2 was verified with several related infectious agents. Sensitivity was compared to standard IFA using PCV2-infected cells by evaluating the reactivity of 44 field serum samples from pigs on farms suffering from postweaning multisystemic wasting syndrome. The recombinant nucleocapsid-based test was able to detect 15 more positive pigs than the PCV2-based IFA. Therefore, the relative sensitivity of latter test was estimated at only 57.1% compared to the recombinant nucleocapsid-based test. The recombinant fusion protein has been purified by affinity chromatography and is being used to develop further sensitive serological tests.

Introduction

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is an emerging swine disease first described in Canada in 1991 (7, 13), but subsequent outbreaks have frequently struck pig farms in North and South America, Europe and Asia (2, 3, 6, 15, 22, 28). The disease affects 5 to 12 week-old piglets and is characterized in part by weight loss, dyspnea, jaundice and enlarged lymph nodes, as well as degeneration and necrosis of hepatocytes, multifocal lymphohistiocytic pneumonia, lymphocytic depletion and multinucleated giant cell formation (13). Typically, morbidity rates can reach 5 to 50% in affected herds, and mortality is close to 100% in pigs that develop the full spectrum of symptoms associated with the disease (19). The rapid and simultaneous emergence of the disease in many different parts of the world as well as the uncertain mode of transmission and high rates of mortality in pigs suffering from PMWS has caused great concern throughout the swine industry. The agent thought to be mainly responsible for PMWS has been identified; a circovirus-like particle isolated from diseased pigs was associated with the syndrome and named PCV2 (2, 11, 12).

The first porcine circovirus, now known as PCV1, was discovered in 1974 as a non-pathogenic contaminant of the porcine kidney PK-15 cell line (27). It has since been characterized as a small non enveloped single stranded DNA virus with a 1.76 kb ambisense genome (25). Antibodies against the virus in pigs have been found worldwide but no discernible pathogenic properties have been associated to PCV1 infection in swine (8, 10, 24). PCV2 isolated from pigs suffering from PMWS displays a 76-83% amino acid (aa) identity with nonpathogenic PCV1 and shares the same genomic organization,

consisting of two major open reading frames (ORFs) coding for the replicase protein (Rep) and the nucleocapsid (NC) protein respectively (12, 18, 19). The 702 nucleotide ORF2 sequence coding for the PCV2 NC protein is located on the complementary strand of the double-stranded replicative form of the PCV2 genome, and shares only 66% aa identity with the sequence of the PCV1 ORF2, as opposed to a 85% identity between the ORF1 of both viruses (12). These data have led scientists to speculate that the PCV2 NC protein may be at least in part responsible for the pathogenicity associated with PCV2. Recently, several studies have suggested that the 28 kDa PCV2 NC is the major immunogenic protein of the virus, and the principal bearer of type-specific epitopes (14, 20).

PMWS is most commonly diagnosed on the basis of the presence of its characteristic clinical symptoms, histopathological lesions, and on the detection of PCV2 in the lesions (23). Current methods most commonly used for the detection of PCV2 in pigs include indirect immunofluorescence assays (IFA) against PCV2-infected cells and PCR (Ouardani *et al.*, 1999). Because the use of PCR requires several time-consuming steps, IFA is generally preferred for rapid and inexpensive diagnosis of PMWS. However, IFA requires the prior infection of porcine cells with live PCV2 virus, which can be very arduous because of its very slow replication cycle. The aim of this work was to develop a rapid, easy to use and inexpensive ORF2-based serological diagnostic assay for PCV2 detection based on a recombinant (rec) PCV2 NC protein produced in an eucaryotic expression system.

5. Materials and Methods

Virus, cells and antisera. In a previous work, the IAF-2897 strain of PCV2 virus was isolated from lung tissue of young pigs with typical clinical signs of PMWS in Québec farms and its genome was entirely sequenced (GenBank #AF408635) (21). The virus was propagated in PCV1-free PK-15 porcine kidney cells (PKA), which were graciously provided by A. Afshar (Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada, Nepean, Ontario, Canada). Cells were infected at very low confluence with purified virus and grown in monolayers from 3 to 4 days in GIBCO Minimal Essential Medium (MEM; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 5% fetal bovine serum, 1 mM glutamine, 1% sodium pyruvate and 100 µM of penicillin-streptomycin. When cells reached confluence, supernatant was removed and cells were washed three times with PBS. The virus was harvested by freezing and thawing the infected cells three times in a low volume of PBS. The resulting cell lysate was then clarified by centrifugation. Viral genomic DNA was extracted from stocks of virus using TriPure DNA isolation reagent (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) according to the manufacturer's recommendations. Transfection experiments were carried out with the human embryonic kidney (HEK) 293 cell line (ATCC CRL-1573). Cells were grown in GIBCO Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 5% fetal bovine serum, 1mM glutamine, 1% sodium pyruvate and 100 µM of penicillin-streptomycin.

To produce a swine reference serum against the IAF-2897 strain of PCV2 for use in serological tests, four 5-week-old SPF pigs were injected intranasally with 10^6

fluorescent units (FU) of semi-purified PCV2 virus stock. Antisera from inoculated pigs were tested weekly for the presence of PCV2-specific antibodies until bleeding at 63 days post-infection (dpi). Negative sera were collected from two non-infected SPF piglets that were maintained in the same conditions. A total of 44 field serum samples collected from different groups of pigs from southern Québec farms suspected to be infected with PCV2 were provided by Biovet Inc. (St-Hyacinthe, Québec, Canada).

Cloning of PCV2 ORF2 in an eucaryotic expression vector. The PCV2 ORF2 sequence coding for the virus NC was amplified from the purified PCV2 DNA in two successive PCR reactions using the primers described in table 1. These primers were designed to add a polyhistidine sequence to permit purification of the rec protein using an affinity column and an enterokinase site for the subsequent removal of the polyhistidine site. All primers overlap with each other or with the ORF2 sequence by 20 to 22 nucleotides. Both PCR reactions used Taq Polymerase and consisted of an initial enzyme activation step at 95°C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 48°C for 1 min, extension at 72°C for 3 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The first PCR amplified the ORF2 using the 6H-F2 no.1 forward primer and the F2 reverse primer. The resulting PCR product was then purified using the Qiagen PCR purification kit (Qiagen Inc., Mississauga, Ontario, Canada). In the second PCR the 6H-F2 no. 2 forward primer was used with the same F2 reverse primer used previously. A 780 nucleotide DNA sequence of expected size was confirmed by gel electrophoresis, and the final PCR product was then purified as previously described.

The eucaryotic expression vector pCEP5 derived from the pCEP4 vector (9) was obtained from Dr Kamen laboratory (BRI, NRC, Montreal, Canada). Both the vector and the final purified PCR product were digested with the *Bam*HI enzyme for 2h at 37°C. The enzyme was subsequently inactivated by incubation at 65°C for 20 minutes. The digested PCR product and plasmid were then ligated using T4 DNA ligase at 14°C for 14h. *Escherichia coli* DH5 α competent cells were transformed using the resulting pCEP-6H-ORF2 plasmid. Positive clones were screened by PCR, restriction enzyme digestion and DNA sequencing using the SeqpCEP primers detailed in table 1.

Expression of the rec nucleocapsid protein. Transfection experiments were carried out in either 96-well plaques or 60 cm² petri dishes, and 293 or PKA cells as well as polyethylenimine (PEI) gene transfer reagent (5) in its 25 kDa linear form (Polysciences, Warrington, PA) were used for all transfection experiments. Typically, 1 μ g of linear 25 kDa PEI was mixed to 1 μ g of pCEP5-6H-ORF2 DNA plasmid in a total volume of 100 μ l of GIBCO serum-free DMEM. This mix was incubated at 37°C for 10 min and then 20 μ l per well was added to the sub-confluent 293 or PKA cell monolayers, and incubated in standard culture conditions for 48h.

Expression of the PCV2 ORF2 in transfected cells was verified by IFA using polyclonal PCV2 porcine sera from pigs experimentally infected with purified PCV2, as well as sera from PCV-free pigs. Briefly, transfected cells were washed with PBS and fixed with an acetone-methanol solution (1:1). Fixed cells were then rehydrated with PBS for 10 min. PCV2-positive and negative pig sera were diluted at 1/100 in PBS with 0,15% Tween-20, and incubated with cells for 1h at 37°C. Cells were washed three times with

PBS, and then incubated with rabbit anti-pig IgG-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) diluted 1/100 in PBS during 45 minutes at 37°C. Cells were finally observed and photographed with an epi-fluorescence microscope (Leica, Leitz Wetzlar, Germany). PCV2-infected PKA cells were also used as controls as described above.

Purification and characterization of rec protein. 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2 expression vector in 100 mm petri dishes were lysed with a cell lysis buffer (150 mM NaCl; 10mM Tris pH 7,8; 1% Triton-X; 1% sodium deoxycholate; 0,1% SDS) containing protease inhibitors. The cell lysate was then solubilized by repeated passage through a syringe, and added to a HiTrap chelating affinity column (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec, Canada) as per the manufacturer's instructions. Collected fractions were screened for the presence of the recombinant ORF2 protein by sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot.

Collected fractions of purified 6H-ORF2 protein, as well as non-transfected 293 cell lysate, and purified virus preparation were analyzed by Western blot. Proteins were separated in 12% SDS-PAGE gels using the standard method and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada), which was then incubated in blocking solution (4% skim-milk, 0.05% Tween-20 in PBS). Polyclonal anti-PCV2 serum, as well as serum from PCV-free pigs were diluted 1/500 in blocking solution, and incubated with the membranes for 1h at room temperature. Membranes were washed three times in PBS-Tween 20 and incubated for 1h with a 1/1000 diluted solution

of goat anti-porcine IgG-peroxidase conjugate (Sigma) in blocking solution. After three final washes, the blots were developed with 4-chloro-1-naphtol reagent (Bio-Rad).

Sensitivity and specificity of the IFA. All field serum samples were tested by IFA on 96-well plaques of either 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2 or PKA cells infected with purified PCV2 as described previously. Serum dilutions from 1/50 to 1/5000 were used. Sera were considered positive for PCV2 at 1/50. Specificity of both diagnostic tests for PCV2 was assayed by testing serum samples from pigs infected with PCV1, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus (HEV) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. The calculations of sensitivity values for both assays were determined using the following formula, using the IFA on transfected 293 cells as reference assay:

$$\text{Sensitivity} = \text{True Positives} / (\text{True Positives} + \text{False Negatives}) \times 100$$

$$\text{Specificity} = \text{True Negatives} / (\text{True Negatives} + \text{False Positives}) \times 100$$

Results

Expression of the PCV2 NC protein in transfected cells. A mix of purified plasmid DNA and linear 25 kDa PEI was used to transfect subconfluent monolayers of 293 cells. Transfected cells showed no sign of cellular damage that could be attributed to the presence of the PCV2 NC protein or to the PEI transfection reagent. The presence of the NC protein was determined by IFA with various types of antibodies. Intense and specific fluorescence was observed in the nuclei as well as in the peri-nuclear region of transfected cells. The pattern of fluorescence was similar to that of PKA cells infected with wild-type PCV2 (fig. 1).

Transfected cells containing the recNC antigen reacted very strongly to polyclonal anti-PCV2 antibodies, but did not cross-react against normal pig serum. The expression level of the NC protein in *in vitro* infections of PKA cells and in 293 cells transfected with the pCEP-6H-ORF2 plasmid was compared by IFA (fig. 2). The proportion of cells expressing the PCV2 NC antigen was much higher in cells transfected with the plasmid than in infected cells. Repeated experiments confirmed that on average the PCV2 recNC protein is expressed roughly 9 times more in cells transfected with the pCEP5-6H-ORF2 plasmid than in cells infected with the virus.

Characterization of the rec PCV2 NC protein. Transfection of sub-confluent 293 cells in 60 mm petri dishes with the pCEP-6H-ORF2 plasmid resulted in the production of a significant quantity of rec PCV2 recNC which could then be recovered by cell lysis as described above. The resulting lysate containing both cellular proteins and the PCV2 recNC antigen was purified by passage through a Ni-affinity column. Both the total

protein from the cell lysate and the purified recNC reacted specifically in immunoblotting with polyclonal anti-PCV2 serum at 1/500 dilution (fig. 3, lanes 2, 3). The recNC protein had an observed molecular weight of 32 kDa. Concentrated and purified PCV2 virus was used as control antigen (fig. 3, lane 4) and produced a specific reaction at a molecular weight of 29 kDa. Neither the recNC nor the purified PCV2 virus reacted against PCV2-negative swine serum.

Accuracy of the recombinant ORF2-based diagnostic IFA. The accuracy of the test was verified by comparing both the classic IFA diagnostic test using PCV2-infected PKA cells (classic IFA) and the recNC-based test (recNC IFA). All the 44 porcine sera collected from PMWS-affected swine farms were tested using both IFA, and observed results are summarized in Table 2. A total of 23 sera were positive for PCV2-specific antibodies with the PCV2-based test, while 35 sera were positive with the recNC-based test. The sensitivity of the classic IFA versus the recNC-based test is 57.1% when the latter is used as the reference assay. A total of 15 sera that were negative in the classic IFA are considered positive in the recNC IFA.

Among the 35 sera that tested positive for PCV2 antibodies in the recNC-based test, 10 sera showed antibody titers greater than 5000, while only 3 showed antibody levels greater than 2500 in the classic IFA. Sera from 6 pigs that tested negative in the classic IFA produced antibody titers over 2500 with the new IFA test. Overall 25 sera produced a significantly higher antibody titer with the recNC IFA than with the classic IFA. In addition, 7 positive sera gave roughly equal titers, and 9 were negative with both

assays. Only 3 samples had antibody titers that were lower with the recNC IFA than with the classic IFA.

Positive control sera from pigs infected with PCV1, PRRSV, HEV or *Mycoplasma hyopneumoniae* were also tested against both IFA (data not shown). Some non-specific background fluorescence was observed amongst PCV2-infected PKA cells, but no reactivity whatsoever was observed in cells transfected with the pCEP5-6H-ORF2 plasmid. As a result, both IFA diagnostic tests had a specificity of 100%.

Discussion

The dramatic increase in reported outbreaks of PMWS in pig farms in recent years has been an additional burden for pig producers already under pressure from other pig pathogens, increased public scrutiny, and intense competition in the marketplace. Early detection of PCV2 in pigs is essential to help contain the spread of the virus and of PMWS. The goal of the present study was to conceive a very specific and extremely sensitive but low-cost and easy to use test to help in the diagnosis of early cases of PCV2 infection in pigs. The IFA is probably the most commonly used method for the detection of PCV2 antibodies in pig serum, as it is faster, less expensive than of PCR tests and does not require specialized equipment. However, the use of live PCV2 to infect cells used in IFA has always been problematic at best. Because the virus does not produce a visible cytopathic effect in infected cells and only replicates in cells currently undergoing mitosis, PCV2 infections yield very small amounts of virus (1). The use of D-glucosamine to stimulate the entry of cells in the S phase of mitosis to accelerate the replication of PCV2 has been suggested (26). However, it was also reported to be problematic because of its high cellular toxicity and therefore should generally be avoided when possible (1). There is also evidence of antigenic cross-reactivity between the Rep proteins of PCV1 and PCV2, which could generate false diagnostic results. Recent studies have demonstrated that the ORF1-encoded proteins in the two viruses were antigenically related, whereas the ORF2 proteins were recognized differentially by polyclonal anti-PCV2 antibodies (4, 16, 17). No cross-reactivity was demonstrated between NC proteins of both viruses (Truong *et al.*, 2001).

To circumvent the previous problems, the ORF2 gene from the PCV2 virus was cloned into a pCEP5 eucaryotic expression vector bearing the CMV2 promoter. The resulting pCEP5-6H-ORF2 plasmid was used to transfect cells that could then express the viral NC protein. Initial attempts to transfect PKA cells with the plasmid and either PEI or fuGENE6 transfection reagents (Roche Diagnostics) were a failure. No plasmid DNA was detected in the cytoplasm or the nucleus of transfected cells. Alternatively, 293 cells had previously been used successfully in conjunction with the pCEP5 vector and PEI (9). Subsequent transfection experiments with the pCEP5-6H-ORF2 consistently produced clear and distinct fluorescence in the nucleus and the peri-nuclear area of the 293 cells (fig. 1). This fluorescence pattern was identical to that observed in naturally infected PKA cells, but background fluorescence was markedly lower in transfected cells.

The proportion of transfected cells expressing the PCV2 recNC was roughly proportional to the quantity of plasmid DNA used in the transfection mix. Fluorescent cells may be observed with as little as 40 ng of plasmid DNA per well in a 96-well plate, the optimal amount of plasmid being about 200 to 300 ng per well. Using these conditions, transfection of 293 cells with the plasmid generated on average 9 times more fluorescent cells expressing the PCV2 NC than PKA cells infected with the virus (fig. 2). In addition, transfections of 293 cells in 60 mm petri dishes using the same transfection conditions yielded significantly larger quantities of NC product than PKA cells infected with PCV2 virus in the same culture conditions. The addition of a polyhistidine-tag to the recNC allowed quick and easy purification and concentration of the protein by affinity chromatography with a metal chelate affinity column. Purified and non-purified recNC from cell lysate analyzed by Western blot reacted strongly against PCV2-specific

antibodies (fig. 3). As expected, the addition of the polyhistidine-tag and the enterokinase restriction site to the NC amino acid sequence increased the molecular weight of the protein to roughly 32 kDa, compared to about 29 kDa for the native protein. These results suggest that the recNC protein expressed in transfected cells is immunogenically identical to the native protein.

In order to determine whether recNC IFA using cells transfected with the pCEP-6H-ORF2 plasmid can be used as an accurate diagnostic tool for the detection of PCV2-specific antibodies in pigs, 44 swine sera from several porcine farms in southern Québec that have had recurrent problems with PMWS outbreaks in the past years have been analyzed. Each serum sample was tested by classic IFA using a diagnostic protocol from local laboratories, and by recNC IFA as described in the present study (table 2). The results strongly indicate that the recNC IFA was able to detect much smaller amounts of antibodies in serum, as evidenced by comparing several serial serum dilutions in each test, and it is therefore a much more sensitive assay. The sensitivity of the classic IFA was only 57.1% compared to the recNC IFA. Of the 44 sera tested, only three samples that were considered to be positive using the classic IFA were shown to be negative with the recNC IFA. This could be explained by the high amount of background fluorescence often observed in classic IFA, particularly at low serum dilutions. However, fluorescence in transfected cells is strongly localized in the cell nucleus even when incubated with low serum dilutions. It is noteworthy that both IFA tests were also used with sera collected at different times post-infection from piglets experimentally infected with PCV2. The recNC IFA was able to detect the presence of PCV2-specific antibodies in serum as early as 7 dpi, compared to 14 dpi for the classic IFA.

The results presented in this report indicate that an IFA diagnostic test using PCV2 recNC antigen expressed from transfected cells can quickly and accurately detect even small amounts of PCV2 antibodies in pig sera. The sensitivity of the assay is much improved compared to the classic IFA method using virus-infected cells. This system is particularly advantageous because very large amounts of protein can be rapidly and inexpensively produced, as opposed to PCV2 infections, which can be relatively difficult and produce only small quantities of virus. In addition, the recNC protein can be immediately purified and concentrated by affinity chromatography, and can subsequently be used as antigen for ELISA, Western blot and for further characterization studies. Additional work is necessary to determine whether the protein might be used as a subunit vaccine in pigs to prevent infection by PCV2.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. A. Kamen (BRI, NRC, Montreal, Canada), and Biovet Inc. (St-Hyacinthe, Québec, Canada) for providing respectively the pCEP5 eucaryotic expression vector and swine sera from porcine farms suffering from PMWS. We are grateful to Mourad Ouardani for his technical help, as well as to Dr. Peter Tijssen for helpful discussions. This work was partly supported by the Québec ministry of agriculture (MAPAQ), the Conseil de Recherche en Pêche et Agro-Alimentaire du Québec (CORPAQ) grant #102055 and Biovet Inc (St-Hyacinthe, Québec, Canada). This report was taken in part from a dissertation to be submitted by S. Racine to the INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, in partial fulfillment of the requirements for the M. Sc. degree.

References

1. **Allan, G. M., and J. A. Ellis.** 2000. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* **12**:3-14.
2. **Allan, G. M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Daft, E. G. Clarke, J. A. Ellis, D. M. Haines, B. M. Meehan, and B. M. Adair.** 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* **10**:3-10.
3. **Allan, G. M., F. McNeilly, B. M. Meehan, S. Kennedy, D. P. Mackie, J. A. Ellis, E. G. Clark, E. Espuna, N. Saubi, P. Riera and C. E. Charreyre.** 1999. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol* **66**:115-123.
4. **Blanchard, P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. Le Dimna, C. Arnauld, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec, and A. Jestin.** 2003. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol* **94**:183-194.
5. **Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr.** 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7297-7301.
6. **Choi, C., C. Chae, and E. G. Clark.** 2000. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and PCR. *J Vet Diagn Invest* **12**:151-153.
7. **Clark, E.** 1997. Post-weaning multisystemic syndrome. *Proc Am Assoc Swine Prac* **28**:499-501.
8. **Dulac, G. C., and A. Afshar.** 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res* **53**:431-433.
9. **Durocher, Y., S. Perret, and A. Kamen.** 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* **30**:E9.
10. **Edwards, S., and J. J. Sands.** 1994. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec* **134**:680-681.
11. **Ellis, J., L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Willson, J. Strokappe, K. Martin, F. McNeilly, B. Meehan, D. Todd, and D. Haines.** 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* **39**:44-51.
12. **Hamel, A. L., L. L. Lin, and G. P. Nayar.** 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* **72**:5262-5267.
13. **Harding, J.** 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc Am Assoc Swine Prac* **28**:503.
14. **Liu, Q., S. K. Tikoo, and L. A. Babiuk.** 2001. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* **285**:91-99.
15. **Liu, Q., L. Wang, P. Willson, B. O'Connor, J. Keenlside, M. Chirino-Trejo, R. Melendez, and L. Babiuk.** 2002. Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica. *Can J Vet Res* **66**:225-231.

16. **Magar, R., P. Muller, and R. Larochelle.** 2000. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res* **64**:184-186.
17. **Mahe, D., P. Blanchard, C. Truong, C. Arnauld, P. Le Cann, R. Cariolet, F. Madec, E. Albina, and A. Jestin.** 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* **81**:1815-1824.
18. **Meehan, B. M., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V. A. Jewhurst, J. A. Ellis, L. E. Hassard, E. G. Clark, D. M. Haines, and G. M. Allan.** 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* **79**:2171-2179.
19. **Morozov, I., T. Sirinarumitr, S. D. Sorden, P. G. Halbur, M. K. Morgan, K. J. Yoon, and P. S. Paul.** 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* **36**:2535-2541.
20. **Nawagitgul, P., I. Morozov, S. R. Bolin, P. A. Harms, S. D. Sorden, and P. S. Paul.** 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* **81 Pt 9**:2281-2287.
21. **Ouardani, M., L. Wilson, R. Jette, C. Montpetit, and S. Dea.** 1999. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J Clin Microbiol* **37**:3917-3924.
22. **Plana-Duran, J., M. Balasch, J. Segalés, C. Rosell, G. M. Rodriguez-Arrioja, M. Domingo, J. M. Folch, A. Sanchez, and A. Mankertz.** 1999. Post-weaning multisystemic wasting syndrome in Spain. *Vet Rec* **145**:87-88.
23. **Rosell, C., J. Segalés, J. Plana-Duran, M. Balasch, G. M. Rodriguez-Arrioja, S. Kennedy, G. M. Allan, F. McNeilly, K. S. Latimer, and M. Domingo.** 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* **120**:59-78.
24. **Tischer, I., L. Bode, D. Peters, S. Pociuli, and B. Germann.** 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch Virol* **140**:737-743.
25. **Tischer, I., H. Gelderblom, W. Vettermann, and M. A. Koch.** 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* **295**:64-66.
26. **Tischer, I., D. Peters, R. Rasch, and S. Pociuli.** 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* **96**:39-57.
27. **Tischer, I., R. Rasch, and G. Tochtermann.** 1974. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* **226**:153-167.
28. **Trujano, M., G. Iglesias, J. Segalés, and J. M. Palacios.** 2001. PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet Rec* **148**:792.
29. **Truong, C., D. Mahe, P. Blanchard, M. Le Dimna, F. Madec, A. Jestin, and E. Albina.** 2001. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch Virol* **146**:1197-1211.

Tables and figures

TABLE 1. Oligonucleotide primers used for the construction and sequencing of the pCEP5-6H-ORF2 plasmid. Nucleotide sequences corresponding to *Bam*HI digestion sites were underlined; the polyhistidine sequence is boxed, the enterokinase digestion site is in bold and nucleotides corresponding to the ORF2 sequence were italicized.

Primer	Sense ^a	Sequence	Length (bp)
6H-F2 no.1	F	5'- <u>ACCATCAC</u> GGTGACGATGACGATAA <i>GGATATGACGTATCCAAGGAGGCG</i> -3'	49
6H-F2 no.2	F	5'-CGCGGATCCGCGATC <u>CATCACCATCACCATCA</u> GGTGACGATGACGA -3'	47
F2	R	5'-CGCGGATCCGCGCGCGGATCCGCGT TAGGGTTAAGTGGGGGGT -3'	44
SeqpCEP-F	F	5'-GAGTGACAATGACATCCAC-3'	19
SeqpCEP-R	R	5'-GTCCTCCGAGTGAGAGAC-3'	19

^a F: Forward ; R: Reverse

Fig. 1: Localization of the ORF2 protein in transfected cells. Fluorescence was localized in the peri- and intra-nuclear regions of 293 cells transfected with the pCEP5-6H-ORF2 plasmid (a). This specific fluorescence is similar to that observed in PCV2-infected PKA cells (b). To facilitate observation, the 293 cells were transfected with a sub-optimal quantity of pCEP5-6H-ORF2 DNA.

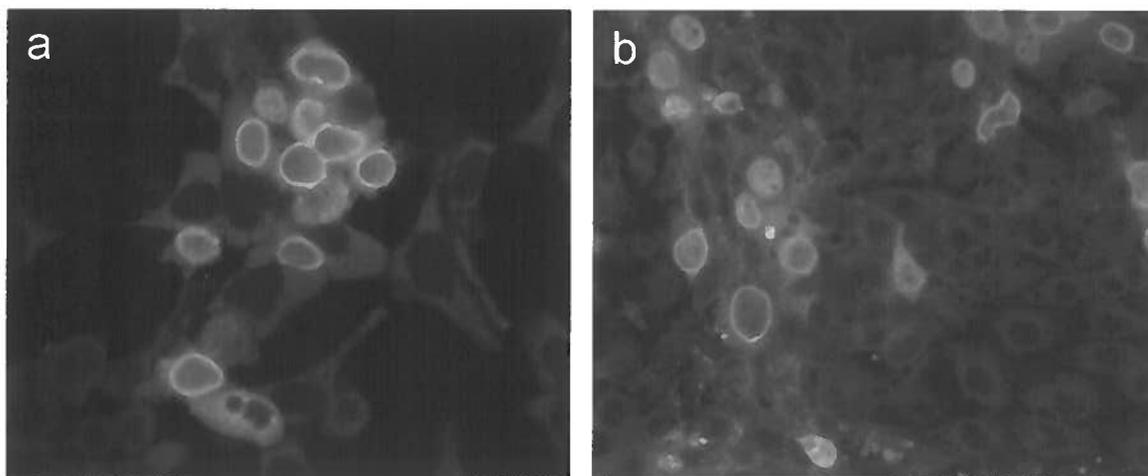


Fig. 2: IFA Comparison of PCV2 NC expression in PCV2 infected PKA cells and 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2. A) PKA cells infected with PCV2. B) Mock-infected PKA cells. C) 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2. D) Non transfected 293 control cells. Cells were incubated with either polyclonal anti-PCV2 pig serum (positive serum) or PCV-negative pig serum (negative serum).

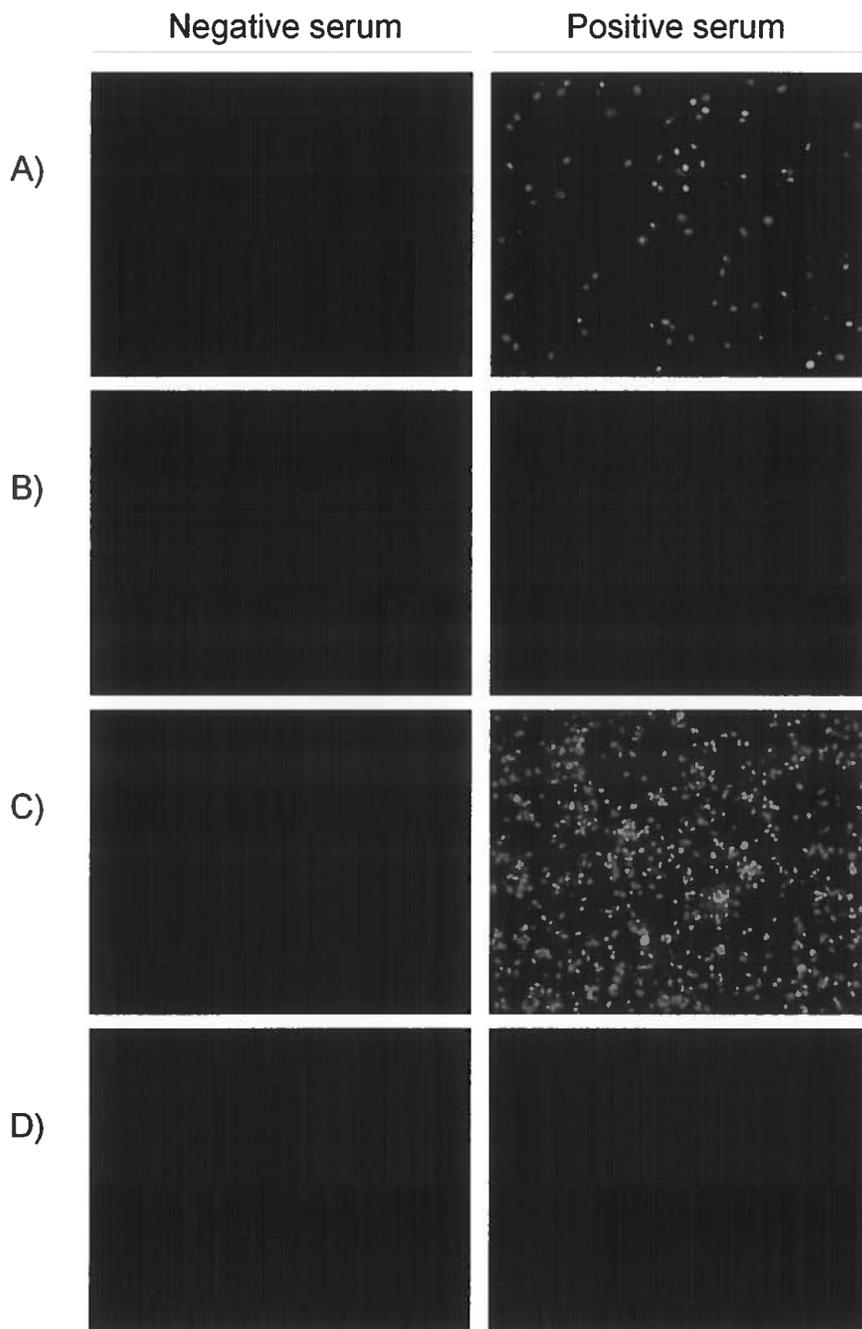


Fig. 3: Expression and purification of rec 6H-ORF2 protein and reactivity against polyclonal anti-PCV2 pig serum and PCV-negative serum in Western blot. Lane 1: Non-transfected 293 cell lysate Lane 2: Total protein in cell lysate from 293 cells transfected with pCEP5-6H-ORF2. Lane 3: 6H-ORF2 protein partially purified in HiTrap chelating affinity column. Lane 4: Total protein in cell lysate from concentrated purified PCV2.

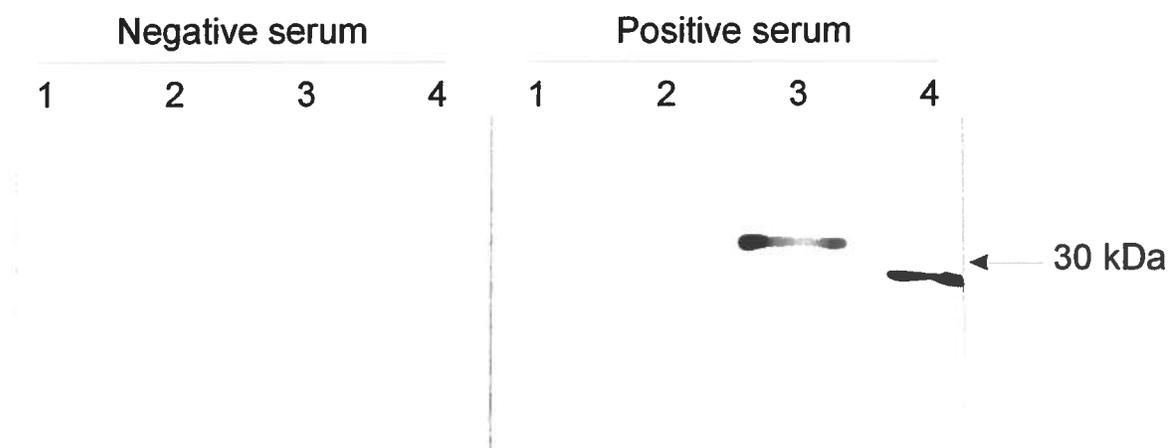


TABLE 2. Comparison between both IFA for the serologic detection of specific PCV2 antibodies in pigs.

Classic IFA	No. of serum samples (%)		
	Positive	recNC IFA Negative	Total
Positive	20 (45.5)	3 (6.8)	23 (52.3)
Negative	15 (34.1)	6 (13.6)	21 (47.7)
Total	35 (79.6)	9 (20.4)	44 (100.0)

DISCUSSION

1. Clonage, expression et purification de la nucléoprotéine du CVP2

Découvert seulement depuis 1997, le virus du CVP s'est propagé à une vitesse fulgurante à travers le monde et dans plusieurs pays, dont le Canada (Ellis *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002), où la situation atteint presque le statut d'épidémie. L'occurrence du SDMPS est directement reliée à la distribution du CVP2 dans les régions touchées par l'épidémie (Segalés et Domingo, 2002). La détection précoce de l'infection par le CVP2 chez les porcs est essentielle au contrôle du virus en permettant immédiatement d'isoler les porcs affectés et de mettre en place des mesures sanitaires plus efficaces (Rose *et al.*, 2003). Un des objectifs du projet était de mettre au point une nouvelle technique pour réaliser le diagnostic sérologique des infections au CVP2 chez les porcs. La séquence de l'ORF2 du CVP2 a été clonée dans un vecteur d'expression eucaryote pCEP5 en amont d'une séquence polyhistidine, et des cellules HEK 293 ont été transfectées avec le plasmide afin d'exprimer une protéine de nucléocapside recombinante. Ces cellules transfectées ont été utilisées pour l'élaboration d'un nouveau test diagnostique pour la détection d'anticorps dirigés contre le CVP2.

Le clonage de l'ORF2 dans le vecteur pCEP5 a nécessité plusieurs tentatives en raison de problèmes successifs au niveau de l'amplification du gène par PCR, de la digestion du fragment amplifié et du plasmide, de la déphosphorylation et du criblage des clones positifs. Un seul clone positif a été obtenu sur les dizaines de colonies testées, mais sa séquence a pu par la suite être confirmée par séquençage. Les premiers essais de transfection de cellules PKA avec le plasmide pCEP-6H-ORF2 et à l'aide des agents de transfection fuGENE6 et le PEI furent un échec. Aucune trace d'ADN de la nucléocapside recombinante ne pu être détectée dans le noyau ou le cytoplasme des cellules. Cependant, des cellules de type HEK 293 avaient déjà été utilisées avec succès pour des transfections avec le vecteur pCEP5 et le PEI (Durocher *et al.*, 2002). De plus, le coût d'utilisation du PEI est infime par rapport à celui du fuGENE6. Les essais de transfection sur ces cellules avec le PEI ont été couronnés de succès, et l'IFI avec des

anticorps polyclonaux anti-CVP2 a révélé une fluorescence forte, spécifique localisée dans le noyau ainsi que dans la région péri-nucléaire des cellules transfectées. La distribution des antigènes viraux observée par IFI dans les cellules transfectées est identique à celle dans les cellules infectées avec le CVP2 complet (Liu *et al.*, 2001a). Les conditions de transfections ont par la suite été optimisées afin de maximiser l'expression de la nucléocapside recombinante. La comparaison du niveau d'expression des antigènes de la nucléocapside par transfection de cellules HEK 293 avec le plasmide pCEP5-6H-ORF2 et par infection de cellules PKA avec le CVP2 complet révèle que 9 fois plus de cellules transfectées expriment les antigènes par rapport aux cellules infectées.

L'IFI sur les plateaux de cellules infectées par le CVP2 est l'un des outils les plus utilisés pour le diagnostic sérologique du CVP2, et il a l'avantage d'être très facile d'utilisation. Cependant, l'obtention de plateaux de qualités peut être ardue en raison de la faible productivité de l'infection virale (Allan et Ellis, 2000; Segalés et Domingo, 2002). Le traitement des cellules à la D-glucosamine peut contribuer à augmenter le titre viral (Tischer *et al.*, 1987), mais son utilisation entraîne souvent la dégénérescence du feuillet cellulaire. La comparaison de la sensibilité entre les tests par IFI utilisant les cellules infectées par le CVP2 et les cellules transfectées a révélé que ce dernier peut détecter de plus faibles quantités d'anticorps dans le sérum. Sur 44 échantillons testés, 20 étaient positifs par IFI avec les cellules infectées et 35 avec les cellules transfectées. Chez ces dernières, l'absence presque de totale de fluorescence à l'arrière-plan permet de bien distinguer les cellules positives. Aucun des différents échantillons de sérum provenant d'animaux infectés par PCV1, SRRP, HEV et *Mycoplasma hyopneumoniae* n'a réagi avec les cellules transfectées, ce qui indique que le test est très spécifique pour le CVP2 et que le risque de résultats faux positifs est faible. L'utilisation de plateaux de cellules HEK 293 transfectées avec le plasmide pCEP-6H-ORF2 est donc à la fois sensible, spécifique rapide, et moins complexe, car elle ne requière pas la production préalable des grandes quantités de virus nécessaires à l'infection de plusieurs plaques.

La nucléocapside recombinante produite dans les cellules transfectées a été récupérée par lyse des cellules, puis le lysat cellulaire a ensuite été semi-purifié et concentré rapidement et aisément par chromatographie d'affinité sur colonne. L'ajout d'une queue polyhistidine à la nucléocapside permet à la molécule d'être capturée par les ions métalliques d'une colonne de chromatographie. Ceci permet d'éviter le recours à d'autres techniques de purification plus longues et difficiles telles l'ultracentrifugation sur coussin de sucrose ou sur gradient de CsCl. La protéine recombinante a pu être analysée par immunobuvardage de type Western. Tel que prévu, l'ajout de la séquence polyhistidine et du site entérokinase augmente la masse de la molécule à environ 32 kDa, comparativement à environ 29 kDa pour le CVP2. Cependant, la nucléocapside recombinante dénaturée est spécifiquement reconnue par les anticorps polyclonaux anti-CVP2, ainsi que par des anticorps monoclonaux dirigés contre la nucléocapside (figure 11). Les anticorps monoclonaux ont aussi pu se fixer à la protéine non dénaturée, exprimée dans les cellules HEK 293 transfectées (figure 10).

Ces résultats suggèrent que la nucléocapside recombinante serait identique à la nucléocapside virale sur le plan de l'immunogénicité. Sa production facile, rapide et peu coûteuse en fait une alternative de choix à l'utilisation du virus complet pour le diagnostic sérologique des infections au CVP2 chez les porcs. La nucléocapside recombinante peut aussi servir d'outil permettant une étude plus approfondie de la structure de la protéine, de son rôle dans la pathologie du SDMPs et de son immunogénicité.

2. Étude de l'immunogénicité du CVP2

L'expérience d'infection expérimentale de porcs entreprise lors de ce projet constitue une première étape permettant d'étudier la réponse humorale des porcs à une infection *in vitro* avec le CVP2, et a aussi permis de déterminer si le protocole d'infection employé est suffisant pour déclencher l'apparition des symptômes du SDMPS, et de récupérer une quantité importante de sérum polyclonal spécifique au CVP2.

L'analyse de la réponse sérologique humorale des porcs (figure 8) a permis de confirmer expérimentalement que l'isolat IAF-2897 du CVP2 est capable de se répliquer et d'induire une réponse immunitaire forte chez les porcs, contrairement aux résultats d'une expérience précédente (Ouardani *et al.*, 1999 résultats non publiés). Les quatre porcs infectés ont séroconverti avant le 14^e jour pi, ce qui est conforme aux résultats obtenus par d'autres équipes de chercheurs (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002).

Parallèlement, les premiers symptômes de maladie observés chez les porcs ont commencé à apparaître vers la 2^e semaine pi. Plusieurs de ces porcs ont développé de légers troubles respiratoires se traduisant par une légère toux vers la 2^e semaine, puis par la suite par des éternuements et un sifflement lors de la respiration dans les deux à trois semaines suivantes. Ces symptômes pourraient être dus à une accumulation de mucus et à une congestion des voies respiratoires. Les symptômes se sont résorbés chez tous les porcs vers la 5^e semaine, et ne sont pas réapparus par la suite.

Le comportement des animaux infectés différait aussi de celui des animaux sains, principalement dans les premières semaines. Les porcelets infectés semblaient plus fatigués que les autres, et étaient fréquemment couchés sur le sol de l'enclos. Leur appétit était plus faible, ce qui semble aussi avoir engendré des retards de croissance marqués chez les animaux pouvant atteindre 20% à 40% de différence de poids par rapport à des porcs sains du même âge par observation visuelle. Lors de la deuxième partie de l'expérience les animaux infectés ont par la suite regagné du poids normalement.

Il est intéressant de constater que la sévérité des principales manifestations du SDMPS observées, comme les problèmes respiratoires et les retards de croissance, semble avoir diminué dans les deux cas à partir de la 5^e semaine pi, alors que c'est à ce moment que le titre des anticorps anti-CVP2 dans le sérum était à son plus élevé. Ceci pourrait confirmer que l'infection au CVP2 est directement responsable de l'apparition de ces symptômes. Toutefois, puisque aucun animal n'est décédé ou n'est tombé gravement malade et que les symptômes observés se sont rapidement résorbés, on ne peut soutenir que les porcs ont été atteints de SDMPS à un degré tel qu'il existe *in vivo* dans les fermes porcines. Après examen post-mortem, aucune lésion macroscopique ou microscopique typique du CVP2 n'a été découverte dans les tissus des principaux organes.

On ignore toujours la nature exacte due lien entre le virus et le SDMPS. De nombreux travaux ont confirmé que l'infection au CVP2 est un préalable essentiel au développement du syndrome (Allan *et al.*, 1999a; Ellis *et al.*, 1999; Albina *et al.*, 2001; Segalés et Domingo, 2002). Cependant, les porcs atteints de SDMPS dans les fermes porcines *in vivo* sont presque toujours co-infectés par d'autres pathogènes tels le PPV (Kim et Chae, 2002a), le SRRP (Segalés *et al.*, 2002), le virus de l'influenza porcine (Pallares *et al.*, 2002) et *Mycoplasma hyopneumoniae* (Sirinarumitr *et al.*, 2001), entre autres. De plus, bien que le syndrome occasionne un niveau de mortalité élevé *in vivo* (Morozov *et al.*, 1998), de nombreuses infections expérimentales *in vitro* avec le CVP2 seul ont été incapables de reproduire l'ensemble des symptômes de la maladie (Krakowka *et al.*, 2000). Plusieurs expériences tentant des co-infections avec le CVP2 et un ou plusieurs des agents mentionnés précédemment ont reproduit des symptômes et lésions beaucoup plus importantes chez les animaux (Allan *et al.*, 1999a; Allan *et al.*, 2000e; Harms *et al.*, 2001; Rovira *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 2003b). L'absence des pleins effets du SDMPS chez les porcs infectés lors de l'expérience tend à confirmer ces observations d'autres chercheurs. Certains ont donc suggéré que d'autres facteurs que l'infection par le CVP2 pourraient être nécessaires à l'apparition du SDMPS. Ainsi, d'autres études ont confirmé que la stimulation du système immunitaire des porcs par un immunostimulateur chimique (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002), une vaccination (Allan *et al.*, 2001; Kyriakis *et al.*, 2002) ou une bactérie (Opriessnig *et al.*, 2003) peut décupler l'intensité

des symptômes et des lésions observés. Afin de poursuivre la démarche il serait donc intéressant de refaire l'infection expérimentale de porcs avec du CVP2 purifié, mais en ajoutant un immunostimulateur tel l'adjuvant de Freund afin de confirmer que la souche IAF-2897 du CVP2 est capable d'induire le SDMPs chez les porcs.

Bien que les résultats observés précédemment soient conformes aux attentes, il fut très surprenant de constater que les deux porcs témoins non-infectés (porcs no. 156 et 157) aient développé une réponse humorale forte contre le CVP2 (figure 8). Ces deux animaux n'ont cependant pas souffert de problèmes respiratoires, et les retards de croissance étaient minimes par rapport à ceux des animaux infectés. Des mesures sanitaires avaient pourtant été prises afin d'éviter tout contact direct entre les porcs infectés et témoins. Ces derniers étaient dans leur propre enclos dans une pièce différente, et les prélèvements de sérum étaient toujours effectués sur ces porcs en premier afin qu'ils ne soient jamais en contact avec des objets ayant touché aux porcs infectés. Les cages des porcs étaient lavées environ une fois par jour par le personnel de soutien.

Malgré que le mode de transmission exact du CVP2 entre animaux soit encore inconnu, plusieurs études récentes ont révélé la présence du virus dans les fèces des animaux atteints (Krakowka *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2003a; Yang *et al.*, 2003). De plus, les porcs ont tendance à produire de grandes quantités de matières fécales, qui peut par la suite contaminer les cages, le sol ou les bottes des chercheurs et du personnel. Il est possible que le virus ait contaminé les bottes du personnel nettoyant les cages des animaux infectés, et qu'ils aient par la suite pénétré dans la pièce où se trouvaient les porcs témoins. Une personne portant des bottes contaminées aurait pu pénétrer dans la cage pour la nettoyer, et ainsi rentrer en contact avec les porcs. Ces derniers ont d'ailleurs parfois l'habitude de mordiller les souliers ou les bottes des personnes qui s'en approchent. Ainsi, ceci peut servir à illustrer plusieurs des problèmes sanitaires auxquels font face les fermes porcines aux prises avec le SDMPs, et expliquer pourquoi il est si difficile de contrôler le virus. Il sera important de réviser les standards de propreté et de stérilité afin d'éviter toute contamination dans le futur.

3. Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la nucléocapside

Malgré la mise en place de mesures sanitaires de plus en plus sévères (Madec *et al.*, 1999; Madec *et al.*, 2000) chez les fermes porcines, le SDMP2 devient de plus en plus répandu à travers le monde. Depuis sa découverte au Canada et au Royaume-Uni (Harding *et al.*, 1991; LeCann *et al.*, 1997), il est maintenant retrouvé dans plusieurs pays de l'Europe, d'Amérique latine et d'Asie (Allan *et al.*, 1999b; Onuki *et al.*, 1999; Trujano *et al.*, 2001). De plus, le mode de transmission de CVP2 entre différents animaux est encore méconnu (Rodriguez-Arrijoja *et al.*, 2002). Il est donc urgent d'arrêter la progression du CVP2 et du SDMP2, d'où l'importance d'approfondir nos connaissances de la structure et des propriétés antigéniques de la nucléocapside virale. L'élaboration d'anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre la nucléocapside permettra de déterminer la topographie des épitopes pouvant éventuellement servir à la mise au point de vaccins contre le CVP2.

Les six souris ayant servi à l'expérience ont reçu un total de six injections de CVP2 concentré et purifié, et les échantillons de sérum recueillis une semaine après chaque immunisation ont été analysés par immunobuvardage de type Western. Les membranes de nitrocellulose utilisées pour chaque immunobuvardage ont été produites par SDS-PAGE avec la nucléocapside recombinante obtenue précédemment, ce qui permettait de confirmer que la réponse observée chez les souris était bien spécifique à la nucléocapside du CVP2. Le sérum de souris a aussi été testé contre des membranes contenant du SVF, ce qui permettait de vérifier si le virus utilisé pour immuniser les souris était contaminé par du sérum provenant du milieu de culture. Une faible réactivité contre le SVF a été détectée chez les souris, ce qui signifie que le virus n'était pas complètement purifié. Après six immunisations, une des souris a été sacrifiée et ses splénocytes ont été récupérés et mis en culture pour produire les hybridomes.

Les hybridomes ont par la suite été criblés à plusieurs reprises par ELISA avec le CVP2 complet, par IFI avec la nucléocapside recombinante et par immunobuvardage de type Western avec la nucléocapside recombinante. Toutes ces étapes ont permis de

sélectionner les hybridomes produisant des anticorps dirigés spécifiquement contre la nucléocapside et non contre le SVF ou d'autres protéines susceptibles d'avoir contaminé les échantillons de souris injectés aux souris. Un total de six anticorps monoclonaux distincts ont été obtenus.

Les isotypages par ELISA et IFI ont révélé que seulement un seul des six anticorps monoclonaux était de type IgG1 (5a6-d10), alors qu'il y avait quatre IgM (2d8-g4, 4e5-f5, 8d10-f5, 9c5-c10) et un IgA (3f7-h10) (figure 10). La prépondérance des anticorps de type IgM semblerait indiquer une réponse humorale précoce du système immunitaire de la souris contre le virus. Cependant, il devrait théoriquement ne plus y avoir de production d'IgM après six immunisations contre le virus. Il est possible que certaines des injections n'aient pas été effectuées au bon endroit chez la souris, ou qu'il n'y ait pas eu suffisamment d'antigène pour induire une réaction immunitaire forte.

La comparaison des résultats des criblages par IFI et par immunobuvardage de type Western permet d'identifier les anticorps spécifiques à un épitope structural, ou un épitope linéaire, puisque la protéine est exprimée dans sa forme native dans les cellules eucaryotes HEK 293 mais qu'elle a été dénaturée par le SDS lors de l'électrophorèse avant d'être transférée à la membrane de nitrocellulose pour le test d'immunobuvardage. Les quatre anticorps de type IgM reconnaissent des épitopes conformationnels puisqu'ils réagissent par IFI et non par immunobuvardage de type Western, tandis que les anticorps de type IgG et IgA reconnaissent des épitopes linéaires puisqu'ils réagissent par IFI et immunobuvardage. De plus, aucun des anticorps n'a pu neutraliser le CVP2 et empêcher le virus d'infecter des cellules PKA lors de tests de neutralisation.

À ce jour, une seule étude publiée a décrit l'élaboration et la caractérisation d'anticorps monoclonaux contre le CVP2 (McNeilly *et al.*, 2001), et aucun autre anticorps monoclonal de type IgM contre le CVP2 n'est mentionné dans la littérature. L'étape suivante de la recherche consistera à déterminer l'emplacement sur la nucléocapside des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux nouvellement produits.

4. Topographie des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux

Il est maintenant acquis que la protéine de la nucléocapside virale est la protéine la plus immunogène du virus, et la production d'anticorps monoclonaux a permis de confirmer que les principaux déterminants antigéniques reconnus sont situés sur cette protéine, mais peu d'études ont tenté d'en analyser la structure. Afin d'identifier des sites porteurs des épitopes, la protéine a été séparée en trois fragments distincts et clonée dans le vecteur d'expression eucaryote pCEP5. Des cellules HEK 293 ont été transfectées avec les plasmides et leur expression a été analysée par IFI.

L'analyse de la séquence d'aa a permis de déterminer quelles régions précises comportaient des sites susceptibles de porter des épitopes. L'élaboration à l'aide du logiciel PLOTSTRUCTURE (Jameson et Wolf, 1988) d'une carte du potentiel hydrophile ou hydrophobe des aa (figure 13) a révélé la présence de deux régions fortement hydrophiles au début et à la fin de la protéine, ainsi que d'une région hydrophobe à l'intérieur. Ceci suggère que la protéine dans sa forme native expose les aa des extrémités à sa surface, tandis que ceux du centre sont probablement à l'intérieur de la capsid virale. Il y aurait donc plus de chance de trouver des épitopes sur les régions exposées à la surface de la protéine. L'élaboration d'une carte du potentiel antigénique des différents aa (figure 14) (Jameson et Wolf, 1988) a confirmé que les deux régions à l'extrémité possèdent plus de sites au potentiel antigénique élevé. À la suite de ces observations, la séquence de l'ORF2 a été séparé en trois régions distinctes : N-terminale (aa 1 à 78), Interne (aa 59 à 145), et C-terminale (aa 138 à 233). Les épitopes devraient ainsi être répartis entre les trois fragments.

L'expression du plasmide contenant le fragment C-terminale a entraîné chez les cellules transfectées une fluorescence très distinctive localisée spécifiquement dans le cytoplasme (figure 15). La fluorescence est diffuse et semble composée de petits points, à l'opposé de la fluorescence observée lors de l'expression du virus complet. La séquence qui permet à la protéine de se localiser dans le noyau des cellules a été identifiée lors d'une étude précédente, et serait située dans la région des aa 12 à 18 et 34 à 41, situées

dans la régions N-terminale (Liu *et al.*, 2001a). Ainsi, l'amputation de cette partie de la protéine bouleverse la répartition de la nucléocapside à l'intérieur de la cellule.

L'analyse de l'expression des fragments Interne et N-terminal dans les cellules HEK 293 n'a révélé aucune fluorescence. Afin de confirmer que les deux plasmides étaient fonctionnels, ceux-ci ont été analysés avec des enzymes de restriction et par séquençage. Les deux plasmides digérées avaient la taille attendue et la séquence du plasmide portant le fragment Interne était bonne, mais le séquençage du plasmide portant le fragment N-terminal a échoué pour des raisons inconnues. Il reste donc à déterminer si l'absence de fluorescence dans les deux cas est due à des imperfections dans les plasmides ou les conditions des transfections, ou seulement à l'absence d'épitopes dans ces régions. Des études précédentes avaient pourtant démontré la présence d'épitopes dans les régions des aa 25 à 39, (N-terminal) 73 à 87 (Interne), 121 à 147 (Interne et C-terminale) et 169 à 183 (C-terminale) (Mahe *et al.*, 2000). Des analyses plus approfondies seront nécessaires pour déterminer si ces épitopes sont bel et bien présents dans la séquence de la nucléocapside de la souche IFA-2897 du CVP2. Notamment, les anticorps monoclonaux produits précédemment pourront être utilisés afin de déterminer si tous peuvent reconnaître le ou les épitopes présents sur le fragment C-terminal.

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr Serge Dea, qui m'a accueilli à bras ouverts dans son labo et qui n'a jamais cessé de m'encourager et de me soutenir, même quand la maladie l'accablait. Même s'il n'est plus parmi nous, il reste encore un peu de Serge chez sa femme, ses trois enfants, et chez chacun des ses nombreux étudiants qui peuvent tous témoigner de sa passion pour la science.

Je tiens à souligner le travail exceptionnel, la générosité et la patience sans limite d'Ali Kheyar, qui m'a grandement aidé tout au long de ma maîtrise et qui a un peu pris la place de Serge pour me superviser.

Merci au Dr Peter Tijssen, qui a généreusement accepté de devenir mon co-directeur et qui a pris de son temps pour réviser mon mémoire et mon article.

Un gros merci à Mourad Ouardani, qui m'a précédé sur le projet et qui a pris de son temps précieux pour m'initier à la vie de laboratoire et au circovirus.

Merci à Benoît Charbonneau d'avoir pris le flambeau du projet circovirus et qui a toujours su m'endurer avec le sourire.

Finalement, merci à tous les autres étudiants qui ont séjourné dans le laboratoire et qui ont su m'apporter seulement leurs connaissances scientifiques et leur aide précieuse, mais aussi leur amitié. Annie Boisvert, Martine Boutin, Sylvie Chabot, Kane Cheikh Saad Bouh, Patrick Cléroux, Dr Carl Gagnon, Ahmed Jabrane, Guillaume Lachapelle, Faust Okamba, Barthélemy Ontsouka, Marie-Josée Sasseville, Dominic Therrien.

...ainsi que nos amis les cochons!

ANNEXE I : INFECTION EXPÉRIMENTALE DE PORCS AVEC LE CVP2

1. Introduction

L'un des aspects les plus curieux du SDMPS est que l'on ignore encore quels sont les facteurs spécifiques qui déclenchent l'apparition des pleins symptômes de la maladie chez les animaux. L'infection préalable des porcs par le CVP2 semble être un prérequis essentiel, mais comment expliquer que tous les animaux infectés ne développent la maladie? Bien que plusieurs autres virus soient couramment associés au SDMPS, aucun autre n'est présent chez la totalité des porcs malades. De plus, plusieurs expériences de reproduction expérimentale de la maladie dans des conditions contrôlées ne sont pas parvenues à reproduire le syndrome (Magar *et al.*, 2000; Pogranichnyy *et al.*, 2000; Segalés et Domingo, 2002). Certains ont récemment suggéré que l'effet combiné de l'infection par CVP2 et de certains autres facteurs de stress comme la surpopulation, de mauvaises conditions sanitaires ou l'activation du système immunitaire par la vaccination ou par une autre infection puisse être l'élément déclencheur du syndrome (Allan *et al.*, 2001; Krakowka *et al.*, 2001; Kyriakis *et al.*, 2002).

Une première infection expérimentale de porcelets avec le CVP2 purifié avait été réalisée précédemment dans le laboratoire (Ouardani *et al.*, 1999, résultats non publiés). À cette occasion, aucun anticorps anti-CVP2 n'avait été détecté chez les porcs. La décision a été prise de recommencer cette expérience afin de confirmer les observations de plusieurs autres chercheurs que le CVP2 seul n'est pas suffisant pour reproduire les symptômes du SDMPS. De plus, l'expérience permettra d'évaluer la réponse humorale des porcs contre le CVP2. La récolte de nombreux échantillons de sérums permet aussi d'obtenir de grandes quantités d'anticorps polyclonaux spécifiques au CVP2 qui pourront par la suite être utilisés comme contrôles positifs pour toutes les futures expériences du laboratoire.

2. Matériel et méthodes

2.1. Production de stocks viraux

Tel que mentionné précédemment, les stocks de CVP2 IAF2897 ont été produits en infectant des flacons de 150 ml de cellules PKA à très faible densité. Les cellules ont été récupérées lorsque le feuillet a atteint une confluence de 99%, après environ 7 jours, et ont été redistribuées dans d'autres flacons de 150 ml. Après le troisième passage des cellules infectées, le lysat cellulaire a été récupéré, clarifié, et concentré par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 70% durant 3h à une vitesse de 100,000g. Le culot a par la suite été resuspendu dans le PBS

2.2. Provenance des porcs

Les animaux ont été commandés au mois d'août 2002. Les six porcelets utilisés pour cette expérience étaient âgés de cinq semaines au j0. Les porcs 151, 152, 153 et 154 seront infectés avec le virus, et les porcs 156 et 157 seront considérés comme témoins.

2.3. Injections de virus

Une grande quantité de virus purifié a été préparée pour les fins de cette expérience tel que décrit précédemment. Un total de 1 ml de virus ultracentrifugé a été dilué à un volume final de 12 ml dans du PBS. Les porcs furent inoculés par voie intranasale avec 1,5 ml de la solution virale par narine, pour un total de 10^6 unités fluorescentes (FU) de virus par porc.

2.4. Suivi des animaux

Les animaux infectés ont été gardés dans leur propre enclos dans une pièce séparée de celle où ont été placés les porcs témoins. Les enclos ont été nettoyés une fois par jours par le service d'entretien du Centre de Biologie Expérimentale. La condition des porcs a été surveillée visuellement deux à trois fois par semaine. Des échantillons de sérum ont été prélevés aux jours 0, 3, 7, 14, 22, 28, 35, 42, 58 et 74. Tous les porcs ont été

sacrifiés au jour 74, et des échantillons de cerveau, de poumon, des nœuds lymphatiques, du foie et de la rate ont été prélevés pour analyse future.

2.5. Évaluation de la réponse sérologique

Les échantillons de sérum récupérés au fil de l'expérience ont été testés par IFI afin de déterminer les titres d'anticorps dirigés spécifiquement contre le CVP2 et le CVP1. Dans le premier cas, les IFI ont été réalisées sur des plaques de 96 puits de cellules 293 transfectées avec le plasmide pCEP-6H-ORF2 et fixées tel que décrits précédemment. Afin de déterminer le titre précis des anticorps présents dans le sérum, chaque échantillon a été testé à des dilutions de 1 :100, 1 :1000, 1 :10000, 1 :50 000, 1 :100 000 et 1 :1 000 000. Des plaques de 96 puits de cellules PK-15 infectées de façon persistante par le CVP1 ont été utilisées pour déterminer la présence d'anticorps spécifiques au CVP1.

3. Résultats

3.1. Sérologie

La réponse humorale des porcs contre le CVP2 est illustrée à la figure 8. Tous les porcs ayant reçu l'injection de CVP2 au jour 0, c'est-à-dire les porcs 151, 152, 153 et 154 ont développé des titres d'anticorps significatifs de une à deux semaines après l'injection. Les titres d'anticorps ont atteint leur maximum vers la 5^e semaine de l'expérience, et ont diminué par la suite pour atteindre un niveau stable toujours élevé jusqu'à la fin de l'expérience au 74^e jour pi. Cependant, les deux porcs témoins non infectés ont aussi produit des anticorps contre le CVP2 qui ont commencé à apparaître à la 2^e semaine pi, et ont atteint un maximum plus élevé que chez les porcs infectés vers la 5^e semaine de l'expérience. Chez tous les porcs testés seulement des anticorps de type IgG ont pu être détectés. Les tests de détection des IgM se sont avérés négatifs. Tous les porcs possédaient des titres faibles d'anticorps dirigés contre le CVP1, mais ceux des porcs 151, 152 et 153 étaient légèrement plus élevés (résultats non illustrés).

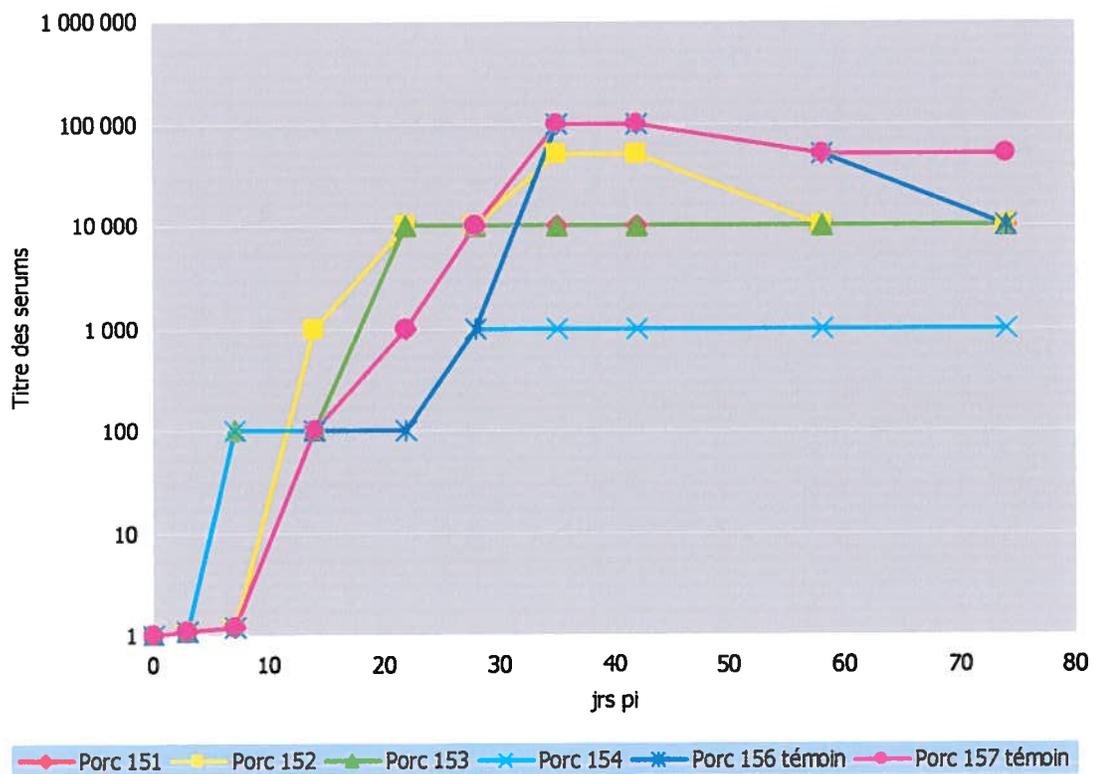


Figure 8: Réponse humorale des porcs dirigée contre le CVP2.

3.2. Observations cliniques et post-mortem

Tout au long de l'expérience, les porcs infectés ont montré plusieurs des signes cliniques associées au SDMPs, mais à des degrés relativement faibles. Ainsi, dès la 2^e semaine les quatre porcs infectés ont commencé à tousser fréquemment. Trois des quatre porcs semblaient prendre moins de poids que les autres. Le porc 153 semblait particulièrement fatigué et portait un kyste rempli de sang sur une fesse. Pendant les deux semaines suivantes les porcs ont continué d'éternuer de façon occasionnelle. Certains d'entre eux semblaient avoir une respiration un peu plus difficile, et les retards de croissance par rapport aux porcs témoins devenaient de plus en plus évidents. Après la 5^e semaine, la toux et la respiration difficile se sont résorbés, et les porcs n'ont pas développé d'autres symptômes graves. Les animaux ont graduellement repris du poids, mais la taille des porcs infectés est toujours restée inférieure par rapport à celle des porcs témoins.

Les porcs ont été sacrifiés au 74^e jours de l'expérience, et le cerveau, les poumons, les nœuds lymphatiques, le foie et la rate ont été examinés. Aucun signe de lésion caractéristique du SDMPs attribuable au CVP2 n'a pu être détecté. Des coupes des échantillons de poumons observées au microscope ne possédaient pas de lésions remarquables.

ANNEXE II : PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LA NUCLÉOCAPSIDE

1. Introduction

La production d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre les épitopes de la nucléocapside du CVP2 constitue une étape essentielle des travaux de caractérisation de l'ORF2. Les anticorps monoclonaux pourront éventuellement être utilisés pour les tests de diagnostic spécifiques ainsi que pour l'étude de la topographie des épitopes immunodominants de la nucléocapside virale.

2. Matériel et méthodes

2.1. Provenance des souris

Six souris de type Balb/c de 5 semaines ont été utilisées pour l'étude. Elles provenaient d'une colonie de souris du Centre de Biologie Expérimentale de l'INRS-Institut Armand-Frappier à Laval.

2.2. Immunisation des souris

Les souris ont reçu un total de six injections de 30 µg de CVP2 purifié dans un volume équivalent d'adjuvant de Freund complet pour la première injection, et incomplet pour les injections subséquentes. Toutes les injections ont été effectuées par voie intradermique à la base de la queue. Les injections ont été effectuées à des intervalles d'environ une semaine. Des échantillons de sérum ont été prélevés à chaque semaine et analysés par immunobuvardage de type Western sur des membranes réalisées avec la protéine de nucléocapside recombinante 6H-ORF2.

2.3. Prélèvement et mise en culture des cellules de la rate

La souris ayant réagi le plus fortement contre le CVP2 après la 6^e injection a été sacrifiée. La rate a été prélevée dans des conditions stériles et les splénocytes ont été

récupérés et fusionnés avec des cellules de myélomes Sp2/0-Ag14. Les hybridomes ont par la suite été redistribués dans des plaques de 96 puits et cultivées pendant plusieurs semaines dans du milieu DMEM contenant de l'hypoxantine-aminoptérine-thymidine, ce qui permet d'éliminer les cellules non fusionnées.

2.4. Criblage des hybridomes

Un premier criblage a été effectué par ELISA. En premier lieu, des plaques d'ELISA de 96 puits ont été incubées 12h à 4°C avec une solution de virus CVP2 purifiée. Par la suite, 100 µl de milieu de chacun des puits des plateaux contenant les hybridomes a été transféré dans le puits correspondant d'un des plateaux d'ELISA. Les étapes subséquentes de l'ELISA suivent le protocole standard. Au total, douze plateaux de 96 puits d'hybridomes ont ainsi été criblés par ELISA, et les résultats ont été lus au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm et analysés par ordinateur. Les hybridomes des puits où la longueur d'onde mesurée était significativement plus élevée que celle des puits témoins ont été redistribués dans des nouveaux plateaux de 24 puits par la technique de la dilution limite afin d'isoler les hybridomes stables produisant des anticorps dirigés spécifiquement contre le CVP2. Lorsque les hybridomes ont atteint une taille satisfaisante, ils ont à nouveau été criblés par ELISA, et les clones les plus intéressants ont été transférés en plateaux de 6 puits, puis subséquentement dans des flacons de 25 ml.

2.5. Caractérisation des anticorps monoclonaux

2.5.1. Isotypage par ELISA

Les anticorps produits par les différents hybridomes ont été isotypés par ELISA de capture avec le kit Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents de SIGMA, qui contient des anticorps dirigés contre les chaînes lourdes des IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM et IgA. Les plateaux d'ELISA doivent tout d'abord être incubés 12h à 4°C avec le surnageant des hybridomes contenant les anticorps monoclonaux. Par la suite, le protocole standard d'ELISA est appliqué.

2.5.2. Isotypage par IFI

Le milieu de culture des hybridomes contenant les anticorps monoclonaux a été utilisé pour réaliser des IFI sur des plateaux de cellules 293 transfectées avec le plasmide pCEP5-6H-ORF2 et fixées selon le protocole standard. Les anticorps monoclonaux ne sont cependant pas dilués. Des anticorps dirigés contre le chaîne lourde des IgG ou des IgM de souris et conjugués à la FITC sont utilisés comme 2^e anticorps pour chacun des anticorps monoclonaux.

2.5.3. Caractérisation par immunobuvardage de type Western

La réactivité des anticorps monoclonaux contre la protéine de la nucléocapside obtenue par transfection avec le plasmide pCEP5-6H-ORF2 et dénaturée par le SDS a été évaluée par la technique d'immunobuvardage de type Western. Des bandelettes de nitrocellulose portant la nucléocapside recombinante ont été obtenues par la technique décrite précédemment. Les bandelettes ont été incubées à 37°C pendant 1h avec le surnageant non dilué provenant des hybridomes en culture, et la révélation a été réalisée avec la technique standard.

3. Résultats

3.1. Réponse des souris à l'immunisation

Un échantillon de sérum sanguin de chacune des souris fut récolté environ une semaine après chacune des immunisations. Ces sérums ont été analysés par immunobuvardage de type Western sur des membranes de nitrocellulose portant la nucléocapside recombinante produite avec le plasmide pCEP5-6H-ORF2. La souris ayant le mieux réagit après la 6^e immunisation (figure 9) a été sacrifiée, et ses splénocytes ont été recueillis afin de produire les anticorps monoclonaux.

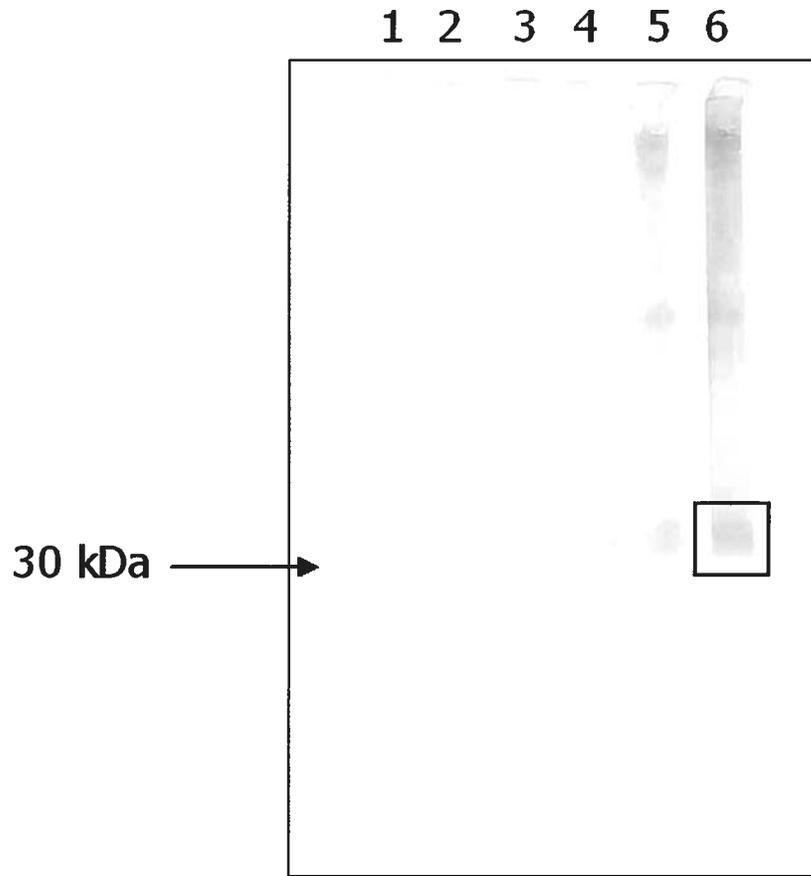


Figure 9: Réponse immunitaire de la souris no. 5 après chaque immunisation avec le CVP2.

3.2. Criblage des hybridomes

Après plusieurs étapes successives de criblage par ELISA, un total de six hybridomes stables producteurs d'anticorps contre le CVP2 ont été obtenus à partir des douze plateaux de 96 puits initiaux. Les hybridomes positifs ont été appelés 2d8-g4, 3f7-h10, 4e5-f5, 5a6-d10, 8d10-f6 et 9c5-c10.

3.3. Caractérisation des anticorps monoclonaux

Les anticorps produits par chacun des six hybridomes stables ont été isotypés par deux techniques distinctes : le kit d'isotypage par ELISA de la compagnie Sigma qui utilise des anticorps dirigés contre les chaînes lourdes des IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM et IgA (tableau II) et par IFI en utilisant des anticorps conjugués à la FITC dirigés contre les IgG ou IgM de porcs (figure 10). Chacun des anticorps a aussi été analysé par immunobuvardage de type Western sur une bande de nitrocellulose portant la nucléocapside virale recombinante (figure 11). Un second anticorps dirigé contre les IgG de porcs couplé à la peroxydase (POD) a été utilisé pour l'immunobuvardage mais cet anticorps était capable dans d'autres expériences de se lier aussi bien à des IgG, IgM ou IgA. Les résultats des deux tests d'isotypage concordent entre eux, et l'immunobuvardage a permis de déterminer quel type d'épitope était reconnu par chacun des anticorps. Les résultats des trois tests sont résumés dans le tableau III.

Tableau II: Isotypage des anticorps monoclonaux par ELISA.

Hybridome	Isotype
2d8-g4	IgM
3f7-h10	IgA
4e5-f5	IgM
5a6-d10	IgG1
8d10-f5	IgM
9c5-c10	IgM

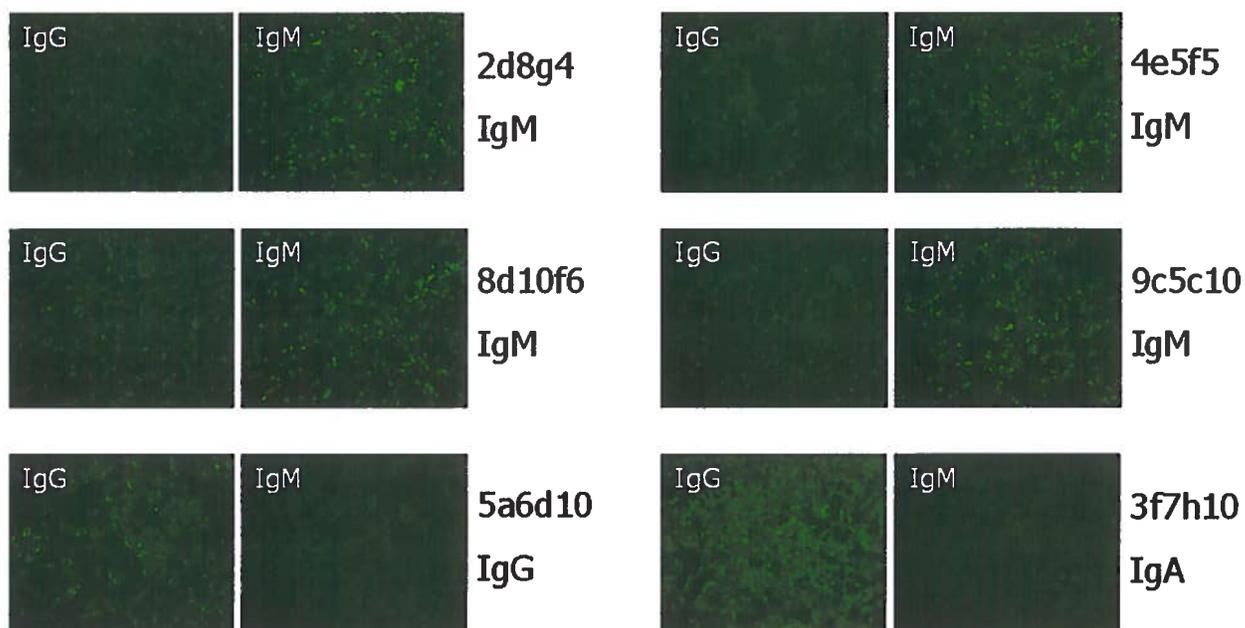


Figure 10: Isotypage des anticorps monoclonaux par IFI.

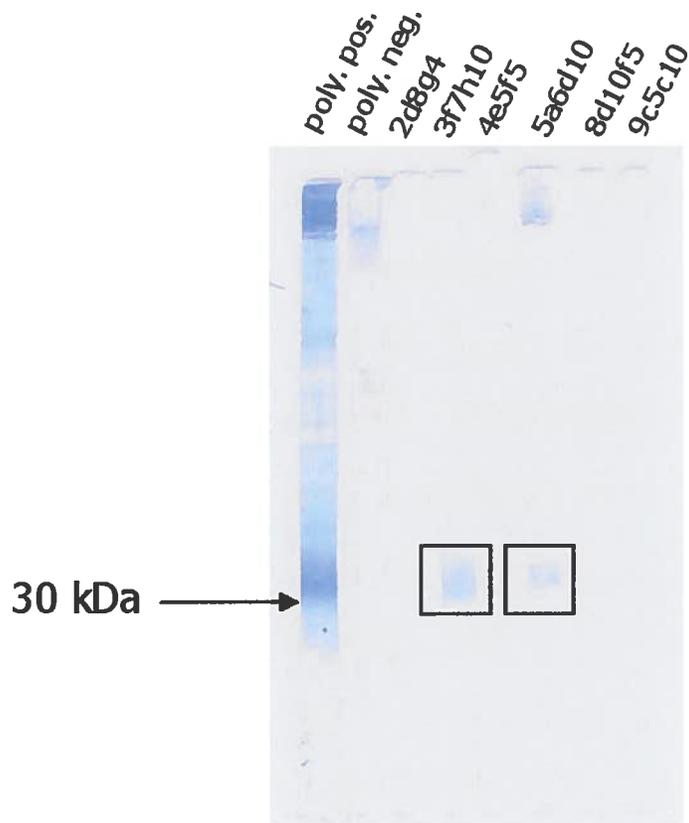


Figure 11: Caractérisation des anticorps mono. par immunobuvardage de type Western.

Tableau III: Caractérisation des anticorps monoclonaux.

Hybridome	Isotype	Épitope
2d8-g4	IgM	Conformationnel
3f7-h10	IgA	Linéaire
4e5-f5	IgM	Conformationnel
5a6-d10	IgG1	Linéaire
8d10-f5	IgM	Conformationnel
9c5-c10	IgM	Conformationnel

ANNEXE III : TOPOGRAPHIE DES ÉPITOPES DE LA NUCLÉOCAPSIDE

1. Introduction

Tel que mentionné en introduction, le but ultime de la recherche sur le CVP2 est la mise au point d'un vaccin recombinant permettant de protéger les porcelets contre l'infection par le virus et donc contre le SDMPs. La nucléocapside du virus codée par l'ORF2 a déjà été identifiée comme étant la protéine virale porteuse des principaux épitopes. Certaines études récentes sont aussi parvenues à isoler des épitopes spécifiques sur l'ORF2 (Mahe *et al.*, 2000; Truong *et al.*, 2001). Afin de parvenir à l'objectif d'identifier les épitopes particuliers de l'ORF2 qui seraient importants pour la réalisation éventuelle d'un vaccin, il est donc essentiel d'entamer une caractérisation plus fine de la structure de la nucléocapside. Pour ce faire, les propriétés structurales et antigéniques de la nucléocapside ont été analysées afin de diviser la séquence de l'ORF2 en trois fragments distincts qui furent clonés dans un vecteur d'expression eucaryote. La caractérisation de ces trois fragments se veut la première étape dans l'étude de la topographie antigénique de la molécule.

2. Matériel et méthodes

2.1. Étude de la structure et de l'immunogénicité théoriques de l'ORF2

Afin de cibler les parties potentiellement intéressantes de la protéine, la séquence d'aa de cette dernière a été analysée à l'aide du logiciel PLOTSTRUCTURE (Jameson et Wolf, 1988), qui fait partie de la suite de logiciels scientifiques GCG (Accelrys Inc.). Le potentiel hydrophile ou hydrophobe, ainsi que le potentiel antigénique des différents aa ont été analysés. À la suite de cette démarche, la protéine a été séparée en trois régions : N-terminale, Interne, C-terminale (figure 12).

2.2. Élaboration des amorces

Cinq nouvelles amorces ont été synthétisées afin de pouvoir amplifier les trois fragments cibles de l'ORF2, en se basant sur la séquence de l'isolat IAF2897 (Genbank no. AF408635). La stratégie de PCR employée fut la même que pour le clonage de l'ORF2 complet, et vise l'ajout d'un site de restriction *Bam*HI, d'une queue polyhistidine et d'un site entérokinase en 5', et l'ajout d'un autre site *Bam*HI et 3'. Un premier PCR utilisant l'amorce sens no. 1 ainsi que l'amorce anti-sens permet d'amplifier le fragment d'ORF2 à partir de l'ADN génomique viral. Le produit de PCR est par la suite récupéré et purifié à l'aide du Quiagen PCR purification kit. Un deuxième PCR utilisant l'amorce sens no. 2 ainsi que la même amorce anti-sens permet de compléter l'ajout du site de restriction *Bam*HI et de la queue polyhistidine à l'extrémité 5' de la molécule. La séquence des diverses amorces utilisées est détaillée au tableau IV.

2.3. Clonage des fragments de l'ORF2 dans pCEP5

Les produits de PCR finaux ont été récupérés, purifiés avec le Quiagen PCR purification kit, et analysés par migration sur gel d'agarose. Par la suite, les fragments ainsi que le plasmide pCEP5 ont été digérés avec l'enzyme *Bam*HI pendant 2h à 37°C. L'enzyme a subséquentement été inactivée par incubation pendant 20 minutes à 65°C. Chacun des trois fragments digérés a été ligué dans le plasmide pCEP5 digéré par incubation avec la T4 DNA ligase pendant 12h à 14°C. L'ADN ligué a servi à transformer des bactéries *E. coli* DH5 α qui ont été étalées sur des pétris d'agar 2xYT contenant de l'ampicilline, et qui furent incubés à 37°C. Les colonies ont par la suite été criblées par PCR et par digestion avec des enzymes de restriction. Le sens de l'insert a aussi été confirmé par digestion avec des enzymes de restriction. Finalement, chacun des nouveaux plasmides a été séquencé pour vérifier si des erreurs ont été introduites dans la séquence.

2.4. Expression des plasmides contenant les fragments de l'ORF2

Les plasmides contenant les fragments de séquence de l'ORF2 ont été utilisés pour transférer des cellules HEK 293 avec le PEI tel que décrit précédemment pour le plasmide pCEP5-6H-ORF2.

1034		ttaggg	ttaagtggg	ggtctttaag	attaaattct	ctgaattgta	
1081	catacatgg	tacacggata	ttgtagtcct	ggtcgtattt	actgttttcg	aacgcagtgc	
1141	cgaggcctac	gtggtccaca	tttctagagg	ttttagcct	cagccaaagc	tgattccttt	
1201	tgttatttg	ttggaagtaa	tcaatagtgg	agtcaagaac	aggtttgggt	gtgaagtaac	
1261	gggagtggta	ggagaagggt	tgggggattg	tatggcggga	ggagtagttt	acatatgggt	
1321	cataggttag	ggctgtggcc	tttgttacia	agttatcatc	tagaataaca	gcagtggagc	
1381	ccactcccct	atcgccctgg	gtgatggggg	agcagggcca	gaattcaacc	ttaacctttc	
1441	ttattctgta	gtattcaaag	ggtagagaga	ttttgttgg	ccccctccc	gggggaacaa	
1501	agtcgtcaag	tgtaaatttc	atcatgtcca	ctgccagga	gggcgttctg	actgtggtag	
1561	ccttgacagt	atatccgaag	gtgcgggaga	ggcgggtgtt	gaagatgcca	tttttccttc	
1621	tccaacggta	gcggtggcgg	gggtggacga	gccagggcg	gcggcggagg	atctggccaa	
1681	gatggctgcg	ggggcgggtg	cttcttctgc	ggtaacgcct	ccttggatac	gtcat 1735	Fragment N-terminal
1034		ttaggg	ttaagtggg	ggtctttaag	attaaattct	ctgaattgta	
1081	catacatgg	tacacggata	ttgtagtcct	ggtcgtattt	actgttttcg	aacgcagtgc	
1141	cgaggcctac	gtggtccaca	tttctagagg	ttttagcct	cagccaaagc	tgattccttt	
1201	tgttatttg	ttggaagtaa	tcaatagtgg	agtcaagaac	aggtttgggt	gtgaagtaac	
1261	gggagtggta	ggagaagggt	tgggggattg	tatggcggga	ggagtagttt	acatatgggt	
1321	cataggttag	ggctgtggcc	tttgttacia	agttatcatc	tagaataaca	gcagtggagc	
1381	ccactcccct	atcgccctgg	gtgatggggg	agcagggcca	gaattcaacc	ttaacctttc	
1441	ttattctgta	gtattcaaag	ggtagagaga	ttttgttgg	ccccctccc	gggggaacaa	
1501	agtcgtcaag	tgtaaatttc	atcatgtcca	ctgccagga	gggcgttctg	actgtggtag	
1561	ccttgacagt	atatccgaag	gtgcgggaga	ggcgggtgtt	gaagatgcca	tttttccttc	
1621	tccaacggta	gcggtggcgg	gggtggacga	gccagggcg	gcggcggagg	atctggccaa	
1681	gatggctgcg	ggggcgggtg	cttcttctgc	ggtaacgcct	ccttggatac	gtcat 1735	Fragment Inteme
1034		ttaggg	ttaagtggg	ggtctttaag	attaaattct	ctgaattgta	
1081	catacatgg	tacacggata	ttgtagtcct	ggtcgtattt	actgttttcg	aacgcagtgc	
1141	cgaggcctac	gtggtccaca	tttctagagg	ttttagcct	cagccaaagc	tgattccttt	
1201	tgttatttg	ttggaagtaa	tcaatagtgg	agtcaagaac	aggtttgggt	gtgaagtaac	
1261	gggagtggta	ggagaagggt	tgggggattg	tatggcggga	ggagtagttt	acatatgggt	
1321	cataggttag	ggctgtggcc	tttgttacia	agttatcatc	tagaataaca	gcagtggagc	
1381	ccactcccct	atcgccctgg	gtgatggggg	agcagggcca	gaattcaacc	ttaacctttc	
1441	ttattctgta	gtattcaaag	ggtagagaga	ttttgttgg	ccccctccc	gggggaacaa	
1501	agtcgtcaag	tgtaaatttc	atcatgtcca	ctgccagga	gggcgttctg	actgtggtag	
1561	ccttgacagt	atatccgaag	gtgcgggaga	ggcgggtgtt	gaagatgcca	tttttccttc	
1621	tccaacggta	gcggtggcgg	gggtggacga	gccagggcg	gcggcggagg	atctggccaa	
1681	gatggctgcg	ggggcgggtg	cttcttctgc	ggtaacgcct	ccttggatac	gtcat 1735	Fragment C-terminal

Figure 12: Disposition des fragments de l'ORF2 à amplifier.

Tableau IV: Amorces utilisées pour l'amplification des fragments de l'ORF2.

Amorce	Sens ^a	Séquence	Taille (nt)
6H-F2 no. 1	F	5'- <u>ACC ATC AC</u> G GTG ACG ATA AGG ATA <i>TGA CGT ATC CAA GGA GGC G-3'</i>	43
F2-N1-R	R	5'-CGC <u>CGC GGA TCC GCG</u> CCC AAG CTT <i>GGG TTA GGG CGT TCT GAC TGT GGT A-3'</i>	49
F2-I1-F	F	5'- <u>ACC ATC AC</u> G GTG ACG ATA AGG ATG <i>CTA CCA CAG TCA GAA CGC C-3'</i>	43
F2-I1-R	R	5'-CGC <u>CGC GGA TCC GCG</u> CCC AAG CTT <i>GGG TTA GGA GTA GTT TAC ATA TGG GT-3'</i>	50
F2-C1-F	F	5'- <u>ACC ATC AC</u> G GTG ACG ATA AGG ATG <i>ACC CAT ATG TAA ACT ACT C-3'</i>	43
F2-C1-R	R	5'-CGC <u>CGC GGA TCC GCG</u> CCC AAG CTT <i>GGG TTA GGG TTT AAG TGG GGG GT-3'</i>	47
6H-F2 no. 2	F	5'-CGC GGA TCC GCG ATG <u>CAT CAC CAT</u> <u>CAC CAT CAC</u> GGT GAC GAT GAC GA-3'	47

^a F : sens positif, R : sens inverse ; sites *Bam*HI soulignés ; queue polyhistidine dans une boîte ; site entérokinase en gras ; sites de liaison à la séquence de l'ORF2 en italique

3. Résultats

3.1. Structure et immunogénicité de l'ORF2

L'analyse de la séquence de l'ORF2 à l'aide du logiciel PLOTSTRUCTURE a révélé la présence de nombreuses régions hydrophiles, situées principalement dans les régions C-terminale et N-terminale de la protéine . Une seule région hydrophobe est localisée dans la région interne de la protéine (figure 13). Plusieurs aa ayant un potentiel antigénique très élevé sont groupés dans les régions C-terminales et N-terminales de la séquence de la nucléocapside, tandis que moins de sites potentiellement antigéniques sont situés dans la région interne (figure 14).

3.2. Expression des fragments d'ORF2 par transfection

Les plasmides pCEP5 contenant les fragments C-terminal, Interne et N-terminal ont été utilisés pour transfecter des cellules de type 293 selon le même protocole que pour les transfections avec le plasmide pCEP5-6H-ORF2. Les transfections avec le plasmide portant le fragment C-terminal (figure 15) ont produit un patron de fluorescence très particulier, distinct de la fluorescence nucléaire et péri-nucléaire observée avec l'ORF2 complet. La fluorescence se retrouve donc uniquement dans le cytoplasme des cellules transfectées, et a l'aspect d'un nuage de petits points très rapprochés. Les transfections avec les plasmides portant des fragments Interne et N-terminal n'ont pas engendré de fluorescence, et la présence des fragments de la nucléocapside n'a pas pu être confirmée.

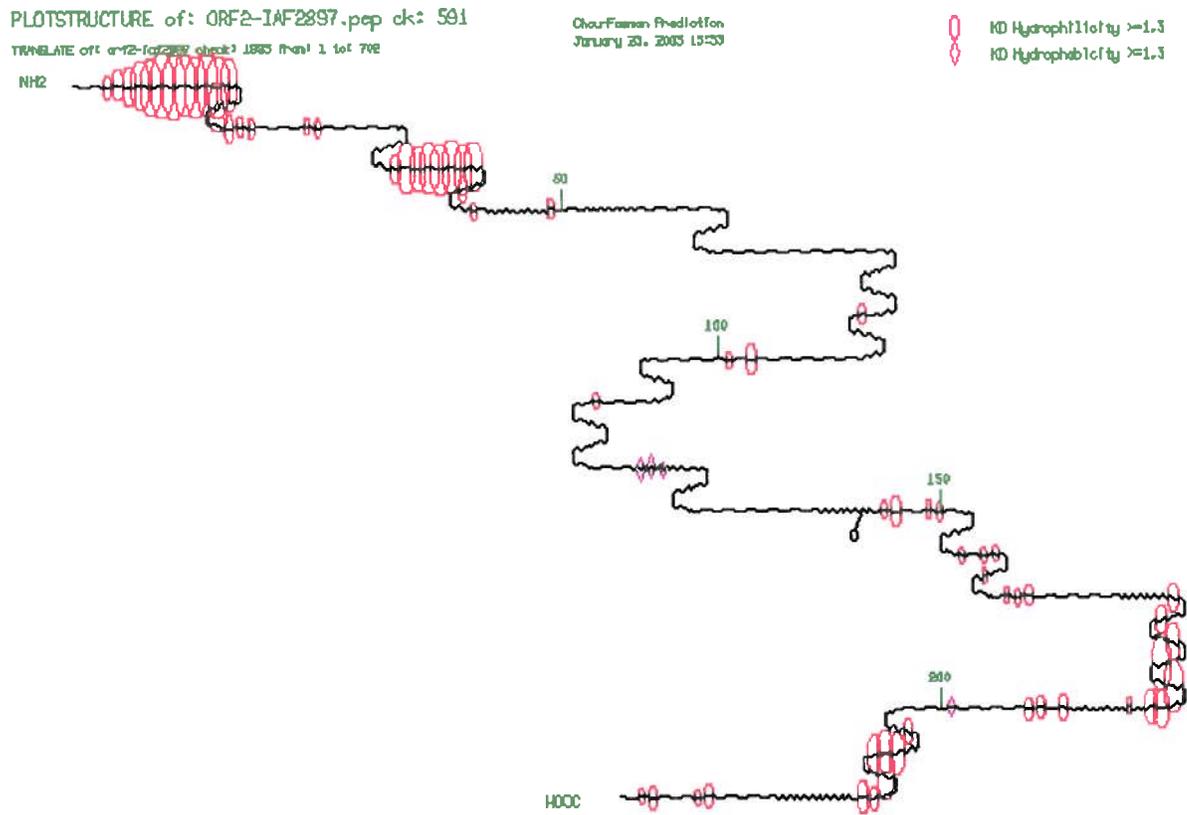


Figure 13: Analyse du potentiel hydrophile/hydrophobe de la nucléocapside du CVP2. La figure a été produite à l'aide du logiciel PLOTSTRUCTURE (Jameson et Wolf, 1988).

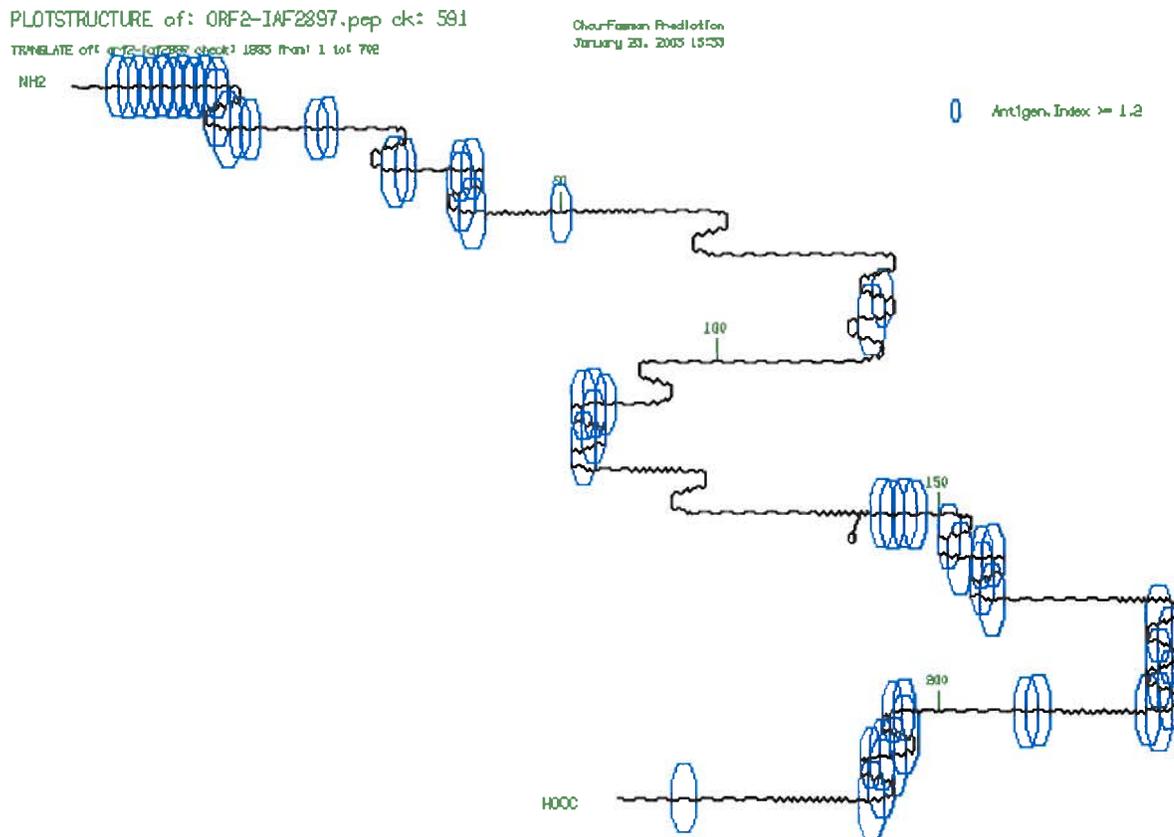


Figure 14: Analyse du potentiel antigénique de la nucléocapside du CVP2. La figure a été produite à l'aide du logiciel PLOTSTRUCTURE (Jameson et Wolf, 1988).

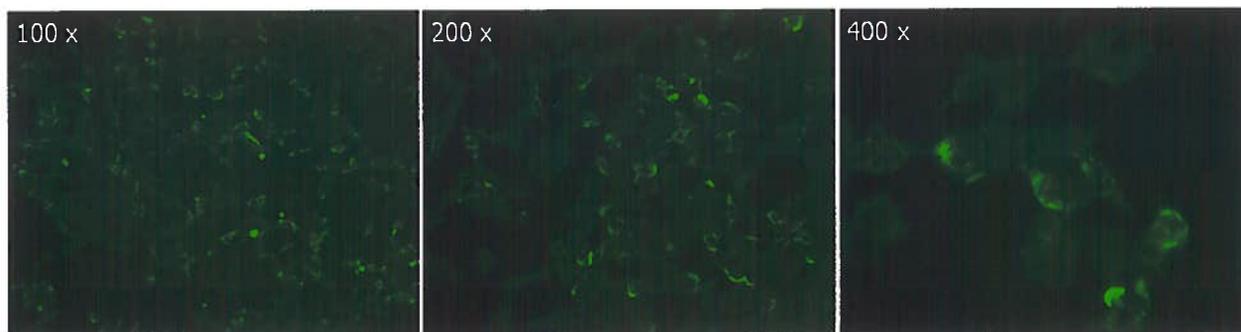


Figure 15: Expression du fragment C-terminal de l'ORF2 par transfection.

ANNEXE IV : LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

1. Communications scientifiques

- 1) Charbonneau, B., **S. Racine**, A. Kheyar, S. Dea and Y. St-Pierre. Evaluation of the expression of the porcine circovirus type 2 (PCV2) ORF2 from an inducible human recombinant adenovirus type 5. The 83nd Annual Meeting of the Conference for Research Workers in Animal Diseases, CRWAD (Chicago, IL). November 2003. Poster presentation.
- 2) **Racine, S.**, A. Kheyar, B. Charbonneau, C. Gagnon and S. Dea. Early detection of Porcine Circovirus type 2 infection in pigs using recombinant nucleocapsid protein in an indirect immunofluorescence assay. Annual Conference of the Canadian Society of Microbiologists (Laval, QC). May 2003. Poster presentation.
- 3) **Racine, S.**, A. Kheyar, B. Charbonneau and S. Dea. Eucaryotic expression of the nucleocapsid (NC) protein gene of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) and use of transfected human 293 cells in an indirect immunofluorescence assay (IIF) for serological diagnosis. The 82nd Annual Meeting of the Conference for Research Workers in Animal Diseases, CRWAD (St-Louis, MO). November 2002. Poster presentation.
- 4) **Racine, S.**, M. Ouardani, A. Kheyar et S. Dea. Utilisation d'un adénovirus recombinant portant l'ORF2 du circovirus porcin de type 2 (CVP2) comme outil de diagnostic pour la production des stocks de nucléoprotéine du virus. 2^e Congrès INRS-Institut Armand-Frappier (Ste-Adèle, QC). Présentation en affiche. Novembre 2000. (Troisième prix, meilleure communication étudiante)

2. Publication scientifique

- 1) **Racine, S.**, A. Kheyar and S. Dea. Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of PMWS in pigs. Clin Diagn Lab Immunol. (article accepté, en cours de publication)

BIBLIOGRAPHIE

- Albina E., C. Truong, E. Hutet, P. Blanchard, R. Cariolet, R. L'Hospitalier, D. Mahe, C. Allee, H. Morvan, N. Amenna, M. Le Dimna, F. Madec et A. Jestin (2001). An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J Comp Pathol* 125: 292-303.
- Allan G. M., D. P. Mackie, J. McNair, B. M. Adair et M. S. McNulty (1994a). Production, preliminary characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 357-371.
- Allan G. M., F. McNeilly, J. C. Foster et B. M. Adair (1994b). Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. *Vet Microbiol* 41: 267-279.
- Allan G. M., K. V. Phenix, D. Todd et M. S. McNulty (1994c). Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 41: 17-26.
- Allan G. M., F. McNeilly, J. P. Cassidy, G. A. Reilly, B. Adair, W. A. Ellis et M. S. McNulty (1995). Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol* 44: 49-64.
- Allan G. M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Daft, E. G. Clarke, J. A. Ellis, D. M. Haines, B. M. Meehan et B. M. Adair (1998a). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10: 3-10.
- Allan G. M., B. Meehan, D. Todd, S. Kennedy, F. McNeilly, J. Ellis, E. G. Clark, J. Harding, E. Espuna, A. Botner et C. Charreyre (1998b). Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* 142: 467-468.
- Allan G. M., S. Kennedy, F. McNeilly, J. C. Foster, J. A. Ellis, S. J. Krakowka, B. M. Meehan et B. M. Adair (1999a). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121: 1-11.
- Allan G. M., F. McNeilly, B. M. Meehan, S. Kennedy, D. P. Mackie, J. A. Ellis, E. G. Clark, E. Espuna, N. Saubi, P. Riera, A. Botner et C. E. Charreyre (1999b). Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol* 66: 115-123.
- Allan G. M. et J. A. Ellis (2000). Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12: 3-14.

- Allan G. M., E. McNeilly, S. Kennedy, B. Meehan, D. Moffett, F. Malone, J. Ellis et S. Krakowka (2000a). PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146: 711-712.
- Allan G. M., F. McNeilly, J. Ellis, S. Krakowka, B. Meehan, I. McNair, I. Walker et S. Kennedy (2000b). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* 145: 2421-2429.
- Allan G. M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Meehan, J. Ellis et S. Krakowka (2000c). Immunostimulation, PCV-2 and PMWS. *Vet Rec* 147: 170-171.
- Allan G. M., F. McNeilly, I. McNair, M. D. Curran, I. Walker, J. Ellis, C. Konoby, S. Kennedy et B. Meehan (2000d). Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Arch Virol* 145: 853-857.
- Allan G. M., F. McNeilly, B. M. Meehan, J. A. Ellis, T. J. Connor, I. McNair, S. Krakowka et S. Kennedy (2000e). A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 81-94.
- Allan G. M., F. McNeilly, I. McNair, M. O'Connor, B. Meehan, D. Gilpin, J. Ellis, H. Townsend, C. Lasagna, G. Boriosi et S. Krakowka (2001). Neonatal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae* and post-weaning multisystemic wasting syndrome: a field trial. *Pig Journal*: 34-41.
- Allan G. M., F. McNeilly, B. Meehan, S. Kennedy, D. Johnston, J. Ellis, S. Krakowka, C. Fossum, E. Watrang et P. Wallgren (2002). Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV-2. *Vet Rec* 150: 255-256.
- Balasz M., J. Segalés, C. Rosell, M. Domingo, A. Mankertz, A. Urniza et J. Plana-Duran (1999). Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121: 139-148.
- Bassaganya-Riera J., R. M. Pogranichniy, S. C. Jobgen, P. G. Halbur, K. J. Yoon, M. O'Shea, I. Mohede et R. Hontecillas (2003). Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression. *J Nutr* 133: 3204-3214.
- Bassami M. R., I. Ypelaar, D. Berryman, G. E. Wilcox et S. R. Raidal (2001). Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. *Virology* 279: 392-400.
- Bandinelli M., M. Pistello, F. Maggi, C. Fornai, G. Freer et M. L. Vatteroni (2001). Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* 14: 98-113.

- Blanchard P. (2002). Études des propriétés antigéniques et immunogènes de la protéine de la capsid (ORF2) du Circovirus Porcin de type 2 : Application au diagnostic et à la vaccination. École pratique des hautes études, 65 p.
- Blanchard P., D. Mahe, R. Cariolet, A. Keranflec'h, M. A. Baudouard, P. Cordioli, E. Albina et A. Jestin (2003a). Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21: 4565-4575.
- Blanchard P., D. Mahe, R. Cariolet, C. Truong, M. Le Dimna, C. Arnauld, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec et A. Jestin (2003b). An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol* 94: 183-194.
- Boevink P., P. W. Chu et P. Keese (1995). Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: affinities with the geminiviruses. *Virology* 207: 354-361.
- Bogdan J., K. West, E. Clark, C. Konoby, D. Haines, G. Allan, F. McNeilly, B. Meehan, S. Krakowka et J. A. Ellis (2001). Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Can Vet J* 42: 548-550.
- Bolin S. R. (1992). Congenital tremors virus. dans *Diseases of swine*, 7e ed, pp. 247-249. Édité par A. D. Leman, B. E. Straw et W. L. Mengeling. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Bolin S. R., W. C. Stoffregen, G. P. Nayar et A. L. Hamel (2001). Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 13: 185-194.
- Burns T. M., R. M. Harding et J. L. Dale (1995). The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components. *J Gen Virol* 76 (Pt 6): 1471-1482.
- Calsamiglia M., J. Segalés, J. Quintana, C. Rosell et M. Domingo (2002). Detection of Porcine Circovirus Types 1 and 2 in Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *J Clin Microbiol* 40: 1848-1850.
- Carrasco L., J. Segalés, M. J. Bautista, J. C. Gomez-Villamandos, C. Rosell, E. Ruiz-Villamor et M. A. Sierra (2000). Intestinal chlamydial infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Rec* 1: 21-23.
- Cheung A. K. et S. R. Bolin (2002). Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Arch Virol* 147: 43-58.

- Cheung A. K. (2003). Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology* 305: 168-180.
- Chianini F., N. Majo, J. Segalés, J. Dominguez et M. Domingo (2003). Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 94: 63-75.
- Choi C. et C. Chae (1999). In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121: 265-270.
- Choi C. et C. Chae (2000). Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J Comp Pathol* 123: 302-305.
- Choi C., C. Chae et E. G. Clark (2000). Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 12: 151-153.
- Choi C. et C. Chae (2001). Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. *Vet Pathol* 38: 436-441.
- Choi J., G. W. Stevenson, M. Kiupel, B. Harrach, L. Anothayanontha, C. L. Kanitz et S. K. Mittal (2002). Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 66: 217-224.
- Clark E. (1997). Post-weaning multisystemic syndrome. *Proc Am Assoc Swine Prac* 28: 499-501.
- Corrégé I., D. Pirouelle, D. Gaudré et L. M. H. (2001). La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP): Influence de différents paramètres zootechniques sur son incidence dans un élevage expérimental. *Journées de la Recherche Porcine en France*: 283-290.
- Darwich L., J. Segalés, M. Domingo et E. Mateu (2002). Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and Immunoglobulin M-Positive Peripheral Blood Mononuclear Cells of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome-Affected Pigs and Age-Matched Uninfected Wasted and Healthy Pigs Correlate with Lesions and Porcine Circovirus Type 2 Load in Lymphoid Tissues. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 236-242.

- Drolet R., S. Thibault, S. D'Allaire, J. R. Thomson et S. H. Done (1999). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. *Swine Health Production*: 283-285.
- Drolet R., R. Larochelle, M. Morin, B. Delisle et R. Magar (2003). Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and Swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet Pathol* 40: 143-148.
- Dulac G. C. et A. Afshar (1989). Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res* 53: 431-433.
- Durocher Y., S. Perret et A. Kamen (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* 30: E9.
- Edwards S. et J. J. Sands (1994). Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec* 134: 680-681.
- Ellis J., L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Willson, J. Strokappe, K. Martin, F. McNeilly, B. Meehan, D. Todd et D. Haines (1998). Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 39: 44-51.
- Ellis J., S. Krakowka, M. Lairmore, D. Haines, A. Bratanich, E. Clark, G. Allan, C. Konoby, L. Hassard, B. Meehan, K. Martin, J. Harding, S. Kennedy et F. McNeilly (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest* 11: 3-14.
- Ellis J. A., A. Bratanich, E. G. Clark, G. Allan, B. Meehan, D. M. Haines, J. Harding, K. H. West, S. Krakowka, C. Konoby, L. Hassard, K. Martin et F. McNeilly (2000a). Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 12: 21-27.
- Ellis J. A., B. M. Wiseman, G. Allan, C. Konoby, S. Krakowka, B. M. Meehan et F. McNeilly (2000b). Analysis of seroconversion to porcine circovirus 2 among veterinarians from the United States and Canada. *J Am Vet Med Assoc* 217: 1645-1646.
- Ellis J. A., C. Konoby, K. H. West, G. M. Allan, S. Krakowka, F. McNeilly, B. Meehan et I. Walker (2001). Lack of antibodies to porcine circovirus type 2 virus in beef and dairy cattle and horses in western Canada. *Can Vet J* 42: 461-464.
- Farnham M. W., Y. K. Choi, S. M. Goyal et H. S. Joo (2003). Isolation and characterization of porcine circovirus type-2 from sera of stillborn fetuses. *Can J Vet Res* 67: 108-113.

- Fenaux M., P. G. Halbur, M. Gill, T. E. Toth et X. J. Meng (2000). Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR- restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 38: 2494-2503.
- Fenaux M., P. G. Halbur, G. Haqshenas, R. Royer, P. Thomas, P. Nawagitgul, M. Gill, T. E. Toth et X. J. Meng (2002). Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol* 76: 541-551.
- Fenaux M., T. Opriessnig, P. G. Halbur et X. J. Meng (2003). Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol* 77: 11232-11243.
- Ferreira D., B. Sansot et A. Laval (2001). " Attempt to use serotherapy to control mortality in PMWS ". Dans *Proceedings of the ssDNA Viruses of Plants, Pigs and Primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome*, pp. 34: European Society of Veterinary Virology.
- Gibbs M. J. et G. F. Weiller (1999). Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8022-8027.
- Hamel A. L., L. L. Lin et G. P. Nayar (1998). Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 72: 5262-5267.
- Harding J. (1997). Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc Am Assoc Swine Prac* 28: 503.
- Harding R. M., T. M. Burns et J. L. Dale (1991). Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. *J Gen Virol* 72 (Pt 2): 225-230.
- Harms P. A., S. D. Sorden, P. G. Halbur, S. R. Bolin, K. M. Lager, I. Morozov et P. S. Paul (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 38: 528-539.
- Hijikata M., K. Takahashi et S. Mishiro (1999). Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 260: 17-22.

- Hino S. (2002). TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol* 12: 151-158.
- Hsu H. Y., Y. H. Ni, H. L. Chen, J. H. Kao et M. H. Chang (2003). TT virus infection in healthy children, children after blood transfusion, and children with non-A to E hepatitis or other liver diseases in Taiwan. *J Med Virol* 69: 66-71.
- Illanes O., A. Lopez, L. Miller, J. McLearn, C. Yason, D. Wadowska et J. Martinez (2000). Lesions associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs from Prince Edward Island, Canada. *J Vet Diagn Invest* 12: 146-150.
- Jameson B. A. et H. Wolf (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci* 4: 181-186.
- Jestin A., D. Mahe, P. Blanchard, M. Le Dimma, R. Cariolet, C. Truong, A. Keranflec'h, F. Madec et E. Albina (2001). Protection of swine from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) conferred by porcine circovirus type 2 (PCV2) ORF2 protein. dans *Proceedings of the ssDNA Viruses of Plants, Pigs and Primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome*, pp. 139: European Society of Veterinary Virology.
- Johnson C. S., H. S. Joo, K. Direksin, K. J. Yoon et Y. K. Choi (2002). Experimental *in utero* inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 14: 507-512.
- Katul L., E. Maiss, S. Y. Morozov et H. J. Vetten (1997). Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. *Virology* 233: 247-259.
- Kennedy S., D. Moffett, F. McNeilly, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka et G. M. Allan (2000). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 122: 9-24.
- Kennedy S., J. Segalés, A. Rovira, S. Scholes, M. Domingo, D. Moffett, B. Meehan, R. O'Neill, F. McNeilly et G. Allan (2003). Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 15: 151-156.
- Kiatipattanasakul-Banlunara W., R. Tantilertcharoen, K. Suzuki, S. M. Albarenque, R. Thanawongnuwech, H. Nakayama et K. Doi (2002). Detection of porcine circovirus 2 (PCV-2) DNA by nested PCR from formalin-fixed tissues of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. *J Vet Med Sci* 64: 449-452.
- Kim J. et C. Chae (2001). Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridisation. *Res Vet Sci* 70: 265-269.

- Kim J., C. Choi, D. U. Han et C. Chae (2001a). Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. *Vet Rec* 149: 304-305.
- Kim J., D. U. Han, C. Choi et C. Chae (2001b). Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 98: 25-31.
- Kim J. et C. Chae (2002a). Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in naturally and experimentally coinfecting pigs by double in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest* 14: 236-240.
- Kim J. et C. Chae (2002b). Double in situ hybridization for simultaneous detection and differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet J* 164: 247-253.
- Kim J., H. K. Chung, T. Jung, W. S. Cho, C. Choi et C. Chae (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *J Vet Med Sci* 64: 57-62.
- Kim J. et C. Chae (2003a). A Comparison of the Lymphocyte Subpopulations of Pigs Experimentally Infected with Porcine Circovirus 2 and/or Parvovirus. *Vet J* 165: 325-329.
- Kim J. et C. Chae (2003b). Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 67: 133-137.
- Kim J., C. Choi et C. Chae (2003). Pathogenesis of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Reproduced by Co-infection with Korean Isolates of Porcine Circovirus 2 and Porcine Parvovirus. *J Comp Pathol* 128: 52-59.
- Kiupel M., G. W. Stevenson, S. K. Mittal, E. G. Clark et D. M. Haines (1998). Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet Pathol* 35: 303-307.
- Kiupel M., G. W. Stevenson, J. Choi, K. S. Latimer, C. L. Kanitz et S. K. Mittal (2001). Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. *Vet Pathol* 38: 74-82.
- Krakowka S., J. A. Ellis, B. Meehan, S. Kennedy, F. McNeilly et G. Allan (2000). Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 37: 254-263.

- Krakovka S., J. A. Ellis, F. McNeilly, S. Ringler, D. M. Rings et G. Allan (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 38: 31-42.
- Krakovka S., J. A. Ellis, F. McNeilly, D. Gilpin, B. Meehan, K. McCullough et G. Allan (2002). Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol* 15: 567-582.
- Kyriakis S. C., K. Saoulidis, S. Lekkas, C. Miliotis Ch, P. A. Papoutsis et S. Kennedy (2002). The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 126: 38-46.
- Labarque G. G., H. J. Nauwynck, A. P. Mesu et M. B. Pensaert (2000). Seroprevalence of porcine circovirus types 1 and 2 in the Belgian pig population. *Vet Q* 22: 234-236.
- Ladekjaer-Mikkelsen A., J. Nielsen, T. Stadejek, T. Storgaard, S. Krakowka, J. Ellis, F. McNeilly, G. Allan et A. Botner (2002). Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol* 89: 97.
- Ladekjaer-Mikkelsen A. S., J. Nielsen, T. Storgaard, A. Botner, G. Allan et F. McNeilly (2001). Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet Rec* 148: 759-760.
- Larochelle R., M. Antaya, M. Morin et R. Magar (1999a). Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods* 80: 69-75.
- Larochelle R., M. Morin, M. Antaya et R. Magar (1999b). Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR. *Vet Rec* 145: 140-142.
- Larochelle R., R. Magar et S. D'Allaire (2003). Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 67: 114-120.
- LeCann P., E. Albina, F. Madec, R. Cariolet et A. Jestin (1997). Piglet wasting disease. *Vet Rec* 141: 660.
- Liu Q., L. Wang, P. Willson et L. A. Babiuk (2000). Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 38: 3474-3477.
- Liu Q., S. K. Tikoo et L. A. Babiuk (2001a). Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285: 91-99.

- Liu Q., P. Willson, S. Attoh-Poku et L. A. Babiuk (2001b). Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expr Purif* 21: 115-120.
- Liu Q., L. Wang, P. Willson, B. O'Connor, J. Keenlside, M. Chirino-Trejo, R. Melendez et L. Babiuk (2002). Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica. *Can J Vet Res* 66: 225-231.
- Lukert P. D., G. F. de Boer, J. L. Dale, P. Keese, M. S. McNulty, J. W. Randles et I. Tischer (1995). The *Circoviridae*. dans *Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 166-168. Édité par F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martinelli, M. A. Mayo et M. D. Summers. Vienna & New York: Springer-Verlag.
- Madec F., E. Eveno, P. Morvan, L. Hamon, H. Morvan, E. Albina, C. Truong, E. Hutet, R. Cariolet, C. Arnauld et A. Jestin (1999). La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP) en France: 1 - Aspects descriptifs, impact en élevage. *Journées de la Recherche Porcine en France*: 347-354.
- Madec F., E. Eveno, P. Morvan, L. Hamon, P. Blanchard, R. Cariolet, N. Amenna, H. Morvan, C. Truong, D. Mahe, E. Albina et A. Jestin (2000). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science* 63: 223-233.
- Magar R., R. Larochelle, S. Thibault et L. Lamontagne (2000). Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *J Comp Pathol* 123: 258-269.
- Mahe D., P. Blanchard, C. Truong, C. Arnauld, P. Le Cann, R. Cariolet, F. Madec, E. Albina et A. Jestin (2000). Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 81: 1815-1824.
- Mahe D., C. Truong, M. Le Dimma et F. Madec (2001). Capsid protein as a relevant antigen for the detection of porcine circovirus type 2 antibodies. dans *Proceedings of the ssDNA Viruses of Plants, Pigs and Primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome*: European Society of Veterinary Virology.
- Mankertz A., F. Persson, J. Mankertz, G. Blaess et H. J. Buhk (1997). Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 71: 2562-2566.
- Mankertz A., J. Mankertz, K. Wolf et H. J. Buhk (1998a). Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol* 79: 381-384.

- Mankertz A., M. Domingo, J. M. Folch, P. LeCann, A. Jestin, J. Segalés, B. Chmielewicz, J. Plana-Duran et D. Soike (2000a). Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res* 66: 65-77.
- Mankertz A., K. Hattermann, B. Ehlers et D. Soike (2000b). Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Arch Virol* 145: 2469-2479.
- Mankertz A. et B. Hillenbrand (2001). Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology* 279: 429-438.
- Mankertz A. et B. Hillenbrand (2002). Analysis of transcription of Porcine circovirus type 1. *J Gen Virol* 83: 2743-2751.
- Mankertz A., B. Mueller, T. Steinfeldt, C. Schmitt et T. Finsterbusch (2003). New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *J Virol* 77: 9885-9893.
- Mankertz J., H. J. Buhk, G. Blaess et A. Mankertz (1998b). Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes* 16: 267-276.
- Mayo M. A. (2002). Virus taxonomy - Houston 2002. *Arch Virol* 147: 1071-1076.
- McNeilly F., S. Kennedy, D. Moffett, B. M. Meehan, J. C. Foster, E. G. Clarke, J. A. Ellis, D. M. Haines, B. M. Adair et G. M. Allan (1999). A comparison of *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods* 80: 123-128.
- McNeilly F., I. McNair, D. P. Mackie, B. M. Meehan, S. Kennedy, D. Moffett, J. Ellis, S. Krakowka et G. M. Allan (2001). Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch Virol* 146: 909-922.
- McNeilly F., I. McNair, M. O'Connor, S. Brockbank, D. Gilpin, C. Lasagna, G. Boriosi, B. Meehan, J. Ellis, S. Krakowka et G. M. Allan (2002). Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 14: 106-112.
- McNulty M. S., S. G. McIlroy, D. W. Bruce et D. Todd (1991). Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Dis* 35: 263-268.
- Meehan B. M., J. L. Creelan, M. S. McNulty et D. Todd (1997). Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* 78: 221-227.

- Meehan B. M., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V. A. Jewhurst, J. A. Ellis, L. E. Hassard, E. G. Clark, D. M. Haines et G. M. Allan (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79: 2171-2179.
- Meehan B. M., F. McNeilly, I. McNair, I. Walker, J. A. Ellis, S. Krakowka et G. M. Allan (2001). Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch Virol* 146: 835-842.
- Merits A., O. N. Fedorkin, D. Guo, N. O. Kalinina et S. Y. Morozov (2000). Activities associated with the putative replication initiation protein of coconut foliar decay virus, a tentative member of the genus Nanovirus. *J Gen Virol* 81: 3099-3106.
- Mori M., K. Sato, S. Akachi, S. Asahi, S. Taniguchi et M. Narita (2000). Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. *Vet Pathol* 37: 667-669.
- Morozov I., T. Sirinarumitr, S. D. Sorden, P. G. Halbur, M. K. Morgan, K. J. Yoon et P. S. Paul (1998). Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36: 2535-2541.
- Naoumov N. V., E. P. Petrova, M. G. Thomas et R. Williams (1998). Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 352: 195-197.
- Nawagitgul P., I. Morozov, S. R. Bolin, P. A. Harms, S. D. Sorden et P. S. Paul (2000). Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81 Pt 9: 2281-2287.
- Nawagitgul P., P. A. Harms, I. Morozov, B. J. Thacker, S. D. Sorden, C. Lekcharoensuk et P. S. Paul (2002). Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 33-40.
- Nayar G. P., A. Hamel et L. Lin (1997). Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet J* 38: 385-386.
- Niagro F. D., A. N. Forsthoefel, R. P. Lawther, L. Kamalanathan, B. W. Ritchie, K. S. Latimer et P. D. Lukert (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol* 143: 1723-1744.
- Nielsen J., I. E. Vincent, A. Botner, A. Ladekjaer-Mikkelsen, G. Allan, A. Summerfield et K. C. McCullough (2003). Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 92: 97-111.

- Nishizawa T., H. Okamoto, K. Konishi, H. Yoshizawa, Y. Miyakawa et M. Mayumi (1997). A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 92-97.
- Noteborn M. H., G. F. de Boer, D. J. van Roozelaar, C. Karreman, O. Kranenburg, J. G. Vos, S. H. Jeurissen, R. C. Hoeben, A. Zantema, G. Koch et et al. (1991). Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol* 65: 3131-3139.
- Nunez A., F. McNeilly, A. Perea, P. J. Sanchez-Cordon, B. Huerta, G. Allan et L. Carrasco (2003). Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50: 255-258.
- O'Connor B., H. Gauvreau, K. West, J. Bogdan, M. Ayroud, E. G. Clark, C. Konoby, G. Allan et J. A. Ellis (2001). Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J* 42: 551-553.
- Okamoto H., T. Nishizawa et M. Ukita (1999). A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirology* 42: 196-204.
- Okuda Y., M. Ono, S. Yazawa et I. Shibata (2003). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *J Vet Diagn Invest* 15: 107-114.
- Onuki A., K. Abe, K. Togashi, K. Kawashima, A. Taneichi et H. Tsunemitsu (1999). Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J Vet Med Sci* 61: 1119-1123.
- Opriessnig T., S. Yu, J. M. Gallup, R. B. Evans, M. Fenaux, F. Pallares, E. L. Thacker, C. W. Brockus, M. R. Ackermann, P. Thomas, X. J. Meng et P. G. Halbur (2003). Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* 40: 521-529.
- Ouardani M., L. Wilson, R. Jette, C. Montpetit et S. Dea (1999). Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J Clin Microbiol* 37: 3917-3924.
- Ouardani M. (2001). Étude biologique du Circovirus Porcin associé au syndrome de dépérissement en poste-sevrage des porcs. INRS-Institut Armand-Frappier, Mémoire de Maîtrise, 266 p.
- Pallares F. J., P. G. Halbur, T. Opriessnig, S. D. Sorden, D. Villar, B. H. Janke, M. J. Yaeger, D. J. Larson, K. J. Schwartz, K. J. Yoon et L. J. Hoffman (2002). Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest* 14: 515-519.

- Pasick J. (2002). Porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome - possible new links. *Vet J* 164: 171-172.
- Plana-Duran J., M. Balasch, J. Segalés, C. Rosell, G. M. Rodriguez-Arrijoja, M. Domingo, J. M. Folch, A. Sanchez et A. Mankertz (1999). Post-weaning multisystemic wasting syndrome in Spain. *Vet Rec* 145: 87-88.
- Pogranichnyy R. M., K. J. Yoon, P. A. Harms, S. L. Swenson, J. J. Zimmerman et S. D. Sorden (2000). Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol* 13: 143-153.
- Pogranichnyy R. M., K. J. Yoon, P. A. Harms, S. D. Sorden et M. Daniels (2002). Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 14: 449-456.
- Pringle C. R. (1999). Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch Virol* 144: 2065-2070.
- Quintana J., J. Segalés, C. Rosell, M. Calsamiglia, G. M. Rodriguez-Arrijoja, F. Chianini, J. M. Folch, J. Maldonado, M. Canal, J. Plana-Duran et M. Domingo (2001). Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 149: 357-361.
- Ramos-Vara J. A., O. Duran, J. A. Render et D. Craft (1997). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *Vet Rec* 141: 479-480.
- Rodriguez-Arrijoja G. M., J. Segalés, M. Balasch, C. Rosell, J. Quintant, J. M. Folch, J. Plana-Duran, A. Mankertz et M. Domingo (2000). Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Vet Rec* 146: 762-764.
- Rodriguez-Arrijoja G. M., J. Segalés, M. Calsamiglia, A. R. Resendes, M. Balasch, J. Plana-Duran, J. Casal et M. Domingo (2002). Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 63: 354-357.
- Rodriguez-Arrijoja G. M., J. Segalés, C. Rosell, A. Rovira, J. Pujols, J. Plana-Duran et M. Domingo (2003). Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50: 99-101.
- Rose N., E. Le Diguerher, E. Eveno, J. P. Jolly, G. Larour, A. L'Hostis, P. Blanchard, A. Oger, M. Le Dimna, A. Jestin et F. Madec (2003). Facteurs de risque de l'expression de la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) dans les Élevages de type naisseur-engraisseur en France. *Journées de la Recherche Porcine en France*.

- Rosell C., J. Segalés, J. Plana-Duran, M. Balasch, G. M. Rodriguez-Arrioja, S. Kennedy, G. M. Allan, F. McNeilly, K. S. Latimer et M. Domingo (1999). Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120: 59-78.
- Rosell C., J. Segalés et M. Domingo (2000a). Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 37: 687-692.
- Rosell C., J. Segalés, J. A. Ramos-Vara, J. M. Folch, G. M. Rodriguez-Arrioja, C. O. Duran, M. Balasch, J. Plana-Duran et M. Domingo (2000b). Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146: 40-43.
- Rovira A., M. Balasch, J. Segalés, L. Garcia, J. Plana-Duran, C. Rosell, H. Ellerbrok, A. Mankertz et M. Domingo (2002). Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2. *J Virol* 76: 3232-3239.
- Royer R. L., P. Nawagitgul, P. G. Halbur et P. S. Paul (2001). Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal of Swine Health and Production* 9: 281-284.
- Sanchez R. E., H. J. Nauwynck, F. McNeilly, G. M. Allan et M. B. Pensaert (2001). Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet Microbiol* 83: 169-176.
- Sanchez R. E., P. Meerts, H. J. Nauwynck et M. B. Pensaert (2003). Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet Microbiol* 95: 15-25.
- Sano Y., M. Wada, Y. Hashimoto, T. Matsumoto et M. Kojima (1998). Sequences of ten circular ssDNA components associated with the milk vetch dwarf virus genome. *J Gen Virol* 79 (Pt 12): 3111-3118.
- Saoulidis K., S. C. Kyriakis, S. Kennedy, S. Lekkas, C. Miliotis Ch, G. Allan, G. C. Balkamos et P. A. Papoutsis (2002). First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome in pigs in Greece. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49: 202-205.
- Sarli G., L. Mandrioli, M. Laurenti, L. Sidoli, C. Cerati, G. Rolla et P. S. Marcato (2001). Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 83: 53-67.
- Sato K., T. Shibahara, Y. Ishikawa, H. Kondo, M. Kubo et K. Kadota (2000). Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 62: 627-633.

- Schmoll F., W. Sipos, H. Weissenbock, F. Schilcher et M. Schuh (2003). First report of porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) in Austria. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 90: 23-27.
- Segalés J., M. Sitjar, M. Domingo, S. Dee, M. Del Pozo, R. Noval, C. Sacristan, A. De las Heras, A. Ferro et K. S. Latimer (1997). First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec* 141: 600-601.
- Segalés J., J. Pastor, R. Cuenca et M. Domingo (2000). Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Rec*: 675-676.
- Segalés J., F. Alonso, C. Rosell, J. Pastor, F. Chianini, E. Campos, L. Lopez-Fuertes, J. Quintana, G. Rodriguez-Arriola, M. Calsamiglia, J. Pujols, J. Dominguez et M. Domingo (2001). Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 81: 37-44.
- Segalés J., M. Calsamiglia, C. Rosell, M. Soler, J. Maldonado, M. Martin et M. Domingo (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Vet Microbiol* 85: 23-30.
- Segalés J. et M. Domingo (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24: 109-124.
- Shibahara T., K. Sato, Y. Ishikawa et K. Kadota (2000). Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci* 62: 1125-1131.
- Shibata I., Y. Okuda, S. Yazawa, M. Ono, T. Sasaki, M. Itagaki, N. Nakajima, Y. Okabe et I. Hidejima (2003a). PCR Detection of Porcine circovirus type 2 DNA in Whole Blood, Serum, Oropharyngeal Swab, Nasal Swab, and Feces from Experimentally Infected Pigs and Field Cases. *J Vet Med Sci* 65: 405-408.
- Shibata I., S. Yazawa, M. Ono et Y. Okuda (2003b). Experimental dual infection of specific pathogen-free pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 50: 14-19.
- Sirinarumitr T., S. D. Sorden, I. Morozov et P. S. Paul (2001). Double in situ hybridization for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus (PCV). *J Vet Diagn Invest* 13: 68-71.
- Smith W. J., J. R. Thomson et S. Done (1993). Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec* 132: 47.

- Spillane P., S. Kennedy, B. Meehan et G. Allan (1998). Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet Rec* 143: 511-512.
- Steinfeldt T., T. Finsterbusch et A. Mankertz (2001). Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology* 291: 152-160.
- Stevenson G. W., M. Kiupel, S. K. Mittal et C. L. Kanitz (1999). Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet Pathol* 36: 368-378.
- Stevenson G. W., M. Kiupel, S. K. Mittal, J. Choi, K. S. Latimer et C. L. Kanitz (2001). Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 13: 57-62.
- Takahashi K., Y. Iwasa, M. Hijikata et S. Mishiro (2000). Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* 145: 979-993.
- Tischer I., R. Rasch et G. Tochtermann (1974). Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* 226: 153-167.
- Tischer I., H. Gelderblom, W. Vettermann et M. A. Koch (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295: 64-66.
- Tischer I., W. Miels, D. Wolff, M. Vagt et W. Griem (1986). Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 91: 271-276.
- Tischer I., D. Peters, R. Rasch et S. Pociuli (1987). Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* 96: 39-57.
- Tischer I. et H. J. Buhk (1988). Viral DNA from cells infected with porcine circovirus. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 270: 280-287.
- Tischer I., L. Bode, J. Apodaca, H. Timm, D. Peters, R. Rasch, S. Pociuli et E. Gerike (1995a). Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol* 140: 1427-1439.
- Tischer I., L. Bode, D. Peters, S. Pociuli et B. Germann (1995b). Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch Virol* 140: 737-743.
- Tischer I., D. Peters et S. Pociuli (1995c). Occurrence and role of an early antigen and evidence for transforming ability of porcine circovirus. *Arch Virol* 140: 1799-1816.
- Todd D., F. D. Niagro, B. W. Ritchie, W. Curran, G. M. Allan, P. D. Lukert, K. S. Latimer, W. L. Steffens, 3rd et M. S. McNulty (1991). Comparison of three

- animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Arch Virol* 117: 129-135.
- Todd D. (2000). Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology* 29: 373-394.
- Todd D., M. S. McNulty, A. Mankertz, P. D. Lukert, J. L. Dale et J. W. Randles (2000). Family *Circoviridae*. dans *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses*. Édité par F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo et M. D. Summers. New York, San Diego: Academic Press.
- Todd D., M. S. McNulty, B. M. Adair et G. M. Allan (2001a). Animal circoviruses. *Adv Virus Res* 57: 1-70.
- Todd D., J. H. Weston, D. Soike et J. A. Smyth (2001b). Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286: 354-362.
- Trujano M., G. Iglesias, J. Segalés et J. M. Palacios (2001). PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. *Vet Rec* 148: 792.
- Truong C., P. Le Cann, P. Blanchard, E. Hutet, E. Albina, A. Jestin, R. Cariolet et F. Madec (1999). La Maladie de l'amaigrissement du Porcelet (MAP) : 2 - Études expérimentales, virologiques et sérologiques. *Journées de la Recherche Porcine en France*: 355-360.
- Truong C., D. Mahe, P. Blanchard, M. Le Dimna, F. Madec, A. Jestin et E. Albina (2001). Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Arch Virol* 146: 1197-1211.
- Tucker A. W., F. McNeilly, B. Meehan, D. Galbraith, P. D. McArdle, G. Allan et C. Patience (2003). Methods for the exclusion of circoviruses and gammaherpesviruses from pigs. *Xenotransplantation* 10: 343-348.
- Vincent I. E., C. P. Carrasco, B. Herrmann, B. M. Meehan, G. M. Allan, A. Summerfield et K. C. McCullough (2003). Dendritic Cells Harbor Infectious Porcine Circovirus Type 2 in the Absence of Apparent Cell Modulation or Replication of the Virus. *J Virol* 77: 13288-13300.
- Waddilove A. E. J. et E. Marco (2002). Assessing serotherapeutic control of PMWS in the field. dans *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*, pp. 34.
- Walker I. W., C. A. Konoby, V. A. Jewhurst, I. McNair, F. McNeilly, B. M. Meehan, T. S. Cottrell, J. A. Ellis et G. M. Allan (2000). Development and application of a

competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 12: 400-405.

Watson J. D., N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz et A. M. Weiner (1988). "Molecular biology of the gene ", 4e ed, pp. 898-959. Menlo Park, California: Benjamin/Cummings Publishing Company.

Wellenberg G. J., S. Pesch, F. W. Berndsen, P. J. Steverink, W. Hunneman, T. J. Van der Vorst, N. H. Peperkamp, V. F. Ohlinger, R. Schippers, J. T. Van Oirschot et M. F. de Jong (2000). Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in The Netherlands. *Vet Q* 22: 167-172.

West K. H., J. M. Bystrom, C. Wojnarowicz, N. Shantz, M. Jacobson, G. M. Allan, D. M. Haines, E. G. Clark, S. Krakowka, F. McNeilly, C. Konoby, K. Martin et J. A. Ellis (1999). Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11: 530-532.

Yang J. S., D. S. Song, S. Y. Kim, K. S. Lyoo et B. K. Park (2003). Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 15: 369-373.

Yoo D. et A. Giulivi (2000). Xenotransplantation and the potential risk of xenogenic transmission of porcine viruses. *Can J Vet Res* 64: 193-203.