

INRS-Institut Armand-Frappier

Université du Québec

**ÉTUDE BIOLOGIQUE DU CIRCOVIRUS PORCIN
ASSOCIÉ AU SYNDROME DE DÉPÉRISSEMENT EN
POST-SEVRAGE DES PORCS**

MOURAD OUARDANI

Mémoire

Présenté pour l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.) en Virologie et Immunologie

Membres du jury : Dr Serge Dea, INRS-IAF, directeur
 Dr François Sharek, INRS-IAF, président
 Dr Bryan Talbot, université de Sherbrooke, jury externe

*À ma femme,
pour sa constante présence et son support
tout au long de ces dernières années*

*À ma mère,
pour son affection*

*À ma sœur ,
pour son cœur si généreux*

*Et à tous ceux qui
ont contribué à mon
épanouissement scientifique*

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XII
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
HISTORIQUE ET TAXONOMIE.....	6
DESCRIPTION PHYSICO-CHIMIQUE DU CVP	11
ORGANISATION GÉNOMIQUE.....	14
ÉPIDÉMIOLOGIE.....	31
MALADIE ASSOCIÉE AU CVP	33
DIAGNOSTIC	39
CHAPITRE 1	45
<u>VOLET DE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE.....</u>	45
1.1 INTRODUCTION	46
1.2 SOMMAIRE.....	47
1.3 ARTICLE SCIENTIFIQUE	49
1.4 ÉTUDE SUR L'ANALYSE DE SÉQUENCES D'ADN D'ISOLATS QUÉBÉCOIS DU CVP2.....	59
CHAPITRE 2	74
<u>VOLET PROPAGATION <i>IN VITRO</i>.....</u>	74
2.1 INTRODUCTION.....	75
2.2 MÉTHODES ET MATÉRIEL	79
2.21 Cultures cellulaires.....	79
2.22 Origine des virus.....	81
2.23 Isolement et propagation des virus	82
2.24 Production et purification des virus	87
2.25 Tests de détection du CVP2	89
2.26 Tests de détection du PPV	91
2.3 RÉSULTATS.....	93
2.31 Tentative d'isolement de souches virulentes CVP	93

2.32 Isolement de la souche CVP2 IAF2897	95
2.33 Test de contrôle de l'agent pathogène propagé en cultures cellulaires.....	103
2.34 Effet de la D-glucosamine sur la réplication du CVP2.....	112
2.35 Cinétique de production du CVP2	118
2.36 Production et purification des virus	134
2.4 DISCUSSION	140
CHAPITRE 3	160
<u>VOLET GÉNIE GÉNÉTIQUE</u>	160
3.1 INTRODUCTION	161
3.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	163
3.21 Conception et synthèse d'amorces.....	163
3.22 Amplification du gène ORF2 par PCR	164
3.23 Clonage du gène ORF2 de la souche de référence CVP2- IAF2897	166
3.24 Système d'expression procaryotique.....	172
3.25 Système d'expression eucaryotique	179
3.26 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	189
3.27 Immunobuvardage de type Western et autoradiographie.....	190
3.28 Construction d'un adénovirus recombinant	191
3.29 Production d'anticorps contre les CVP1 et CVP2.....	192
3.3 RÉSULTATS.....	194
3.31 Expression procaryotique de l'ORF2 du CVP2.....	194
3.32 Expression eucaryotique de l'ORF2 du CVP2.	207
3.33 Production d'anticorps.....	225
3.4 DISCUSSION.....	232
CONCLUSION	244
CONTRIBUTIONS DES COLLABORATEURS.....	248
REMERCIEMENTS.....	251
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	253
ANNEXES.....	266

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Caractéristiques communes à tous les membres de la famille <i>Circoviridae</i> .	7
Tableau 2	Caractérisation des ORFs et de leurs produits obtenus à partir de l'analyse de la séquence nucléotidique du CVP1 des chercheurs allemands et irlandais.	18
Tableau 3	Homologie existante entre le motif nonanucléotidique des membres des familles <i>circoviridae</i> et <i>geminiviridae</i> .	24
Tableau 4	Comparaison des caractéristiques des ORFs du CVP1 et CVP2 ainsi que le pourcentage d'identité au niveau des acides aminés de leurs produits.	29
Tableau 5	Tropisme tissulaire du CVP2 et lésions observées dans les différents organes des porcs.	37
Tableau 6	Approches utilisées pour la détection du CVP associé au SDPS par diverses techniques de diagnostic.	41
Tableau 7	Cumulatif des tests de diagnostic suggérés dans la littérature pour la détection du CVP2 chez les porcs présentant les signes cliniques du SDPS.	42
Tableau 8	Caractéristiques des amorces destinées au séquençage et des produits qu'elles amplifient.	62
Tableau 9	Pourcentage d'identité au niveau génomique entre les souches canadiennes du CVP2 et la souche CVP1.	70
Tableau 10	Résultats obtenus en IFI suite à la propagation de spécimens cliniques ayant été diagnostiqués positifs au CVP2 par PCR.	94

Tableau 11	Alignement des événements de la cinétique de production dans les cellules PK-15A infectées et traitées.	154
Tableau 12	Description des paires d'amorces utilisées pour le clonage du gène ORF2 de la souche CVP2 de référence IAF2897 dans divers vecteurs.	164
Tableau 13	Pourcentage de l'usage des codons dominants trouvés dans l'ORF2 du CVP2 et leur correspondance chez les bactéries Gram – et les mammifères.	212
Tableau 14	Réactivité des sérums de souris Balb/c immunisées avec du CVP1 sur des feuillets de cellules présentant diverses sources d'antigènes.	229
Tableau 15	Réactivité des sérums de porcs, immunisés génétiquement avec les plasmides pRc/CMV:ORF2 et pAdCMV:ORF2, sur des cellules PK-15 et PK-15A infectées par du CVP 2.	231

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Organigramme de la famille <i>Circoviridae</i>	9
Figure 2 Micrographie électronique à coloration négative de particules virales des CVP type 1 et 2.	12
Figure 3 Carte génomique du CVP1 illustrant les ORFs déduits par les études des chercheurs irlandais et allemands.	16
Figure 4 Reconnaissance des 3 motifs caractéristiques des protéines impliquées dans le modèle de la réplication selon le cercle roulant et de la séquence consensus pour la boîte de fixation des dNTPs.	19
Figure 5 Séquence nucléotidique correspondant à l'origine de réplication du CVP.	22
Figure 6 Mécanisme hypothétique de réplication des CVPs: Modèle du cercle roulant.	25
Figure 7 Carte génomique indiquant la position des fragments séquencés suite à leur amplification au moyen de 4 paires d'amorces.	60
Figure 8 Séquence génomique complète de l'isolat québécois CVP2-IAF614.	63
Figure 9 Séquence génomique complète de l'isolat québécois CVP2-IAF4370.	65
Figure 10 Séquence génomique complète de l'isolat québécois CVP2-IAF2897.	67
Figure 11 Déduction des cadres de lecture ouverts potentiels des souches québécoises du CVP2 et de ceux d'une souche de l'Ouest canadien.	72
Figure 12 Index d'infectivité de la souche IAF2897 du CVP2 sur une monocouche de cellules PK-15A.	98

- Figure 13** Index d'infectivité de la souche IAF2897 du CVP2 sur une monocouche de cellules PFT. 101
- Figure 14** Propagation de la souche IAF2897 du CVP2 en culture sur une monocouche de cellules PFT. 104
- Figure 15** Histogramme comparant de façon relative les taux d'infectivité obtenus pour le CVP2 propagé sur les cellules PFT traitées et non-traitées. 106
- Figure 16** Identification de l'agent viral propagé en cultures cellulaires au moyen de la PCR. 110
- Figure 17** Histogramme décrivant la relation entre la concentration de la D-glucosamine et les titres d'infectivité sur des cultures de PK-15A infectées. 116
- Figure 18** Observation au microscope optique des changements morphologiques des feuillettes cellulaires suite à leur infection au CVP2. 120
- Figure 19** Observation au microscope optique des changements morphologiques au niveau extracellulaire suite à une infection au CVP2. 122
- Figure 20** Observation au microscope optique de la quantité de cellules en suspension suite à une infection au CVP2. 125
- Figure 21** Observation au microscope optique d'un début de dégénérescence cellulaire suite à une infection au CVP2. 127
- Figure 22** Index d'infectivité déterminé qualitativement à partir d'une cinétique de production du CVP2 dans les cellules PK-15A au cours d'un intervalle de 6 jours p.i. 129
- Figure 23** Détermination des titres d'infectivité extracellulaire du CVP2 exprimés sous forme de courbe de tendance. 132

Figure 24 Suspension virale du CVP1 observée au microscope électronique à transmission suite à sa production en culture cellulaire et sa purification par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de CsCl.	135
Figure 25 Suspension virale du CVP2 observée au microscope électronique à transmission suite à sa production en culture cellulaire et sa purification par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de CsCl.	138
Figure 26 Carte plasmidique du pGEX-4T1	174
Figure 27 Carte plasmidique du pRSET-C	176
Figure 28 Carte plasmidique du pMAL-2ce	178
Figure 29 Carte plasmidique du pRc/CMV2	182
Figure 30 Carte plasmidique du pAdCMV5	183
Figure 31 Carte plasmidique du pAdMLP5.k7.his1.GFP	184
Figure 32 Comparaison du mécanisme transcriptionnel des différents systèmes d'expression procaryotique employés.	195
Figure 33 Profil électrophorétique des protéines bactériennes BL21/pGEX:ORF2 obtenues suite à une coloration au bleu de Coomassie et par immunobuvardage.	200
Figure 34 Profil électrophorétique des protéines bactériennes DH11S/pMAL:ORF2 obtenues suite à une coloration au bleu de Coomassie.	202

Figure 35	Profil électrophorétique des bandes de protéines bactériennes BL21/pRSET:ORF2 obtenues suite à une coloration au bleu de Coomassie et par immunobuvardage.	205
Figure 36	Analyse de séquençage des constructions pGEX:ORF2 et pRSET:ORF2.	208
Figure 37	Séquence nucléotidique et peptidique de l'ORF2 de la souche québécoise IAF2897 du CVP2.	210
Figure 38	Histogramme portant sur la fréquence des acides aminés de l'ORF2 du CVP2 (IAF2897).	212
Figure 39	Expression transitoire de l'ORF2 du CVP2 dans les cellules 293A à partir du vecteur recombinant pRc/CMV:ORF2.	216
Figure 40	Expression transitoire de l'ORF2 du CVP2 dans les cellules 293A à partir des vecteurs de transfert d'adénovirus.	218
Figure 41	Expression transitoire de la GFP dans les cellules 293A à partir du vecteur de transfert pAdMLP-GFP:ORF2.	220
Figure 42	Détection d'une plage virale de l'adénovirus recombinant pAdORF2.	223
Figure 43	Détection de l'expression de l'ORF2 du CVP2 dans les cellules PK-15A par la technique de RIPA.	226

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μCi	: microcurrie
μg	: microgramme
μl	: microlitre
μm	: micromètre
μM	: micromole
293A	: cellules adhérentes dérivées de rein d'embryon humain
A	: adénosine
Ac	: anticorps
AcMo	: anticorps monoclonaux
Ad5	: adénovirus humain de sérotype 5
Ag	: antigène
ATCC	: "American Type Culture Collection"
ADN	: acide désoxyribonucléique
Arg	: arginine
ARN	: acide ribonucléique
BBTV	: virus de la houppe supérieure de la banane ou "banana bunchy top virus"
BFDV	: virus du bec et des plumes des psittacidés ou "beak and feather disease virus"
C	: cytidine
Ca	: calcium
CaCl_2	: chlorure de calcium
Cb	: carbénicilline
CFDV	: virus de la noix de coco et du pourrissement florale ou "coconut foliar decay virus"
CIAP	: phosphatase alcaline d'intestin de veau
cm	: centimètre
CO_2	: dioxyde de carbone
CI	: Cellules infectées
CITV	: Comité International pour la Taxonomie des Virus

CsCl	: chlorure de césium
CTI	: cellules traitées (à la glucosamine) et infectées
CVP	: circovirus porcin
CVP1	: circovirus porcin, souche non pathogène
CVP2	: circovirus porcin, souche pathogène
DEPC	: diethyl pyrocarbonate
D.O.	: densité optique
DMEM	: milieu modifié de Dulbecco avec une base saline d'Eagle
dNTP	: 2'-désoxyribonucléoside 5'-triphosphates
ECP	: effet cytopathique
EDTA	: acide éthylènediamine tétraacétique
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (épreuve immuno-enzymatique)
EMBL	: European Molecular Biology Laboratory
F	: phenylalanine
FITC	: isothiocyanate de fluorescéine
G	: guanine
g	: gramme
GFP	: gène rapporteur codant pour la "Green Fluorescent Protein"
GST	: glutathione S-transférase
HCl	: acide chlorydrique
I	: isoleucine
IAF	: Institut Armand-Frappier
IFI	: immunofluorescence indirecte
IgG	: immunoglobuline G
INRS	: Institut National de la Recherche Scientifique
IPTG	: isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
Kb	: kilobase
kDa	: kilodalton
KOAc	: acétate de potassium
L	: leucine
LB	: milieu de culture bactérienne Luria Bertani

M	: molaire
MBP	: protéine de fixation du maltose ou "maltose binding protein"
M.E.T	: microscope électronique à transmission
M.O.I	: nombre moyen de particules virales par cellules ou "multiplicity of infection"
MAPAQ	: Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
mg	: milligramme
Min.	: minute
ml	: millilitre
mM	: millimolaire
mm	: millimètre
MnCl ₂	: chlorure de manganèse
mPCR	: multiplex PCR
NaCl	: chlorure de sodium
NCBI	: "National Center for Biotechnology Information"
nm	: nanomètre
nt	: nucléotide
ORF	: cadre de lecture ouvert ou "Open Reading Frame"
P	: proline
PBS	: solution saline phosphatée
p.i.	: post-infection
PAM	: macrophages alvéolaires de porc
pb	: paire de bases
PCR	: réaction de la polymérase en chaîne
PFT	: cellules issues de trompe de Fallope de truie
PK-15	: cellules issues de rein de porc contaminé chroniquement avec CVP1
PK-15A	: cellules issues de rein de porc exempt de CVP1
pmol	: picomole
PPV	: parvovirus porcin ou "porcine parvovirus"
Pro	: proline
PT	: cellules issues de testicules de porc

Q	: glutamine
RbCl	: chlorure de rubidium
Rep	: réplicase
rpm	: rotation par minute
S	: phase de synthèse d'ADN durant le cycle cellulaire
SDPS	: syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage des porcs
SDS	: sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	: électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
SFB	: sérum fœtal de bovin
SV40	: virus simian 40
T	: thymidine
Thr	: thréonine
TBS	: tampon Tris-NaCl
TC	: témoin-cellule
TCID ₅₀	: dose infectieuse produisant un ECP dans 50% des cultures cellulaires infectées
TCT	: témoin-cellules traitées à la glucosamine
TNE	: tampon contenant du Tris-HCl, NaCl et EDTA
Tris	: tris (hydroxyméthyl) amino-méthane
U	: unité
UV	: ultraviolet
V	: valine
V	: volt
v/v	: volume par volume
Y	: tyrosine

INTRODUCTION

Revue de littérature

Historique et taxonomie

Le Circovirus porcin (CVP) a tout d'abord été décrit par Tischer en 1974 comme étant, plausiblement, un virus à ARN du type "picornavirus". Ce virus a été trouvé comme contaminant de la lignée cellulaire de rein de porc PK-15 (ATCC-CCL 33), dans laquelle il établit en réalité une infection chronique (Tischer *et al.*, 1974). Ce n'est qu'en 1982 que les mêmes auteurs ont rapporté, dans des études plus détaillées, la vraie nature de ce contaminant de la lignée PK-15 (Tischer *et al.*, 1982). Ces études ont démontré qu'il n'était pas question d'un virus à ARN, mais plutôt d'un très petit virus à ADN circulaire et monocaténaire. Les auteurs ont également réussi à propager ce virus dans des clones cellulaires PK-15 minutieusement sélectionnés, dépourvus de parvovirus, papovavirus, mycoplasmes et de circovirus. Les auteurs n'ont cependant remarqué aucun effet cytopathique, suite à la propagation du virus dans ces clones de cellules PK-15. De plus, il a été observé que cet agent viral se multipliait aussi bien dans les cultures primaires que dans les cultures continues d'origine porcine, dans lesquelles il établit une infection chronique. Sur la base des caractéristiques décrites dans ce rapport, ce virus appartenait vraisemblablement à une famille de virus animal encore jamais rencontrée que les auteurs ont dès lors nommé "circovirus porcin".

N'ayant aucun lien de parenté avec les virus à ADN simple brin, le circovirus porcin a été classé dans une nouvelle famille, soit *Circoviridae* (Lukert *et al.*, 1995). En effet, le sixième rapport du comité international de taxonomie des virus a associé 6 virus à la famille *Circoviridae*, où le CVP a été assigné au groupe des circovirus d'animaux avec le virus BFDV (le virus du bec et des plumes des psittacidés, ou "beak and feather disease virus") et le virus CAV (le virus de l'anémie infectieuse des poulets, ou "chicken anaemia virus"). Contrairement à ces co-membres, qui n'affectent que les oiseaux, le CVP a comme hôte principal le porc. Même si les membres de cette famille partagent des caractéristiques communes, relativement à la morphologie du virion et de la structure du génome (**tableau 1**), il a été démontré qu'il existe aussi parmi eux des différences marquantes. En effet, des études comparatives basées sur l'analyse génomique des

Tableau 1 Caractéristiques communes à tous les membres de la famille *Circoviridae*.

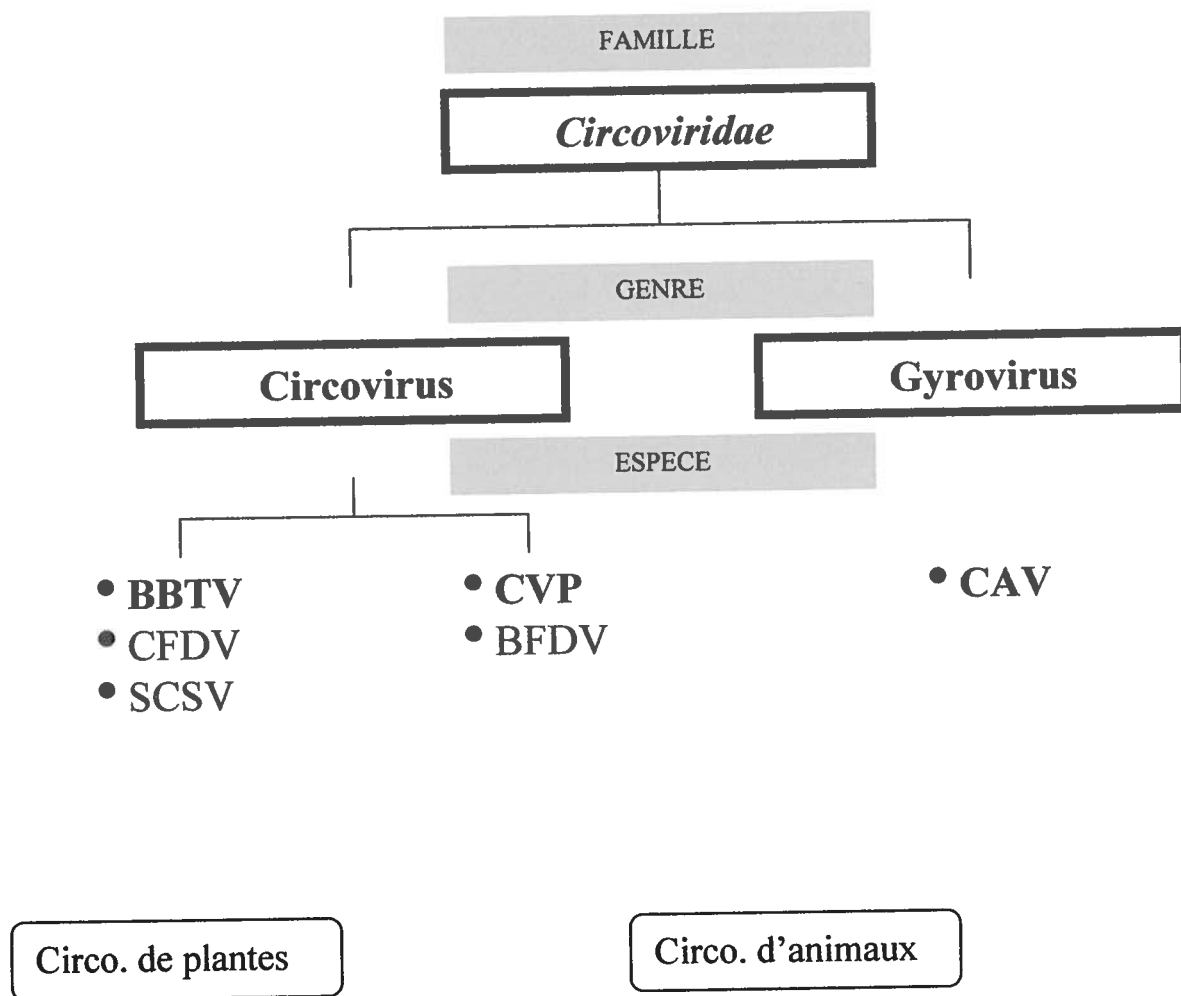
Virions	17 à 23.5 nm icosahédriques non enveloppés
ADN	simple brin circulaire ambisens

circovirus d'animaux et de plantes suggèrent de reconsidérer l'organisation de la famille *Circoviridae* (Niagro *et al.*, 1998). Plusieurs auteurs ont suggéré de subdiviser la famille en trois groupes: le groupe des circovirus d'animaux n'ayant comme membres que les CVP et BFDV, le groupe des circovirus de plantes comprenant les virus CFDV (le virus de la noix de coco et du pourrissement floral, ou "coconut foliar decay virus"), les virus BBTB (le virus de la houppe supérieure de la banane, "banana bunchy top virus"), et les virus SCSV (le virus du développement retardé du trèfle sous terrain "subterranean clover stunt virus"), et finalement dans le dernier groupe, les virus CAV qui ont été placés à part en raison de leur très faible similitude avec les autres membres de la famille. Un an après cette requête, au congrès international de taxonomie des virus, la famille a été sujette à un nouveau regroupement de ses membres (Pringle *et al.*, 1999). En effet, la famille *Circoviridae* se compose dorénavant de deux genres: le genre circovirus regroupant tous les circovirus de plantes et d'animaux, à l'exception du CAV qui a été placé dans un nouveau genre, soit celui des gyrovirus (**figure 1**).

Récemment, en 1996, une nouvelle maladie nommée le syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage des porcs (SDPS ou PMWS pour "Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome") a été rapportée en Amérique du Nord. Deux ans plus tard, des chercheurs ont pu isoler une souche de CVP différente de celle trouvée dans la lignée PK-15 à partir des tissus de porcs manifestant les signes cliniques de cette maladie. Conséquemment, ce nouveau type de CVP a été incriminé comme agent causal de cette nouvelle condition clinique chez les porcs. À cause de ses différences antigéniques et génomiques ainsi que de son association au SDPS, ce nouveau CVP a été désigné CVP2, afin de le distinguer du CVP contaminant les cultures cellulaires PK-15 et désigné CVP1. Dès lors, l'émergence de cette souche distincte à travers tous les élevages de porcs de l'occident a suscité l'intérêt des centres de recherche en médecine vétérinaire, des compagnies œuvrant dans le domaine du diagnostic ou la fabrication de vaccins, des vétérinaires praticiens ainsi que des éleveurs de porcs.

Figure 1
Organigramme de la famille *Circoviridae*

Organigramme identifiant les 6 membres de la famille *Circoviridae* nouvellement suggérés lors du XI^e Congrès International de Taxonomie de Virologie (CITV '99). Le genre circovirus est constitué des circovirus de plantes: coconut foliar decay virus (CFDV), banana bunchy top virus (BBTV), subterranean clover stunt virus (SCSV) et, des circovirus d'animaux: circovirus porcin (CVP), beak and feather disease virus (BFDV). Dans le genre circovirus, le BBTV (en gras) a été choisi comme membre type du groupe des circovirus de plantes, alors que parmi les circovirus d'animaux, c'est le CVP (en gras) qui a été considéré comme membre type. Le CAV (en gras) a été reclassé dans un nouveau genre, gyrovirus, dont il est le seul membre jusqu'à présent. Il est par conséquent le membre type du genre gyrovirus.



Description physico-chimique du CVP

Il a été rapporté que le diamètre des membres de la famille *Circoviridae* varie en moyenne de 17 à 23.5 nm, ce qui fait de ces virus à ADN les plus petits virus d'animaux connus jusqu'à présent et capables de se répliquer de façon autonome (Niagro *et al.*, 1998).

Les particules virales des CVP1 et CVP2 ont été purifiées et observées au microscope électronique en coloration négative comme étant de forme icosahédrique et non enveloppées (**figure 2**). Un examen minutieux au microscope électronique ainsi que des traitements de dénaturation à la chaleur ont indiqué que l'ADN simple brin du CVP1 est une molécule circulaire covalente et fermée (Tischer *et al.*, 1982). Même si les 3 membres du groupe des circovirus d'animaux possèdent un génome à ADN simple brin de forme circulaire, néanmoins, il existe une différence pour l'un de ces virus. En effet une étude a démontré à l'aide du microscope électronique à contraste négatif que les particules du CVP et du BFDV sont 30% plus petites que celles du CAV et qu'elles possèdent une surface distincte de celle du CAV (Todd *et al.*, 1991). La taille des particules des CVP1 et CVP2 est de 17 nm comparativement à celle du CAV qui est de 23.5 nm. Il a été rapporté que la densité de flottation du CVP1, obtenue suite à une centrifugation isopycnique sur un gradient de CsCl est de 1.37 g/cm³ avec un coefficient de sédimentation de 52 S (Tischer *et al.*, 1982) et celle du CVP2 se situe entre 1.33-1.34 g/cm³ avec un coefficient de sédimentation de 57 S (Allan *et al.*, 1994). La taille de l'ADN circulaire et son poids moléculaire ont pu être également calculés dans le cas du CVP1, soit un ADN de 1.76 Kb et d'un PM de 0.58×10^6 , respectivement (Tischer *et al.*, 1982). Il a été démontré que le CVP1 était dépourvu d'activité hémagglutinante suite à l'étude de la susceptibilité d'érythrocytes d'un bon nombre d'espèces animales (Spillane *et al.*, 1998). De plus, le CVP est relativement stable à des valeurs de pH de 3 et plus, est résistant au traitement par le chloroforme et à des températures se situant entre 56 et 70 °C (Allan *et al.*, 1994).

Figure 2
Micrographie électronique à coloration négative de particules virales des CVP type 1 et 2.

Particules des virus des CVPs observées après avoir été propagées dans les cellules PK-15 et purifiées par ultracentrifugation isopycnique sur gradients continus de chlorure de césium ($1.2\text{-}1.4\text{ g/cm}^3$). **A.** Particules virales du CVP1 (grossissement : $\sim 220\ 000\times$). **B.** Particules virales du CVP2 (grossissement : $280\ 000\times$).

A.

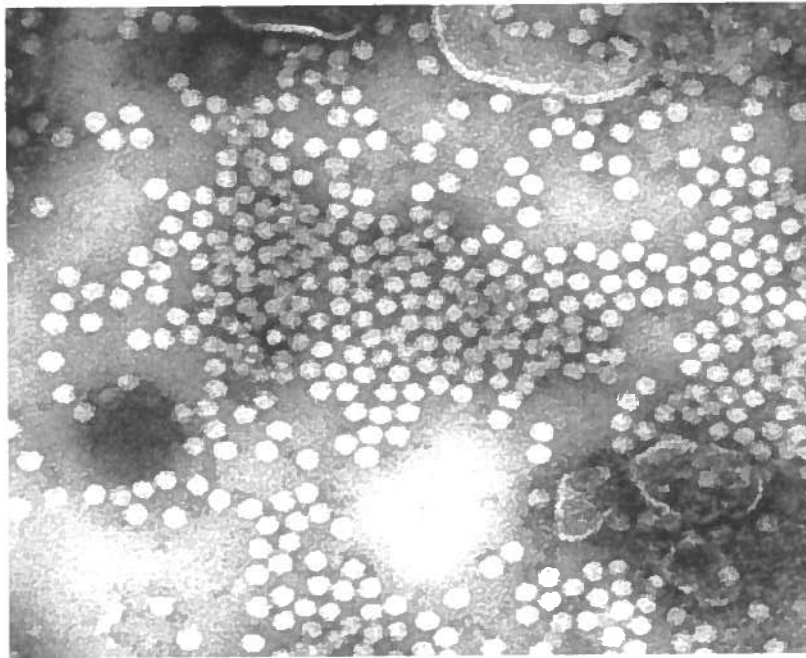


Photo réalisée par Robert Alain du service
de M.E.T. de l'IAF-INRS

B.

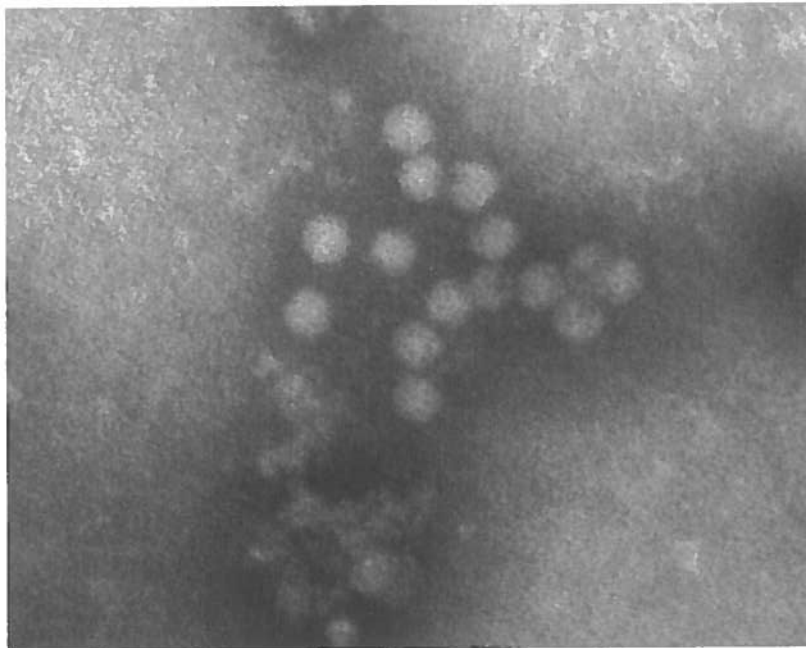


Photo réalisée par Robert Alain du service
de M.E.T. de l'IAF-INRS

Organisation génomique

L'origine du nom circovirus provient de la forme de son génome indiquant que l'ADN viral a une conformation circulaire (Lukert *et al.*, 1995). Jusqu'à présent, les connaissances sur la biologie moléculaire du CVP sont très restreintes. Elles se limitent en grande partie à des déductions fondées sur des études par ordinateur à l'aide de programmes d'analyse de séquences dont certains sont commerciaux et d'autres sont fournis au site Web du NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Les premières études sur l'organisation génomique du CVP1 ont débuté suite à la publication de la séquence de son ADN simple brin. La séquence nucléotidique complète du CVP1 contaminant la lignée PK-15 (ATCC CCL 31) a été rapportée presque simultanément par deux groupes de chercheurs de l'Irlande [GenBank n° U49186 (Meehan *et al.*, 1997)] et de l'Allemagne [EMBL n° Y09921 (Mankertz *et al.*, 1998)]. La taille de l'ADN du CVP1 est de 1759 nucléotides. L'alignement du produit de séquençage obtenu par les chercheurs irlandais avec celui obtenu par les chercheurs allemands a révélé plus de 99% d'identité en nucléotides (Hamel *et al.*, 1998). Ces deux séquences génomiques représentent celles des souches de référence du CVP1.

Le génome du CVP1 possède une organisation ambisense, tout comme celui du BFDV (Meehan *et al.*, 1997, Mankertz *et al.*, 1997). En plus, il a été démontré que les cellules infectées continuellement avec du CVP1 contiennent, en plus du génome viral consistant en de l'ADN simple brin, 2 classes de molécules d'ADN double brin. Ces molécules d'ADN-2 sont circulaires et démontrent une topologie de cercle détendu et une autre de cercle fermé de façon covalente (Tischer *et al.*, 1988). Il a été proposé que ces classes de molécules d'ADN-2 représentaient possiblement les formes répliquatives du génome du CVP1. De plus, cette hypothèse est supportée par le fait que des signaux potentiels de polyadénylation ont été identifiés sur chacun des deux brins de la forme répliquative du CVP1 (Meehan *et al.*, 1997). Ainsi, sous sa forme répliquative, chaque brin (viral et complémentaire) est transcrit et code pour des protéines. Comme dans la convention utilisée pour les geminivirus (Bridgman *et al.*, 1995), le brin d'ADN encapsidé

se réfère au brin viral (+) à l'opposé du brin complémentaire (-) qui n'est produit que dans le noyau de la cellule hôte et qui n'est pas encapsidé dans le virion.

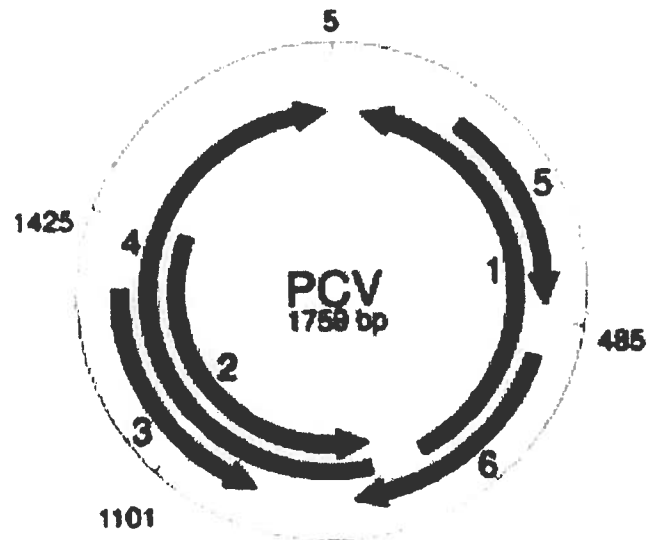
L'analyse par ordinateur faite par l'équipe de chercheurs allemands a révélé la présence de 6 cadres de lecture ouverts (ORFs) alors que celle effectuée par les chercheurs irlandais a permis d'identifier 7 ORFs (**figure 3**). Les caractéristiques des ORFs (la position et leur taille) et des protéines déduites (poids moléculaires) du CVP1 ont été rapportées (**tableau 2**). Il a été déduit des analyses de séquences nucléotidiques que le plus grand cadre de lecture, l'ORF1 des chercheurs irlandais (ORF4 des chercheurs allemands) est transcrit par le brin viral et code pour une protéine associée à la réplication du virus (Meehan *et al.*, 1997, Mankertz *et al.*, 1998). En effet, à l'aide d'un programme d'analyse de similitudes entre un grand nombre de séquences peptidiques retrouvées dans une banque de données non redondante (NCBI, États-Unis), le rôle de cette protéine a pu être prédéfini. De plus, ces données ont permis de constater que les produits prédits pour l'ORF 4 des chercheurs allemands et l'ORF1 des chercheurs irlandais démontrent des similitudes avec la protéine Rep ("replication-associated proteins") d'autres circovirus de plantes (BBTV, CFDV et SCSV) et des geminivirus (Meehan *et al.*, 1997, Mankertz *et al.*, 1997). En plus, grâce à des expériences d'expression transitoire utilisant des plasmides vecteurs de ces ORFs, il a été possible de démontrer que l'ORF4 code pour la protéine Rep du CVP1 et qu'elle est indispensable pour la réplication de l'ADN viral (Mankertz *et al.*, 1998). Trois motifs caractéristiques des protéines impliquées dans la réplication du cercle roulant et une séquence consensus à une possible boîte ou région de fixation des dNTPs ("dNTP-binding box") (**figure 4**) ont été identifiés à l'intérieur du gène ORF4 (Mankertz *et al.*, 1998, Niagro *et al.*, 1998). Par ailleurs, les analyses faites sur le plus grand cadre de lecture du CFDV ont révélé les mêmes caractéristiques que celles observées pour l'ORF4 du CVP1 (Niagro *et al.*, 1998). D'autre part, certains auteurs ont rapporté que cette protéine pourrait être impliquée dans la réaction de clivage et de ligation au site de clivage putatif situé dans la région de l'origine de réplication (Meehan *et al.*, 1997, Mankertz *et al.*, 1998).

Figure 3

Carte génomique du CVP1 illustrant les ORFs déduits par les études des chercheurs irlandais et allemands.

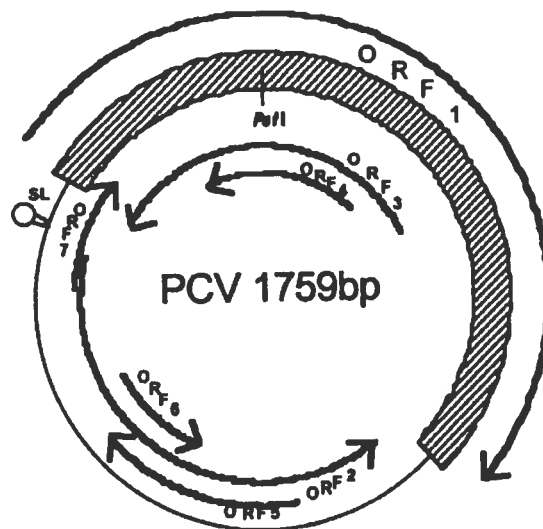
Selon les analyses génomiques faites par ordinateur par les chercheurs allemands et à partir du génome de la souche CVP1 (EMBL n°Y09921), il a été possible de déduire 6 cadres de lecture ouverts (**Carte génomique du-haut**). Alors que suite aux études de bioinformatique faites sur la séquence génomique de la souche CVP1 des irlandais (GenBank n°U49186), il a été possible de prédire 7 ORFs ouverts (**Carte génomique du-bas**). Le sens des flèches représente le brin sur lequel est transcrit l'ORF. Ainsi, les flèches orientées dans le sens d'une aiguille d'une montre représentent les ORFs du brin viral tandis que les flèches orientées dans le sens contraire représentent les ORFs du brin complémentaire.

6 ORFs déduits suite aux études des chercheurs allemands.



Carte génomique tirée du J. Virol. 71. Mankertz *et al.*, 1997.
© 1997 par " the American Society for Microbiology".

7 ORFs déduits suite aux études des chercheurs irlandais.



Carte génomique tirée de J. Gen. Virol. 78. Meehan *et al.*, 1997.
© 1997 par " the Society for General Microbiology".

Tableau 2 Caractérisation des ORFs et de leurs produits obtenus à partir de l'analyse de la séquence nucléotidique du CVP1 des chercheurs allemands et irlandais.

A

Caractérisation des ORFs et de leurs produits obtenus à partir de l'analyse de la séquence nucléotidique du CVP1 des chercheurs allemands.

ORF	BRIN	POSITION nt	GÈNE pb	PROTÉINE kDa
1	C	736 – 38	698	N/A
2	C	1430 – 813	617	N/A
3	C	1324 – 980	344	N/A
4	V	819 – 1754	935	N/A
5	V	176 – 460	284	N/A
6	V	530 – 850	320	N/A

N/A : données non fournies par l'auteur
Données tirées de Mankertz *et al.*, 1997.

B

Caractérisation des ORFs et de leurs produits obtenus à partir de l'analyse de la séquence nucléotidique du CVP1 des chercheurs irlandais.

ORF	BRIN	POSITION nt	GÈNE pb	PROTÉINE kDa
1	V	47 – 983	936	35.7
2	C	1723 – 1024	699	27.8
3	C	658 – 40	618	23.2
4	C	552 - 207	345	13.3
5	V	1163 – 1448	285	9.8
6	C	1518 – 1332	186	6.7
7	V	1670 – 79	168	6.0

Données tirées de Meehan *et al.*, 1997.

Figure 4

Reconnaissance des 3 motifs caractéristiques des protéines impliquées dans le modèle de la réplication selon le cercle roulant et de la séquence consensus pour la boîte de fixation des dNTPs.

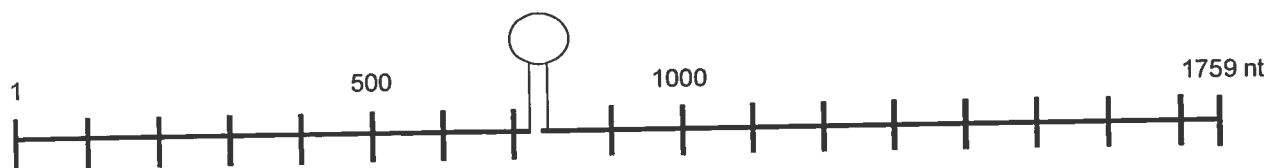
Alignement des séquences d'acides aminés déduites des protéines associées à la réplication (protéine Rep) des circovirus (BFDV, PCV, SCSV, CFDV, BBTv) avec celles d'un certain nombre de geminivirus. Seulement les régions entourant les 3 motifs caractéristiques de la protéine Rep et la séquence "P-loop" sont présentés dans cette figure. En haut, les 2 alignements représentent le premier motif (F-TLN) et le deuxième motif (pHLQG) caractéristique de la protéine Rep. En bas, l'alignement de gauche représente le troisième motif (YCsKE) caractéristique de la protéine Rep et l'alignement de droite correspond à la séquence consensus pour la boîte de fixation dNTP putative ("P-loop" ou GKS).

	1										2									
	L.L.I.					P-TLM					L.L.I.					P-TLM				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R					F					Y					Q				
	R																			

Un fragment de 111 pb (**figure 5A**) portant l'origine de réplication a été défini entre les 728^{ème} et 838^{ème} nucléotides du génome du CVP1 caractérisé par les chercheurs allemands (Mankertz *et al.*, 1997). Ces derniers ont aussi trouvé à l'intérieur de ce fragment trois motifs répétés de 6 pb (5'- CGGCAG -3') adjacents à un motif répété inversé, une structure à tête d'épingle et à son sommet, une séquence nonanucléotidique conservée (**figure 5B**) (Mankertz *et al.*, 1998). Ce dernier motif (5'- TAATATTAC -3') est identique, à un nucléotide près, à celui trouvé chez les circovirus de plantes et des geminivirus (**tableau 3**). De la même façon, il a été démontré que ces motifs propres à l'origine de réplication se retrouvent également dans le génome du BFDV (Niagro *et al.*, 1998). L'identification de ce nonamère a permis aux auteurs, grâce à des programmes informatisés d'analyse de séquences, de mieux comprendre le mode de réplication du CVP1. En effet, il a été possible de déduire que le brin viral (+) de l'ADN est clivé entre le 7^e et le 8^e nucléotide du motif (TAATATTAC) durant l'initiation de la réplication selon le modèle du cercle roulant (Mankertz *et al.*, 1997). Afin d'élucider le mécanisme de réplication du CVP1, les auteurs ont procédé par analogie à celui des geminivirus (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995, Stanley, 1995). Ce mécanisme de réplication selon le modèle du cercle roulant, suggéré par les auteurs, consiste en des étapes de clivage sur le brin (-), séparation des brins et de synthèse d'un nouveau brin à partir du brin (-) (**figure 6**). Par ailleurs, afin de favoriser la compréhension de la communauté scientifique, une convention a été adoptée concernant la numérotation nucléotidique du génome des CVPs (Meehan *et al.*, 1998, Niagro *et al.*, 1998). Ainsi, il a été suggéré, par analogie avec la numérotation utilisée dans le cas des geminivirus, que le premier nucléotide commence immédiatement après le site potentiel de clivage situé à l'apex de la structure en tête d'épingle, donc avec le résidu "A" (Tan *et al.*, 1995). L'homologie de l'organisation génomique du CVP1 avec celle des geminivirus suggère que le motif en tête d'épingle et le nanonucléotide ont possiblement un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN du CVP1 (Meehan *et al.*, 1997, Mankertz *et al.*, 1997, Niagro *et al.*, 1998). À cet égard, le CVP1 semble représenter un lien entre les circovirus d'animaux et de plantes et peut être relié à un grand nombre de différents réplicons viraux et procaryotiques utilisant comme mode de réplication, le modèle du cercle roulant (Mankertz *et al.*, 1998).

Figure 5**Séquence nucléotidique correspondant à l'origine de réplication du CVP.**

Caractérisation et localisation de l'origine de réplication de l'ADN du CVP rapportée dans une étude par des chercheurs allemands. **A.** Séquence nucléotidique d'un fragment de 111 pb caractérisant l'origine de réplication de l'ADN viral ainsi que les motifs conservés qui la définissent. Les deux flèches qui se font face (en gras) représentent les motifs inversés d'une longueur de 11 pb. Les boîtes en pointillé désignent les trois motifs de 6 pb. La séquence nonanucléotidique conservée est encadrée dans une boîte pleine. **B.** Structure à tête d'épingle produite par l'interaction des 2 motifs inversés de 11 pb, comportant le motif nonanucléotidique (en gras) et deux des trois motifs répétés de 6 pb (dans boîte pointillée).



⁷²⁸
 CCA CGTCA TCCTA TAAAA GTGAA ⁷⁵⁰
 AGAAG TGC GC TGCTG TAGTA TTAC
 AGCGC ACTTC GGCAG CGGCA GCACC ⁸⁰⁰
 TCGGC AGCGT CAGTG AAAAT GCCAA
 GCAAG AAAAG CGG ⁸³⁸

A

B

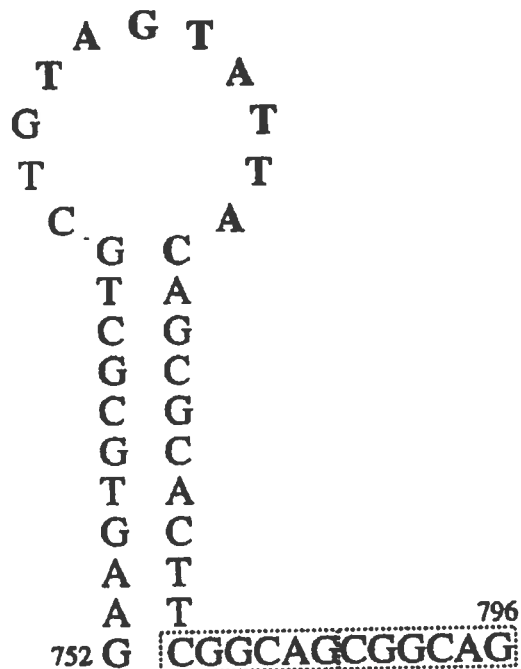


Tableau 3 Homologie existante entre le motif nonanucléotidique des membres des familles *circoviridae* et *geminiviridae*.

TABLE 2. Homology of the PCV nonanucleotide to nonanucleotides of other viral systems

Virus or replicon	Sequence	Genome structure	Mode of replication ^a
PCV	TAGTATTAC	Circular ssDNA ^b	?
GV ^c subgroup I (e.g., MSV)	TAATATTAC	Circular ssDNA	RCR
GV subgroup III (e.g., TGMV)	TAATATTAC	Two components, circular ss DNA	RCR
CFDV	TAATACTAG	Circular ssDNA	RCR
CAV	TACTATTCC	Circular ssDNA	?
BBTV (component 1)	TATTATTAC	Six components, circular ssDNA	?
SCSV	(T/C)AGTATTAC	Seven components, circular ssDNA	?
φX174	TGATATTAT	Circular ssDNA	RCR
pC194	TGATAATAT	ssDNA plasmid	RCR

^a ?, unknown; RCR, rolling-circle replication.

^b ssDNA, single-stranded DNA.

^c GV, geminivirus.

© 1997 par " the American Society for Microbiology".

J. Virol. 71. Mankertz *et al.*, 1997.

Circoviridae

- PCV : membre type des circovirus d'animaux
- CFDV : membre des circovirus d'animaux
- BBTv : membre type des circovirus de plantes
- SCSV : membre des circovirus de plantes
- CAV : membre type et unique du genre gyrovirus

Geminiviridae

- GV : geminivirus

Autres types de réplicons

- φX174 : bactériophage
- pC194 : plasmide bactérien

Figure 6**Mécanisme hypothétique de réplication des CVPs: Modèle du cercle roulant.**

Réplication de l'ADN simple brin des circovirus porcins. Il a été suggéré que les CVPs utilisent comme mécanisme de réplication le modèle du cercle roulant pour répliquer leur ADN (Mankertz *et al.*, 1998). **A.** Le virion à ADN (brin +) pénètre dans la cellule. **B.** Une fois, à l'intérieur, son génome se convertit sous forme répllicative (RF). **C.** Une protéine multifonctionnelle (la protéine ORF1 ou Rep) procède au clivage du brin + dans la région de l'origine de réplication (Meehan *et al.*, 1997, Mankertz *et al.*, 1998). **D,E,F.** La même protéine cause la synthèse du nouveau brin + tout en déplaçant le vieux brin. **G.** Finalement, elle procède à la ligation des extrémités de l'ADN simple brin pour lui donner sa conformation circulaire (Meehan *et al.*, 1997, Mankertz *et al.*, 1998). La protéine Rep reste attachée à la molécule RF afin de poursuivre de nouveaux cycles de réplication. **H.** Le simple brin + est converti en une nouvelle molécule RF dans la première phase de réplication. **I.** Dans la seconde phase, la molécule RF s'associe avec une procapside et vient s'incorporer dans le virion descendant.

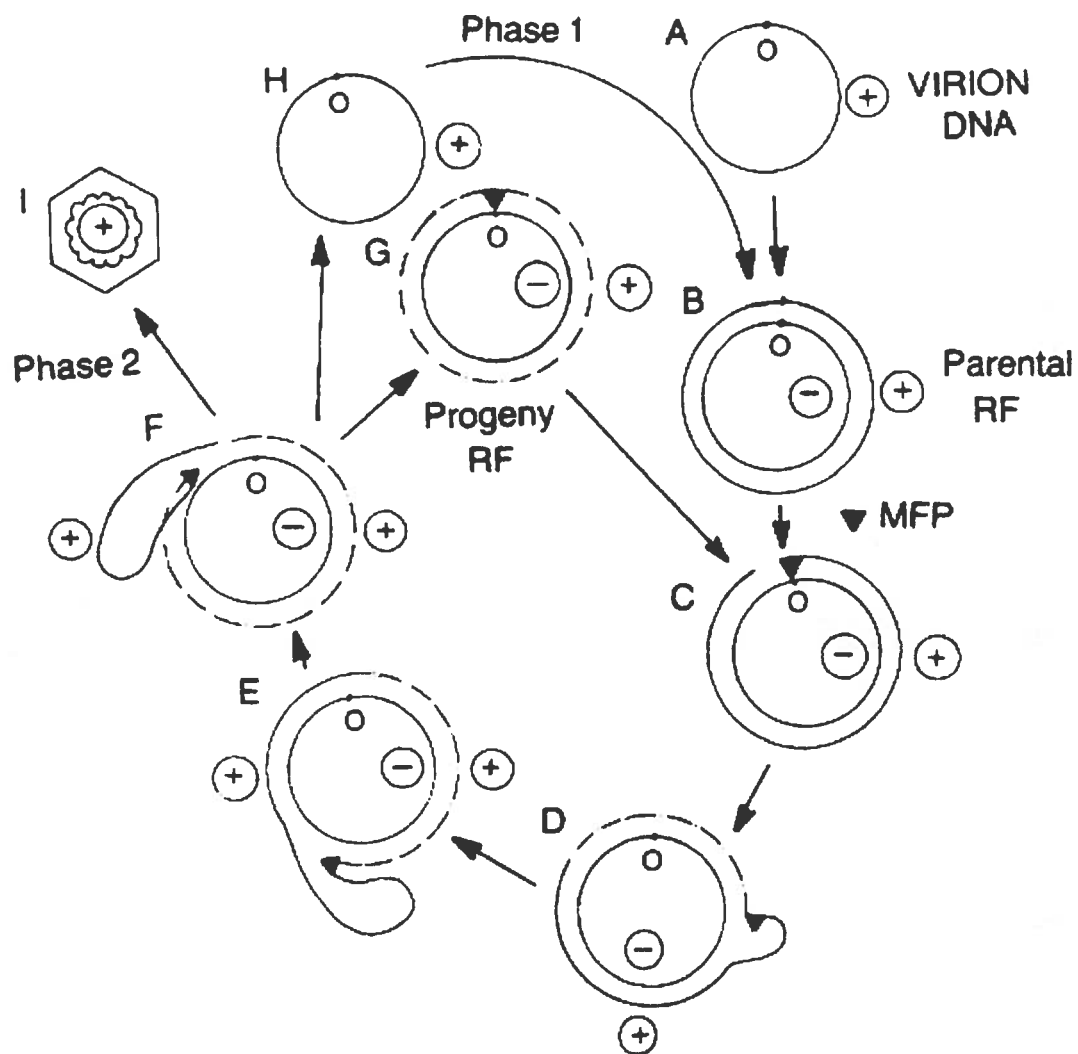


Schéma tiré de " Microbiology, fourth edition", Davis *et al.*, 1990
 © 1990 par " Lipincott Company ".

Il a été déduit que le deuxième plus grand cadre de lecture, l'ORF2 (**tableau 2**) transcrit par le brin complémentaire, code pour une protéine structurale, soit. la protéine majeure de la nucléocapside du CVP1 (Mankertz *et al.*, 1998, Niagro *et al.*, 1998). Cet ORF est accompagné de signaux de polyadénylation et de contrôles transcriptionnels eucaryotiques (Niagro *et al.*, 1998). Une analyse comparative a révélé une similitude intéressante entre l'ORF 2 du CVP1 et l'ORF codant pour une protéine représentant potentiellement la capsid du BFDV, spécialement pour une région située près de l'extrémité C-terminale de leur protéine. En effet, une séquence très conservée de 14 acides aminés (YVtkLTIYVQFRqF) adjacente à des sites de myristylation a été identifiée dans la région C-terminale des protéines correspondant possiblement à la capsid de ces deux circovirus d'animaux (Niagro *et al.*, 1998). La conservation presque intégrale de ces 2 motifs suggère, selon les chercheurs qui ont identifié cette région, un rôle qui est indispensable pour la fonction de leurs protéines.

Même si les 3 circovirus d'animaux (CVP, BFDV et CAV) possèdent un génome à ADN simple brin circulaire, il n'en reste pas moins qu'ils ne possèdent que peu d'homologie au niveau de leur séquence nucléotidique et qu'aucun déterminant antigénique commun n'a été identifié (Todd *et al.*, 1991). Sur la base des études comparatives entre les circovirus d'animaux, il a été démontré que le CVP ressemble au BFDV tant au niveau de la taille de son génome, que de son organisation génomique et de la taille des virions, mais diffère par ces propriétés du CAV (Meehan *et al.*, 1997, Niagro *et al.*, 1998). Par conséquent, c'est sur la base de ces caractéristiques distinctes que les auteurs ont suggéré que le CAV ne soit ni placé parmi les membres du groupe des circovirus d'animaux et, encore moins avec ceux des circovirus de plantes (Meehan *et al.*, 1997, Mankertz *et al.*, 1997, Niagro *et al.*, 1998). Ainsi, n'ayant aucune similitude avec les autres membres de la famille *Circoviridae*, le CAV a jusqu'à présent été reconnu comme le seul représentant du nouveau genre *gyrovirus*.

L'étude de l'organisation génomique du CVP2 a connu le même cheminement que celle du CVP1. Ce que nous savons jusqu'à présent sur la biologie moléculaire du CVP2 a été obtenu principalement à partir des programmes d'analyse de séquences génomiques.

Suite à l'isolation de la nouvelle souche CVP à partir des tissus de porcs montrant les signes cliniques suggérant un problème de SDPS, l'ADN viral a été séquencé et les résultats ont été publiés par plusieurs équipes de recherche (Hamel *et al.*, 1998, Meehan *et al.*, 1998, Morozov *et al.*, 1998, Ouardani *et al.*, 1999). La taille du génome du CVP2 qui a été obtenue par ces auteurs est de 1768 pb, soit 9 nucléotides (nt) de plus que celui du CVP1. L'analyse comparative de l'ADN des isolats CVP2 Nord-américains a démontré une identité de 99% entre les différentes souches de CVP2 et les mêmes résultats ont été obtenus pour les isolats Européens. La comparaison des isolats CVP2 des deux continents a démontré plus que 96% d'identité au niveau des nucléotides. Lorsque tous ces isolats du CVP2 ont été comparés avec la souche de CVP1 contaminant la lignée PK-15, moins de 80% d'identité se retrouvaient au niveau des séquences en nucléotides (Meehan *et al.*, 1998).

Le génome du CVP2 possède les mêmes caractéristiques d'organisation que celui du CVP1. Il s'agit donc d'un génome ambisense comportant une origine de réplication définie par un motif en tête d'épingle, un élément nonanucléotidique conservé et les trois répétitions du motif de 6 pb (CGGCAG) (Hamel *et al.*, 1998, Mankertz *et al.*, 2000). Afin de démontrer la conformation circulaire de l'ADN monocaténaire du CVP2, certains auteurs ont amplifié par la PCR une région joignant la fin du génome avec le début du génome, entre les positions nt 1-30 et 1730-1768 (Hamel *et al.*, 1998). La présence de séquences signaux [poly(A)] trouvées sur chaque brin de l'ADN du CVP2 démontre clairement que chaque brin est transcrit et code pour des protéines distinctes (Mankertz *et al.*, 1998, Hamel *et al.*, 1998).

La première analyse génomique effectuée par Hamel *et al.* (1998) a montré l'existence jusqu'à 11 ORFs dans le génome des CVP1 et CVP2. La position et l'orientation des ORFs des deux souches de CVPs ont été comparées, de même que les tailles, les pourcentages d'identité et les sites de glycolysation pour les protéines prédites (**tableau 4**). Cependant, les 6 protéines qui seraient codées par les ORFs 1,2,3,4,7 et 8 du CVP2 ont été comparées à celles du CVP1 et se sont avérées possiblement homologues à celles du CVP1. Parmi toutes les protéines comparées au **tableau 4**, la protéine codée par

Tableau 4 Comparaison des caractéristiques des ORFs du CVP1 et CVP2 ainsi que le pourcentage d'identité au niveau des acides aminés de leurs produits.

TABLE 1. Comparison of ORFs in pmws PCV and np PCV^a

ORF	pmws PCV						np PCV						Homology (%)
	Genomic DNA			Protein			Genomic DNA			Protein			
	Position (nt)	Strand ^b	No. of aa	kDa	Glyc ^c		Position (nt)	Strand	No. of aa	kDa	Glyc		
1	51-995	V	314	35.8	+		47-985	V	312	35.7	+	85	
2	1735-1034	C	233	27.8	+		1723-1022	C	233	27.8	+	66	
3	671-357	C	104	11.9	-		658-38	C	206	23.2	-	62	
4	565-386	C	59	6.5	+		552-205	C	115	13.3	+	83	
5	1016-1177	V	53	6.2	-		1163-1450	V	95	9.8	+	None	
6	1611-1530	C	27	2.8	-		1518-1330	C	62	6.7	+	None	
7	1682-1741	V	19	1.9	-		1670-81	V	56	6.0	-	79	
8	753-688	C	21	2.3	-		740-627	C	37	4.3	-	67	
9	92-1732	C	42	4.6	-		968-873	C	31	3.4	-	None	
10	1524-1631	V	35	4.1	-		1642-1755	V	3.7	3.7	+	None	
11	1033-989	C	14	1.8	-		648-719	V	23	2.8	-	None	

^a Traits compared were genomic position and orientation of ORF (which viral nucleic acid strand the ORF encoded), predicted size of ORF-encoded protein (number of amino acids and molecular mass), presence of potential glycosylation sites, and homology between ORFs in pmws PCV and np PCV.

^b V, virus strand; C, complementary strand.

^c Glyc, glycosylation site; +, contains glycosylation signal (asparagine sequon N-X-S or N-X-T); -, does not contain asparagine sequon.

© 1998 par " the American Society for Microbiology".

J. Virol. 72. Tirée de Hamel et al., 1998.

l'ORF1 est celle pour laquelle on note le plus haut degré de conservation entre les souches des deux sérotypes, soit plus de 85% d'identité, représentant fort probablement la protéine Rep (ADN polymérase), requise pour la réplication du génome. Ceci est supporté par le fait qu'il a été possible d'identifier trois motifs caractéristiques des réplicases impliquées dans le modèle du cercle roulant à l'intérieur des l'ORF1 du CVP2 (Mankertz *et al.*, 2000). Par contre, il existe une plus grande variabilité dans le cas l'ORF2 des virus des deux sérotypes, recouvrant la seconde moitié du génome, codant pour une protéine correspondant probablement à la capside virale. Il existe pour les ORF2 des deux sérotypes moins de 62 à 66% d'identité au niveau des séquences prédites en acides aminés (Mankertz *et al.*, 2000, Hamel *et al.*, 1998). Jusqu'à récemment, aucune des protéines déduites des séquences nucléotidiques du génome des virus des deux sérotypes n'a pu être caractérisée expérimentalement, ni visualisée après électrophorèse sur gels de polyacrylamide-SDS. Récemment, des groupes de chercheurs ont finalement réussi à caractériser la protéine de la capside du CVP2. En plus d'avoir exprimé l'ORF2 dans des cellules d'insecte, suite au clonage du gène dans le vecteur d'expression baculovirus et de l'avoir caractérisé par immunobuvardage, une équipe de chercheurs français a identifié au niveau de la protéine 4 régions immunoréactives dominantes au moyen d'analyse PEPSCAN (Mahé *et al.*, 2000). Dans l'une de ces régions, certains peptides se sont avérés correspondre à des épitopes immunogènes distincts d'où leur importance pour la discrimination entre les souches des deux sérotypes. Ce qui laisse envisager leur utilisation dans la mise au point de tests de diagnostic sérologique spécifiques. D'autre part, une équipe de chercheurs américains a identifié une protéine structurale de 30 kDa codée par l'ORF2 du CVP2. L'association du produit de l'ORF2 à la structure du virus a été démontrée par le fait que cette protéine forme, de façon indépendante, des capsides virales vides. En effet, ces particules défectives ont été observées au microscope électronique après avoir été exprimées dans des cellules d'insectes, via le système d'expression baculovirus (Nawagitgul *et al.*, 2000).

Épidémiologie

Des sérums de porcs contenant des anticorps anti-CVP1 ont été dénombrés en Allemagne (Tischer *et al.*, 1995), au Canada (Dulac GC *et al.*, 1989), en Nouvelle-Zélande (Horner, 1991), en Grande-Bretagne (Edwards *et al.*, 1994), et en Irlande du Nord (Allan *et al.*, 1994). Compte tenu de ces observations, il a été stipulé que l'infection par le CVP1 chez les porcs est probablement omniprésente dans tous les pays producteurs de porcs. En effet, de nombreuses études épidémiologiques traitant des infections au CVP1 à l'intérieur des troupeaux de porcs ont été rapportées. Dans une étude, 60% des sérums de porcs en provenance des abattoirs d'Allemagne se sont avérés posséder des titres en anticorps contre le CVP1 aussi élevés que ceux trouvés chez des porcs deux à trois semaines après avoir été infectés expérimentalement avec le virus. À partir de ces résultats, les auteurs ont conclu que l'infection des porcs par le CVP1 se produit probablement dans les unités d'engraissement, où les porcs se transmettent l'infection l'un à l'autre par suite des contacts très rapprochés entre les animaux sains et les animaux infectés (Tischer *et al.*, 1986). Dans une autre étude plus détaillée, il a été observé que le pourcentage des sérums négatifs pour le CVP1 diminuait à mesure que l'âge des porcs augmentait, soit une proportion d'animaux infectés de 65,56 % aux alentours de la période de sevrage et de seulement 5,6 % chez les porcs les plus âgés des élevages (Tischer *et al.*, 1995). Les études longitudinales portant sur le suivi de la cinétique de la production en anticorps pour le CVP1, dans deux portées de porcs en Irlande du Nord, ont montré que les anticorps pour le CVP1 dans les sérums maternels disparaissent 8 à 9 semaines après la naissance (Allan *et al.*, 1994). D'autre part, il a été observé que les anticorps réapparaissent dans le sérum des porcelets 11 à 14 semaines après la naissance, indiquant que ces porcs ont été exposés au virus entre les semaines 11 et 13 après la naissance. Selon certains auteurs, cet intervalle de temps correspond au mouvement des porcs de l'unité d'élevage à l'unité d'engraissement (Tischer *et al.*, 1986, Allan et Ellis, 2000).

Certains chercheurs se sont intéressés à savoir si les anticorps contre le CVP pouvaient se retrouver chez d'autres espèces. À cet effet, 5 travaux de recherche ont été effectués afin de connaître la distribution des anticorps contre le CVP chez d'autres espèces

partageant le même environnement. Trois de ces études ont démontré l'absence d'anticorps contre le CVP1 dans les sérums des bovins, chèvres et humains (Tischer *et al.*, 1982, Allan *et al.*, 1994, Allan & McNeilly *et al.*, 2000). Par contre, dans l'une de ces études, une faible réactivité aux antigènes du CVP1 a pu être démontrée dans le sérum de bovins, souris et humains en Allemagne, suggérant que ces espèces avaient pu être exposées à un virus similaire au CVP1 (Tischer *et al.*, 1995). En effet, ces auteurs ont rapporté que la présence d'anticorps réagissant contre le CVP1 a été trouvée dans 35% des sérums de bovins, en utilisant des tests d'IFI et/ou ELISA. Toutefois, en Irlande du Nord, les résultats d'IFI se sont avérés négatifs pour la détection d'anticorps contre le CVP1 dans les sérums de 350 bovins (Allan *et al.*, 1994). Enfin, dans une étude plus récente, la détection de l'ADN du CVP2 par PCR à partir de tissus de 6 bovins sur 100 au prises avec des problèmes respiratoires (bovine respiratory disease) et de 4 sur 30 fœtus bovins avortés ont été rapportés au Canada (Nayar *et al.*, 1999). De plus, ces mêmes auteurs ont détecté par immunohistochimie des antigènes du CVP2 dans le poumon de l'un de ces cas de problèmes respiratoires chez des bovins. Cet agent a été provisoirement surnommé le circovirus bovin (CVB), un virus qui partagerait plus de 99% d'identité au niveau des nucléotides avec le CVP2 (Meehan *et al.*, 1998). Les résultats présentés dans ces études ont révélé d'une part, que le CVP1 peut infecter tant les bovins que les porcs, et d'autre part, que l'existence de circovirus bovins et humains était probablement possible. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires afin de clarifier la situation sur les infections semblables au CVP chez les animaux de ferme et les humains. Récemment, des chercheurs ont fait la découverte d'un circovirus humain, le TTV ("transfusion transmitted virus"), aucun lien n'a cependant été trouvé avec les CVPs (Nishizawa *et al.*, 1997, Mushahwar *et al.*, 1999). L'organisation génomique du TTV n'a montré des similitudes qu'avec le virus CAV aviaire (Miyata *et al.*, 1999), membre à part des *circoviridae*.

L'excrétion du CVP1 dans les fèces et dans le mucus nasal aux 13^e et 14^e jour post-infection a été démontrée après avoir expérimentalement infecté des porcelets séronégatifs âgés d'un jour (Tischer *et al.*, 1986). L'isolation du CVP à partir de porcelets nouveau-nés (Allan *et al.*, 1995), la transmission du syndrome de tremblement congénital

à des porcelets après inoculation du CVP1 à des truies séronégatives (Hines *et al.*, 1994) représentent des évidences que les infections verticales du CVP aux fœtus peuvent se produire. Toutefois, aucune étude n'a été publiée sur l'excrétion du CVP1 chez les animaux infectés naturellement ou sur le mode de transmission du CVP1 entre les porcs dans les troupeaux.

Des études ont rapporté que les anticorps contre le CVP2 sont très répandus chez les porcs de l'Est et l'Ouest canadiens (Harding *et al.*, 1998, Cottrell *et al.*, 1999), de même qu'en Angleterre (Walker *et al.*, 2000). Récemment, des anticorps réagissant contre le CVP2 ont été trouvés dans 97.8% des sérums de porcelets âgés de 1 à 5 mois, provenant de fermes espagnoles (Rodriguez-Arrioja *et al.*, 2000). Par contre, seulement 52.2% des cas avaient des anticorps contre le CVP1. Récemment, tous les 120 sérums récoltés de porcs d'une ferme Irlandaise ayant connu une épidémie du SDPS associé au CVP2 ont réagi fortement contre les antigènes du CVP2 en utilisant les tests d'IFI et d'ELISA (Allan, McNeilly *et al.*, 2000). La même situation fut aussi rapportée en France. Récemment, les anticorps contre le CVP2, de même que l'ADN du CVP2 ont pu être décelés à l'aide d'un test d'IFI et d'un test de PCR, respectivement, dans le sérum et la semence de sangliers infectés. Ces derniers avaient été inoculés par la voie intra-nasale avec un isolat du CVP2 propagé en cultures cellulaires (Larochelle *et al.*, 2000). Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent une nouvelle voie d'investigation quant au mode de transmission du CVP2, une transmission fécale-orale expérimentale pourrait être envisagée en rapport à cette question. D'autant plus que très peu d'informations ont été publiées concernant le mode de transmission du CVP2 ou le profil d'excrétion.

Maladie associée au CVP

CVP1

Basé sur des études expérimentales, le CVP1 est reconnu comme étant un virus non-pathogène (Allan *et al.*, 1995, Tischer *et al.*, 1986). En effet, des infections expérimentales avec le CVP1 (dérivant de la lignée cellulaire PK/15) ont été produites

chez 6 porcs miniatures âgés de 9 mois (Tischer et al., 1986). Suite à cette infection, les auteurs ont été en mesure de récupérer du virus dans les fèces et dans les écouvillons nasales. De plus, tous les échantillons ont séroconverti pour le CVP1, mais aucun n'a démontré de signes de maladie ou de lésions microscopiques suite aux examens post-mortem. Dans cette même expérience, les auteurs ont inoculé du CVP1 à 4 porcelets âgés de 1 jour, et une fois de plus, ils n'ont pas réussi à reproduire des manifestations cliniques de maladie ou des changements macroscopiques lors des examens post-mortem. Dans une autre étude similaire, les auteurs n'ont pas pu produire de maladie clinique après avoir inoculé avec du CVP1 des porcs privés de colostrum âgé de 2 jours (Allan *et al.*, 1995). Par contre, ils ont démontré la présence des antigènes du virus, à l'aide de tests d'IFI sur des sections congelées des tissus du système lymphoïde, des poumons et de l'intestin. La prédominance des antigènes viraux dans les tissus lymphoïdes (rate, thymus) et les poumons, de même que leur association à des cellules de la lignée monocyte /macrophage ont amené les chercheurs à conclure que les infections par le CVP1 peuvent compromettre l'efficacité du système immunitaire des porcs. Cette conclusion vient appuyer les résultats *in vitro* d'autres chercheurs ayant démontré que l'inoculation de macrophages alvéolaires porcins avec le CVP1 affecte certaines fonctions immunes de ces cellules (McNeilly *et al.*, 1996).

Comme il a été mentionné antérieurement, le CVP1 est en général largement distribué dans les troupeaux de porcs domestiques avec des index de séroprévalence élevés. Or, jusqu'à présent, aucune corrélation n'a pu être démontrée entre le titre des anticorps anti-CVP1 et quelconque trouble chez les porcs. De plus, aucun signe clinique n'a pu être reproduit suite à l'infection expérimentale de porcs avec du CVP1. Ces résultats suggèrent que cette souche n'a aucune importance significative quant à son implication comme risque potentiel pour la santé animale.

CVP2

Dans le cadre historique de la découverte du CVP2, l'identification de l'agent infectieux ainsi que son association à une maladie spécifique ont été reconnues presque 10 ans après que la maladie dont il est la cause ait été rapportée pour la première fois à la

communauté scientifique. En effet, le CVP2 est devenu un agent d'intérêt général lorsqu'une nouvelle maladie porcine a été diagnostiquée dans plusieurs pays occidentaux, soit le syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage des porcs (SDPS).

Le syndrome de dépérissement multisystémique en post-sevrage des porcs ou le SDPS est une nouvelle maladie qui affecte le plus souvent les jeunes porcelets entre 5-12 semaines d'âge (Allan & McNeilly *et al.*, 1998, Ellis *et al.*, 1998). D'autres auteurs ont remarqué que ce syndrome se développe normalement à un très jeune âge chez les porcelets, soit 3 à 5 semaines après leur naissance (Harding *et al.*, 1997). Des études post-mortem rétrospectives ont révélé que cette condition pathologique et apparue pour la première fois en 1991, mais n'a seulement été reconnue comme étant une maladie spécifique qu'en 1996 (Harding, 1996). Un syndrome similaire a été par la suite décrit chez les porcs aux États-Unis (Daft *et al.*, 1996), en France (LeCann *et al.*, 1997), en Irlande du Nord (Kennedy *et al.*, 1999), en Espagne (Segalés *et al.*, 1997), en République d'Irlande (Spillane *et al.*, 1998), au Danemark (Allan *et al.*, 1999), en Allemagne (Hinrichs *et al.*, 1999) et au Japon (Onuki *et al.*, 1999).

Les signes cliniques du SDPS les plus communs incluent une perte de poids, de la dyspnée, de la tachypnée, une hypertrophie visible des nœuds lymphatiques et moins fréquemment de la pâleur de la peau, une diarrhée chronique et de la jaunisse (Ellis *et al.*, 1998, Harding, 1997). Selon les chercheurs, la morbidité et la mortalité associées au SDPS varient selon le stade de l'épidémie et la gestion sanitaire à l'intérieur des unités infectées (Allan *et al.*, 2000). De plus, ils ajoutent que lors d'une épidémie importante, la mortalité peut atteindre un niveau de 10%, alors que la morbidité et la mortalité dans des troupeaux infectés endémiquement peuvent être moins élevées. Par contre, d'autres études ont révélé des taux de morbidité s'étalant de 5 à 50% dans des troupeaux infectés (Morozov *et al.*, 1998, Madec *et al.*, 2000), avec presque 100% de mortalité chez les porcelets malades (Morozov *et al.*, 1998). D'autre part, il a été rapporté que certains facteurs environnementaux comme le surpeuplement, la détérioration de la qualité de l'air, le mélange de groupes d'âges hétérologues et autres événements perturbateurs peuvent exaspérer la sévérité de la maladie (Harding, 1997).

Les lésions macroscopiques chez les porcs atteints du SDPS sont assez variables, mais les plus communément observées se situent au niveau des poumons et des nœuds lymphatiques. Il a été remarqué durant les nécropsies que les plus frappantes lésions sont l'hypertrophie des nœuds lymphatiques. D'autres lésions ont aussi été observées, notamment des poumons non collapsés avec présence de plaques oedémateuses, l'ulcération de la partie œsophagienne de l'estomac et une consolidation pulmonaire au niveau cranioventral (Rossel *et al.*, 1999).

Les lésions microscopiques associées au SDPS se retrouvent au niveau des organes lymphoïdes (incluant nœuds lymphatiques, amygdales, plaques de Peyer et la rate), les poumons, le foie, les reins, la peau et le système digestif (**tableau 5**). C'est d'ailleurs sur ces lésions impliquant une multitude d'organes que les auteurs se sont inspirés, en partie, pour proposer le terme anglais du SDPS, "Post-weaning multisystemic wasting syndrome" (Harding, 1996, Clark, 1996). Les lésions microscopiques qui ont été décrites de façon exhaustive dans un rapport sur la pathologie du SDPS (Rossel *et al.*, 1999) se résument comme suit 1) un degré variable de déplétion lymphocytaire, affectant à la fois les zones parafolliculaires et les follicules lymphoïdes; 2) une infiltration multifocale, progressive à diffuse, de cellules histiocytaires (macrophages mobiles) dans les tissus lymphoïdes; 3) la présence de cellules syncytiales spécialement dans les organes lymphoïdes; 4) la présence nettement démarquée de corps d'inclusion sphérique, intracytoplasmiques et basophiliques dans les cellules histiocytaires. Cette dernière observation est la plus importante puisqu'elle caractérise de façon spécifique le syndrome SDPS. Les lésions lymphoïdes notées sont suggestives d'un état d'immunosuppression. Les lésions qui ont été observées ailleurs qu'au niveau des organes lymphoïdes incluent une pneumonie interstitielle à granulomateuse, une infiltration mononucléaire périportale du foie (à des degrés variables) et une néphrite interstitielle. La description des lésions rencontrées dans les différents organes est récapitulée plus en détail au **tableau 5**.

Plusieurs études suggèrent que ces lésions et la symptomatologie sont attribuables à une infection par le CVP2 (Allan & McNeilly *et al.*, 1998, Ellis *et al.*, 1998, Morozov *et*

Tableau 5 Tropisme tissulaire du CVP2 et lésions observées dans les différents organes des porcs.

Organes	Lésions macroscopiques et microscopiques
Peau	Pâleur de la peau. Ictère.
Poumons	Collapsus pulmonaire et augmentation de la fermeté. Nombreuses tâches diffuses avec des endroits de consolidation dans les régions ventrales antérieures. Lymphocytose histiocyttaire multifocale jusqu'à une pneumonie interstitielle lymphohistocytaire à granulomateuse. Observation de foyers de nécrose et d'escharres (croûtes noirâtres) sur l'épithélium des conduits aériens qui peut progresser vers une bronchiolite oblitérante.
Tissus lymphoïdes	Lymphadénopathie systémique remarquable, impliquant les nœuds lymphatiques médiastinaux, bronchiaux, mésentériques et inguinaux qui, à la coupe apparaissent blanchâtres et homogènes. Infiltration de cellules histiocytaires et de cellules géantes dans les nœuds lymphatiques. Corps d'inclusion intracytoplasmiques fréquents dans la région des cellules B dépendante.
Rate & Plaque Peyer's	Des changements similaires aux tissus lymphoïdes sont également observés.
Foie	Peut être légèrement ictérique jusqu'à remarquablement atrophié avec du tissu conjonctif interlobulaire. Phase avancée: maladie hépatique, dégénérescence hydropique important et vacuolisation des hépatocytes avec un remplacement de ceux-ci par des cellules histiocytaires.
Reins	Infiltration lymphohistocytaire diffuse à multifocale et éosinophile du tissu conjonctif péripelvique avec œdème et desmoplasie. Une vasculite non suppurative multifocale a été souvent trouvée dans ces régions. Les lésions du cortex varient d'une atrophie tubulaire multifocale à une nécrose tubulaire importante avec œdème, néphrite interstitielle et fibreuse.
Système gastro-intestinal	La paroi de l'estomac peut être pâle, œdémateuse et ulcérateuse, mais non hémorragique notamment au niveau de la portion œsophagienne de l'estomac. La paroi des intestins est amincie spécialement au niveau de l'iléum et du côlon spiralé. Une atrophie des villosités intestinales avec une légère à sévère infiltration lymphohistocytaire est souvent observée et transmurale.

al., 1998, Ouardani *et al.*, 1999). Dans tous les rapports où il a été question d'isolation du circovirus à partir de lésions chez des porcs présentant le SDPS, les auteurs ont démontré en abondance la présence des antigènes du CVP2 et/ou de son acide nucléique et ce, en association avec les lésions histologiques décrites auparavant. Dans la majorité des cas, les particules du CVP2 ont aussi été isolées à partir de tissus des porcs malades. Les antigènes du CVP2 ont été retrouvés régulièrement dans les organes lymphoïdes, les poumons, le foie et, à un degré moindre dans les reins. Par ailleurs, les cellules les plus permissives à la réplication du CVP incluent les cellules de la lignée macrophagique/monocyte et les cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules épithéliales comme les cellules des tubules rénaux, les cellules des épithéliums bronchiaux et bronchiolaires, les cellules endothéliales, les hépatocytes et les lymphocytes ont tous été identifiées comme étant permissives à la réplication du CVP2, cependant à un moindre degré (Rossel *et al.*, 1999, Allan *et al.*, 2000).

Même si tous les cas de SDPS rapportés jusqu'à présent étaient associés fortement à une infection par le CVP2 (tous les porcs malades avaient des anticorps pour le CVP2, comme mentionné à la section d'épidémiologie), la corrélation existante entre l'apparition des signes cliniques du SDPS et la présence du CVP2 chez le porc n'a pas toujours été évidente. À présent, il est connu que la présence d'anticorps réagissant avec le CVP2 chez les porcs, présentant ou non les signes cliniques du SDPS, ne signifie pas que les porcs ont développé la maladie (Walker *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré qu'une infection de porcs avec le virus CVP2 ne produit pas nécessairement les signes cliniques. Dans une étude de corrélation entre des observations cliniques et histopathologiques et la détection de l'ADN du CVP par PCR non différentiel, les auteurs ont rapporté la présence d'ADN du CVP2 dans 3 des 8 cas d'infection clinique n'ayant aucun rapport avec le SDPS (Ouardani *et al.*, 1999). L'absence de signes cliniques typique du SDPS chez les porcs dont le CVP2 a été décelé peut s'expliquer par divers facteurs, à savoir: la virulence de la souche de CVP2, la présence ou non d'une co-infection avec d'autres agents comme le parvovirus, en plus de facteurs externes pouvant aussi jouer un rôle synergique dans la pathologie du SDPS (Ellis *et al.*, 1999, Allan & McNeilly *et al.*, 2000, Walker *et al.*, 2000).

La possibilité d'une coinfection a été le sujet d'étude de plusieurs investigateurs prônant un effet synergique éventuel de 2 virus dans le développement de la forme sévère du SDPS (Allan & Kennedy *et al.*, 1999, Ellis *et al.*, 2000). En effet, ces auteurs ont obtenu des résultats qui supportent le concept selon lequel le parvovirus porcin (PVP) soit l'un des cofacteurs impliqués dans la progression ou l'évolution clinique de la maladie. Il a été rapporté qu'un autre agent viral, tout particulièrement, le virus du SRRP serait aussi susceptible d'agir en synergie avec le CPV2 dans la pathologie du SDPS (Ellis & Krakowka *et al.*, 1999). L'implication du PVP dans le syndrome SDPS a été suggérée lorsque certains chercheurs ont démontré, chez des animaux inoculés expérimentalement avec le PCV2 et ayant développé les symptômes typiques du SDPS, qu'ils pouvaient détecter la présence simultanée des PPV et CPV2 à partir de leurs tissus par PCR et immunohistochimie, mais que les animaux où ils ne retrouvaient que le PCV2, les signes étaient plutôt mitigés (Ellis *et al.*, 1999). C'était la première fois que des investigateurs réussissaient à reproduire les signes cliniques majeurs du SDPS, après avoir inoculé à des porcs du CVP2 purifié à partir de tissus de porcs atteints du SDPS. D'autres auteurs ont refait des essais d'infection mixte afin d'appuyer cette étude et de répondre, de façon concluante, aux critères du postulat de Koch (Balasch *et al.*, 2000, Ellis *et al.*, 2000, Magar & Larochelle *et al.*, 2000). Par ailleurs, des études portant sur la transmission expérimentale du CVP2 par voie intranasale chez des porcelets SPF, a révélé que le CVP2 peut induire les lésions du SDPS chez le porc en l'absence de PVP ou autres pathogènes communs (Magar & Larochelle *et al.*, 2000).

Diagnostic

Le SDPS est une nouvelle entité clinique chez le porc; pour cette raison, il est encore difficile de le reconnaître et de le différencier avec d'autres syndromes similaires, présentant des signes cliniques analogues. En effet, il est particulièrement difficile de distinguer le SDPS avec le syndrome reproducteur et respiratoire porcin ou l'anorexie et famine du porc en postsevrage ("postweaning anorexia/ starvation"), par exemple. Ce n'est que suite aux examens postmortem que les pathologistes vétérinaires ont pu diagnostiquer de façon définitive un SDPS. En effet, les examens histopathologiques

rèvelent une caractéristique unique au SDPS, soit la présence de corps d'inclusions intracytoplasmiques et basophiliques dans les coupes de tissus d'origine lymphoïde (Harding et Clark, 1997). Puisque le diagnostic final ne peut se faire qu'après la mort de l'animal, il a fallu développer des tests qui permettent aux éleveurs de porcs et aux vétérinaires praticiens de connaître le statut des animaux ou des fermes relativement au SDPS. Les centres de recherche en médecine vétérinaire se sont donc investis dans le développement de tests sérologiques et moléculaires spécifiques à cette nouvelle entité.

L'association des lésions du SDPS avec la présence du CVP2 dans les tissus de porcs malades est à la base du développement de ces tests. En somme, les stratégies suggérées dans le développement de tests de diagnostic sont de deux types. 1- une approche directe, où les composantes du virus sont ciblées (virus entier, protéines, acide nucléique), 2- une approche indirecte, où c'est la présence d'anticorps contre le CVP2 chez des porcs malades ou convalescents qui est ciblée (**tableau 6**). Dans la première approche, des auteurs sont parvenus à identifier les particules du CVP au moyen de la microscopie électronique à partir de tissus de porcs montrant des signes cliniques du SDPS (Ellis *et al.*, 1998, Kiupel *et al.*, 1998, Mankertz *et al.*, 2000). De nombreux investigateurs ont développé des tests moléculaires au moyen d'oligonucléotides dirigés contre l'acide nucléique du CVP2, soit des techniques d'hybridation moléculaire *in situ*, ainsi que diverses approches de la technique PCR (**tableau 7**). Ces tests sont devenus populaires étant donné les avantages qu'ils offrent, leur spécificité, leur sensibilité, leur rapidité, etc. Comme l'hybridation *in situ*, les tests immunohistochimiques ont été les premiers à avoir été utilisés dans la détection du CVP2, en plus de démontrer l'implication des particules virales dans le SDPS (Ellis *et al.*, 1998, Kiupel *et al.*, 1998, Sorden *et al.*, 1999). Cependant, l'isolement du virus en cultures cellulaires n'a pu être associé à aucun effet cytopathique (Allan, McNeilly *et al.*, 1998, Meehan *et al.*, 1998, Ouardani *et al.*, 1999), d'où cette approche est peu utilisée comme moyen de diagnostic étant donné que la croissance virale ne peut être confirmée que suite à une analyse sérologique, comme l'immunofluorescence indirecte ou l'immunoperoxydase indirecte, à l'aide d'anticorps monoclonaux ou antisérums polyclonaux monospécifiques. Dans l'approche indirecte, ce sont les anticorps contre le CVP2 qui doivent être détectés. En

Tableau 6 Approches utilisées dans la détection du CVP associé au SDPS par diverses techniques de diagnostic.

Approches	Prélèvement	Techniques
Directes		
- particules virales	tissus	isolement en cultures cellulaires, M.E.T. *
- ADN virale	tissus, semences	tests moléculaires (PCR et hybridation <i>In situ</i>)
- antigènes viraux	tissus	immunohistochimie
Indirectes (sérologiques)		
- Anticorps anti-CVP2	sang	IF, ELISA

*M.E.T. : microscope électronique à transmission et coloration négative

IF : immunofluorescence

ELISA : "Enzyme-linked immunosorbent assay"

Tableau 7 Cumulatif des tests de diagnostic suggérés dans la littérature pour la détection du CVP2 chez les porcs présentant les signes cliniques du SDPS.

Tests diagnostiques		Références
Tests moléculaires	Hybridation <i>In situ</i>	Allan & McNeilly <i>et al.</i> , 1998, Ellis <i>et al.</i> , 1998, Morozov <i>et al.</i> , 1998, Rossel <i>et al.</i> , 1999, Choi <i>et al.</i> , 2000, Sirinarumitr <i>et al.</i> , 2000.
	PCR	Hamel <i>et al.</i> , 1998, Allan & McNeilly <i>et al.</i> , 1999.
	Multiplex PCR	Ouardani <i>et al.</i> , 1999
	PCR-RFLP	Fenaux <i>et al.</i> , 2000
	c-PCR	Liu <i>et al.</i> , 2000
Tests sérologiques	IFI	Allan <i>et al.</i> , 1998, Ellis <i>et al.</i> , 1999.
	c-ELISA	Walker <i>et al.</i> , 2000.

effet, à l'aide de tests d'IFI, où des conjugués anti-gammaglobulines de porc sont utilisés, de même que des isolats de référence du CVP2 propagés en cultures comme source d'antigène, il est possible de détecter les anticorps contre le CVP dans le sérum des porcs montrant des signes cliniques caractéristiques du SDPS (Allan, McNeilly *et al.*, 1998, Ellis *et al.*, 1998). Toutefois, ces tests ne permettent pas de différencier entre les anticorps contre le CPV1 et ceux contre le CPV2, étant donné les réactions antigéniques croisées existant entre les différents épitopes de la nucléocapside du virus (Allan, McNeilly *et al.*, 1998, Rodriguez-Arrioja *et al.*, 2000).

Récemment, des auteurs ont développé un test d'ELISA compétitif afin de détecter la présence d'anticorps spécifiques au CVP2. Ce test utilise comme antigène, un lysat cellulaire de PK-15 infecté avec le CVP2 et comme réactif opposé, un anticorps monoclonal spécifique au CVP2. Si le sérum de porc testé bloque la réactivité de l'anticorps monoclonal, c'est que l'animal a produit des anticorps spécifiques au CPV2.

Dans un rapport, des auteurs ont observé que certains anticorps monoclonaux produits contre le CVP1 ne reconnaissent pas le CVP2, et les anticorps monoclonaux produits contre le CVP2 font de même par IFI sur une monocouche de cellules infectées (Allan, McNeilly *et al.*, 1999). Ces travaux ont démontré qu'il existe des différences antigéniques entre les CVP1 et CVP2. Dans un autre rapport, un sérum hyperimmun ayant été obtenu suite à l'immunisation de lapins avec le CVP2 a démontré une légère réaction croisée avec le CVP1 sur des monocouches de cellules infectées (Allan, McNeilly *et al.*, 1998). À la lumière de ces résultats, l'utilisation d'anticorps monoclonaux, à l'instar des antisérums polyclonaux hyperimmuns, semble être plus avantageuse à des fins de développement de trousse de diagnostic différentiel. Par ailleurs, lorsque les sérums hyperimmuns sont utilisés comme outils de diagnostic, certains auteurs ont recommandé de les tester à de hautes dilutions pour faciliter l'interprétation des résultats, car à haute dilution ces sérums peuvent perdre leur réactivité contre la souche hétérologue (Allan et Ellis, 1999).

Toutefois, aucune des techniques rapportées antérieurement ne suffit à elle seule pour confirmer que l'animal est atteint du SDPS. De plus, comme il a été mentionné auparavant (section: maladie associée au CVP), il est possible que l'animal soit infecté à un certain niveau avec le CVP2 sans présenter nécessairement les signes cliniques du SDPS. Ainsi, afin d'obtenir un diagnostic définitif, il est recommandé de démontrer la présence de CVP2 (acide nucléique et/ou des antigènes) par une ou deux de ces épreuves, en plus de constater les lésions typiques du SDPS (Allan *et al.*, 2000).

Jusqu'à présent, aucune trousse de diagnostic différentiel développée par les laboratoires de recherche n'a été commercialisée. Cependant, quelques institutions académiques affiliées offrent présentement un service de diagnostic pour le SDPS, basé sur la détection moléculaire de l'acide nucléique du CVP2. Par ailleurs, grâce à certains travaux de recherche, comme l'identification d'épitopes immunogènes au niveau de la protéine de la capsid du CVP2, la commercialisation d'un test sérologique différentiel ne devrait pas tarder.

CHAPITRE 1

Volet de diagnostic moléculaire

1.1 Introduction

Le premier volet de ce projet de recherche consistait à mettre en évidence, grâce à la technique de PCR, un circovirus porcin dans les tissus de porcs présentant des signes cliniques et lésions compatibles avec la nouvelle entité clinique, soit le syndrome SDPS. Puis, il fallait démontrer, à l'aide d'un test PCR multiplex (mPCR) et des analyses de séquençage, que ce circovirus porcin isolé de porcs atteints du SDPS était distinct de celui retrouvé dans la lignée cellulaire PK-15. Ces objectifs constituaient en somme les hypothèses émises dans ce projet de maîtrise. Afin d'y parvenir, diverses amorces oligonucléotidiques ont été conçues d'abord à partir de la séquence d'ADN de la souche PK-15 du CVP, puis ensuite à partir de celle de la souche ayant été associée au SDPS dans l'ouest canadien (Hamel et al. 1998).

Ce chapitre portant sur le diagnostic moléculaire a été subdivisé en deux parties: la première partie contient l'article sur la détection et le typage des circovirus porcins au moyen d'un multiplex PCR, accompagné d'un erratum et d'un sommaire (section 1.2); la deuxième partie porte plutôt sur les résultats des analyses de séquences de trois isolats québécois de CVP2 ainsi qu'une courte discussion (section 1.3).

1.2 Sommaire

Des paires d'amorces oligonucléotides ont été conçues suivant les séquences des cadres de lecture ouverts ORF1 et ORF2 d'un prototype de la souche CVP1 non pathogénique infectant les cellules PK-15 de façon persistante. À l'aide de la technique PCR, appliquée avec ces amorces, l'ADN ou l'ARN génomique d'autres pathogènes viraux ou bactériens des voies respiratoires de porcs n'a pu être amplifié. Cependant, une réaction d'amplification positive a pu être visualisée à partir de l'ADN extrait d'une suspension de CVP1 contenant aussi peu que 10 particules par ml. Par contre, aucun fragment d'ADN n'a pu être amplifié à partir de lysats de lignées cellulaires porcines (cellules PT, ST et PFT), lesquelles sont reconnues comme étant négatives pour le PCV. L'application de la technique PCR sur des échantillons cliniques prélevés de porcs, a révélé presque 93% (13 de 14 échantillons) de corrélation entre les résultats obtenus par PCR et ceux des examens histopathologiques et immunohistochimiques. Des infections sous-cliniques de PCV ont pu être détectées par PCR, à partir des échantillons cliniques provenant d'animaux sans problèmes respiratoires et/ou entériques. Sur la base des séquences nucléotidiques des souches PCV (PCV2), associées récemment aux épidémies du syndrome de dépérissement en post-sevrage des porcs (SDPS) affectant les porcheries du Québec et du Canada, d'autres amorces ont été conçues à partir du génome du PCV1. Celles-ci se sont avérées inaptes à amplifier les fragments génomiques spécifiques aux gènes ORF1 et ORF2 des isolats cliniques associées au SDPS, mais en mesure d'amplifier l'ADN issu de la souche PCV1. Deux méthodes PCR multiplex (mPCR) rapides ont été développées pour distinguer entre les deux génotypes de PCV. Dans le premier mPCR, une paire d'amorces a été utilisée pour amplifier un fragment d'ADN de 488 pb spécifique aux gènes ORF2 des deux génotypes, alors qu'une seconde paire n'a pu amplifier un fragment de 375 pb spécifique au gène ORF1 de la souche PCV-1. Dans le second mPCR, deux paires d'amorces ont été utilisées, la première pour amplifier spécifiquement un fragment

d'ADN de 646 pb du gène ORF1 des deux génotypes, la seconde pour amplifier un fragment de 425 pb qu'à partir du gène ORF2 de la souche PCV2. Grâce à ces deux méthodes mPCR, une infection de PCV2 dans les tissus de 94.2% (33 des 35) des porcs malades a été démontrée, en accord avec les résultats rapportés antérieurement, lesquels montraient une étroite association du nouveau génotype de PCV avec les épidémies de SDPS rapportées en Europe et en Amérique du Nord. D'autre part, une infection de PCV1 a été confirmée que dans seulement 5.7% (2 des 35) des porcs, alors qu'une infection mixte avec du PCV2, a pu être confirmée dans ce même échantillonnage à l'aide d'un simple PCR utilisant des amorces spécifiques au PCV2.

1.3 Article scientifique

Multiplex PCR for Detection and Typing of Porcine Circoviruses

M. OUARDANI,¹ L. WILSON,¹ R. JETTÉ,^{1,2} C. MONTPETIT,¹ AND S. DEA^{1*}

Centre de Microbiologie et Biotechnologie, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec,¹ and Laboratoire de Pathologie Animale, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec,² Laval, Québec, Canada, H7N 4Z3

Received 10 March 1999/Returned for modification 11 May 1999/Accepted 4 August 1999

Sets of oligonucleotide primers were designed according to the sequences of the open reading frames (ORFs) ORF1 and ORF2 of the prototype nonpathogenic PK-15 strain of porcine circovirus (PCV) type 1 (PCV-1). By the PCR performed with the various primer sets, genomic DNA or RNA from other bacterial or viral pathogens of the respiratory tracts of pigs could not be amplified. A positive amplification reaction could be visualized with DNA extracted from a viral suspension containing as few as 10 viral particles per ml. No DNA fragment could be amplified from lysates of continuous porcine cell lines (PT, ST, and PFT cells) known to be negative for PCV. When tested with clinical samples from pigs, the results of the single PCR method showed nearly 93% (13 of 14 samples) correlation with histopathological and immunohistochemical findings. Interestingly, sub-clinical PCV infections could be detected by single PCR with clinical samples that have been submitted from animals with irrelevant cases of respiratory and/or enteric problems. On the basis of the nucleotide sequences of PCV strains (PCV-2) recently associated with outbreaks of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Quebec, Canada, pig farms, other primers were designed from the PCV-1 genome, and these primers failed to amplify genomic fragments specific to the ORF1 or ORF2 genes of clinical isolates associated with PMWS but amplified DNA from the PCV-1 strain. Two rapid multiplex PCR (mPCR) methods have been developed to distinguish between both genotypes of PCV. By those two mPCR methods, (i) species-specific primer pairs were used to amplify a DNA fragment of 488 bp specific for the ORF2 genes of both genotypes, whereas a 375-bp fragment was amplified from the ORF1 gene of the PCV-1 strain only, or (ii) species-specific primer pairs were used to amplify a DNA fragment of 646 bp specific for the ORF1 genes of both genotypes, whereas a 425-bp fragment was amplified from the ORF2 gene of the PCV-1 strain only. By both mPCR methods, a PCV-2 infection was demonstrated in tissues of 94.2% (33 of 35) of the sick pigs tested, in agreement with previous findings showing the close association of this new genotype of PCV with outbreaks of PMWS in Europe and North America. On the other hand, a PCV-1 infection was confirmed in only 5.7% (2 of 35) of the pigs, and confirmation of a mixed infection with PCV-2 was obtained by a single PCR with PCV-2-specific primers.

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is an apparently new disease of 5- to 8-week-old pigs being diagnosed with increasing frequency in Canada (4, 11, 15), the United States (2, 5, 17), and Europe (2, 18, 29). Clinically, the disease is characterized by progressive weight loss, respiratory signs (tachypnea, dyspnea), and jaundice (2, 11, 25). Consistent macroscopic and histological lesions include lymphocytic to granulomatous interstitial pneumonia, lymphadenopathy, and, less frequently, lymphocytic to granulomatous hepatitis and nephritis. Distinctively, multinucleated giant cells and basophilic cytoplasmic inclusion bodies are observed mostly in lymph nodes, tonsils, and Peyer's patches of the ileum (2, 11, 17, 25). Previous investigators have reported morbidity rates ranging from 5 to 50% in affected herds, with close to 100% mortality in sick piglets (25). There is growing evidence that a porcine circovirus (PCV) is associated with PMWS (2, 5, 11, 17, 25), and quite recently, a Canadian group has succeeded in reproducing typical signs and lesions of PMWS with the supernatant of PCV-infected cell cultures (12). Interestingly, the PCV strain isolated from animals with PMWS has been shown, by its pathogenesis and genome sequence, to differ from the nonpathogenic PCV strain (14, 22, 24). The latter was first

detected as a noncytopathic contaminant of a continuous pig kidney (PK-15) cell line (33) that failed to reproduce clinical disorders or lesions after being inoculated into healthy pigs (1, 30).

The PK-15 PCV strain (a PCV type 1 [PCV-1] strain) was characterized as a small nonenveloped virus that contains a single-stranded circular DNA genome of 1.76 kb and was classified in a newly recognized virus family, the *Circoviridae* (23), along with chicken anemia virus (34), beak-and-feather disease virus of psittacine birds (27), and several plant viruses (3, 16, 28). No recognized DNA sequence homologies or common antigenic determinants exist between PCV and the currently recognized circoviruses (25). Recently, it was suggested that the family members be reclassified into three groups, with beak-and-feather disease virus and PCV remaining members of the *Circoviridae* family and chicken anemia virus and plant circoviruses being grouped into new distinct families (26).

Until recently, several methods have been used for the detection of PCV without discriminating among the different strains: virus isolation in cell cultures, electron microscopy, in situ hybridization, and immunohistochemical staining with hyperimmune serum (2, 11, 17, 25). Serological surveys by indirect immunofluorescence, immunoperoxidase, or enzyme-linked immunosorbent assays indicate that antibodies to PCV-1 are very common in North American and European pig herds (2, 10, 14, 18, 23, 32). Type-specific serological tests are needed to study the prevalence of the PMWS-associated PCV strain.

* Corresponding author. Mailing address: Institut Armand-Frappier, Centre de Microbiologie et Biotechnologie, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3. Phone: (514) 687-5010, ext. 4219. Fax: (514) 686-5627. E-mail: Serge_Dea@IAF.UQUEBEC.CA.

Recently, the use of PCR for the detection of the PCV genome in tissues of infected pigs has been described (12, 25) and has enabled comparative sequencing studies of the genomes of both nonpathogenic (PCV-1) and pathogenic or PMWS-associated (PCV-2) strains. Overall, the genome of PCV-1 and those of PMWS-associated PCV-2 strains isolated in the United States, Canada, and France have been found to share only 68% sequence identity, with their first halves (nucleotide [nt] positions 1 to 900) having over 82% sequence homology and their second halves (nt 901 to 1768 or 1759) having only 62% homology (14, 22, 25). The combined use of PCR for amplification of the entire genome and determination of the *EcoRI* digestion patterns also allowed discrimination of both types of PCV strains (22, 25). In this report, we describe the development and application of a rapid multiplex PCR (mPCR) assay with primer sets capable of detecting and typing PCV in clinical respiratory samples.

MATERIALS AND METHODS

Cells and PCV reference strains. PK-15 cells (PK-15 is a continuous pig kidney cell line [ATCC CCL33] persistently infected with PCV-1) were kindly provided to us by A. Afshar, Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada, Nepean, Ontario, Canada. Cells were grown as monolayers in 75- or 150-cm² tissue culture flasks in minimum essential medium (MEM) supplemented with 5% fetal bovine serum, 1 mM glutamine, 1% sodium pyruvate, 100 U of penicillin per ml, and 100 µg of streptomycin per ml. Virus growth was monitored by immunofluorescence (25) with a rabbit hyperimmune serum produced to purified PCV-1 by immunization protocols described elsewhere (6, 7). For the purposes of virus and viral DNA purification, viral yield was improved by treating the cells with 300 mM glucosamine (31). The virus was harvested by freezing and thawing infected cells three times and removing cellular debris by centrifugation at 5,000 × g for 15 min. Following one extraction step with an equal volume of trichlorofluoroethane (Freon; Fisher Scientific, Dorval, Quebec, Canada) to remove lipoproteins and cellular membranes, virus was pelleted by differential ultracentrifugation at 100,000 × g for 3 h through a cushion of a 30% (w/vol) sucrose solution. Concentrated virus was then purified by CsCl isopycnic gradient ultracentrifugation as described previously (7). After an overnight centrifugation at 100,000 × g, virus band was collected and the material was checked by negatively stained electron microscopy (8).

The IAF-614 and IAF-4370 strains of PCV-2 were isolated from the lungs of 5- to 9-week-old pigs in Quebec with clinical signs and lesions compatible with PMWS. Both strains were propagated on PK-15A cells (PK-15 A is a PK-15 cell line shown to be free of PCV) obtained from the National Veterinary Service Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa. Three other cell lines, PT and ST-148 (swine testicle) and PFT (porcine fallopian tube) (7), were used as negative controls.

Viruses and bacteria used in specificity tests. The porcine mycoplasmas and walled bacteria used in the specificity tests are listed in Table 1. *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, and *Mycoplasma fermentans* were cultivated in modified Friis medium (13). Gram-positive and gram-negative bacteria commonly associated with respiratory disorders in pigs were grown in nutrient broths and were kindly provided to us by S. Messier, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada. Pig viruses used as controls included the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the Purdue strain of porcine transmissible gastroenteritis virus (ATCC VR763), the IAF-Q890 strain of porcine encephalomyocarditis virus, the NADL-2 strain of porcine parvovirus, and the A/Sw/Quebec/5393/91 (swQC-91) strain of swine influenza virus. The origins, cultivation, and purification procedures for these reference viruses have been described elsewhere (6–8, 20).

Clinical specimens or samples. Fresh, as well as frozen, specimens of lungs, lymph nodes, spleens, and tonsils of 5- to 12-week-old pigs suffering from respiratory problems accompanied by progressive weight loss were obtained from regional Animal Pathology Laboratories of the Ministry of Agriculture in Quebec, as well as from the Veterinary Faculty Diagnostic Laboratory, University of Montreal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada. Affected pigs originated from farrow-to-finish operations in southern Quebec. In four of these animals, previously forwarded to the Department of Pathology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, the presence of PCV antigen in the lungs, spleens, and lymph nodes was confirmed by immunoperoxidase staining with rabbit hyperimmune serum (11).

Nucleic acid extraction. Viral genomic DNA was extracted either from 400 µl of lysates of PK-15 cells persistently infected with PCV-1, CsCl gradient-purified viral preparation, or 100 mg of fresh or frozen clinical specimens from dyspneic piglets with a commercial DNA extraction kit (Tripure; Boehringer Mannheim, Laval, Quebec, Canada) according to the manufacturer's directions. To eliminate any contamination in the harvesting process, lung tissues collected from

TABLE 1. Bacterial and viral strains used in the PCR specificity tests

Species	Strain	PCR results ^a
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	ATCC ^b	—
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	ATCC	—
<i>Mycoplasma flocculare</i>	ATCC	—
<i>Mycoplasma arginini</i>	ATCC	—
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	ATCC	—
<i>Escherichia coli</i>	Field strain	—
<i>Haemophilus parasuis</i>	Field strain	—
<i>Streptococcus suis</i>	Field strain	—
<i>Actinobacillus suis</i>	Field strain	—
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Serotype 1	—
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Serotype 5	—
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Field strain	—
<i>Pasteurella multocida</i>	Field strain	—
PRRSV	IAF-Klop	—
Transmissible gastroenteritis virus	Purdue	—
Encephalomyocarditis virus	IAF-Q890	—
Porcine parvovirus	NADL-2	—
Porcine influenza virus	A/Sw/Quebec/5393/91	—
Porcine circovirus	PK-15	+

^a +, amplification; —, no amplification.

^b ATCC, American Type Culture Collection.

specific-pathogen-free pigs were processed simultaneously. Following extraction, the pelleted DNA was resuspended in 300 µl of 8 mM NaOH with 0.1 M HEPES and was kept at –20°C until use.

Single PCR. In preliminary experiments, five oligonucleotide primers suitable for single PCR were selected from a published PCV-1 sequence (GenBank accession no. U49186) (19, 23). Primer pairs were selected in open reading frame (ORF) ORF1 regions for which 86 to 100% nt sequence identities have been identified between PCV-1 and PCV-2 strains. Different combinations were evaluated in order to obtain amplification of DNA fragments corresponding to the ORF1 genes of both genotypes ranging from 375 to 865 bp in length. All primers chosen were 16- to 21-mers and had G+C contents of less than or equal to 55%. The sequences of the oligonucleotide primers used for single PCR and their positions on the virus genome are described in Table 2. A set of oligonucleotide primers (primers ORF2.PCV2.S4 and ORF2.PCV2.AS4) was also designed in order to permit specific amplification of a DNA fragment of 493 bp in length of the ORF-2 of PCV-2 only (Table 2). Both primers were selected in ORF2 regions showing less than 31 and 36% nt sequence identities between PCV-1 and PCV-2 strains. Amplification was carried out in a 100-µl reaction mixture containing 2.5 µl of PK-15 DNA suspension or purified viral DNA, 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ (Gibco-BRL), each deoxynucleoside triphosphate (dNTP) at a concentration of 200 µM, 50 pmol of each primer, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL). Amplification with a DNA Engine thermocycler (model PT-100 with hot bonnet; MJ Research) consisted of 5 cycles at 94°C for 1 min, 42°C for 1 min, and 72°C for 1.50 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 1.50 min. The PCR was ended with a final elongation step of 10 min at 72°C. Amplicons were detected by electrophoresing 10-µl aliquots through 2% agarose gels (Boehringer Mannheim) in TAE (0.04 M Tris-acetate [pH 8.5], 0.002 M EDTA) in the presence of ethidium bromide for approximately 30 min at 10 V/cm and photographing the gels under UV illumination.

mPCR. Two mPCR methods were set up in order to permit detection and differentiation of both genotypes of PCV. The primer pairs used in the mPCR methods, their genomic position, the templates amplified (ORF1 or ORF2), and the sizes of the expected amplified products are depicted in Table 3. In each mPCR method, two primer pairs were used in order to permit simultaneous amplification of DNA fragments of the ORF1 and ORF2 genes of the PCV genome. For the first mPCR method, 2.5 µl of DNA sample was added to 97.5 µl of a reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, each dNTP at a concentration of 400 µM, and 2.5 U of *Taq* polymerase. The amplification reaction consisted of 35 cycles of 94°C for 1 min, 53°C for 1 min, and 65°C for 3 min. The PCR was ended with a final elongation step of 10 min at 72°C. For the second mPCR method, the reaction mixture was similar to that for the first one except that only 300 µM each dNTP and 1.5 U of *Taq* polymerase were added. The amplification program was, instead, 33 cycles at 94°C for 1 min, 53°C for 1 min, and 65°C for 5 min.

Sequence analysis. Purified DNA amplicons of two randomly chosen Quebec field strains of PCV-2 were cloned into the TA cloning plasmid pCR 2.1 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) as described previously (9). Both strands of three full-length clones derived from independent PCRs were se-

TABLE 2. Sequences of oligonucleotides used for single PCR and their localization on the virus genome^a

Primer	Sense	Sequence (5'-3')	Genomic position	Template	% Homology between PCV-1 and PCV-2
ORF1.PCV1.S1	+	GCCAAGCAAGAAAAGC	47-63	ORF1	93
ORF1.PCV1.S2	+	GAGGTGGGTGTTACCCCT	82-97	ORF1	94
ORF1.PCV1.AS1	-	CGTTACAGGGAACITGCTC	445-462	ORF1	89
ORF1.PCV1.AS2	-	GTGTACAGCTGTCTTCCAATC	527-547	ORF1	86
ORF1.PCV1.AS5	-	GTGGATTGTTCTCCAGCAGTC	892-912	ORF1	86
ORF1.PCV1.AS6	-	CACACAGTCTCAGTAGATCATCC	706-728	ORF1	100
ORF2.PCV2.S4	+	CACGGATATTGTAGTCTGGT	1093-1114	ORF2	36
ORF2.PCV2.AS4	+	CCGCACCTTCGGATATACTGTC	1565-1586	ORF2	31

^a Nucleotide sequences and localization on the PCV-1 or PCV-2 genome were given in reference to the sequences of the prototype ATCC CCL-33 strain of PCV-1 (GenBank accession no. 49186) (23) and the sequences of the PMWS-associated PCV-2 strain isolated in Manitoba, Canada (GenBank accession no. AF027217) (14).

quenced to produce the final sequences. The sequences of the PCV genomes were analyzed by computer programs: McVector (International Biotechnologies, Inc., New Haven, Conn.) and GeneWorks (IntelliGenetics Inc., Mountain View, Calif.).

Virus isolation. Specimens from a total of 18 animals that were found to be PCV positive by PCR were processed to attempt virus isolation. Samples of 100 mg of pooled tissue (lungs, liver, spleen, lymph nodes) were homogenized in 10 ml of MEM containing 100 U of penicillin per ml, 100 µg of streptomycin per ml, and 100 µg of amphotericin B (Fungizone; Gibco) per ml. Tissue homogenates were clarified by centrifugation at 2,500 × g for 60 min at 4°C and were extracted once with 2/3 volume of trichlorotrifluoroethane. Following another centrifugation step at 3,000 × g for 15 min, the upper phases were collected and filtered through 0.2-µm-pore-size membranes. Aliquots of 0.5 ml of the homogenates were inoculated onto confluent monolayers of PCV-free PK-15A cells in 25-cm² tissue culture flasks. After an adsorption period of 1 h and 30 min at 37°C, 10 ml of MEM containing 1 mM glutamine and antibiotics was added to the infected cultures. After 2 days of incubation at 37°C, monolayers were rinsed twice with phosphate-buffered saline and were incubated for 30 min in MEM containing 300 mM D-glucosamine. The monolayers were rinsed and were then reincubated in MEM until day 5 postinfection. Monolayers were stained for circoviral antigen after two successive passages by using the rabbit polyclonal serum and indirect immunofluorescence.

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequence accession numbers (EMBL/GenBank/DBJ) are AF118095 for strain IAF-614 and AF118097 for strain IAF-4370.

RESULTS

Pathological findings. Since January 1998, outbreaks of respiratory signs and wasting affecting 5- to 12-week-old piglets have been reported in farrow-to-finish pig farms in southern Quebec. A mild diarrhea could also be observed in approximately 20% of the affected pigs. At necropsy, macroscopic lesions were mostly confined to the lower respiratory tract.

Lungs were usually noncollapsed and were mottled red to pale tan with a rubbery texture. Enlarged bronchial, inguinal, and mesenteric lymph nodes were observed in approximately 40% of the affected pigs. Occasionally, the spleen was also enlarged, and whitish necrotic foci could be observed in the kidney cortex and medulla. Microscopic examination of tissues from the necropsied pigs revealed lesions of lymphohistiocytic interstitial pneumonitis, with moderate to severe depletion of tonsillar and splenic lymphoid tissue. In most of these animals, the presence of cytoplasmic basophilic inclusion bodies was demonstrated in macrophage-like cells in the tonsils, lymph nodes, and lungs. In a few animals, indirect immunofluorescence staining revealed PRRSV antigen in the lung, but in more than 50% of the animals the presence of PRRSV could be demonstrated in the lungs and lymph nodes by PCR and virus isolation in cultures of porcine alveolar macrophages (20, 21). From April 1998 to February 1999, pooled organs (lungs, spleens, lymph nodes, livers, and tonsils) collected from nearly 40 affected pigs from 30 pig operations were forwarded to our laboratory to investigate the possibility of a PCV infection.

Efficacy of the PCR method for detection of PCV. In preliminary experiments, an evaluation of the efficacy of a single PCR method in detecting PCV genomic DNA in clinical specimens was done (23). Sets of oligonucleotide primers were first designed according to the sequence of the ORF1 gene of the PCV-1 strain. As illustrated in Fig. 1, the six primer pairs used in this study, from a combination of five different primers covering the entire ORF1, permitted amplification of genomic fragments of the expected size when tested with genomic DNA

TABLE 3. Description and genomic positions of four sets of primers designed for mPCR according to PCV-1 sequence^a

mPCR	Primer	Sequence (5'-3')	Genomic position	Template	Amplicon (bp)	% Homology between PCV-1 and PCV-2	Specificity for strain:	
							PCV-1	PCV-2
1	ORF1.PCV1.S3	CGGAGAGGAAGGTTTGAAG	172-191	ORF1	375	60	+	-
	ORF1.PCV1.AS2	GTGTACAGCTGTCTTCCAATC	527-547	ORF1		86		
	ORF2.PCV1.S	ATGACGTGGCCAAGGAGGCGTTAC	1723-1700	ORF2	488	92	+	+
	ORF2.PCV1.AS	GTGAAGTACCTGGAGTGGTAGG	896-916	ORF2		91		
2	ORF1.PCV1.S2	GAGGTGGGTGTTACCCCT	82-97	ORF1	646	94	+	+
	ORF1.PCV1.AS6	GGATGATCTACTGAGACTGTGTG	706-728	ORF1		100		
	ORF2.PCV1.S1	GGGTTACAAAGTTGGCATCCAAG	1327-1350	ORF2	407	70	+	-
	ORF2.PCV1.AS1	CACTTTATAGGATGACGTGG	1714-1734	ORF2		52		

^a Nucleotide sequences and their localization on the PCV-1 genome were given in reference to those of the sequence of the prototype ATCC CCL-33 strain of PCV-1 (GenBank accession no. 49186) (23).

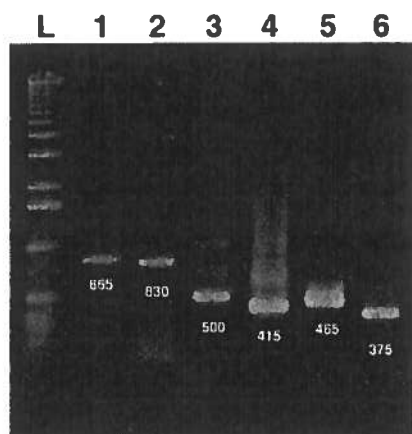


FIG. 1. Electrophoretic profiles of DNA amplicons obtained by single PCR with genomic DNA extracted from CsCl gradient-purified PCV-1. The six primer pairs used to amplify ORF1 of the PCV-1 strain yielded DNA amplicons of the expected size. Lane 1, primers ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS5 (865 bp); lane 2, primers ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS5 (830 bp); lane 3, ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS2 (500 bp); lane 4, primers ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS1 (415 bp); lane 5, primers ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS2 (465 bp); and lane 6, primers ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS1 (375 bp); lane L, 1-kb DNA ladder.

extracted from CsCl gradient-purified PCV-1. The primer pairs ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS5, ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS5, ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS2, ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS1, ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS2, and ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS1 yielded DNA amplicons of 865, 830, 500, 415, 465, and 375 bp in length, respectively. The specificities of the PCR products were confirmed by testing the primer pair ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS1 and the primer pair ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS2 with DNA or RNA templates from other viral and bacterial pathogens commonly associated with respiratory disorders in pigs. As expected, no amplicon product was obtained with heterologous pathogens or with RNA prepared from mock-infected pig cells (PK-15, PT, ST-148, and PFT cells) or distilled water (Table 1).

TABLE 4. Correlation between histopathological findings and detection of PCV genomic DNA in lungs and lymphoid organs by single PCR with ORF1 primers

No. of clinical specimens ^a	Presence of histological lesions		No. of specimens positive by single PCR
	Inclusion bodies	Immunoperoxidase reaction	
14 ^b	+	+	13
2 ^c	—	D ^d	1
6 ^c	—	—	2

^a The specimens comprised lungs, lymph nodes, and spleen specimens.

^b Eight of 14 specimens were found to be PRRSV positive.

^c Submitted because of respiratory and/or enteric problems.

^d D, doubtful.

To evaluate the sensitivity of the single PCR method in detecting viral genomic DNA, primer pair ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS5 (865 bp amplicon) and primer pair ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS1 (375 bp amplicon) were tested with 10-fold dilutions of DNA extracted from 100 μ l of a purified PCV suspension (preadjusted to 10^6 viral particles/ml, as determined by negatively stained electron microscopy) and from persistently infected PK-15 cells (adjusted to 10^6 cells/ml). As illustrated in Fig. 2A and C, independently of the size of amplicon, a positive amplification reaction could be visualized with the 10^{-5} dilution of the purified viral preparation, corresponding to approximately 10 viral particles per ml. On the other hand, a positive reaction was obtained with the 10^{-6} dilution of DNA extracted from persistently infected PK-15 cells, suggesting that amplification of the viral genome was not compromised by excessive amounts of cellular nucleic acids (Fig. 2B).

The single PCR method was then tested for its efficacy at detection of PCV from crude clinical specimens. Table 4 summarizes the data obtained from tests with 22 lung specimens that have been forwarded to our laboratory for virological investigations. A preliminary diagnosis of PCV infection (PMWS) has been suggested for 14 of these specimens on the basis of clinical and histological findings (presence of intracytoplasmic basophilic inclusion bodies in macrophage-like cells, detection of PCV antigen by the immunoperoxidase reaction),

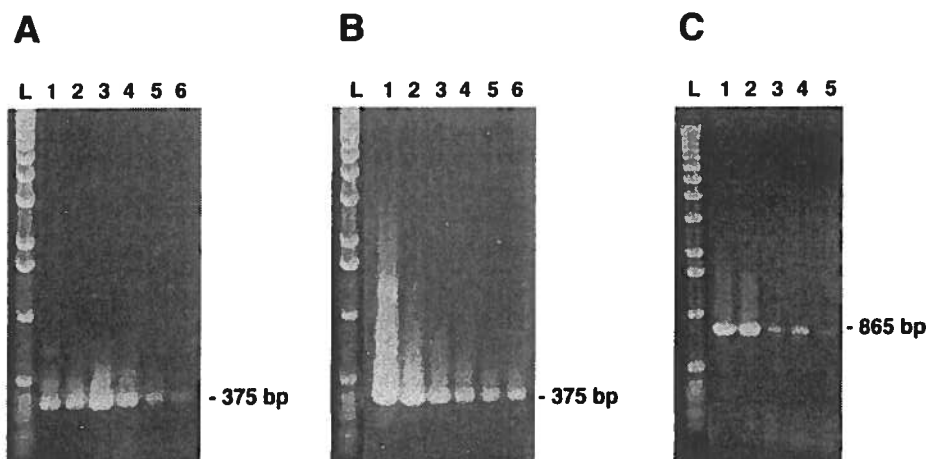


FIG. 2. Sensitivity of the single PCR method in detecting virus-specific DNA extracted from 10-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-6} ; lanes 1 to 6, respectively) of purified viral preparation of PCV-1 (preadjusted to 10^6 viral particles per ml) (A and C) or from PK-15 cells infected with PCV-1 (total of 10^6 cells) (B). The primer pairs used were chosen in order to permit amplification of ORF1 fragments of either 375 bp (primers ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS1) or 865 bp (primers ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS5) in length. Lane L, 1-kb DNA ladder.

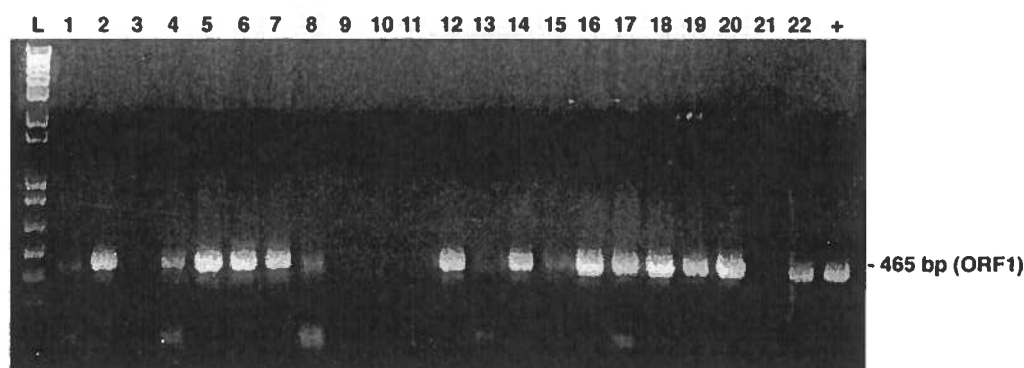


FIG. 3. PCR products resulting from enzymatic amplification of PCV genomic DNA extracted from infected porcine lung tissue. Clinical samples with histopathological lesions suggestive of a PCV infection (presence of basophilic inclusion bodies) (Table 4) were treated as described in the Materials and Methods section, and then extracted DNA was tested by the single PCR method with primers ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS2, which yielded DNA amplicons of 465 bp in length. Lanes 1 to 22, samples from 22 pigs, respectively; lane L, 1-kb DNA ladder; +, DNA from a purified PCV-1 strain.

whereas a diagnosis of PMWS for two other specimens from animals with irrelevant cases of respiratory and/or enteric disorders was doubtful. Specimens from other six animals with irrelevant cases of infection or from clinically healthy pigs were also tested as controls. Specific primer pair ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS2 yielded a PCR product of the expected size (465 bp) for 13 of the 14 pigs with histopathological lesions typical of PCV infection and for 1 of the 2 pigs with irrelevant infections and a doubtful result (Fig. 3). Overall, three of the eight pigs with irrelevant clinical infections were found to be positive by PCR. As expected, a negative reaction was obtained with lung tissues from a specific-pathogen-free pig, as well as PCV-free PK-15 cells, which were used as negative controls that were processed simultaneously for DNA extraction. The PCR results were reproducible when other sections of the tested clinical samples were tested, including samples from the three positive pigs with irrelevant clinical infections. The specific primer pair ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS2 was more effective at detecting PCV DNA (16 of 22 pigs) than primer pair ORF1.PCV1.S1 and ORF1.PCV1.AS1 (only 8 of 22 pigs).

mPCR. The nt sequences of two Quebec PCV isolates, IAF-614 and IAF-4370, for which the entire genome could be amplified as two overlapping fragments with primers flanking the ORF1 and ORF2 of the np PCV strain (19, 23), were determined. Analysis of sequencing data showed nearly 99% nt sequence identities with previously published sequences of PCV-2 strains reported to be associated with PMWS outbreaks in the United States, France, and Germany (14, 22, 24). Accordingly, both Quebec strains were found to have 1,768 bp of DNA and shared approximately 76% sequence identity with the reference PCV-1 strain (23). As described previously (14, 24), greater variation was found within the ORF2 part of the genome, which had less than 67% homology with the genome of the PCV-1 strain. The homology in ORF1 between both Quebec field isolates and the PCV-1 strain was close to 83% at the nt level.

With the aim of distinguishing between both genotypes of PCV that may be present in clinical specimens, two mPCR approaches were set up. The primers were designed to permit amplification of either ORF1 or ORF2 DNA fragments for PCV-2 field isolates (type-specific primers) but to permit amplification of both regions in the case of PCV-1 field isolates. All the primers chosen were 18- to 22-mers and had G+C contents of less than or equal to 55%. Annealing temperatures

of 50 to 60°C were selected in preliminary attempts to give maximum product yield and specificity. The sequences were also chosen to avoid the formation of dimers either within or between pairs; no significant theoretical mispriming was identified on any template. Primers that were used for amplification of PCV-1 only were selected in ORF1 or ORF2 regions with less than 70% nt identities between both genotypes, with most variations being located at the 5' termini of the primers (Table 3). The specific electrophoretic patterns of the amplified products obtained for the two PCV genotypes by both mPCR approaches are depicted in Fig. 4. As expected from the genomic sequences determined previously, primer pair ORF1.PCV1.S3 and ORF1.PCV1.AS2 and primer pair ORF2.PCV1.S and ORF2.PCV1.AS, which were used simultaneously for the first mPCR method, yielded DNA amplicons of 488 bp specific for the ORF2 genes of both genotypes, whereas a 375-bp fragment was amplified from the ORF1 of the PCV-1 strain only (Fig. 4A). On the other hand, primer pair ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS6 and primer pair ORF2.PCV1.S1 and ORF2.PCV1.AS1 used for the second mPCR method yielded DNA amplicons of 646 bp specific for the ORF1 genes of both genotypes, whereas a 407-bp fragment was amplified from the ORF2 of the PCV-1 strain only (Fig. 4B). Electrophoretic profiles of the mPCR products obtained with lung homogenates from 9 of the 16 PCV-infected pigs previously identified by the single PCR method are illustrated in Fig. 5. Only one of the specimens showed an electrophoretic profile similar to that of the PCV-1 strain when products from both ORFs could be amplified. For routine diagnosis purpose, the second mPCR method was selected since the ORF1 has been found by several investigators to be more conserved than ORF2 among both types of PCV (14, 22, 25), which was also the case for both Quebec strains sequenced. When tested with field clinical samples forwarded to our laboratory from April 1998 to February 1999, 33 of 35 PCR-positive samples had mPCR profiles typical of those of PCV-2 strains when only the ORF1 amplicons could be visualized. In two of these clinical samples, genomic fragments of both ORFs could be amplified, and thus, they were considered to be infected with PCV-1.

To address the question of whether the two animals positive for the PCV-1 pattern may also be infected with PCV-2, samples from both animals were further tested by a single PCR with primer pair ORF2.PCV2.S4 and ORF2.PCV2.AS4, the sequences of which have been deduced from specific sequences of the ORF2 of PCV-2 (Table 2). As expected, a DNA frag-

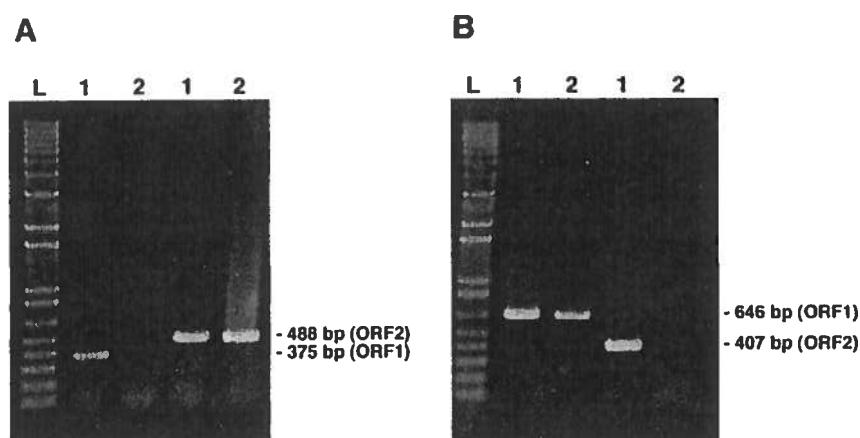


FIG. 4. Strain specificity of the oligonucleotide primers used in both mPCR methods. As expected from the genomic sequences of PCV-1 and PCV-2, primer pair ORF1.PCV1.S3 and ORF1.PCV1.AS2 and primer pair ORF2.PCV1.S and ORF2.PCV1.AS which were used in the first mPCR method (A) yielded DNA amplicons of 488 bp specific for the ORF2 genes of both genotypes, whereas a 375-bp fragment was amplified for the ORF1 gene of the PCV-1 strain only. In the second mPCR-2 method (B), primer pair ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS6 and primer pair ORF2.PCV1.S1 and ORF2.PCV1.AS1 yielded DNA amplicons of 646 bp specific for the ORF1 genes of both genotypes, whereas a 407-bp fragment was amplified for the ORF2 gene of the PCV-1 strain only. Lane L, 1-kb DNA ladder; lanes 1 and 2, genotypes 1 and 2 of PCV, respectively.

ment of 493 bp in length could be amplified from Quebec PCV-2 isolates, isolates IAF-614 and IAF-4370, as well as other clinical specimens already found to be positive for PCV-2 (data not shown), but not from DNA extracted from PK-15 cells persistently infected with PCV-1 (Fig. 6). By this single PCR approach, amplicons were also obtained from the two animals previously shown to be positive for PCV-1, suggesting a mixed infection with both genotypes of PCV.

Virus isolation. Attempts were made to isolate in cell cultures PCV from 18 clinical samples previously found to be positive for PCV-2 by mPCR. After two successive passages and an incubation period of 5 days, no cytopathic effect was observed in PK-15A cell cultures inoculated with pooled tissue homogenates from the mPCR-positive animals. However, for seven of these samples (38.8%), detection of viral antigen in the cytoplasm of infected cells could be detected by indirect immunofluorescence with specific rabbit hyperimmune serum. For these samples, the presence of PCV-2 in culture supernatants was detected by mPCR after the second passage.

DISCUSSION

Several reports dealing with the occurrence of a new genotype of PCV associated with PMWS outbreaks in Europe and North America have recently been published (14, 22, 24). Although PCR was reported to be a useful tool for detecting PCV in clinical specimens from naturally and experimentally infected pigs (12, 14, 25), an investigation such as the one described herein was needed to establish the sensitivity and specificity of the technique in comparison with those of other routine diagnostic procedures that have been used for the detection of PCV, mainly virus isolation in cell cultures, *in situ* hybridization, and immunohistochemical staining with hyperimmune serum (2, 11, 17, 25). The data obtained in the present study confirmed the specificity of the PCR method since no DNA amplicons could be obtained from DNA or RNA prepared from bacterial and viral pathogens commonly associated with respiratory disorders in pigs by using primer sets corresponding to different regions of the ORF1 gene of the PCV-1 strain. These primers were in fact chosen from regions of the polymerase gene, which is highly conserved among both geno-

types of PCV (14, 23). The sensitivity was comparable to those of PCR methods that have previously been reported for the detection of other small DNA viruses such as porcine parvoviruses (24). By negatively stained electron microscopy, it was estimated that the highest dilution from which PCV DNA could be detected by the single PCR assay contained approximately 10 viral particles per ml, which would correspond to as little as 5 to 50 pg of viral genomic DNA. A comparable sensitivity was obtained with primer pairs covering one-third (375 bp) or the entire (approximately 900 bp) polymerase gene. When tested with clinical samples from pigs, the results of the single PCR method showed a nearly 93% (13 of 14 samples) correlation with histopathological and immunohistochemical findings. Interestingly, PCV infection could also be detected by single PCR with three clinical samples that have been submitted from pigs with irrelevant respiratory and/or enteric problems. Since the positive PCR results were reproducible, even when other sections from the same specimens were tested, the data obtained were suggestive of subclinical PCV infections. In Canada, a seroprevalence of nearly 70% was reported in the early 1990s in the absence of clinical symptoms (10). However, due to the lack of a type-specific serological test, the genotype involved in asymptomatic or subclinical infections could not be identified.

By the single PCR method, the lungs appeared to be the most suitable organs for the recovery of PCV from PMWS-affected pigs, as similar data were obtained with pooled organ homogenates (data not shown). Amplification products of the expected sizes were obtained for all Quebec field isolates by PCR amplification of the ORF1 gene with different sets of primer pairs, which suggests that this first half of the PCV genome is highly conserved among field isolates, in agreement with previous findings by other investigators (14, 22, 25). Data also demonstrated that amplification of the viral genome was not compromised by excessive amounts of cellular nucleic acids (Fig. 2B).

Although our preliminary findings further demonstrated the suitability of the single PCR method for the identification of PCV-positive clinical samples, this technique was unable to differentiate which genotype was in fact involved. Sequencing analyses demonstrated that two representative Quebec isolates

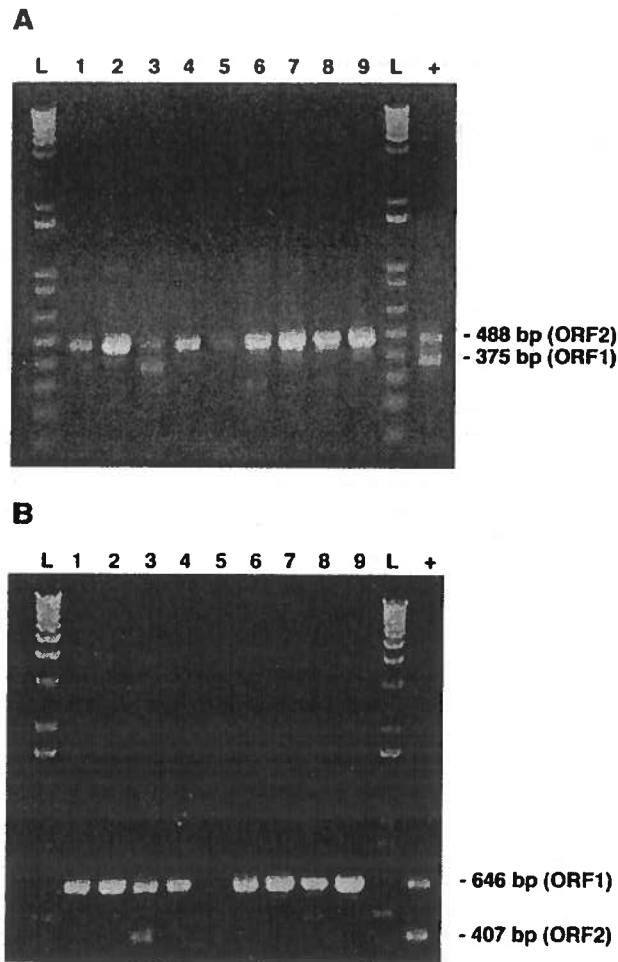


FIG. 5. Detection and typing of PCV in a panel of positive clinical specimens (lung tissue; lanes 1 to 9) by both mPCR methods. As described in the Materials and Methods section, in both mPCR methods, two sets of primers were used simultaneously with DNA extracted from lungs of the affected pigs to amplify fragments of the ORF1 and ORF2 genes of PCV-1 but only the ORF1 or ORF2 fragment of PCV-2. (A and B) For only one of the clinical samples tested, an mPCR profile of a PCV-1 strain was observed. As expected, by the mPCR1 method (A), a fragment of 488 bp specific for the ORF2 genes of strains of both genotypes could be amplified for all positive samples, whereas for only one sample (lane 3), the ORF1 fragment (375 bp) could be amplified. By the mPCR2 method (B), a fragment of 646 bp specific for the ORF1 genes of both genotypes could be amplified for all positive samples, whereas for only the same sample described in panel A, the 407-bp fragment specific for the ORF1 of PCV-1 could be amplified (lane 3). Lane L, 1-kb DNA ladder; lane +, DNA extracted from purified PCV-1.

of PCV that were associated with outbreaks of PMWS, detected by single PCR, and selected at random differed significantly from the nonpathogenic PCV-1 strain. Both Quebec field isolates instead showed nearly 99% nt sequence identities with previously published sequences of PCV-2 strains reported to be associated with PMWS outbreaks in the United States, France, and Germany (14, 22, 25). These two representative Quebec strains displayed only 76% nt sequence identities with the reference PCV-1 strain (23).

A technique for differentiating the nonpathogenic and pathogenic strains is needed since serological surveys have demonstrated that infection with PCV is very common in North American and European pig herds (2, 10, 23, 30, 32).

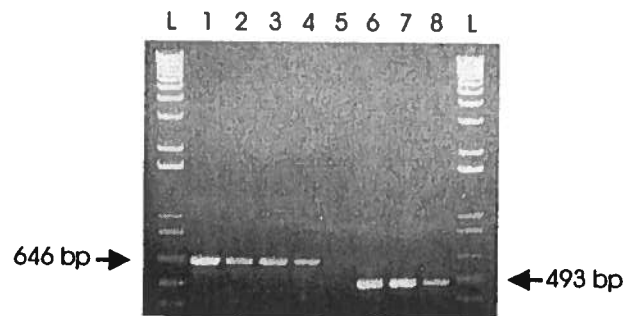


FIG. 6. Differentiation of PCV-1 and PCV-2 strains by single PCR with universal and type 2-specific primer pairs. Primer pair ORF1.PCV1.S2 and ORF1.PCV1.AS6 (lanes 1 to 4) yielded a DNA amplicon of 646 bp specific for the ORF1 genes of both genotypes, whereas primer pair ORF2.PCV2.S4 and ORF2.PCV2.AS4 (lanes 5 to 8) yielded a DNA amplicon of 493 bp specific for the ORF2 gene of PCV-2 only. Lanes 1 and 5, DNA extracted from PK-15 cells persistently infected with the PCV-1 strain; lanes 2 and 6, clinical specimen positive for PCV-1 by the mPCR; lanes 3 and 7, Quebec PCV-2 strain IAF-614; lanes 4 and 8, Quebec PCV-2 strain IAF-4370; lanes L, 1-kb DNA ladder; lane +, DNA extracted from purified PCV-1.

The possibility that both genotypes of PCV may coexist in the same pig should also be considered. By comparing the nucleotide sequences of the two Quebec PMWS-associated PCV strains with that of the reference PCV-1 strain (23), oligonucleotide primers were designed from within regions of ORF1 or ORF2 of PCV-1 to permit PCR amplification of strains of both genotypes or only PCV-1. By the two mPCR methods investigated, amplification of both ORF1 and ORF2 genomic fragments from clinical samples was suggestive of a PCV-1 infection, whereas in the case of a PCV-2 infection, only one of the two genomic regions was amplified. However, a major drawback of these two mPCR methods is that the primers used probably cannot detect PCV-2 DNA in the presence of a PCV-1 infection, so that a mixed infection with both genotypes could be misdiagnosed. On the basis of the data obtained for 35 animals that were found to be PCV positive by the mPCRs, PCV-2 infection was demonstrated in tissues of 94.2% (33 of 35) of sick animals tested, in agreement with previous findings showing the close association of this new genotype of PCV with outbreaks of PMWS in Europe and North America (12, 14, 25). On the other hand, a PCV-1 infection was demonstrated for only 5.7% (2 of 35) of the animals; thus, for a minority of the specimens tested by mPCR, further analyses were needed to eliminate the possibility of a mixed infection with both PCV genotypes. For this purpose, a single PCR was conducted with PCV-2-specific primers designed from ORF2 regions showing less than 35% nt identities with the sequence of PCV-1. Specific amplification of PCV-2 was obtained with all positive clinical specimens tested, including both PCV-1-positive specimens, thus confirming a mixed infection with both PCV genotypes. Consequently, in the absence of type-specific serological tests, this additional single PCR method should routinely be done when a PCV-1 profile is obtained by mPCR.

Interestingly, data from the mPCR method could be obtained within 1 or 2 days, whereas the more classical methods, such as virus isolation in cell cultures, followed by serotyping, require at least 2 weeks. In the present study, PCV could be isolated in cell cultures from only one-third of the PCR-positive samples tested. For all samples, a distinct cytopathic effect was not observed, so that serological identification by indirect immunofluorescence was required for final diagnosis. The mPCR method thus appeared to be more convenient and reliable for routine diagnosis of PCV infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Judith Caron, Hélène Drolet, and Nicole Sawyer for technical assistance. We also thank the following veterinarians and pathologists from the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec for assistance with obtaining the clinical samples and involvement in histopathological studies: René Sauvageau, André Bourgault, and René Larochelle. The collaboration of W. L. Mengeling from the National Veterinary Service Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa, and A. Afshar from the Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada, Nepean, Ontario, Canada, in providing the PCV-free and PCV-infected PK-15 cell lines was greatly appreciated.

This research was partly funded by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec and the Fondation Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada.

REFERENCES

- Allan, G. M., F. McNeilly, J. P. Cassidy, G. A. C. Rellly, B. Adair, W. A. Ellis, and 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, 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.
- Boevink, P., P. W. G. Chu, and P. Keese. 1995. Sequence of subterranean clover stunt virus DNA: affinities with the geminiviruses. *Virology* 207:354-361.
- Clark, E. G. 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 28:499-501.
- Daft, B., R. W. Nordhausen, K. S. Latimer, and F. D. Niagro. 1996. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six-week-old piglet. *Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.* 39:32.
- Dea, S., and S. Garzon. 1991. Identification of coronaviruses by the use of indirect protein-A immunogold electron microscopy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3:297-305.
- Dea, S., R. Bilodeau, R. A. Sauvageau, and G. P. Martineau. 1991. Outbreaks of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus in Quebec pig farms. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3:275-282.
- Dea, S., R. Bilodeau, C. Monpetit, R. A. Sauvageau, and G. P. Martineau. 1992. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:380-392.
- Dea, S., L. Michaud, and G. Milane. 1995. Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery in adult dairy cattle in Quebec. *J. Gen. Virol.* 76:1263-1270.
- Dulac, G. C., and A. Ahmad. 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.
- Ellis, J., L. Hassard, E. Clark, J. Harding, G. Allan, P. Wilson, 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.
- Ellis, J., S. Krakowka, M. Lairmore, D. Haines, A. Bratanich, E. Clark, G. Allan, C. Konoby, L. Hassard, R. Meehan, K. Martin, J. Harding, S. Kennedy, and F. McNeilly. 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:3-14.
- Frills, N. F. 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare*. *Nord. Veterinaer-med.* 27:337-339.
- Hamel, A. L., L. L. Lin, and G. P. S. 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 (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 28:503.
- Harding, R. M., T. M. Burns, G. Hafner, R. G. Dietzgen, and J. L. Dale. 1993. Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene. *J. Gen. Virol.* 74:323-328.
- Kiupel, M., G. W. Stevenson, S. K. Mittal, E. G. Clark, and D. M. Haines. 1998. Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet. Pathol.* 35:303-307.
- LeCann, P., E. Alblan, F. Madec, R. Carillet, and A. Jestin. 1997. Piglet wasting disease. *Vet. Rec.* 141:660.
- Mankertz, J., H.-J. Buhk, G. Blaess, and A. Mankertz. 1998. Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes* 16:267-276.
- Mardassi, H., R. Athanassios, S. Mounir, and S. Dea. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated to acute and chronic outbreaks of PRRS. *Can. J. Vet. Res.* 58:55-64.
- Mardassi, H., L. Wilson, S. Mounir, and S. Dea. 1994. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 32:2197-2203.
- Meehan, B. H., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V. A. Jewhurst, J. A. Ellis, L. 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.
- Meehan, B. H., J. L. Creelan, M. S. McNulty, and D. Todd. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 78:221-227.
- Molitor, T. W., K. Oraveerakul, Q. Q. Zhang, C. S. Choi, and L. R. Lude-man. 1991. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *J. Virol. Methods* 32:201-211.
- Morozov, I., T. Sirinarumit, 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.
- Niagro, F. D., A. N. Forsthoefel, R. P. Lawther, L. Kamalanathan, B. W. Ritchie, K. S. Latimer, and P. D. Lukert. 1998. Beak and feather disease virus porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circovirus. *Arch. Virol.* 143:1723-1744.
- Ritchie, B. W., F. D. Niagro, P. D. Luckert, W. L. Steffens, and K. S. Latimer. 1989. Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology* 171:83-88.
- Rohde, W., J. W. Randles, P. Langridge, and D. Harold. 1990. Nucleotide sequence of a circular single stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology* 176:648-651.
- Segales, J., M. Sijar, M. Domingo, S. Dee, M. DelPozo, R. Noval, C. Sacristan, A. DeLasHeras, A. Ferro, and K. S. Latimer. 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet. Rec.* 141:600-601.
- Tischer, I., W. Mields, D. Wolff, M. Vagt, and W. Greim. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91:271-276.
- Tischer, I., D. Peters, R. Rasch, and S. Poelll. 1987. Replication of porcine circovirus-induction by glucosamine and cell-cycle dependence. *Arch. Virol.* 96:39-57.
- 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.
- Tischer, I., R. Rasch, and G. Teichmann. 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* 26:153-167.
- Todd, D., J. L. Creelan, D. P. Mackie, F. Rixon, and M. S. McNulty. 1990. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J. Gen. Virol.* 71:819-823.

Erratum for Ouardani et al., *J. Clin. Microbiol.* 37 (12) 3917-3924.

Journal of Clinical Microbiology, April 2000, p. 1707b-1707b, Vol. 38, No. 4
0095-1137/00

Copyright © 2000, American Society for Microbiology. All rights reserved.

ERRATUM**Multiplex PCR for Detection and Typing of
Porcine Circoviruses**

M. Ouardani, L. Wilson, R. Jetté, C. Montpetit, and S. Dea

Centre de Microbiologie et Biotechnologie, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, and
Laboratoire de Pathologie Animale, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du
Québec, Laval, Québec, Canada, H7N 4Z3

Volume 37, no. 12, p. 3917-3924, 1999. Page 3919, Table 3: the sequence for primer ORF1.PCV1.AS6
should read "CACACAGTCTCAGTAGATCATCC."

- ▶ Similar articles found in:
[JCM Online](#)
- ▶ Search Medline for articles by:
[Ouardani, M.](#) || [Dea, S.](#)
- ▶ Alert me when:
[new articles cite this article](#)
- ▶ [Download to Citation Manager](#)

▶ [Books from ASM Press](#)

Journal of Clinical Microbiology, April 2000, p. 1707b-1707b, Vol. 38, No. 4
0095-1137/00

Copyright © 2000, American Society for Microbiology. All rights reserved.

- ▶ Similar articles found in:
[JCM Online](#)
- ▶ Search Medline for articles by:
[Ouardani, M.](#) || [Dea, S.](#)
- ▶ Alert me when:
[new articles cite this article](#)
- ▶ [Download to Citation Manager](#)

▶ [Books from ASM Press](#)

1.4 Étude sur l'analyse de séquences d'ADN d'isolats québécois du CVP2

Matériel et Méthodes

L'étude portant sur l'analyse des séquences nucléotidiques des souches de CVP2, isolées à partir d'organes de porcs présentant les signes du SDPS, visait à confirmer, par des analyses de séquençage, que leur ADN était distinct de la souche retrouvée dans la lignée cellulaire PK-15. Pour ce faire, il a fallu concevoir et synthétiser 4 paires d'amorces dont le chevauchement des fragments qu'elles amplifient couvre en entier l'ADN génomique du CVP (**figure 7**). Ces amorces ont été conçues à partir de la séquence génomique d'un isolat de CVP2 (Hamel *et al.*, 1998). La synthèse des oligonucléotides a été effectuée à l'aide d'un synthétiseur automatique d'ADN "Gene assembler" (Amersham Pharmacia Biotech, Pointe-Claire, Canada), disponible au service de synthèse d'amorces du laboratoire de Dr François Shareck, au centre de microbiologie et biotechnologie de l'INRS-Institut Armand Frappier. Les caractéristiques de ces paires d'amorces sont énumérées au **tableau 8**. Les conditions d'amplification de base sont les mêmes que celles rapportées dans l'article publié (section 1.2), à l'exception du choix de la polymérase. En effet, afin de réduire les risques d'erreur par cette enzyme lors de l'épreuve de PCR, 2.6 U de l'ADN polymérase Expand™ High Fidelity (Roche Diagnostic, Laval, Canada) ont été employés au lieu de 2.5 U de la Taq DNA polymérase. La procédure employée au cours de l'analyse de séquençage a aussi été décrite dans l'article publiée.

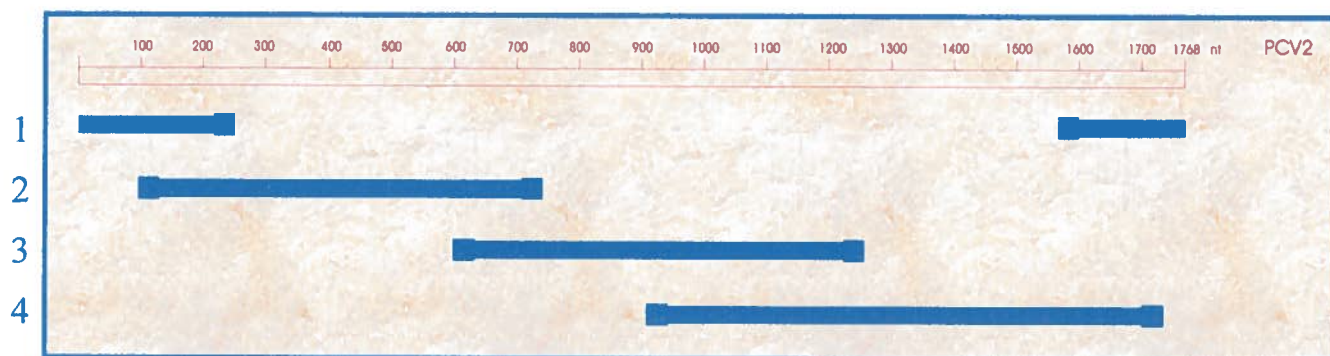
Résultats

L'ADN génomique des trois isolats de CVP2, IAF614, IAF4370 et IAF2897, a pu ainsi être séquencé et déposé dans la librairie de Genbank sous les numéros d'acquisition (EMBL/GenBank/ DDBJ) respectifs: AF118095, AF118097 et AF408635. Leurs séquences d'ADN sont présentées aux **figures 8, 9 et 10**. Obtenus au moyen du programme d'informatique GenWorks, les résultats des analyses comparatives entre l'ORF1 de la souche CVP-PK-15 et celle associée au SDPS ont révélé 82 % d'identité au niveau des nucléotides et 85% d'identité au niveau des acides aminés. Alors qu'entre l'ORF2 des deux souches, les observations ont été plus distinctes: 45% au niveau des

Figure 7

Carte génomique indiquant la position des fragments séquencés suite à leur amplification au moyen de 4 paires d'amorces.

Schéma représentant la position des produits de PCR qui ont servi au séquençage du génome des trois isolats québécois de CVP2 (IAF614, IAF4370 et IAF2897). Les produits de PCR ont été amplifiés à l'aide de 4 paires d'amorces spécifiques au CVP2, décrites au tableau 8.



- 1: fragment génomique n°1 de 447 pb.
- 2: fragment génomique n°2 de 646 pb.
- 3: fragment génomique n°3 de 655 pb.
- 4: fragment génomique n°4 de 826 pb.

(voir tableau 8)

Tableau 8 Caractéristiques des amorces destinées au séquençage et des produits qu'elles amplifient.

Fragment	Positions	Taille	Amorces	T _m
1	1567 – 237	447 pb	ORF1.PCV2.S2	55°C
			ORF2.PCV2.AS1	57°C
2	123 – 719	646 pb	CIRS2	53°C
			CIRAS6	55°C
3	671 – 1239	655 pb	ORF1.PCV2.S3	56°C
			ORF2.PCV2.AS3	57°C
4	962 – 1671	826 pb	CIRORF2S	61°C
			CIRORF2AS	56°C

Figure 8**Séquence génomique complète de l'isolat québécois CVP2-IAF614.**

Résultat de séquençage compilé par le programme d'analyse de séquence "GenWorks ". La séquence génomique du CVP2-IAF614 a été déposée dans la librairie de GenBank sous le numéro d'acquisition AF118095. Le génome de l'isolat IAF614 a une taille de 1768 pb et possède une structure à tête d'épingle entre les nucléotides (nt) 1750-13 (délimitée par les flèches bleues) et à son sommet, une séquence nonanucléotide conservée entre les nt 1762-2 (soulignée en rouge) et, trois motifs de 6 pb (encadrés en vert) adjacents à un motif répété inversé entre les nt 13 et 35.

Génome entier 614-8 Sequence

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
<u>A</u> CCAGGCGAC	TTGGGCAGCG	GCAGCACTC	GGCAGCACT	CAGCAGCAAC	50
ATGCCCAGCA	AGAAGAATGG	AAGAAGGGGA	CCCCAACCAC	ATAAAAGGTG	100
GGTGTTCACG	CTGAATAATC	CTTCOGAAGA	CGAGCGCAAG	AAAATAAGGG	150
AGCTOCCAAT	CTOCCATATTT	GATTATTTTA	TTGTTGGCGA	GGAGGGTAAT	200
GAGGAAGGAC	GAACACCTCA	CCTOCAGGGG	TTGCTAATT	TTGTGAAGAA	250
GCAACTTTTT	AATAAAGTGA	AGTGGTATTT	GGGTGCCCCG	TGCCATATCG	300
AGAAAGCCAA	AGGAAGTATG	CATCAGAATA	AAGAATATTG	CAGTAAAGAA	350
GGCAACTTAC	TTATTGAATG	TGGAGCTOCT	OGATCTCAAG	GACAAAGGAG	400
TGACCTGTCT	ACTGCTGTGA	GTACCTTGTT	GGAGAGCGGG	AGTCTGGTGA	450
COGTTGCAGA	GCAGCACTCT	GTAAAGTTTG	TCAGAAATTT	CCGCGGGCTG	500
GCTGAACTTT	TGAAAGTGAG	CGGAAAATG	CAGAAGCGTG	ATTGGAAGAC	550
CAATGTACAC	GTCATTGTGG	GGCCACTGGG	GTTGGTTAAA	AGCAAATGGG	600
CTGCTAATTT	TGCAGACCCG	GAAACCACAT	ACTGGAAACC	ACCTAGAAAC	650
AAGTGGTGGG	ATGGTTACCA	TGGTGAAGAA	GTTGGTTGTA	TTGATGACTT	700
TTATGGCTGG	CTGCGGTGGG	ATGATCTACT	GAGACTGTGT	GATCGATATC	750
CATTGACTGT	AGAGACTAAA	GGTGGAACTG	TACCTTTTTT	GGCCCCGAGT	800
ATTCTGATTA	CCAGCAATCA	GACCCCGTTG	GAATGGTACT	CCTCAACTGC	850
TGTOCCAGCT	GTAGAAGCTC	TCTATCGGAG	GATTACTTCC	TTGGTATTTT	900
GGAAGAATGC	TACAGAACAA	TCCACGGAGG	AAGGGGGCCA	GTTGCTCACC	950
CTTTCCCCCC	CATGCOCTGA	ATTTCCATAT	GAAATAAATT	ACTGAGTCTT	1000
TTTTATCACT	TCGTAAATGG	TTTTATTATT	CATTTAGGGT	TTAAGTGGGG	1050
GGTCTTTAAG	ATTAAATTC	CTGAATTGTA	CATACATGGT	TACACGGATA	1100
TTGTAGTCTT	GGTGTATTTT	ACTGTTTTTC	AACGCAGTGC	CGAGGCTTAC	1150
GTTGTCCACA	TTTCTAGAGG	TTTGTAGCCT	CATCCAAAGC	TGATTCTCTT	1200
TGTTATTTTG	TTGGAAGTAA	TCAATAGTGG	AGTCAAGAAC	AGGTTTGGGT	1250
GTGAAGTAAC	GGGAGTGGTA	GGAGAAGGGT	TGGGGGATTG	TATGGCGGGA	1300
GGAGTAGTTT	ACATATGGGT	CATAGGTTAG	GGCTGTGGCC	TTTGTTACAA	1350
AGTTATCATC	TAGAATAACA	GCAGTGGAGC	CCACTCCCC	GTCACCCCTG	1400
GTGATGGGGG	AGCAGGGCCA	GAATTCACCC	TTAACCTTTC	TTATTCTGTA	1450
GTATTCAAAG	GGTATAGAGA	TTTTGTGTGG	CCCCCTCCC	GGGGGAACAA	1500
AGTCGTCAAT	ATTAAATCTC	ATCATGTCCA	CCGCCAGGGA	GGGGGTTCTG	1550
ACTGTGGTAG	CCTTGACAGT	ATATCCGAAG	GTGCGGGAGA	GGCGGGTGT	1600
GAAGATGCCA	TTTTTCCTTC	TCCAACGGTA	GCGGTGTGGG	GGGTGGACGA	1650
GCCAGGGGCG	GCGGCGGAGG	ATCTGGCCAA	GATGGCTGCG	GGGGCGGTGT	1700
CTTCTTCTGC	GGTAACGCTT	CCTTGGATAC	GTCATAGCTG	AAAACGAAAG	1750
<u>AAGTGGCTG</u>	<u>TAAGTATT</u>				1768

Figure 9**Séquence génomique complète de l'isolat québécois CVP2-IAF4370.**

Résultat de séquençage compilé par le programme d'analyse de séquence GenWorks. La séquence génomique du CVP2-IAF4370 a été déposée dans la librairie de GenBank sous le numéro d'acquisition AF118097. Le génome de l'isolat IAF4370 a une taille de 1768 pb et possède une structure à tête d'épingle entre les nucléotides (nt) 1750-13 (délimitée par les flèches bleues) et à son sommet, une séquence nonanucléotide conservée entre les nt 1762-2 (soulignée en rouge) et, trois motifs de 6 pb (encadrés en vert) adjacents à un motif répété inversé entre les nt 13 et 35.

Génome entier IAF4370 Sequence

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACCAGGCGAC	TTCGGCAGCG	GCAGCAOCTC	GGCAGCAOCT	CAGCAGCAAC	50
ATGCCCAGCA	AGAAGAATGG	AAGAAGOGGA	CCCCAACCAC	ATAAAAGGTG	100
GGTGTTCACG	CTGAATAATC	CTTCCGAAGA	CGAGOGCAAG	AAAATAACGG	150
AGCTCCCAAT	CTOCTATTTT	GATTATTTTTA	TTGTITGGOGA	GGAGGGTAAT	200
GAGGAAGGAC	GAACAOCTCA	CCTCCAGGGG	TTGGCTAATT	TTGTGAAGAA	250
GCAAACTTTT	AATAAAGTGA	AGTGGTATTT	GGGTGCCCCG	TGCCACATCG	300
AGAAAGCCAA	AGGAACGTAT	CAGCAGAATA	AAGAATATTG	CAGTAAAGAA	350
GGCAACTTAC	TTATTGAATG	TGGAGCTOCT	CGATCTCAAG	GACAAOGGAG	400
TGAOCTGTCT	ACTGCTGTGA	GTACCTTGTT	GGAGAGOGGG	AGTCTGGTGA	450
COGTTGCAGA	GCAGCAOCTT	GTAACGTTTG	TCAGAAATTT	CCGGGGGCTG	500
GCTGAACTTT	TGAAAGTGAG	CGGGAATATG	CAGAAGOGTG	ATTGGAAGAC	550
CAATGTACAC	GTCATTGTGG	GGCAOCTGGG	GTTGGTTAAA	AGCAAATGGG	600
CTGCTAATTT	TGCAGACCCG	GAAACCACAT	ACTGGAAACC	ACCTAGAAAC	650
AAGTGGTGGG	ATGGTTACCA	TGGTGAAGAA	GTTGGTTGTA	TTGATGACTT	700
TTATGGCTGG	CTGCCGTGGG	ATGATCTACT	GAGACTGTGT	GATCGATATC	750
CATTGACTGT	AGAGACTAAA	GGTGGAACTG	TACCTTTTTT	GGCCCGCAGT	800
ATTCTGATTA	CCAGCAATCA	GACCCCGTTG	GAATGGTACT	CCTCAACTGC	850
TGTCCAGCTT	GTAGAAGCTC	TCTATCGGAG	GATTACTTCC	TTGGTATTTT	900
GGAGAATGTC	TACAGAACAA	TCCACGGAGG	AAGGGGGCCA	GTTGGTCAAC	950
CTTTCCCCCC	CATGCCCTGA	ATTTCATAT	GAAATAAATT	ACTGAGTCTT	1000
TTTTATCACT	TGGTAATGGT	TTTTATTTTT	CATTTAGGGG	TTAAGTGGGG	1050
GGTCTTTAAG	ATTAAATCTT	CTGAATTGTA	CATACATGGT	TACACGGATA	1100
TTGTAGTCTT	GGTGGTATTT	ACTGTTTTCG	AACGCAGTGC	CGAGGCCTAC	1150
GTTGGTCCCA	TTTCTAGAGG	TTTGTAGCCT	CAGCCAAAGC	TGATTCTCTT	1200
TGTTATTTGG	TTGGAAGTAA	TCAATAGTGG	AGTCAAGAAC	AGGTTTGGGT	1250
GTGAAGTAA	GGGAGTGGTA	GGAGAAGGGT	TGGGGGATTG	TATGGCGGGA	1300
GGAGTAGTTT	ACATATGGGT	CATAGGTATG	GGCATTGGCC	TTTGGTACAA	1350
AGTTATCATC	TAGAATAACA	GCAGTGGAGC	CCACTCCCCC	ATCACCCCTG	1400
GTGATGGGGG	AGCAGGGCCA	GAATTCACCC	TTAACTTTTC	TTATTCTGTA	1450
GTATTCAAAG	GGTATAGAGA	TTTTGTGTGG	CCCCCTCCC	GGGGGAACAA	1500
AGTCGTCAAG	CTTAAATCTC	ATCATGTCCA	CCGCCAGGA	GGGGGTGTG	1550
ACTGTGGTAC	GCTTGACAGT	ATATCCGAAG	GTGGGGGAGA	GGGGGTGTG	1600
GAAGATGCCA	TTTTTCCTTC	TCCAACGGTA	GCGGTGGCGG	GGGTGGACGA	1650
GCCAGGGGGG	GCGGCGGAGG	ATCTGGCCAA	GATGGCTGCG	GGGGCGGTGT	1700
CTTCTTCTGC	GGTAACGCCT	CCTTGGATAC	GTCATAGCTG	AAAACGAAAG	1750
AAGTGGCTG	TAAGTATT				1768

Figure 10**Séquence génomique complète de l'isolat québécois CVP2-IAF2897.**

Résultat de séquençage compilé par le programme d'analyse de séquence GenWorks. La séquence génomique du CVP2-IAF2897 a été déposée dans la librairie de GenBank sous le numéro d'acquisition AF408635. Le génome de l'isolat IAF2897 a une taille de 1768 pb et possède une structure à tête d'épingle entre les nucléotides (nt) 1750-13 (délimitée par les flèches bleues) et à son sommet, une séquence nonanucléotide conservée entre les nt 1762-2 (soulignée en rouge) et, trois motifs de 6 pb (encadrés en vert) adjacents à un motif répété inversé entre les nt 13 et 35.

Génome complet IAF2897 Sequence

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACCAGCGCAC	TTCGGCAGCG	GCAGCAOCTC	GGCAGCAOCT	CAGCAGCAAC	50
ATGCCCAGCA	AGAAGAATGG	AAGAAGCGGA	CCCCAACCAC	ATAAAAGGTG	100
GGTGTTCACG	CTGAATAATC	CTTCOGAAGA	CGAGCGCAAG	AAAATAOGGG	150
AGCTOCCAAT	CTOCTATTTT	GATTATTTTA	TTGTTGGCGA	GGAGGGTAAT	200
GAGGAAGGAC	GAACAOCTCA	OCTOCAGGGG	TTCGCTAATT	TTGTGAAGAA	250
GCAAACTTTT	AATAAAGTGA	AGTGGTATTT	GGGTGCCCCG	TGCCACATCG	300
AGAAAGCCAA	AGGAACGTAT	CAGCAGAATA	AAGAATATTG	CAGTAAAGAA	350
GGCAACTTAC	TTATTGAATG	TGGAGCTOCT	CGATCTCAAG	GACAAOGGAG	400
TGACCTGTCT	ACTGCTGTGA	GTACCTTGTT	GGAGAGOGGG	AGTCTGGTGA	450
COGTTGCAGA	GCAGCAOCTT	GTAACGTTTG	TCAGAAATTT	COGOGGGCTG	500
GCTGAACTTT	TGAAAGTGAG	CGGAAAATG	CAGAAGOGTG	ATTGGAAGAC	550
CAATGTACAC	GTCAATTGTG	GGCACCTGG	GTGTGGTAAA	AGCAAATGGG	600
CTGCTAATTT	TGCAGACCOG	GAAACCACAT	ACTGGAAACC	ACCTAGAAAC	650
AAGTGGTGGG	ATGGTTACCA	TGGTGAAGAA	GTGGTTGTTA	TTGATGACTT	700
TTATGGCTGG	CTGCOGTGGG	ATGATCTACT	GAGACTGTGT	GATCGATATC	750
CATTGACTGT	AGAGACTAAA	GGTGGAACTG	TACCTTTTTT	GGCCCGCAGT	800
ATTCTGATTA	CCAGCAATCA	GACCCCGTTG	GAATGGTACT	CCTCAACTGC	850
TGTCCAGCT	GTAGAAGCTC	TCTATOGGAG	GATTACTTCC	TTGGTATTTT	900
GGAAGAATGC	TACAGAACAA	TCCACGGAGG	AAGGGGGCCA	GTTCGTCAAC	950
CTTTCOOOCC	CATGCOCTGA	ATTTCCATAT	GAAATAAATT	ACTGAGTCTT	1000
TTTTATCACT	TCGTAAATGG	TTTTATTATT	CATTTAGGGT	TTAAGTGGGG	1050
GGTCTTTAAG	ATTAAATCTC	CTGAATTGTA	CATACATGGT	TACACGGATA	1100
TTGTAGTCTT	GGTCGTATTT	ACTGTTTTTG	AACGCAGTGC	CGAGGCCTAC	1150
GTTGTCCACA	TTTCTAGAGG	TTTGTAGCCT	CAGCCAAAGC	TGATTCCTTT	1200
TGTTATTTTG	TTGGAAGTAA	TCAATAGTGG	AGTCAAGAAC	AGGTTTGGGT	1250
GTTGAAGTAA	GGGAGTGGTA	GGAGAAGGGT	TGGGGGATTG	TATGGCGGGA	1300
GGAGTAGTTT	ACATATGGGT	CATAGGTTAG	GGCTGTGGCC	TTTGTTACAA	1350
AGTTATCATC	TAGAATAACA	GCAGTGGAGC	CCACTCCCCC	ATCGCCCTGG	1400
GTGATGGGGG	AGCAGGGCCA	GAATTCAACC	TTAACCTTTC	TTATTCTGTA	1450
GTATTCAAAG	GGTAGAGAGA	TTTTGTTTGG	CCCCCCTCC	GGGGGAACAA	1500
AGTCGTCAAG	TGTAAATCTC	ATCATGTCCA	CTGCCAGGA	GGGCGTTCTG	1550
ACTGTGGTAG	OCTTGACAGT	ATATCOGAAG	GTGGGGGAGA	GGGGGGTGT	1600
GAAGATGCCA	TTTTTCCTTC	TOCAACGGTA	GCGGTGGCGG	GGGTGGACGA	1650
GCCAGGGGCG	GCGGCGGAGG	ATCTGGCCAA	GATGGCTGCG	GGGGCGGTGT	1700
CTTCTTCTGC	GGTAACGCCT	CCTTGGATAC	GTCATAGCTG	AAAACGAAAG	1750
AAGTGGCTGT	TAAGTATT				1768

nucléotides et 64% d'identité au niveau des acides aminés. Dans leur totalité, les génomes des souches québécoises du CVP associées au SDPS ont démontré que 66% d'identité avec celui du CVP-PK-15 (N° d'acquisition U49186) (**tableau 9**). Entre les souches québécoises et la souche de référence de l'Ouest canadien (N° d'acquisition AF027217), les analyses ont révélé 99% d'identité au niveau des nucléotides. En ce qui concerne l'organisation génomique, la recherche de cadres de lecture ouverts potentiels s'est effectuée à l'aide du programme "ORF Finder" offert au site d'Internet NCBI. Ce programme d'informatique a pu révéler jusqu'à 10 ORFs, 5 transcrits à partir du brin viral et 5 autres transcrits à partir du brin complémentaire, potentiellement susceptibles de coder pour des protéines virales. Le programme BLAST, retrouvé au même site d'Internet, a révélé pour l'ORF1 des trois isolats de CVP2 québécois des similitudes très élevées avec les protéines Rep putatives de nombreux circovirus. Il a aussi été possible de trouver, dans l'ADN génomique des trois isolats, les trois éléments caractéristiques de l'origine de réplication chez tous les circovirus, à l'exception du CAV, et les geminivirus: trois motifs de 6 pb (5'- CGGCAG -3') adjacents à un motif répété inversé entre les nt 13 et 35, une structure à tête d'épingle entre les nt 1750 à 13 et à son sommet, une séquence nonanucléotide conservée (5'- AAGTATTAC -3') entre les nt 1762 à 2.

Discussion

Les résultats du séquençage de l'ADN génomique de trois isolats de CVP2 ont permis de déterminer dans les trois cas des génomes d'une taille de 1768 pb, soit le même nombre de nucléotides que celui d'autres souches de CVP2 rapportées par d'autres auteurs (Hamel *et al.*, 1998, Meehan *et al.*, 1998, Morozov *et al.*, 1998). Ils ont aussi révélé qu'ils étaient génomiquement distincts de la souche non-pathogène retrouvée dans la lignée cellulaire PK-15 (CVP1). La taille de ce dernier est 9 nucléotides de moins que celle des trois isolats de CVP2. Le tableau 9 indique qu'il existe 66% d'identité entre l'ADN des isolats CVP2 québécois et celui du CVP1. Cette différence est relativement énorme pour un si petit virus dont la taille du génome ne mesure que 1768 pb. La majorité des variations génomiques existant entre les souches CVP1 et CVP2 se retrouvent dans le second plus long ORF. Par contre, aucune différence marquée n'a pu

Tableau 9 Pourcentage d'identité au niveau génomique entre les souches canadiennes du CVP2 et la souche CVP1.

	CVP2 (SDPS)			
	IAF614-8 (AF118095)	IAF4370 (AF118097)	IAF2897 (AF408635)	Nayar (AF027217)
CVP1(PK-15) (U49186)	66%	66%	66%	67%

être constatée entre les isolats québécoises et de l'Ouest canadien. Ce qui signifie qu'il n'existe quasiment aucune variation génomique entre les isolats de CVP2 au Canada.

En utilisant le programme d'informatique "ORF Finder", dix ORFs potentiels ont pu être déduits à partir des analyses des séquences d'ADN génomique des trois isolats québécois (**figure 11A**). Ce résultat a été obtenu en utilisant le critère universel et les paramètres de recherche d'ORFs se limitant à au moins 100 pb de long et commençant avec un codon d'initiation ATG. Le résultat ne coïncide ni avec le nombre d'ORFs rapporté par Hamel *et al.* (1998) pour les souches CVP1 et CVP2, ni avec celui rapporté par Meehan *et al.* (1997) ou Mankertz *et al.* (1998) pour la souche CVP1. Cette divergence dans les déductions des uns et des autres s'explique par le fait que ceux-ci n'ont pas utilisé le même programme d'informatique pour établir leurs prédictions. En effet, l'utilisation de programmes différents tel que "GenWorks" ou "McVector" n'aboutit pas à la prédiction du même nombre d'ORFs. Par contre, si l'on utilise le programme "ORF Finder", qui est après tout un outil de recherche d'accessibilité gratuit et universel, il devient possible d'obtenir le même résultat en termes d'ORFs, à l'exception de l'ORF4 dont la taille varie de 255 pb (Hamel *et al.*, 1998) à 261 pb dans la présente étude (**figure 11B**).

Le fait d'avoir découvert dans les séquences d'ADN génomique les trois éléments caractéristiques de l'origine de réplication, dénote le haut degré de similitude de l'organisation génomique des trois isolats isolés à partir de cas cliniques avec celles des autres membres de la famille des *circoviridae* et des *geminivirus*. En somme, l'analyse des séquences d'ADN des trois isolats de CVP, isolés à partir de porcs montrant des signes du SDPS, confirme sans ambiguïté qu'elles correspondent au génotype 2 du CVP.

Figure 11**Déduction des cadres de lecture ouverts potentiels des souches québécoises du CVP2 et de ceux d'une souche de l'Ouest canadien.**

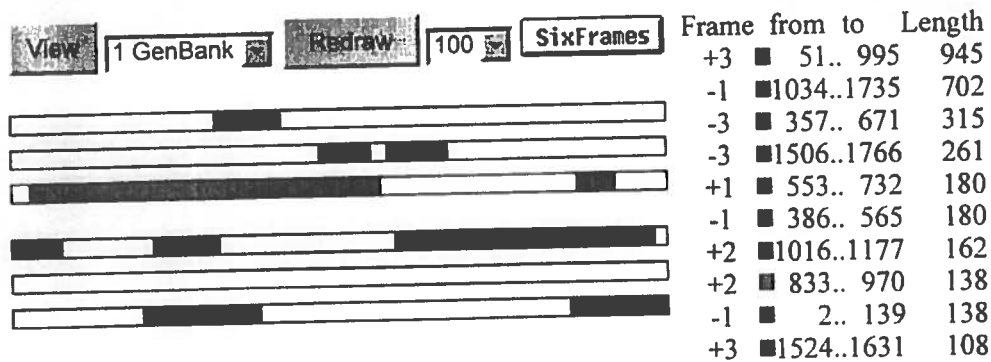
Résultat d'une recherche de cadres de lecture ouverts (ORFs) potentiels effectuée à partir du programme d'informatique "ORF Finder". Celui-ci est accessible gratuitement et universellement au site d'Internet NCBI. Ce programme d'informatique a révélé 10 ORFs potentiels dans le génome du CVP2, 5 transcrits à partir du brin viral (+1 à +3) et 5 autres transcrits à partir du brin complémentaire (-1 à -3). **A.** Prédiction d'ORFs potentiels obtenus à partir de la souche de référence québécoise CVP2-IAF2897 (identiques à celles des deux autres isolats québécois). **B.** Prédiction d'ORFs potentiels obtenus à partir de la souche CVP2 de référence de l'Ouest canadien (Hamel *et al.*, 1998).

A.

NCBI ORF Finder (Open Reading Frame Finder)

PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

Porcine circovirus type 2 isolate IAF2897 complete genome

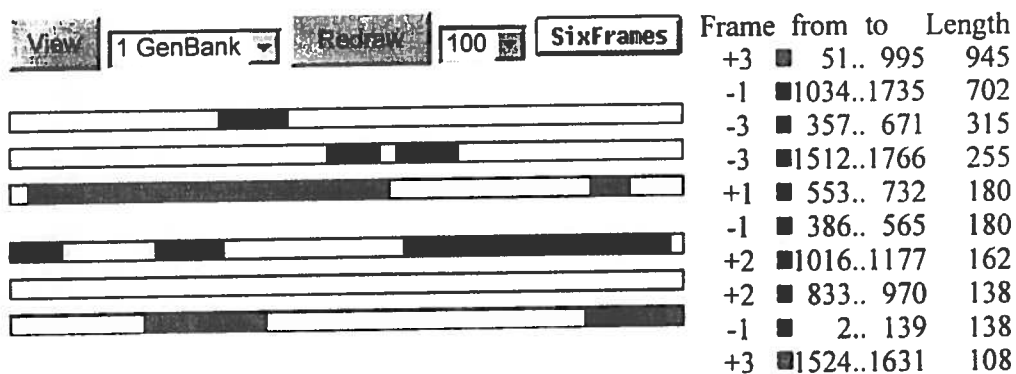


B.

NCBI ORF Finder (Open Reading Frame Finder)

PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure

Porcine circovirus strain pmws PCV, complete genome.



CHAPITRE 2

volet propagation *in vitro*

2.1 Introduction

Le deuxième volet de ce projet de recherche a été la propagation *in vitro* du CVP2. En raison du manque de connaissance sur la biologie de ce nouveau virus et sur sa culture *in vitro*, des objectifs élémentaires à son étude ont été fixés. Il s'agissait tout d'abord de tenter d'isoler divers isolats de CVP2, de suivre la propagation d'au moins une souche de CVP2 au cours de passages consécutifs et de produire en culture un stock de la souche CVP1 purifiée à des fins ultérieures, soit la production d'anticorps, objectif du troisième volet. De plus, en raison des événements qui sont survenus au cours de l'accomplissement de nos objectifs, des études complémentaires ont été rajoutées pour y supplées. Certaines d'entre elles étaient de nature à nous préparer éventuellement à des projets futurs, telle que l'étude du cycle de réplication du virus. Toutefois, afin de parvenir à la réalisation des objectifs de ce volet, la plupart des études se sont inspirées de travaux de chercheurs ayant œuvré sur le sujet, de même que de connaissances de base sur les virus à ADN.

Dans la tentative d'isolement d'isolats du CVP2 en culture, notre investigation a été primordialement centrée sur la lignée cellulaire PK-15A. Au fur et à mesure de l'avancement du projet, d'autres études *in vitro* portant sur le tropisme viral ont été ajoutées, telle que la propagation d'une souche du CVP2 sur des cultures primaires de macrophages alvéolaires de porc (PAM) et sur la lignée cellulaire PFT. En effet, il a été rapporté que la réplication *in vitro* des CVP est accomplie avec de meilleurs résultats lorsque le virus est inoculé sur un feuillet semiconfluent de cellules PK-15A (Allan et Ellis, 2000). De plus, il a été établi que le CVP1 peut se multiplier aussi sur d'autres lignées cellulaires de porc (Allan, McNeilly *et al.*, 1999). Par contre, il a été observé que des passages prolongés sur des cellules Vero entraînaient des changements antigéniques du virus (Allan *et al.*, 1994).

L'objectif visant à suivre la propagation d'au moins une souche de CVP2 au cours de passages consécutifs a été réalisé principalement à l'aide d'épreuves d'IFI. La raison qui a justifié ce choix est qu'aucun effet cytopathique n'a été reconnu avec les deux souches

de CVP (Allan et Ellis, 2000). Ainsi l'IFI est une technique qui nous permettait d'évaluer le pouvoir infectieux des isolats entre les différents passages et de suivre la réplication du virus. En effet, depuis les premières expériences d'inoculation de cellules PK-15A (PK-15 exemptes de CVP1: Tischer *et al.*, 1982) par le CVP1 (Tischer *et al.*, 1986) et jusqu'à présent, la réplication des CVP sur des cultures de cellules infectées est contrôlée par des tests d'IFI ou d'immunoperoxydase (Allan et Ellis, 2000). Le profil de fluorescence spécifique observé sur un feuillet cellulaire infecté par le CVP est une fluorescence dense localisée typiquement au noyau et, à l'occasion, dans des inclusions intra-cytoplasmiques (Tischer *et al.*, 1995).

Conjointement aux objectifs élémentaires visés dans ce volet, des expériences complémentaires ont aussi été réalisées dans le but de vérifier la crédibilité de nos observations. C'est dans ce sens d'ailleurs, qu'a été assumée une évaluation de la spécificité des techniques utilisées pour le suivi de l'isolat propagé en cultures cellulaires. Cette initiative avait été entreprise suite aux recommandations suggérées par certains auteurs. En raison de la similitude de fluorescence observée en IFI par les isolats de CVP et de PPV, ces auteurs ont conseillé de prendre des mesures de prudence avec le sérum qui est utilisé pour l'immunomarquage des cellules infectées (Allan et Ellis, 2000).

Ce chapitre présente également deux études qui nous ont permis de mieux comprendre la réplication du CVP2 et ses besoins, et par conséquent, d'apprendre à mieux le manipuler en cultures cellulaires. L'une d'elles visait à étudier l'effet de la D-glucosamine sur la réplication du CVP2. Il a été démontré que la réplication de l'ADN du CVP1 est dépendante des enzymes cellulaires de la phase S (Tischer *et al.*, 1987). Ces auteurs ont également ajouté que la mitose est nécessaire à l'inclusion de l'ADN viral dans le noyau de la cellule et qu'artificiellement, il était possible d'induire le transfert de l'ADN viral dans le noyau à l'aide d'un court traitement à la glucosamine. Normalement, la réplication de l'ADN dans les cellules d'animaux s'effectue au cours d'une période restreinte du cycle cellulaire, soit la phase S. Or, les cellules de plusieurs tissus sont la plupart du temps dans un état de non division et contiennent des concentrations en desoxynucléotides et en enzymes (associés à la réplication de l'ADN) insuffisantes pour

supporter plusieurs cycles de réplication virale. Afin de surmonter ce manque d'enzymes et de précurseurs nécessaires à la synthèse d'ADN, les virus simples à ADN doivent se répliquer exclusivement dans des cellules en division (e.g.: Parvovirus) ou concevoir un moyen d'arriver à induire des conditions qui permettent la synthèse d'ADN (e.g.: Adénovirus) (Watson *et al.*, 1989). Dans le cas du CVP1, le traitement à la D-glucosamine a été la stratégie utilisée par certains auteurs pour stimuler, de façon artificielle, la cellule à entrer dans la phase S et de répliquer simultanément l'ADN viral (Tischer *et al.*, 1987). Par ailleurs, d'autres auteurs ont encouragé la communauté scientifique à prendre des mesures de prudence lors du traitement à la D-glucosamine, en raison de la nature toxique de ce composé chimique pour les cellules (Allan et Ellis, 2000).

L'autre volet de ces études a porté sur la cinétique de production du CVP2. Malgré qu'elle ne figurait pas dans les objectifs initiaux, celle-ci a été néanmoins cruciale à plusieurs égards. L'initiative de cette étude est survenue suite aux nombreuses contraintes rencontrées au cours de la tentative de propagation *in vitro* du CVP2. Il devenait primordial d'examiner et de définir plus en détails l'effet produit sur les cultures de cellules PK-15A par le CVP2. De plus, il a fallu déterminer le matériel infectieux de choix pour effectuer les passages viraux, ainsi que fixer les conditions nécessaires pour atteindre la production virale maximale. Par conséquent, afin de mesurer la charge infectieuse produite par les cellules, le choix s'est porté sur la méthode de dilution limite exprimée en TCID₅₀, précédemment utilisée par d'autres auteurs (Tischer *et al.*, 1987, Ellis, Krokowka *et al.*, 1999, Rodriguez-Arriola *et al.*, 2000). En fait, la méthode de dilution limite reste jusqu'à ce jour une technique de choix pour quantifier la virulence d'une suspension biologique, lorsque la technique de "plaque assay" ne peut être appliquée sur le virus à l'étude (Davis *et al.*, 1990, Flint *et al.*, 2000).

Le dernier objectif de ce chapitre consistait en la production d'un stock de CVP1 sur cultures cellulaires. Celui-ci a été fixé pour répondre à un besoin précis de l'un des objectifs du 3^e volet de ce projet d'étude. La procédure de production du CVP1 qui a été employée était basée sur le fait que le CVP1 a la capacité d'infecter chroniquement la

lignée cellulaire PK-15 et de s'y répliquer de façon autonome (Tischer *et al.*, 1982). En plus, l'effet de la glucosamine a été mise à profit, sachant qu'il avait été antérieurement possible d'augmenter la production virale suite à un traitement à la glucosamine (Tischer *et al.*, 1987). Ce virus, de même que le CVP2 récupéré aux cours des différentes expériences ont été purifiés par ultracentrifugation isopycnique dans le but d'immuniser les animaux destinés à la production d'antisérums polyclonaux.

2.2 Méthodes et Matériel

2.21 Cultures cellulaires

2.211 Lignées cellulaires

La lignée cellulaire de rein de porc PK-15 (ATCC-CCL 33) a été obtenue gracieusement du Dr A. Afshar, Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada, Nepean, Ontario, Canada. D'autre part, la lignée cellulaire de rein de porc PK-15A a été obtenue du " National Veterinary Service Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa, É.-U.". Cette dernière à l'instar des cellules PK-15 est exempte du CVP1. Les cultures de cellules PAM ont été préparées à partir des cellules récoltées suite à des lavages broncho-alvéolaires de poumons de jeunes porcelets exempts de pathogènes spécifiques (SPF) de 5 à 10 semaines d'âge. La lignée cellulaire PFT, issue de la trompe de Fallope de truie, nous a été gracieusement fournie par le Dr Alain Bouillant, Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada, Nepean, Ontario, Canada.

2.212 Passages cellulaires

Les lignées PK-15 et PK-15A ont été ensemencées à des concentrations de 60 000 cellules/ml dans des flacons de culture en plastique d'une surface de 25 cm² ou de 75 cm², ou dans des pétris de 60 mm de diamètre (Corning Glass Works, NY, É.-U.). Les cellules ont été cultivées dans le milieu minimal essentiel contenant une base saline de Earle (MEM-Earle) (GIBCO-BRL Laboratories Inc., Grand Island, NY, É.-U.) auquel étaient ajoutés 100 unités (U) par millilitre (ml) de pénicilline (GIBCO-BRL) et 100 µg/ml de streptomycine (GIBCO-BRL), 0,2% de gentamycine sulfate (25 µg/ml), 1% de pyruvate de sodium (GIBCO-BRL), 1% de L-glutamine (0,584 g/L) (GIBCO-BRL), 1% d'acides aminés non essentiels (GIBCO-BRL) et 2% v/v (pour le maintien des cellules) ou 5% v/v (pour la croissance des cellules) de sérum fœtal bovin (SFB; Multi Ser™). Ce dernier avait été préalablement décomplémenté par une incubation à 56°C pendant 30 minutes. Enfin, les cultures cellulaires étaient incubées à une température de 37°C en présence de 5% de dioxyde de carbone (CO₂).

Les cellules de la lignée PFT ont étéensemencées à des concentrations de 100 000 cellules/ml dans des flacons de culture en plastique d'une surface de 25 cm² ou 75 cm², ou dans des pétris de 60 mm de diamètre. Elles ont été cultivées dans le milieu MEM modifié de Dulbecco avec une base saline d'Eagle (DMEM, GIBCO-BRL) additionné de 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, 0,2% de gentamycine sulfate (25µg/ml), 1% de L-glutamine et 10% SFB. Les cultures de cellules PFT ont été incubées à une température de 37°C en présence de 5% de CO₂.

Les cellules PAM ont été décongelées à partir d'un stock entreposé à -80°C et ont été resuspendues par pipettage dans une solution saline phosphatée (PBS) ajustée à un pH de 7.4, préalablement réchauffée à 37°C. Elles ont été par la suite propagées à une concentration de 1x10⁶ cellules/ml dans des plateaux de 96 puits (Nalge Nunc International, Nalgene, NY, É.-U.) et maintenues dans du milieu DMEM additionné de 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, 100 µg/ml d'amphotéricine B (fugizone; GIBCO-BRL), 1% de L-glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% pyruvate de sodium, 1% anti-PPLO (tylosine, GIBCO-BRL) et 10% SFB. Les cellules PAM étaient incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂ pendant 48 heures, avant d'être infectées avec du surnageant de culture infecté par le CVP2.

Lorsque les feuillets des cellules PK-15, PK-15A et PFT avaient atteint une confluence de 85-95%, le milieu de croissance était vidangé et les feuillets cellulaires étaient rincés avec une solution de PBS, pH 7.4, préchauffé à 37°C. Puis, les cellules étaient dissociées et détachées de la surface du flacon après avoir été incubées à 37°C pour 15-20 min. en présence d'une solution de 0,25% de trypsine (Worthington Biochemical Co, Freehold, NJ, É.-U.). Cette dernière solution était préparée dans du PBS exempt de calcium (Ca⁺²) et de magnésium (Mg⁺²), afin d'empêcher l'aggrégation des cellules entre elles et le substrat de culture. De plus, la solution de trypsine était supplémentée de 0.04% d'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA; Sigma-Aldrich chemical Co., St-Louis, MO, É.-U.) nécessaire pour la dispersion des cellules. L'effet de la trypsine était arrêtée par l'ajout de milieu de croissance contenant du SFB, agissant comme inhibiteur de la trypsine. Une fois que les cellules étaient remises en suspension,

la concentration cellulaire était déterminée suite au dénombrement des cellules viables non-colorées au bleu de trypan (1%) à l'aide d'un l'hémacytomètre. Ainsi, les passages subséquents étaient réalisés en ensemençant les cellules dans de nouveaux flacons à des concentrations de 60 000 (PK-15) à 100 000 (PFT) cellules /ml.

2.22 Origine des virus

2.221 Isolats cliniques du CVP2

Aussi bien frais que congelés, des spécimens provenant d'organes de porc (poumons, nœuds lymphatiques, rates, amygdales) ont été obtenus des laboratoires régionaux de pathologie animale du Ministère d'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) et des pathologistes de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada. Ces spécimens cliniques ont été prélevés chez des porcelets âgés de 5 à 12 semaines, manifestant des problèmes respiratoires accompagnés de pertes de poids progressives. Par ailleurs, ces échantillons de tissus de porc ont été acheminés à notre service de diagnostic dans le but d'obtenir un diagnostic définitif de SDPS, suite à la détection du génome du CVP2 au moyen des tests PCR.

2.222 Souche de référence du CVP1

Comme il a été mentionné auparavant, le CVP1 a été isolé à partir de la lignée cellulaire de rein de porc PK-15 (ATCC-CCL 33) infectée de façon persistante. Par conséquent, le CVP1 peut se propager naturellement d'un passage à l'autre dans les cellules PK-15 sans pour autant produire d'effet cytopathique.

2.223 Souche de référence du PPV

Une aliquote de la souche de référence ATCC VR-742 (NADL-2) du parvovirus porcin (PPV) purifiée nous a été gracieusement fournie par le laboratoire de diagnostic virologique du MAPAQ. Après l'avoir propagé sur des feuillets de cellules PFT, le virus a tout d'abord été libéré par trois cycles de gel-dégel et ensuite clarifié à partir des surnageants par centrifugation. Le titre infectieux fut déterminé par le personnel du

MAPAQ par un test d'hémagglutination, et exprimé selon la réciproque de la plus haute dilution du surnageant causant l'agglutination des globules rouges de cochons d'Inde ou causant un effet cytopathique dans 50% des feuillets de cellules PFT infectées. Le PPV nous a ainsi été fourni à un titre de $10^{7.2}$ TCID₅₀/50µl. et repropagé dans notre laboratoire sur les cellules PFT.

2.23 Isolement et propagation des virus

2.231 Préparation des homogénats

Parmi les spécimens de tissus de porc reçus à notre service de diagnostic, 26 d'entre eux, s'étant avérés positifs pour la présence du CVP2 par le test de PCR, ont été soumis à une tentative d'isolement viral. Des aliquotes de 100 à 500 mg prélevées des tissus de porc (CVP2+) ont été homogénéisées à l'aide d'un "pellet pestle de Kontes" (VWR Scientific products, West chester, PA, É.-U.) dans du milieu MEM-E supplémenté de 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 100 µg/ml d'amphotéricine B, de façon à obtenir des homogénats de 5 à 20%. Les suspensions de tissus homogénéisés ont été par la suite clarifiées par une centrifugation de 3000 x g pour 30 min. à 4°C et extraites une fois avec 2/3 de volume de trichlorotrifluoroéthane (Fréon; Fischer Scientific, Dorval, Quebec, Canada). Après une centrifugation subséquente de 3000 x g pour 30 minutes, la phase du dessus a été recueillie et filtrée au travers de filtres membranaires d'une porosité de 0.22 µm (Sartorius, Mississauga, Ontario, Canada). L'inoculum ainsi préparé était prêt pour l'infection des cellules PK-15A.

2.232 Isolement des isolats du CVP2

2.2321 Propagation du CVP2 sur les cellules PK-15A

Les différents isolats québécois du CVP2 ont été propagés sur la lignée cellulaire PK-15A. Un volume de 0.5 ml des homogénats tissulaires clarifiés étaient inoculés sur des feuillets cellulaires PK-15A semi-confluents préparés soit dans des pétris de 60 mm de diamètre ou des flacons de culture de 25 cm² de surface. Les feuillets étaient par la suite incubés à 37°C pendant 90 minutes sous une légère agitation pour favoriser l'adsorption

et la distribution uniforme du virus sur les feuillets cellulaires. Après avoir vidangé l'homogénat, les cellules infectées étaient lavées à deux reprises avec une solution de PBS (pH 7.4). Elles étaient par la suite ré-incubées, jusqu'au traitement à la D-glucosamine, dans 10 ml de milieu de croissance consistant en du milieu MEM-E supplémenté de 5% SFB. Après le traitement à la D-glucosamine, les feuillets cellulaires infectés étaient remis en incubation pendant 2 à 3 jours supplémentaires dans 10 ml de milieu de maintien consistant en du milieu MEM-E ne contenant que 2% SFB. Par la suite, les cultures infectées étaient soumises à 3 cycles de gel-dégel (de -80°C à 37°C) afin de favoriser la libération dans le surnageant des particules virales produites par les cellules infectées. Les lysats cellulaires étaient finalement clarifiés par une centrifugation à 3000 x g pour 15 minutes et les surnageants étaient filtrés au travers des filtres membranaires d'une porosité de 0.22 µm et entreposés à -80°C. Ces surnageants infectieux clarifiés ont servi pour les passages subséquents des isolats.

2.2322 Propagation du CVP2 sur les cellules PFT

Dans le cas de l'isolat IAF-2897, sa propagation a également pu être effectuée sur la lignée cellulaire PFT. Dans cette expérience, trois feuillets cellulaires PFT semi-confluents ont été infectés avec 0.5 ml du surnageant infectieux de l'isolat IAF-2897, dans des pétris de 60 mm, pendant 90 minutes sous les mêmes conditions d'incubation citées plus haut. Parmi les pétris contenant des cellules infectées, deux ont été traités à la D-glucosamine, 24 heures post-infection. De plus, un pétri de PK-15A non infecté a aussi été traité avec ce glucide aminé. Enfin, tous les pétris traités ont été remis avec les autres en culture, pendant 2 à 3 jours additionnels, avant de faire l'objet d'un passage subséquent en plateaux de 96 puits ou d'être simplement fixés à l'acétone.

2.2323 Propagation du CVP2 sur les cellules PAMs

Il a été aussi possible de propager l'isolat IAF-2897 sur les cellules PAMs. Dans cette expérience, les infections se sont déroulées sur une période de 48 heures suivant l'ensemencement des cellules dans des puits de plateaux de 96 puits. Ainsi, les cellules PAMs adhérentes au plastique et occupant plus de 75% de la surface ont été infectées avec 0.06 ml de l'isolat IAF-2897 sous les mêmes conditions d'infection citées plus haut. Par

contre, le traitement des cellules infectées à la glucosamine fut omis. Après une période de 5 jours d'incubation, un test d'immunofluorescence indirecte a été effectué pour confirmer la présence du virus. Une série de puits contenant des cellules saines ont également été infectées avec la souche de référence du CVP1 (lysate de cellules PK-15 clarifié), reproduisant ainsi en partie les expériences effectuées par d'autres auteurs (McNeilly *et al.*, 1995).

2.233 Propagation du CVP1 sur les cellules PK-15 et PK-15A

Puisque le CVP1 infecte de façon persistante les cellules PK-15, la production de ce virus ne requiert donc pas d'infections effectuées en série avec un inoculum du CVP1. Il suffisait de maintenir les cellules PK-15 en culture et, lorsque les tapis cellulaires atteignaient 70-80% de confluence, de les traiter avec une solution de D-glucosamine afin d'augmenter la production des particules infectieuses dans les cellules (Tischer *et al.*, 1987). Les cellules PK-15 traitées ont été maintenues en culture pour 2 à 3 jours additionnels avant d'être passées ou fixées. Par ailleurs, des feuillets cellulaires PK-15A semi-confluents préparés dans des flacons de culture de 25 cm² ont été infectés avec 0.5 ml d'un lysat cellulaire PK-15 pendant 90 minutes sous une légère agitation pour favoriser l'adsorption et une distribution uniforme du virus. Le lysat cellulaire PK-15 fut obtenu suite à trois cycles gel-dégel (de -80°C à 37°C) et une clarification à 3000 x g pour 15 minutes. Son infectivité fut évaluée en plateaux de 96 puits par un test d'immunofluorescence indirecte (IFI). Par ailleurs, ce lysat de cellules PK-15 représentait notre contrôle positif d'infection lors des essais de propagation des isolats du CVP2 en cultures cellulaires.

2.234 Propagation du PPV (NADL-8) sur les cellules PFT

La propagation de la souche NADL-8 du PPV s'est effectuée en plateaux de 96 puits (Nalge Nunc International, Nalgene, NY, É.-U.). Des dilutions sérielles de 10⁻¹ à 10⁻⁷ ont été effectuées et 0.025 ml des dilutions de 10⁻⁴ à 10⁻⁷ ont été transférées dans chaque puits. Un volume de 0.1 ml d'une suspension de cellules PFT (300 000 cellules/ml) a par la suite été ajouté dans chaque puits contenant les dilutions virales. Le plateau a par la suite été incubé à 37°C en présence de 5% de CO₂. La fixation des feuillets cellulaires

infectées fut effectuée dès que l'apparition d'un effet cytopathique conduisant à la dégénérescence cellulaire fut mis en évidence. Le plateau fixé fut entreposé à -20°C jusqu'à l'exécution des tests d'IFI.

2.235 Traitement à la D-glucosamine

Généralement, les cultures cellulaires qui avaient été infectées la veille et préparées dans des pétris de 60 mm de diamètre et des flacons de 25 cm^2 de surface, recevaient 0.5 ml d'une solution de 200 mM de D-glucosamine-HCl (Sigma-Aldrich) et étaient incubées pendant 30 min (au maximum) à 37°C sous agitation. La solution de D-glucosamine-HCl était préparée dans du milieu MEM-E additionné de 1% de pyruvate de sodium et de 2% SFB. Ce traitement était réalisé seulement si le feuillet cellulaire avait atteint une confluence dépassant les 60%, étant donné l'effet toxique de la D-glucosamine sur les cellules (Molnar et Bekesi, 1972). Une fois la période du traitement terminée, les feuillets étaient rincés deux fois au PBS (pH 7.4) avant d'être maintenus dans 5 à 10 ml de milieu de maintien contenant du MEM-E enrichi et 2% SFB. De façon similaire, les plateaux de 96 puits ont été traités avec la solution de 200 mM de D-glucosamine. Dans ce cas, 0.06 ml du glucide aminé était cependant déposé dans chaque puits et 0.1 ml du milieu de maintien était ajouté, après la série de lavages, suivi d'une incubation de 2 à 3 jours.

Par ailleurs, des expériences visant à étudier l'effet de la concentration de la solution de la D-glucosamine sur le nombre de cellules produisant du CVP2 ont été effectuées en utilisant le même isolat du CVP2. Effectivement, des feuillets cellulaires PK-15A semi-confluents, préparés dans des pétris de 60 mm de diamètre, ont été infectés avec 0.5 ml du surnageant infectieux de l'isolat IAF-2897, dans les mêmes conditions d'infection citées plus haut. Certains feuillets ont été traités avec la solution de 200mM de D-glucosamine, alors que les autres ont été traités avec 300mM de D-glucosamine. Des contrôles non infectés ont été traités aux même concentrations du glucide aminé.

2.236 Cinétique de production du CVP2

Dans cette expérience, des cultures cellulaires PK-15A semi-confluents, préparées dans des pétris de 60 mm de diamètre ont été infectées avec 0.5 ml du surnageant

infectieux de l'isolat IAF-2897, dans les mêmes conditions d'infection citées plus haut. À l'exception des étapes après la période d'adsorption du virus, où le surnageant n'a pas été vidangé des pétris et 5 ml de milieu de maintien ont été rajoutés avant qu'ils ne soient remis en incubation. Cette prolongation du temps d'adsorption devait permettre aux particules virales d'infecter les cellules-filles engendrées entre le jour de l'inoculation et celui du traitement à la glucosamine. La majorité des cultures ont été traitées après un peu plus de 12 heures post-infection (p.i.) avec une solution de 200mM de D-glucosamine. Par la suite, ces cultures ont été fixées à l'acétone froid à un jour d'intervalle et ont été entreposées à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des tests d'IFI pour évaluer l'infectivité. Leurs surnageants ont été récoltés et entreposés jusqu'à l'évaluation des titres infectieux du virus extracellulaire. Ainsi, il fut possible de suivre les titres infectieux durant une période de 6 jours p.i. et de déterminer ultérieurement la cinétique de production du CVP2 dans un intervalle de temps déterminé. De plus, des observations ont été notées et des photos ont été prises au microscope photonique à inversion à chaque jour p.i.

2.237 Titrage et index d'infectivité

Le titre infectieux fut mesuré par la méthode des dilutions limites en utilisant des plateaux de 96 puits dans lesquels des feuillets cellulaires furent inoculés avec des dilutions sérielles du surnageant à évaluer. Les valeurs en TCID₅₀ ont été obtenues par la méthode de calcul de Reed et Muench (1938). Cependant, des modifications ont été effectuées au niveau de l'interprétation des résultats. Compte-tenu qu'aucun effet cytopathique (ECP) n'a été reconnu dans le cas du CVP2, l'interprétation du titre infectieux par la méthode Reed et Muench n'était donc pas applicable. Ainsi, dans la version modifiée, l'infectivité a été déterminée par la mise en évidence d'une fluorescence nucléaire spécifique en IFI au lieu d'être reconnu en terme d'ECP. De plus, les résultats ont été exprimés selon la dilution limite à laquelle 50% des puits montraient une fluorescence positive. Tout d'abord, 0.1 ml du surnageant infectieux, préalablement dilué 1/5 fut déposé dans les puits de la première rangée d'un plateau de 96 puits contenant les feuillets cellulaires et 0.08 ml de MEM-E dans tous les autres puits des rangées subséquentes. Afin d'obtenir des dilutions sérielles à base 5, 0.02 ml de la

dilution virale était transférée de la rangée antécédente à la rangée suivante (jusqu'à la dilution 1/78 125). Une fois la période d'adsorption écoulée, 0.12 ml de MEM-E enrichi avec 2% SFB était ajouté dans tous les puits infectés et le plateau était replacé à l'incubateur à 37°C. Après avoir propagé les dilutions des surnageants infectieux sur des cultures cellulaires semi-confluentes, les feuillets ont été fixés 2 à 3 jours p.i. et les titres infectieux déterminés par la méthode modifiée de Reed et Muench (1938).

L'index d'infectivité fut défini selon l'intensité de la fluorescence spécifique localisée dans le noyau des cellules infectées (Tischer et al., 1987). Par conséquent, cette information n'a permis que d'estimer qualitativement le degré d'infectivité des surnageants à évaluer. Un puits était reconnu positif si au moins 1 cellule émettait une fluorescence nucléaire spécifique. Dans les études sur la cinétique de production du CVP2, l'effet de la D-glucosamine sur la réplication virale et la propagation du CVP2 dans les cellules PFT, et les valeurs obtenues en TCID₅₀ ont été exprimées de façon relative sous forme d'un histogramme ou d'une courbe. Ceci avait comme but d'alléger l'éventuel manque de précision des titres infectieux obtenus par la méthode de titrage utilisée.

2.24 Production et purification des virus

2.241 CVP1

À partir d'une culture de cellules PK-15 équivalent à une production de 10 flacons de 150 cm², le culot cellulaire fut resuspendu dans 5 ml de milieu MEM-E. Le virus présent dans les cellules infectées par le CVP1 de façon persistante fut récolté après trois cycles de gel-dégel (de -80°C à 37°C) à partir du surnageant. Le lysat cellulaire fut aussi traité avec un volume égal de Fréon, puis homogénéisé à l'aide d'un vortex pour 5 minutes à la température de la pièce. Le mélange fut centrifugé à 2000 x g pour 20 minutes et la phase du dessus (ou aqueuse) fut récoltée. Cette dernière fut mixée au surnageant clarifié et le tout placé sur un gradient continu de 1.2-1.4 g/cm³ de chlorure de césium (CsCl) dans des tubes Ultra-Clear[™] de 12.5 ml (Beckman Coulter, Mississauga, Ontario, Canada). Les solutions de CsCl ont été préparées dans du tampon TNE (0.02 Tris-HCl, 0.15 M NaCl,

1 mM EDTA) à pH 8.0. Après une ultracentrifugation isopycnique de 27 heures à 100 000 x g avec un rotor 40 Ti (Beckman Coulter) dans une ultracentrifugeuse de type L8-55 (Beckman Coulter), les particules virales formant deux bandes furent récoltées (2 fractions de 1 ml). Chacune des deux fractions fut mélangée à 1 ml de TNE, puis déposée dans un tube de dialyse d'une limite de poids moléculaire de 6-8000 Dalton [(MWCO) (Spectrum laboratories inc., CA, USA)]. Les deux fractions furent soumises à une période de dialyse de 24 heures à température de la pièce contre 500 volumes d'une solution de TBS (0.85% de NaCl dans 0.05 mM de Tris-HCl pH 7.6). Les tubes de dialyse avaient une longueur d'environ 15 cm et avaient été préparés selon la méthode conventionnelle (Sambrook *et al.*, 1989). La suspension du CVP1 apparemment pure a été récoltée des tubes de dialyse, diluée 1/20 dans le tampon TNE et acheminée au service de microscopie électronique de l'Institut Armand-Frappier pour examen après coloration négative dans une solution de 0,05M de phosphotungstate de sodium à pH 7.0.

2.242 CVP2

Les particules virales du CVP2 ont été purifiées à partir des nombreux surnageants infectieux récoltés lors des expériences de l'infection des cellules PK-15A par les isolats cliniques du CVP2. Ainsi, un total de 600 ml de surnageant infectieux ont été soumis à une purification en trois étapes. Dans la première étape, le surnageant infectieux était clarifié par une première centrifugation à 13 000 x g pour 15 min. dans des tubes de 50 ml en polycarbonate (Beckman Coulter) et à l'aide du rotor T35 (Beckman Coulter), afin de sédimenter les débris cellulaires de densité supérieure au virus. Dans une deuxième étape, le surnageant clarifié fut déposé dans des tubes de polycarbonate contenant préalablement un coussin de 15 ml d'une solution de 30% (W/W) de saccharose (Boehringer Mannheim), préparée dans un tampon de 0.02 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl (TBS), pH 8.0. Puis les fractions du surnageant infectieux ont été semi-purifiées et concentrées par une centrifugation différentielle à 100 000 x g pour 4 heures, en utilisant le rotor T35. Dans la dernière étape, après avoir resuspendu et rassemblé dans un volume total de 5 ml les culots du virus semi-purifié, celui-ci fut déposé sur un gradient de 1.2-1.4 g/cm³ de CsCl préparé dans deux tubes Ultra-Clear[™] (2.5 ml / tube) puis, soumis à une ultracentrifugation isopycnique à 100 000 x g pour 48 heures. Deux bandes opaques

furent observées et récoltées en fractions d'environ 2 ml, puis dialysées pour la nuit contre 500 volumes d'une solution de PBS à 4°C. Un échantillon de chaque bande correspondant au CVP2 purifié fut acheminé au service de microscopie électronique de l'Institut Armand-Frappier pour coloration négative, tel que décrit précédemment.

2.25 Tests de détection du CVP2

Afin de confirmer la présence des particules virales de CVP1 et CVP2, un test d'immunofluorescence indirecte (IFI) fut réalisé après chacun des passages cellulaires effectués, tant sur la lignée cellulaire PK-15A que sur la lignée PPT, dans le cas du CVP2. La détection du CVP2 sur les cultures primaires de cellules PAMs fut également accomplie par des tests d'IFI. De plus, des tests de PCR ont été effectués sur les lysats de cellules après un nombre de passages choisis stratégiquement pour la détection du CVP2.

2.251 Épreuve de PCR

L'ADN a été extrait à partir de 100 mg de tissu de l'échantillon clinique IAF-2897, de 0.4 ml des surnageants des passages cellulaires I, VII et XII, des préparations virales purifiées de CVP et PPV, et de l'ADN des cellules PK-15A (contrôle négatif). L'extraction de l'ADN s'est faite à l'aide du réactif Tripure, une trousse commerciale (Ouwardani *et al.*, 1999). L'ADN récolté a été resuspendu dans 0.3 ml de 8 mM de NaOH en présence de 0.1 M HEPES. Ce dernier permet à l'ADN de se stabiliser durant l'entreposage à -20°C. Des aliquotes de 20 µl des solutions d'ADN ont été utilisées dans un volume total de 100 µl du mélange réactionnel de la technique PCR. Le mélange réactionnel était composé de 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM (GIBCO-BRL), chacun des dNTPs à une concentration de 200 µM, 2.5 U de la Taq DNA polymérase (GIBCO-BRL) et 30 pmol de chaque amorce de CVP2 (ORF2.PCV2.S4 et ORF2.PCV2.AS4) (Ouwardani *et al.*, 1999) et de PPV (pr 39 et pr 43) (Dubuc *et al.*, 1996). La paire d'amorces ORF2.PCV2.S4 et ORF2.PCV2.AS4 a été conçue pour permettre l'amplification spécifique d'un amplicon d'une longueur de 493 pb de l'ORF2 du CVP2. Ces amorces ont été sélectionnées dans des régions de l'ORF2 démontrant moins que 31% et 36% d'homologie avec les séquences nucléotidiques des souches de CVP1 (Meehan *et al.*, 1997) et des souches de CVP2. Les amorces pr 39

(5'TGCAAGCTTAATGGTCGCACTAG3') et pr 43 (5'TTGGTCTCCTTCTGTGGTA GGTT3') ont été conçues pour permettre l'amplification d'un fragment de 397 pb et ont été choisies dans la région du gène VP2 du PPV. Les conditions d'amplification ont été programmées dans un thermocycleur (model PT-100 Hot Bonnet, MJ Research) et consistaient en 33 cycles de dénaturation à 94°C pour 1 min., d'appariement à 54°C pour 1 min. et d'élongation à 72°C pour 1.5 min., suivis d'une étape d'extension finale de 72°C pour 10 min. Des aliquotes de 10 µl du produit de la réaction d'amplification ont été chargées dans les puits des gels de 1% d'agarose (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada), préparés préalablement dans 100 ml d'une solution de TAE (0.04 M Tris-acetate [pH8.5], 0.002 M EDTA) mélangée avec 0.05 ml d'une solution de 50 mg/ml de bromure d'éthidium. La migration de l'ADN s'est faite par électrophorèse à un potentiel de 90 volts pendant 1h30 min et les fragments ont été visualisés dans les gels sous illumination ultraviolette (UV).

2.252 Épreuve d'IFI

Les pétris de 60 mm de diamètre et les plateaux de 96 puits contenant les feuillets des cellules PK-15A, PFT et PAMs infectées par les isolats du CVP2, ont tous été fixés avec une solution de 80% d'acétone et 20% de PBS à l'exception des cellules PAMs qui ont été fixées dans une solution de 50% d'acétone et 50% de méthanol. Suite à une période de fixation à 4°C pendant 20 min., deux lavages au PBS, pH 7.4, ont été réalisés. Après 20 minutes de séchage à la température de la pièce, les cellules ont été réhydratées avec une solution de blocage (PBS, pH 7.4, supplémenté de 0.15% de Tween 20) pour 10 à 15 minutes. Les cellules infectées ont été incubées en présence de sérums hyperimmuns de souris dirigés contre le CVP1 et dilués 1/100 ou 1/200 ou en présence de sérums de porcs convalescents dilués 1/100 ou 1/150. Ceux-ci provenaient de jeunes porcelets ayant été infectés par le CVP2 et qui présentaient une symptomatologie et des lésions typiques du SDPS. La réaction immunologique s'est déroulée à 37°C pendant 1 heure et puis, 5 lavages sous forte agitation ont été faits dans du PBS. Une seconde étape d'incubation fut effectuée en présence d'un conjugué FITC (isothiocyanate de fluorescéine) anti-IgG de souris (Boehringer Mannheim) dilué 1/80 (dans du PBS pH 7.4) ou un conjugué FITC anti-IgG de porc (Sigma-Aldrich) dilué 1/80, pendant 45 min. à 37°C. Après 5 autres

lavages au PBS et un lavage de courte durée à l'eau distillée, les feuillets cellulaires infectés furent visualisés pour la mise en évidence de cellules fluorescentes avec un microscope à contraste de phase sous un rayonnement UV (Leitz DM IL, Wetzlar, Allemagne). Seules les cellules démontrant une fluorescence nucléaire spécifique ont été considérées comme étant infectées par le virus.

2.26 Tests de détection du PPV

2.261 Épreuve de PCR

Comme dans l'épreuve PCR pour la détection du CVP2, l'ADN a été extrait à partir de 100 mg de tissu de l'échantillon clinique IAF-2897, à partir de 0.4 ml des passages cellulaires I, VII et XII, des virus CVP et PPV purifiés et de l'ADN des cellules PK-15A (contrôle négatif). L'extraction de l'ADN s'est faite à l'aide du réactif Tripure, une trousse commerciale (Ouwardani *et al.*, 1999). La quantité d'ADN, le mélange réactionnel et les conditions d'amplification étaient les mêmes que pour la PCR destinée à la détection du CVP2, sauf que les amorces étaient spécifiques au PPV (pr 39 et pr 43; Dubuc, 1996). Les amorces pr 39 (5'TGCAAGCTTAATGGTCGCACTAG3') et pr 43 (5'TTGGTCTCCTT-CTGTGGTAGGTT3') ont été conçues de façon à permettre l'amplification d'un fragment de 397 pb et ont été choisies dans la région du gène VP2 du PPV. Les produits de PCR ont été chargés sur un gel de 1% d'agarose. Des aliquotes de 10 µl de ces produits ont été analysées de la même manière que dans la procédure antécédente.

2.262 Épreuve d'hémagglutination

Le test d'hémagglutination a été utilisé pour la détection du PPV. Les plateaux de 96 puits à fond rond étaient tout d'abord rincés une fois avec une solution de PBS. Puis, 0.05 ml de la suspension de PPV préalablement diluée 1/10 dans du PBS (contrôle positif), et des surnageants de culture des passages I et XII de l'isolat IAF-2897 sur les cellules PKA, ainsi que 0,05 ml de PBS (contrôle négatif), ont été déposés dans les puits de la première rangée. Après avoir déposé dans tous les puits des rangées subséquentes 0.05 ml de PBS, 0.05 ml des puits de la première rangée fut transféré dans la seconde rangée, et

ainsi de suite pour des dilutions sérielles à base 2 de 1:2 à 1:256. Finalement, tous les puits ont reçu par la suite 0.05 ml de globules rouges de cobaye, et les plateaux furent laissés à la température de la pièce sur un linge humide pour une période d'une heure, avant de procéder à la lecture des résultats. Un résultat négatif fut interprété suite à l'obtention d'un dépôt uniforme des globules rouges au fond des puits. Les globules rouges, au lieu de sédimenter librement, formaient plutôt un tapis lors d'un résultat positif dû à leur agglutination et la formation d'un réseau.

2.3 Résultats

2.31 Tentative d'isolement de souches virulentes du CVP

Les morceaux d'organes (poumons, nœuds lymphatiques, rates, amygdales) utilisés pour l'isolement des souches virulentes du CVP avaient été obtenus de jeunes porcelets de fermes du Québec, affectées par l'épidémie de problèmes respiratoires en 1998-99. Les examens post-mortem qui ont été effectués sur ces derniers dans les laboratoires du MAPAQ ont révélé des lésions macroscopiques et microscopiques suggérant un problème de SDPS, tel que rapporté antérieurement dans les fermes de l'Ouest canadien (Ouardani *et al.*, 1999).

Après avoir été soumis à notre service de diagnostic, certains de ces spécimens cliniques se sont révélés positifs au PCR multiplex pour la présence de l'ADN du CVP2, ce qui permit de confirmer le diagnostic de SDPS. Dès lors, l'isolement viral fut tenté sur des feuillets cellulaires PK-15A à partir d'échantillons positifs au PCR et ayant été reconnus comme les plus représentatifs. Avant même d'entreprendre les expériences sur la propagation de souches du CVP2, les cellules PK-15A avaient été testées par PCR pour confirmer l'absence de CVP1.

La réplication des souches du CVP2 propagées en cultures cellulaires a été suivie par des épreuves d'IFI. Les cellules infectées ont été incubées en présence d'un pool de sérums de porcs obtenus d'une ferme chroniquement affectée par des problèmes de SDPS, puis révélées suite à une seconde incubation en présence d'un conjugué FITC anti-IgG de porc. Le **tableau 10** présente les résultats d'IFI obtenus suite à la propagation de 28 spécimens cliniques. Dans ce tableau, l'interprétation d'un résultat positif est basée sur l'index d'infectivité qui est défini par la mise en évidence d'une fluorescence nucléaire dense et spécifique dans les cellules infectées. Ainsi, les isolats de CVP2 s'étant avérés positifs au test d'IFI ont produit une fluorescence spécifique des cellules. Évidemment, les échantillons qui se sont révélés négatifs n'induisaient pas de fluorescence dans les

Tableau 10 Résultats obtenus en IFI suite à la propagation de spécimens cliniques ayant été diagnostiqués positifs au CVP2 par PCR.

Année	n°IAF	Signes cliniques	PCR	IFI	
				PII	PIII
1998	4370	SDPS	+	-	
	4440-1	SDPS	+	+	
	4440-2	SDPS	+	-	
	4440-3	SDPS	+	-	
	4441-1	SDPS	+	-	
	4441-2	SDPS	+	+	
	4442	SDPS	+	-	
	4585	SDPS	+	-	
	709-1	SDPS	+	-	
	709-2	SDPS	+	-	
	614-7	SDPS	+	-	
1999	348	SDPS	+	-	
	350	SDPS	+	-	
	522-1	SDPS	+	-	
	709-1	SDPS	+	-	
	709-2	SDPS	+	-	
	1049-A	SDPS	+	-	
	1049-B	SDPS	+	+	
	2434-A	SDPS	+		-
	2434-B	SDPS	+		-
	2669	SDPS	+		-
	2670	SDPS	+		-
	2734	SDPS	+		-
	2735	SDPS	+		-
	2817	SDPS	+		-
	2897	SDPS	+		+
	3054	SDPS	+		+
	3120	SDPS	+		+

IFI : immunofluorescence indirecte

PII : 2^e passage

PIII : 3^e passage

+

- : résultat négatif

mêmes cellules. D'autre part, comme l'indique le **tableau 10**, les épreuves d'IFI ont été effectuées à partir du deuxième passage en cultures cellulaires des 11 cas de l'année 1998 et des 7 premiers cas de l'année 1999. Par la suite, le même profil de fluorescence fut observé après le troisième passage cellulaire des 10 derniers cas de l'année 1999. En résumé, le tableau démontre que 6 souches de CVP2 (deux en 1998 et quatre en 1999) ont pu être propagées avec succès sur la lignée cellulaire PK-15A. Seulement l'un des 6 isolats propagés pour plusieurs passages, l'isolat IAF2897 (en gras), a semblé avoir conservé un haut titre infectieux au cours de différents passages.

Les contrôles d'infection positive et négative ont donné les résultats escomptés. En effet, le test d'infectivité s'est révélé positif à l'infection des cellules PK-15A avec un inoculum de CVP1. Un sérum hyperimmun anti-CVP1, préalablement produit chez la souris (voir chap.III), a été utilisé pour détecter les antigènes du CVP1 et un conjugué FITC anti-souris a été utilisé pour la révélation des complexes immuns. Une fluorescence dense et spécifique au niveau des noyaux des cellules a pu être observée. En ce qui concerne le contrôle négatif, des cellules PK-15A ont été infectées avec un lysat de cellules PK-15A. Le test d'IFI effectué sur ce feuillet de cellules s'est révélé négatif, aucune fluorescence spécifique n'ayant pu être observée au microscope optique sous rayonnement UV. Dans ce test, les antisérums utilisés pour la détection des antigènes du CVP2 étaient les mêmes que ceux utilisés avec les 28 autres isolats de CVP2.

2.32 Isolement de la souche CVP2 IAF2897

2.321 Propagation sur PK-15A

La souche virulente IAF2897 fut la seule qui a semblé avoir maintenu un titre infectieux élevé jusqu'au 3^e passage en cultures cellulaires. Au cours de sa propagation *in vitro*, aucun effet cytopathique n'a pu être décelé. Par conséquent, afin de suivre sa multiplication d'un passage à l'autre, des tests d'IFI ont été effectués après chaque passage. Ceci a permis de suivre les fluctuations de son pouvoir infectieux. En effet, grâce à cette approche, une variabilité importante de l'infectivité a été observée au cours des passages subséquents, c'est-à-dire que le taux de cellules infectées d'un passage à

l'autre était généralement très instable. Il arrivait parfois que l'infection soit faiblement productive ou insuffisante pour entamer un passage subséquent. Certains facteurs ont semblé jouer un rôle dans ce phénomène. Trois d'entre eux ont pu être identifiés au cours des expériences subséquentes sur la propagation *in vitro* du CVP2. L'importance de ces facteurs pour l'obtention d'une infection productive a été constatée à partir d'observations cumulées à travers les expériences répétées.

Le premier facteur fut le niveau de confluence des feuillets de cellules PK-15A lors de l'infection. Premièrement, il a été remarqué à travers de nombreux essais qu'il était plus profitable d'infecter un feuillet cellulaire PK-15A n'ayant atteint une confluence que de 40-50% plutôt que supérieure à 75%.

Un nombre plus élevé de cellules fluorescentes étaient observées si les cultures étaient infectées à semi-confluence, i.e. à un moment où les cellules étaient en phase exponentielle de croissance. Évidemment, ces observations ont été remarquées lorsque les infections étaient répétées avec un même surnageant infectieux et sous les mêmes conditions d'infection, à l'exception du niveau de confluence du feuillet PK-15A. Par contre, ces résultats n'étaient pas reproductibles à chaque fois, et donc d'autres facteurs étaient impliqués dans l'obtention d'une infection productive et reproductible.

Le second facteur considéré fut l'âge du feuillet PK-15A lors de l'infection. dépendant de la façon d'entretenir les cellules PK-15A. Des mesures ont donc été considérées afin que les cellules PK-15A saines soient régulièrement passées avant d'atteindre une confluence. Nous voulions ainsi maintenir les cellules dans un état homéopatique optimal fournissant au virus un environnement adéquat à sa réplication. Nous avons réalisé l'importance de ce facteur à quelques reprises, lorsque nous évaluons le taux d'infectivité des surnageants récoltés, suite à des infections de cellules PK-15A provenant de feuillets cellulaires surconfluents, avec un surnageant infectieux habituellement utilisé comme contrôle positif. Celui-ci avait l'habitude de produire en IFI un nombre d'unités fluorescentes élevé, quand les cellules étaient passées avant d'atteindre la confluence. Or,

dans ce cas-ci, une diminution du taux d'infectivité avait été observée en IFI, lorsque le contrôle positif avait été propagé sur des feuillets surconfluents de cellules PK-15A .

Le troisième facteur considéré fut les conditions du traitement des cellules PK-15A à la D-glucosamine. Celui-ci s'est avéré le facteur ayant le plus d'influence au cours de la propagation *in vitro* du CVP2. Il sera discuté plus loin en détails (voir section 2.34).

Malgré le manque de reproductibilité des infections réalisées, il a été possible de maintenir la souche IAF-2897 jusqu'au VII^e passage tout en observant une progression du titre infectieux. La **figure 12** présente les résultats ayant permis de confirmer le maintien de la souche virulente IAF-2897 sur une culture de PK-15A. Aussi, une photo d'un feuillet PK-15 infecté chroniquement par le CVP1 et traité à la D-glucosamine a été ajoutée à gauche pour des fins de comparaison. Le taux d'infectivité fut défini comme étant le nombre d'unités de fluorescence spécifique par puits ou dans un pétri. Ainsi, les résultats d'IFI présentés à la **figure 12** montrent une nette augmentation du taux d'infectivité du I^{er} passage au VII^e passage. De plus, au I^{er} passage une fluorescence très dense et spécifique fut notée au niveau du noyau. Ceci fut aussi observé au IV^e passage avec une légère fluorescence cytoplasmique. Cette dernière observation a été d'autant plus remarquée au VII^e passage, la fluorescence cytoplasmique était distinctement plus marquée et diffuse.

Enfin, la souche CVP2IAF-2897 a pu être maintenue jusqu'au XII^e passage. En effet, le personnel du service de diagnostic du MAPAQ a pu, à partir de notre IV^e passage, propagé le virus jusqu'au XII^e passage. Cependant, une diminution importante du titre infectieux a progressivement été observée en IFI. Néanmoins, à partir du surnageant du XII^e passage, un test PCR positif a été obtenu (**figure 16**). Après avoir confirmé le maintien de la souche de CVP2 IAF-2897 pour plus de 12 passages cellulaires, des expériences ont été réalisées afin de trouver les conditions optimales pour sa propagation *in vitro*. Nous avons tenté d'y parvenir en réalisant deux études stratégiques. La première a porté sur l'effet de la D-glucosamine sur la réplication du CVP2, tandis qu'en deuxième

Figure 12**Index d'infectivité de la souche IAF2897 du CVP2 sur une monocouche de cellules PK-15A.**

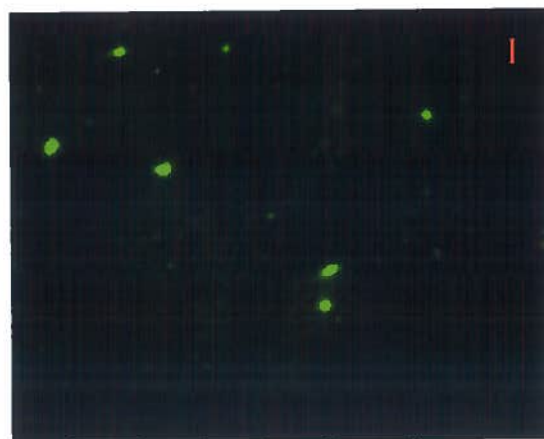
Résultats d'IFI obtenus sur des feuillets cellulaires PK-15A infectés avec différents passages de l'isolat IAF2897 et traités avec la glucosamine. Le test d'IFI a été effectué à l'aide d'un pool de sérums de porcs convalescents obtenus d'une ferme chroniquement affectée par des problèmes de SDPS, puis les cellules infectées ont été révélées suite à une seconde incubation en présence d'un conjugué FITC anti-IgG de porc.

- A. cellules-témoins PK-15A non infectées
- B. cellules PK-15 infectées chroniquement avec du CVP1 et traitées avec la glucosamine.
- C. cellules PK-15A infectées au I^{er} passage et traitées avec la glucosamine.
- D. cellules PK-15A infectées au IV^e passage et traitées avec la glucosamine
- E. cellules PK-15A infectées au VII^e passage et traitées avec la glucosamine.

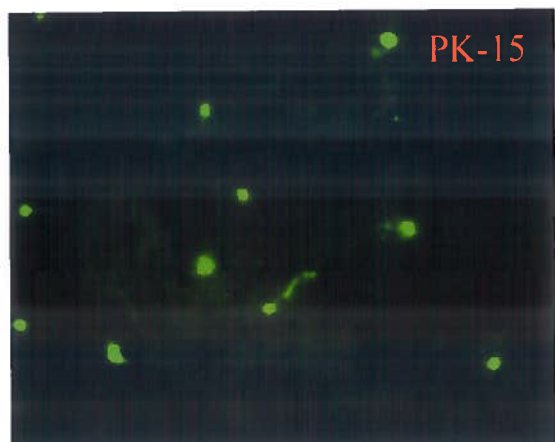
A.



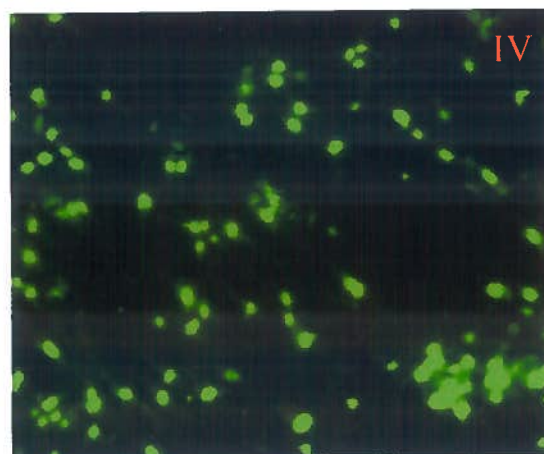
C.



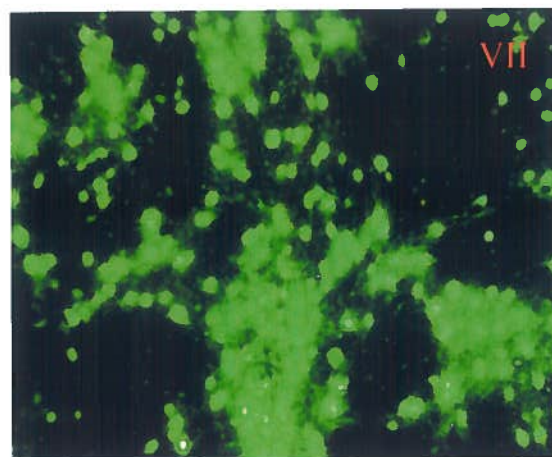
B.



D.



E.



lieu, la cinétique de production du virus a été étudiée plus en détails. Ces études sont rapportées aux points 2.34 et 2.35, respectivement.

2.322 Propagation sur les cellules PAMs

Des tentatives ont été faites dans le but de tenter de reproduire en partie les expériences d'un groupe de recherche allemand. Ces expériences visaient à propager la souche non virulente CVP1 sur une culture primaire de cellules PAMs. Or, lors des tentatives réalisées dans notre laboratoire le but était plutôt de suivre la propagation de la souche virulente CVP2, les essais réalisés avec la souche CVP1 ont servi à des fins de comparaison. Les résultats obtenus lors de l'infection d'un feuillet de cellules PAMs, à plus de 75% de confluence, avec un surnageant infectieux de la souche IAF-2897 (1^{er} passage sur PK-15A) se sont révélés négatifs. En effet, après avoir fixé à l'acétone froide les cellules PAMs infectées, les tests IFI réalisés avec un sérum de porc infecté chroniquement par le CVP2, se sont avérés négatifs. Il en a été de même pour la propagation de la souche non virulente CVP1.

2.323 Propagation sur les cellules PFT

Une autre lignée cellulaire porcine a également été testée pour sa permissivité au CVP2. Les cellules PFT ont fait l'objet d'une étude sur la susceptibilité du virus. Les résultats d'IFI obtenus sont présentés à la **figure 13**. Il a d'abord été possible de confirmer la permissivité de ces cellules au CVP2 par IFI, d'où la capacité du CVP2 de se répliquer dans un autre type cellulaire que les cellules PK-15A. Comme le démontre les résultats d'IFI illustrés à la **figure 13**, les cellules infectées au 3^e jour p.i. étaient nettement positives en IFI, un profil typique de la fluorescence du CVP2 (fluorescence très dense au noyau) ayant été obtenu. Également, il a été possible de noter une fluorescence légèrement diffuse dans le cytoplasme des cellules infectées, phénomène qui avait été observé sur les cellules PK-15A infectées par le CVP2 (**figure 12**).

De plus, les changements morphologiques durant les jours qui suivirent l'infection furent notés. Tout d'abord, le maintien des cellules PFT saines a été moins exigeant que dans le cas des cellules PK-15A. De plus, la croissance des PFT en feuillets se faisait de façon

Figure 13**Index d'infectivité de la souche IAF2897 du CVP2 sur une monocouche de cellules PFT.**

Résultats d'IFI obtenus sur des feuillets cellulaires PFT infectés avec différents passages de l'isolat IAF2897, traité ou non avec la glucosamine. Le test d'IFI fut effectué à l'aide d'un pool de sérums de porcs convalescents obtenus d'une ferme chroniquement affectée par des problèmes de SDPS, puis les cellules infectées ont été révélées suite à une seconde incubation en présence d'un conjugué FITC anti-IgG de porc.

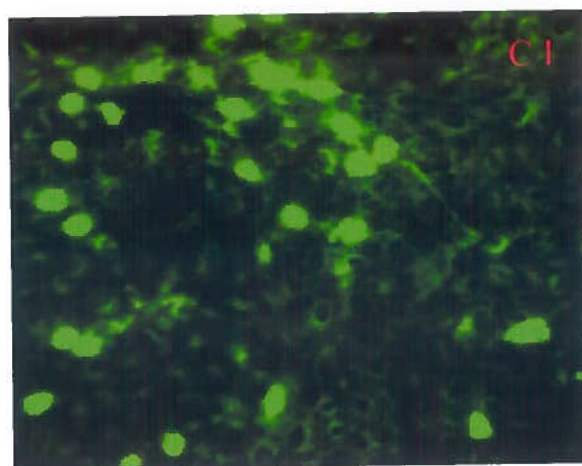
A. cellules-témoins PFT non infectées (TC)

B. cellules PFT infectées (CI) avec le surnageant du VI^e passage de l'isolat IAF2897.

A.



B.



plus uniforme que dans le cas des cellules PK-15 et des foyers de surcroissance cellulaire sur les feuillets ne furent pas observés comme dans le cas des cellules PK-15A. Par contre, les cellules PFT ont démontré un degré de tolérance à la D-glucosamine semblable à celui des cellules PKA. Toutefois les changements morphologiques ont été observés dans les jours qui suivirent le traitement à la D-glucosamine et semblaient alors similaires à ceux observés suite à l'infection des cellules PK-15A. En effet, comme il est démontré dans la **figure 14**, le feuillet cellulaire semblait entrer dans une phase de dégénérescence assez avancée à partir du 3^e jour p.i. Les cultures de cellules témoins traitées et non traitées ont été incubées une journée de plus que celles infectées et traitées, afin de démontrer que ces changements morphologiques étaient causés par la présence du virus. L'effet de la D-glucosamine sur les cellules PFT a été remarqué. Tout comme pour les cellules PK-15A, les cultures PFT traitées se sont distinguées par l'élargissement de leur cytoplasme et la présence abondante de granules (**figure 14**).

Les degrés d'infectivité obtenus dans le cas des cultures PFT ont aussi été comparés en absence et présence du traitement à la D-glucosamine moins de 24 heures après le début de l'infection. Sachant que le traitement avec cet hexoamine favorise la multiplication virale du CVP2 dans les cellules PK-15A, le but était de déterminer si c'était aussi le cas pour les cellules PFT. Afin de comparer le taux d'infectivité des échantillons de façon quantitative, la méthode de Reed et Muench (1938) a été utilisée pour déterminer les titres infectieux. Les résultats en TCID₅₀ obtenus ont ensuite été exprimés sous forme d'histogramme et interprétés de façon relative. Ainsi, l'histogramme présenté à la **figure 15** démontre que le traitement à la D-glucosamine des cellules PFT infectées, donne un meilleur taux d'infectivité que dans le cas des cellules qui n'ont pas subi de traitement.

2.33 Test de contrôle de l'agent pathogène propagé en cultures cellulaires

L'utilisation de sérums provenant de porcelets chroniquement infectés par du CVP2 (sérum contrôle) dans les tests d'IFI peut être mise en doute. En effet, les sérums de ces

Figure 14**Propagation de la souche IAF2897 du CVP2 en culture sur une monocouche de cellules PFT.**

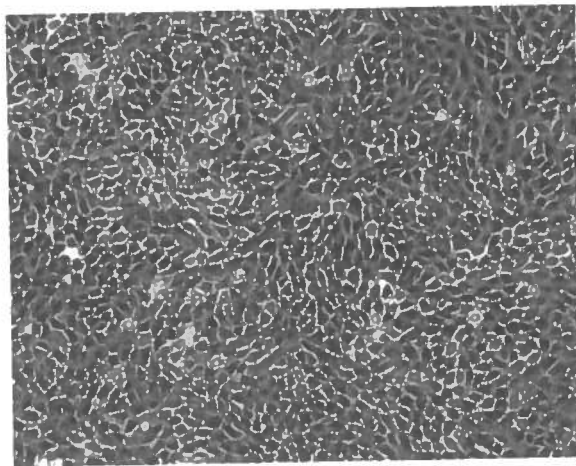
Expérience sur la susceptibilité et la permissivité des cellules PFT à la souche pathogène du CVP (IAF2897). Les photos TC (A) et TCT (B) correspondent respectivement aux cellules-témoins non traitées et traitées à la glucosamine au jour 4 p.i. La photo CTI (C) met en évidence au jour 3 p.i. une dégénérescence avancée du feuillet cellulaire PFT infecté et traité. Les cultures PFT traitées se sont distinguées par l'élargissement de leur cytoplasme et la présence abondante de granules.

TC: Cellules-témoins

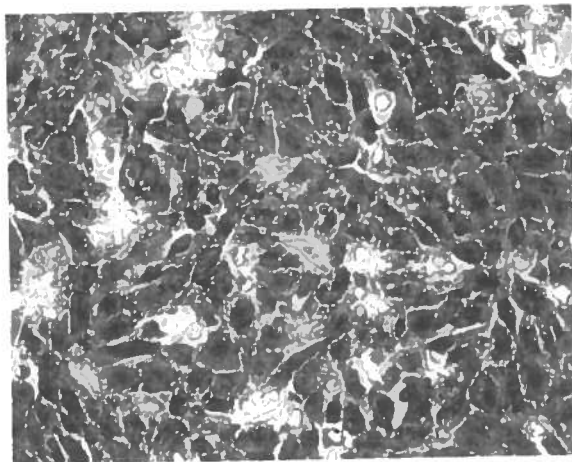
TCT: Cellules-témoins traitées

CTI: Cellules infectées et traitées

A.



B.



C.

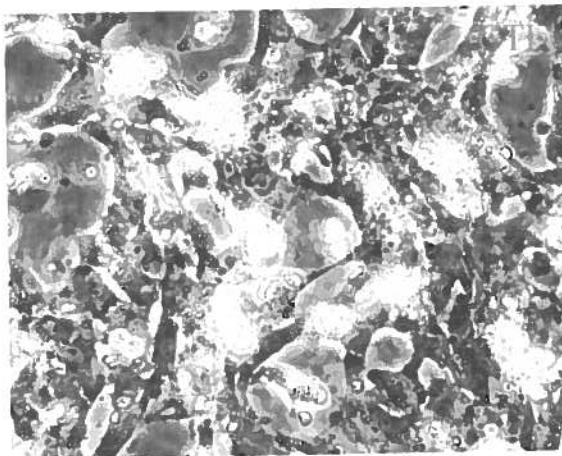


Figure 15

Histogramme comparant de façon relative le taux d'infectivité obtenus pour le CVP2 propagé sur les cellules PFT traitées et non-traitées.

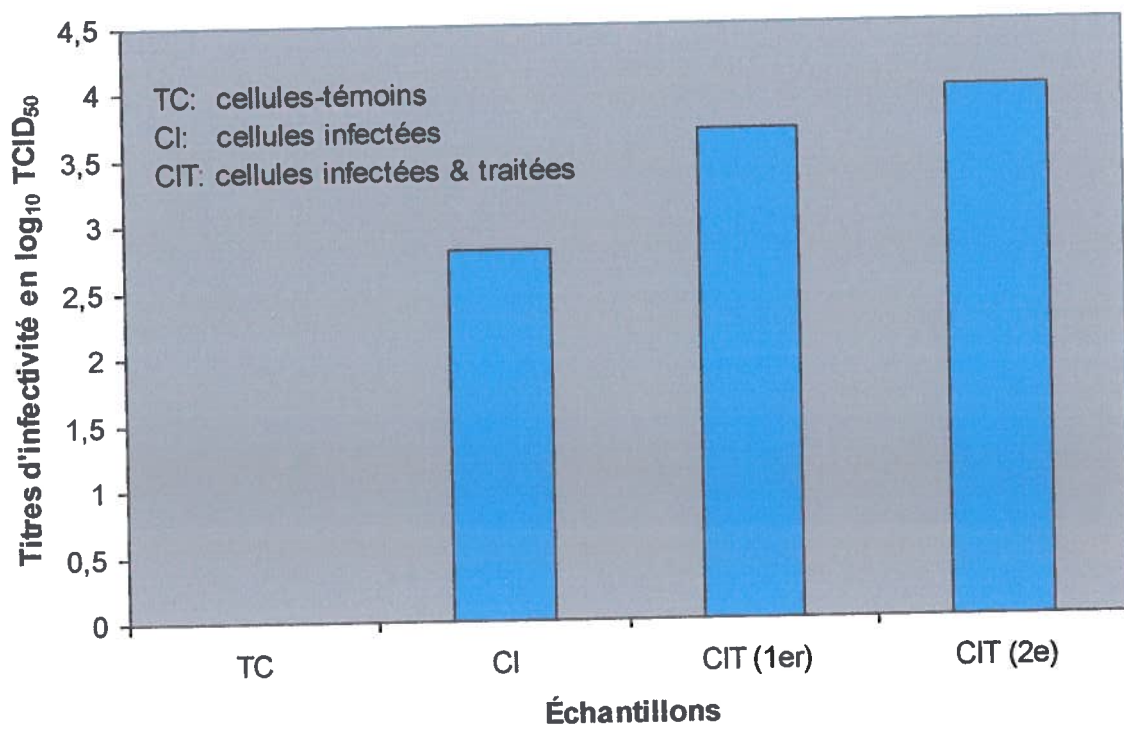
Histogramme représentant les titres d'infectivité en TCID₅₀ à base 10 de deux échantillons de cellules infectées-traitées (CIT) et d'un échantillon de cellules infectées (CI). Un échantillon de cellules-témoins saines (TC) a aussi été utilisé comme contrôle négatif. Les titres d'infectivité en TCID₅₀ ont été calculés selon la méthode de Reed et Muench basée sur la méthode des dilutions limites. Sur l'axe des ordonnées se trouvent les valeurs de titres d'infectivité en TCID₅₀ à base 10 et sur l'axe des abscisses se trouvent les jours p.i.

TC: 0

CI: $10^{2.8}$ TCID₅₀/ml

CIT (1): $10^{3.7}$ TCID₅₀/ml

CIT (2): 10^4 TCID₅₀/ml



jeunes porcelets souffrant du SDPS sont souvent positifs en anticorps spécifiques à d'autres pathogènes qui sont communément retrouvés dans les élevages de porcs. La présence d'anticorps spécifiques au PPV peut être spécialement problématique durant l'interprétation de nos résultats en IFI. Effectivement, il a déjà été mentionné dans la littérature que le profil de fluorescence de ces deux pathogènes est identique (Allan et Ellis, 2000). Il a donc fallu évaluer la réactivité de notre sérum contrôle à différents antigènes potentiellement susceptibles d'être détectés dans nos tests d'IFI. Dans cette expérience, un test d'IFI a été fait sur 4 cultures différentes (PK-15A, PK-15A+CVP2, PK-15, PFT, PFT+PPV), présentant des antigènes différents. La révélation a été effectuée en utilisant notre sérum contrôle et le conjugué FITC anti-IgG de porc. Les antigènes cellulaires des feuillets PK-15A et PFT n'ont démontré aucune réactivité avec notre sérum contrôle. Par contre, il fut possible d'observer une réactivité positive avec les feuillets cellulaires PKA infectés par le CVP2, les cellules PK-15 infectées chroniquement avec le CVP1, et sur les cellules PFT infectées par le PPV. Ces résultats ont révélé que notre sérum contrôle possédait non seulement des anticorps pour les antigènes du CVP2, mais aussi pour ceux du CVP1 et PPV. Suite à ces résultats, d'autres tests ont été réalisés afin de nous assurer de l'absence de ces antigènes lors de la propagation du CVP2 sur les feuillets PK-15A.

Une vérification fut faite afin de démontrer si l'homogénat de tissus, utilisé pour l'isolement de la souche CVP2 en cultures cellulaires, pouvait contenir d'autres pathogènes comme PPV et, par conséquent, contaminer les cultures de CVP2. Afin de faire le lien entre l'agent infectieux propagé et la spécificité de la fluorescence observée sur les cellules PK-15A infectées, des épreuves d'hémagglutination et de PCR pour le PPV ont été réalisés à partir des surnageants des différents passages viraux.

Ainsi, pour permettre l'identification de l'agent viral propagé en cultures cellulaires, les surnageant infectieux du I^e et XII^e passage que nous avons produit à partir de la souche IAF-2897 ont d'abord été vérifiées pour la présence d'une activité hémagglutinante. Les différentes dilutions des surnageants infectieux n'ont révélé aucune activité hémagglutinante avec les globules rouges de cobaye. Par contre, une réaction

positive a été obtenue dans les puits du contrôle positif correspondant aux différentes dilutions du PPV. Ce qui signifie qu'il n'a pas été possible de confirmer la présence du PPV dans les surnageants infectieux des cellules PK-15A par le moyen du test d'hémagglutination. Cependant, cette technique n'est pas suffisamment sensible pour détecter de très faibles quantités de PPV. Par contre, la technique du PCR a permis de confirmer les résultats négatifs obtenus par les tests d'hémagglutination.

La grande sensibilité de la technique de PCR a permis de confirmer l'absence de l'ADN du PPV dans l'homogénat tissulaire d'origine de l'isolat IAF-2897, puis dans les surnageants infectieux des différents passages cellulaires de cet isolat. La **figure 16** présente les résultats du PCR obtenus à partir de l'ADN extrait de l'homogénat tissulaire d'origine de l'isolat IAF-2897, et des surnageants des passages I, VII et XII sur cellules PK15-A et des virus CVP2 et PPV contrôles. Ainsi, il fut possible de détecter, à l'aide des amorces spécifiques au CVP2, un amplicon de 493 pb spécifique au CVP2 dans les échantillons correspondants à l'homogénat IAF-2897 et aux surnageants des 3 différents passages sur cellules PK15A de cet isolat. Ces mêmes amorces ont également permis d'amplifier un fragment d'ADN de même taille dans l'échantillon contrôle correspondant au CVP2. Cependant, il ne fut pas possible de détecter l'amplicon attendu de 397 pb spécifique au PPV dans ces mêmes échantillons, ce dernier n'ayant été obtenu qu'avec l'échantillon contrôle correspondant à l'ADN du PPV. La paire d'amorces spécifiques au CVP2 n'a pas réagi avec l'ADN du PPV et vice versa. Ce qui signifie que la spécificité des amorces était satisfaisante tant pour l'amplification de l'ADN du PCV2 que pour celle du PPV (voir les puits 5 et 6 de la **figure 16**). L'ADN du lysat cellulaire PK-15A a été utilisé comme contrôle négatif et, comme prévu aucune des deux paires d'amorces n'a réagi avec l'ADN cellulaire.

D'autre part, les cellules PK-15A ont été soumises à un test de diagnostic pour la mise en évidence du CVP1 et ont été trouvées exemptes de CVP1. De plus, afin d'éviter que les passages des cultures PK-15A saines et infectées par notre souche de CVP2 ne soient contaminés par du CVP1, certaines mesures sécuritaires ont été préconisées. Ainsi, les travaux avec la lignée cellulaire PK-15 ont été arrêtés dans le laboratoire avant

Figure 16**Identification de l'agent viral propagé en cultures cellulaires au moyen de la PCR.**

Profil électrophorétique des fragments d'ADN obtenus par PCR et migrés sur un gel d'agarose (1%). Afin de vérifier la seule présence du CVP2, l'ADN total extrait des cellules PK-15A (puits n°7), de l'homogénat de l'isolat CVP2-IAF2897 et de ses I^{er}, VII^e et XII^e passage (puits n°1 à 4) et des suspensions virales purifiées de CVP2 (puits n°5) et PPV (puits n°6) a été évalué par la technique de PCR à l'aide des amorces ORF2.CVP2.S4 et ORF2.CVP2.AS4 (spécifiques à la souche CVP2). Le produit attendu de cette amplification est un fragment génomique d'une longueur de 397 pb.

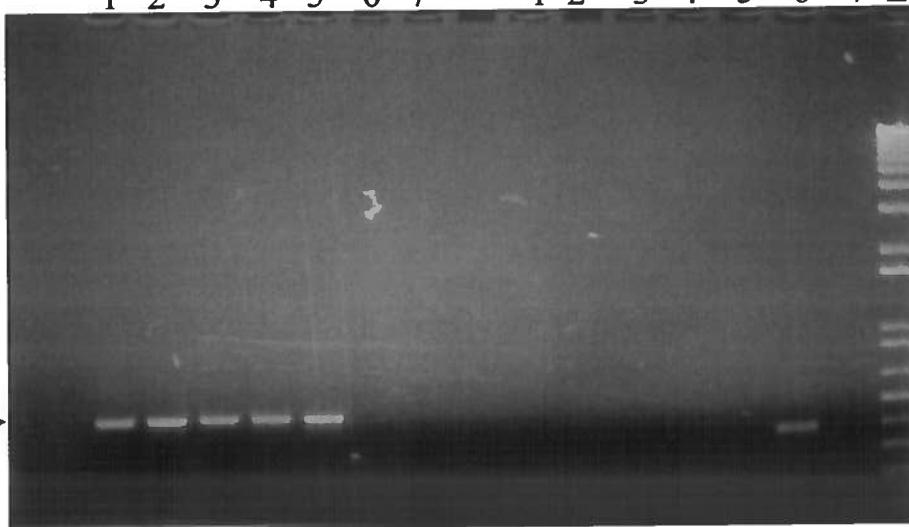
1. Isolats IAF2897
2. I^{er} passage
3. VII^{er} passage
4. XII^e passage
5. PCV2 purifié
6. PPV purifié
7. PKA
- L. Échelle de longueur d'ADN

PCV2-spécifique

PPV-spécifique

1 2 3 4 5 6 7 1 2 3 4 5 6 7 L

493 pb



397 pb



d'engager les expériences sur la propagation de la souche IAF-2897 du PCV-2. En effet, après avoir produit et purifié la souche CVP1 à partir des cultures cellulaires PK-15, le maintien en culture de ces cellules a été arrêté afin d'éviter la possibilité d'une contamination des aires de travail avec le CVP1.

2.34 Effet de la D-glucosamine sur la réplication du CVP2

Sachant que la synthèse d'ADN du CVP1 dépend des enzymes cellulaires exprimées durant la phase S du cycle cellulaire, sachant aussi que la multiplication du CVP1 est intensifiée par le traitement des cellules PK-15 avec la D-glucosamine, ce traitement des cultures de PK-15 était effectué à chaque fois qu'une production de CVP1 était entamée. La différence a été constatée à différents degrés, dépendant du niveau de confluence du feuillet cellulaire lors du traitement. En effet, lorsque le traitement était réalisé sur un feuillet parvenu à confluence, les résultats n'étaient pas supérieurs à ceux obtenus lorsque les feuillets cellulaires étaient traités à un degré de confluence inférieur. Ceci a été constaté qualitativement lors des épreuves d'IFI où des rendements d'environ 2 à 10 fois plus élevés ont été observés suite à l'infection de cellules PK-15 traitées à sous-confluence. Évidemment, le nombre de foyers de fluorescence était toujours inférieur avec les cellules non traitées. Dans ces tests, un sérum hyperimmun de souris anti-CVP1 a été utilisé pour l'identification des cellules PK-15 exprimant les antigènes du CVP1.

L'effet de la D-glucosamine sur la propagation du CVP2 dans la lignée cellulaire PK-15A n'a pas fait l'objet d'étude précise dans la littérature scientifique. En vue d'y pallier, des expériences ont été entamées pour étudier l'effet de la D-glucosamine sur les cellules PK-15A et sur la réplication *in vitro* du CVP2. Des traitements ont aussi été effectués sur les cellules PFT avec ce sucre aminé (voir section 2.322).

Dans les premières expériences, les cellules PK-15A infectées par le CVP2, ont été traitées pendant 45 minutes avec une solution de 300 mM de D-glucosamine lorsque les tapis cellulaires avaient atteint près de 80 % de confluence. Un nombre accru de cellules mortes dans le surnageant a été observé après 24-48 heures. Afin de déterminer si le

traitement à la D-glucosamine induisait une multiplication plus élevée du virus dans les cultures infectées comparativement aux cellules non-traitées, des épreuves d'infectivité ont été réalisées dans des plateaux de 96 puits. Une fois que les feuillets cellulaires avaient atteint presque 80% de confluence, seuls furent traités les puits contenant les feuillets PK-15A inoculés par le lysat de cellules traitées lors de passages antérieurs. Deux à quatre jours plus tard, dépendant de l'état des cellules suite au stress causé par l'hexoamine, le nombre de cellules réagissant positivement au test IFI ne différait pas significativement dans les cultures de cellules ayant été traitées ou non traitées. Les cellules ont été incubées en présence du sérum-contrôle de porc et la révélation des cellules infectées a été faite suite à une seconde incubation avec un conjugué FITC anti-IgG de porc. Toutefois, les résultats étaient variables lors des expériences ultérieures. Conséquemment, des changements se sont imposés dans la procédure de traitement à la D-glucosamine.

La première variable qui a fait l'objet de cette étude a été le niveau de confluence du feuillet cellulaire infecté le jour du traitement. Cette nouvelle modification nous a amené à changer un second paramètre, le temps de traitement à la D-glucosamine. En effet, il a été démontré que lors de l'infection d'un feuillet cellulaire à une confluence d'environ 60%, le processus de dégénérescence cellulaire ne pouvait que s'accélérer. Pour neutraliser ce phénomène il a fallu diminuer le temps du traitement à 25-30 minutes. Suite à cet ajustement, il fut possible de maintenir davantage les cellules infectées en culture et d'évaluer la production de CVP2. Les résultats obtenus en IFI avec ces nouvelles conditions ont été nettement plus concluants. En effet, il a été possible de remarquer à plusieurs reprises en IFI qu'un feuillet cellulaire infecté à environ 60% avait un taux d'infectivité supérieur à celui dont les cellules avaient été traitées à 80% de confluence et plus. Par ailleurs, il arrivait parfois que la dégénérescence cellulaire précédait le traitement à la D-glucosamine.

La perte occasionnelle de la production virale due à la dégénérescence précoce du feuillet cellulaire infecté a été d'une grande préoccupation tout au long de ces travaux. La sensibilité des cellules PK-15A à la D-glucosamine paraissait justifiable lorsque l'état du

feuillet cellulaire était observé sous le microscope optique immédiatement après le traitement. En effet, tel que constaté suite au traitement, les cellules devenaient arrondies et dans un état hypotonique, comme si elles allaient éclater ou perdre leur adhérence pour le plastique. Pour des raisons incertaines, les cellules reprenaient dans certains cas leur forme normale et dans d'autres, elles ne parvenaient pas à se remettre du stress chimique causé par l'hexoamine. Afin d'élucider ce phénomène, deux autres variables ont fait l'objet d'une étude plus approfondie.

La troisième variable analysée fut la concentration de la solution de D-glucosamine utilisée lors du traitement des feuillets de cellules PK-15A infectées par le CVP2. Ainsi, afin de remédier au problème de toxicité engendré par l'hexoamine, il a fallu abaisser sa concentration à 200 mM tout en conservant les dernières modifications apportées aux conditions du traitement. En fait, cette expérience visait à noter toute amélioration possible de l'état du feuillet cellulaire suite au traitement et d'évaluer la constante efficacité de la D-glucosamine sur la multiplication du CVP2. Les résultats obtenus ont été suffisamment satisfaisants pour conserver l'ajustement de ce paramètre. En effet, il a fallu réduire presque à chaque fois l'effet toxique de l'hexoamine et traiter les cellules à un peu plus de 60% de confluence, avec 200 mM de D-glucosamine et pendant 25 minutes. Dans certains cas, les cellules qui se trouvaient à la périphérie étaient plus vulnérables au stress causé par l'hexoamine et finissaient par perdre leur adhérence. Les résultats observés étaient une dégénérescence périphérique du feuillet cellulaire dans les pétris infectés. Cependant, les valeurs des titres d'infectivité déterminés qualitativement dans les épreuves d'IFI étaient plus élevées dans le cas des cellules traitées avec 200 mM de glucosamine que chez celles qui n'avaient pas été soumises à ce traitement. Par contre, ces résultats d'IFI différaient de ceux obtenus suite au traitement des PK-15A avec 300 mM de l'hexoamine. Afin de reproduire ces résultats, l'expérience suivante fut réalisée.

Trois séries de 3 feuillets semi-confluents de cellules PK-15A, ensemencés dans des pétris de 60 mm, ont été infectés avec un même surnageant infectieux (VI^e passage de l'isolat IAF2897). L'une des séries n'a pas été traitée, la 2^e série fut traitée avec 200 mM et la dernière série traitée avec 300 mM de l'hexoamine. Les trois séries ont été fixées à

l'acétone deux jours après et soumises à des tests d'IFI. De façon qualitative, les valeurs d'infectivité étaient significativement supérieures dans le cas des échantillons ayant été traités avec 300mM de glucosamine plutôt qu'avec 200 mM. Évidemment, l'infectivité était plus élevée dans le cas des échantillons traités avec 200 mM de glucosamine que pour ceux qui n'ont pas été traités. L'expérience a été recommencée pour être cette fois exprimée sous forme d'un rapport quantitatif. Les titres infectieux des échantillons (non traités, traités avec 200 mM et traités avec 300 mM de glucosamine) ont été évalués à partir des surnageants des cultures récoltées moins de 48 heures après le jour du traitement. Malgré l'effet de dégénérescence cellulaire observé, il a été quand même possible de comparer les titres infectieux entre les différents échantillons. La méthode utilisée pour calculer les titres infectieux était une version de la méthode de Reed et Muench (voir section 2.35). Les résultats obtenus par cette approche corrélèrent à un certain degré avec ceux de l'expérience précédente (qualitative). Comme le démontre l'histogramme de la **figure 17**, les titres d'infectivité obtenus suite au traitement avec 300 mM étaient supérieurs à ceux obtenus après traitement avec 200 mM de l'hexoamine qui, à leur tour, étaient plus élevés que ceux de l'échantillon non traité.

Quoi qu'il en soit, pour des raisons de prudence, le traitement des cultures cellulaires avec la solution de 200 mM de D-glucosamine fut préconisé dans les travaux ultérieurs sur la propagation et la production du CVP2.

La dernière variable qui a été investiguée fut le pH de la solution de D-glucosamine utilisée lors du traitement des feuillets de cellules PK-15A infectées. Le pH des solutions de 200 et 300 mM de D-glucosamine est assez bas et instable (entre pH 5.5 et 6), ce qui explique sa couleur jaunâtre, tandis que le pH normal auquel une culture cellulaire peut croître se situe autour de 7.0-7.4. Par conséquent, le pH de la solution d'hexoamine offre un environnement très acide pour les cellules qui sont déjà sous le stress d'un agent étranger. C'est pourquoi il a fallu ajuster le pH de la solution de la D-glucosamine et vérifier s'il n'était pas le paramètre en cause dans le phénomène de dégénérescence cellulaire. Dans ces expériences, les solutions de 200 et 300 mM de l'hexoamine ont été ajustées avec une solution stérile de 1N NaOH à un pH d'environ 7. Par la suite, des

Figure 17

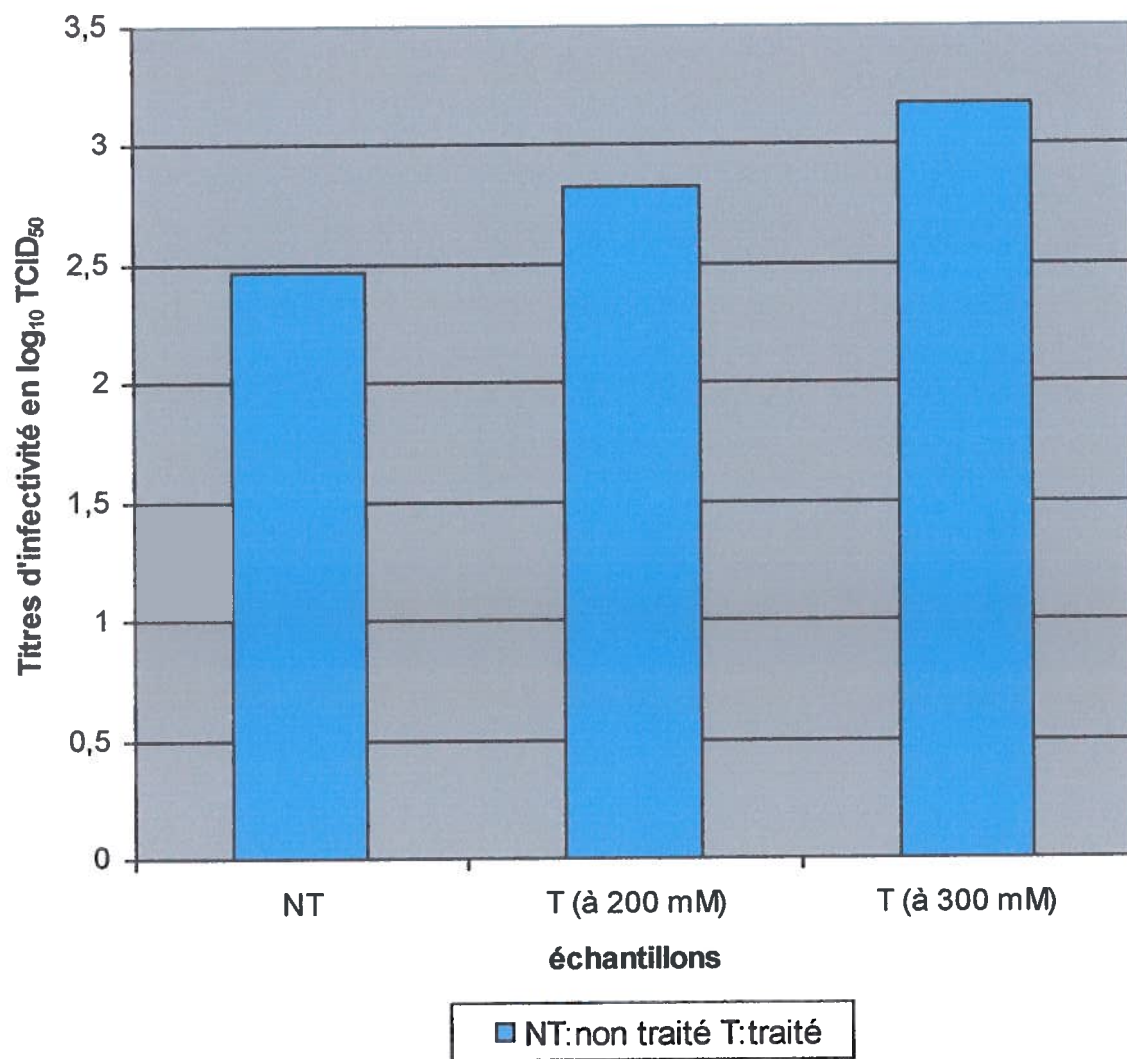
Histogramme décrivant la relation entre la concentration de la D-glucosamine et les titres d'infectivité sur des cultures de PK-15A infectées.

Histogramme représentant les titres d'infectivité en TCID₅₀ à base 10 de trois échantillons de cellules infectées, l'un n'ayant pas été traité (NT), l'autre traité avec une concentration de 200 mM (T) de glucosamine et le dernier avec une concentration de 300 mM (T). Les titres d'infectivité en TCID₅₀ ont été calculés selon la méthode de Reed et Muench basée sur la méthode des dilutions limites. Sur l'axe des ordonnées se trouvent les valeurs des titres d'infectivité exprimées en log₁₀ TCID₅₀ et sur l'axe des abscisses se trouvent les jours p.i.

NT: 10^{2.47} TCID₅₀/ml

T (à 200 mM): 10^{2.83} TCID₅₀/ml

T (à 300 mM): 10^{3.17} TCID₅₀/ml



cellules-témoins et des cellules infectées, parvenues à plus de 60% de confluence, ont été traitées avec ces solutions de 200 et 300 mM de glucosamine. Le jour qui suivit le traitement, aucun effet de dégénérescence n'a été remarqué dans l'un ou l'autre des échantillons traités. Dans une autre expérience visant à étudier l'effet du pH d'une solution de 200 mM sur la multiplication du CVP2, des séries de 8 puits (dans un plateau de 96 puits) ont été infectées avec un même surnageant infectieux (IAF2897). La moitié des cultures ont été traitées à un pH acide, tandis que les autres ont été traitées avec une préparation de l'hexoamine ajustée à pH neutre. Les résultats qualitatifs obtenus en IFI démontrèrent que dans 75% des cas, le nombre d'unités fluorescentes était plus élevé dans les échantillons traités avec la solution originale de D-glucosamine (pH acide) que dans ceux ayant été traités avec la solution de 200 mM à pH neutre. En résumé, l'ajustement du pH n'a fait que prolonger la demi-vie des feuillettes cellulaires, mais n'a pas accentué la multiplication du CVP2 en culture.

2.35 Cinétique de production du CVP2

Le suivi de la cinétique de production du CVP2 a été réalisée afin d'une part, de développer une procédure standard de production *in vitro* de CVP2; et d'autre part, afin de caractériser plus spécifiquement les effets toxiques du CVP2 sur les cultures de cellules PK-15A. Évidemment, cette étude a également permis de mieux comprendre les besoins du virus et sa multiplication *in vitro*.

Pour l'infection, huit feuillettes de cellules PK-15A ont été utilisés à un niveau de confluence de 40-45%. Deux feuillettes ont servi de contrôles, l'un n'ayant pas été traité et l'autre traité avec la D-glucosamine. De plus, un autre pétri additionnel a servi pour déterminer le compte cellulaire au jour de l'infection. Celui-ci a permis d'estimer la M.O.I de l'infection (voir annexe 1) à 0.2. Ainsi, des feuillettes de cellules PK-15A à faible confluence, dont le compte cellulaire fut estimé en moyenne à 6.75×10^5 cellules, ont été infectés avec un surnageant infectieux de l'isolat IAF2897 (IV^e passage), dont le titre infectieux avait été préalablement estimé à $10^{5.4}$ TCID₅₀/ml. (voir **Annexe 1**). Les résultats de cette expérience ont été partagés en 2 parties que voici :

Première partie.

La première partie résume les observations quotidiennes effectuées sur l'aspect des feuillets infectés comparativement au témoin. Le but recherché était d'identifier les dommages cellulaires résultant de l'infection avant et après le traitement à la D-glucosamine. Ces effets ont été décrits en tenant compte des changements morphologiques occasionnés aux feuillets cellulaires, du nombre de cellules mortes ou en suspension et de l'aspect des cellules mortes.

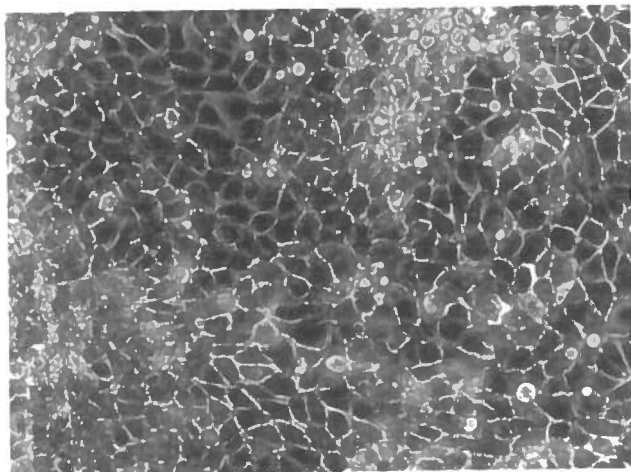
Aucun changement n'a été observé au 1^{er} jour p.i. dans les cultures infectées. Ce n'est qu'au 2^e jour p.i. que des changements ont commencé à se manifester sur les feuillets PK-15A infectés et traités, ainsi que dans le milieu extracellulaire, comparativement aux cellules-témoins. En effet, au niveau des feuillets cellulaires, les cellules infectées et traitées ainsi que les cellules de la culture contrôle traitées avaient légèrement augmenté de volume, suggérant que les cellules s'étaient probablement remises en phase de croissance. Au niveau du milieu extracellulaire, un plus grand nombre de cellules rassemblées sous forme d'agrégats ont été observées en suspension dans les surnageants des cultures infectées et traitées.

Au 3^e jour, les feuillets de la plupart des cultures cellulaires étaient devenus confluent et c'est à ce moment là, que les changements morphologiques au niveau des cultures cellulaires étaient plus remarquables, comme le montre la **figure 18**. Les cellules des cultures infectées et traitées (CTI) paraissaient légèrement plus volumineuses et espacées que celles du témoin cellulaire traité (TCT), alors qu'elles l'étaient encore plus que celles du témoin cellulaire non traité (TC). De plus, une caractéristique distincte des cellules CTI était qu'il était possible d'y observer la présence de granules denses, ce qui n'était pas le cas pour les témoins TC et TCT. Au niveau extracellulaire, une augmentation de cellules en suspension a été observée dans les cultures CTI. Ainsi, dans la **figure 19** et dans le cas des CTI, les cellules en suspension se présentent sous forme irrégulière et en agrégats, alors que dans les photos des témoins CT et TCT, elles apparaissaient de forme plus régulière (ronde) et individualisées.

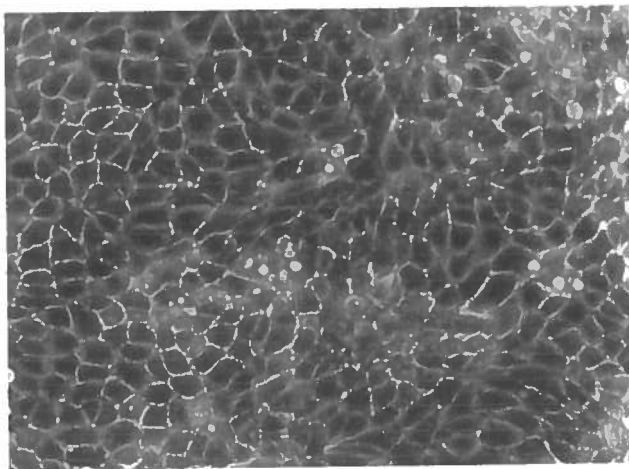
Figure 18**Observation au microscope optique des changements morphologiques des feuillets cellulaires suite à leur infection au CVP2.**

Changements morphologiques observés au niveau du feuillet cellulaire au 3^e jour p.i. à un grossissement de 200x. **A.** Échantillon de cellules-témoins (TC) n'ayant pas été traitées et présentant une taille normale. **B.** Échantillon de cellules-témoins traitées (TCT) apparaissant plus volumineuses que l'échantillon TC. **C.** Échantillon de cellules infectées et traitées (CTI) étant légèrement plus volumineuses et espacées que celles de l'échantillon TCT, alors qu'elles le sont encore plus que celles du TC.

A.



B.



C.

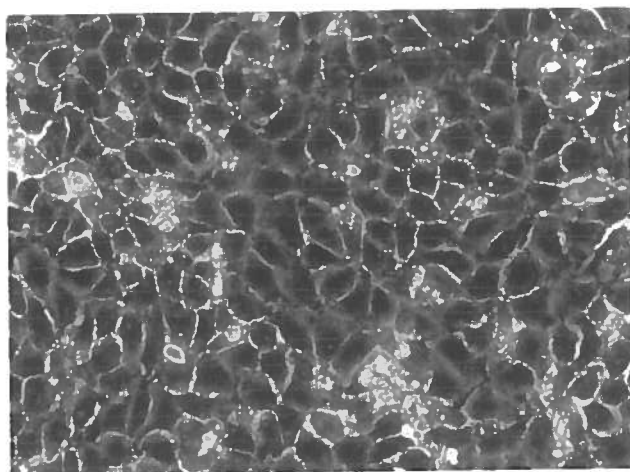
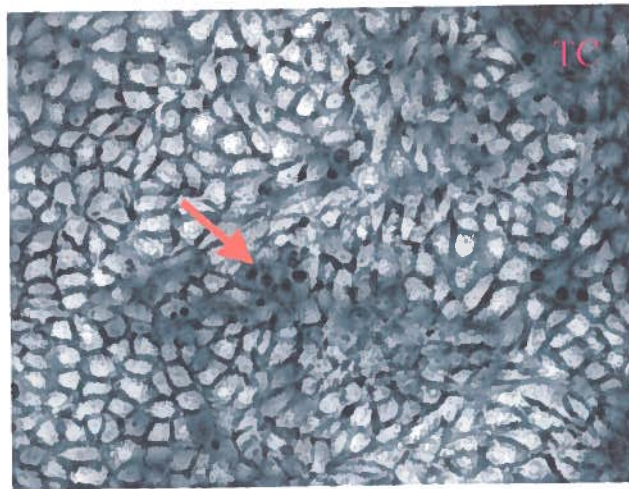


Figure 19

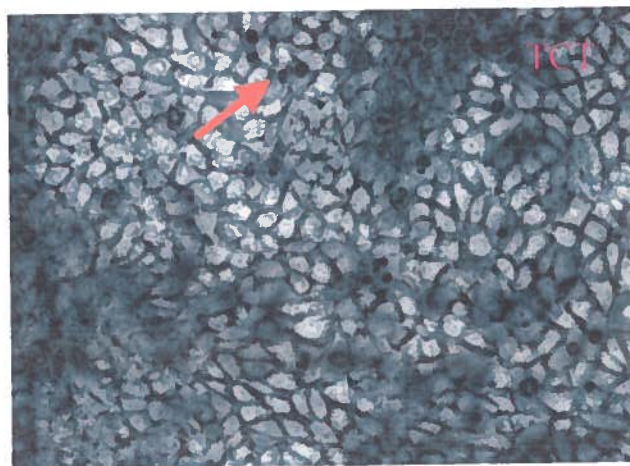
Observation au microscope optique des changements morphologiques au niveau extracellulaire suite à une infection au CVP2.

Mise en évidence des changements morphologiques observés au niveau extracellulaire au 3^e jour p.i., au grossissement de 200x. **A.** Échantillons de cellules-témoins saines (TC) présentant une faible quantité de cellules en suspension, lesquelles apparaissent de forme régulière (ronde) et individualisées. **B.** Échantillons de cellules-témoins traitées (TCT) dénotant une quantité relativement faible de cellules en suspension, lesquelles apparaissent de forme ronde et individualisée. **C.** Échantillons de cellules infectées et traitées (CTI) mettant en évidence une augmentation du nombre de cellules en suspension, lesquelles se distinguent par leur forme irrégulière et leur agrégation. Les cellules en suspension apparaissent denses et noires et sont indiquées par une flèche orange.

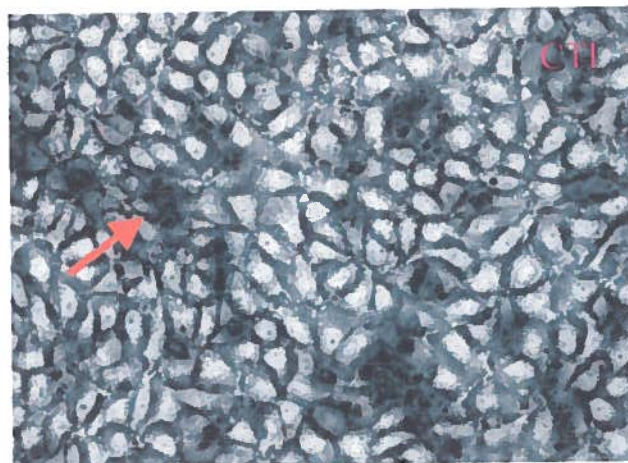
A.



B.



C.



Au 4^e jour p.i., encore plus de cellules en suspension ont été observées dans le milieu des cultures CTI comparativement aux témoins TC et TCT, tels qu'illustré dans les photos de la **figure 20**. Dans ces photos, le contraste de lumière a été amplifié de façon à visualiser distinctement les cellules en suspension. Celles-ci ont une apparence de flocons de neige dans les photos. Au niveau des cultures cellulaires, un début de dégénérescence cellulaire en foyers a été remarqué dans les cultures CTI, comparativement aux témoins TC et TCT. Ainsi, la **figure 21** présente une photo prise dans une région du feuillet cellulaire CTI, laquelle représente ce début de dégénérescence au 4^e jour p.i. Afin de distinguer ce phénomène d'une région non confluyente, une photo prise au 1^{er} jour p.i. a été juxtaposée en guise de comparaison.

Finalement, aux 5^e et 6^e jour p.i., une progression de l'effet de dégénérescence a été notée au niveau des cultures CTI, comparativement aux témoins TC et TCT. Au 6^e jour, la quasi-totalité des feuillets CTI étaient détruits. Au niveau extracellulaire, le nombre de cellules en suspension était pratiquement plus grand que dans les feuillets cellulaires des cultures CTI.

Deuxième partie.

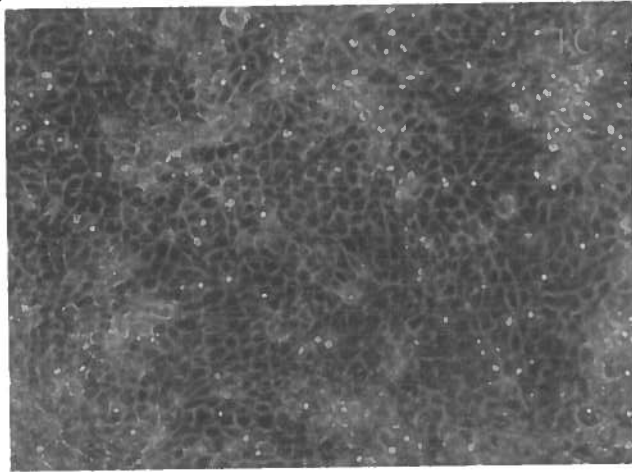
La deuxième partie de ces résultats comprend les épreuves d'infectivité et l'évaluation des titres infectieux des particules virales extracellulaire. En effet, le nombre de foyers infectieux dans les feuillets cellulaires relatifs à l'un des 6 jours p.i. a été déterminé par IFI, alors que les surnageants, préalablement récoltés, ont été évalués quantitativement pour leurs titres infectieux. Tel que rapporté dans la **figure 22**, le premier changement qui a été observé fut la nette différence dans l'intensité de la fluorescence entre le 1^{er} jour p.i. (avant le traitement) et le 2^e jour p.i. (après le traitement). Ceci suggère que suite au traitement à la D-glucosamine, il y aurait eu une augmentation significative d'antigènes viraux dans les cellules qui ont été infectées et traitées. La seconde caractéristique qui fut retenue est une saturation de la fluorescence entre le 3^e jour p.i. et 4^e jour p.i. De façon intéressante, cet événement s'est avéré concorder avec l'arrêt de la croissance cellulaire dû à l'inhibition de contact produite par la confluence du feuillet. D'autre part, ce phénomène de confluence peut être observé en IFI. En effet, la taille des cellules ainsi

Figure 20

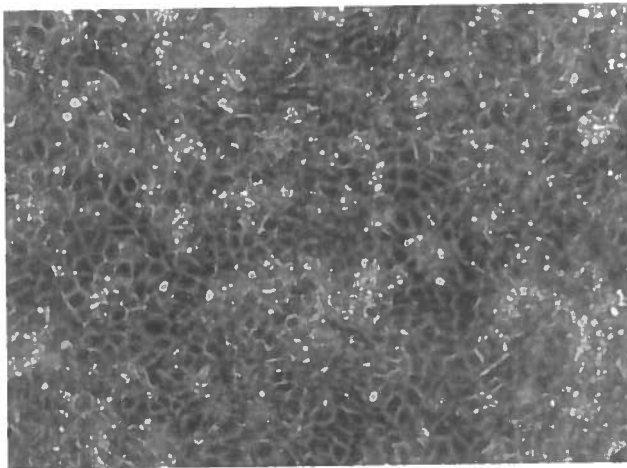
Observation au microscope optique de la quantité de cellules en suspension suite à une infection au CVP2.

Mise en évidence de l'arrondissement ("rounding up") et du détachement des cellules au 4^e jour p.i. **A.** Échantillons de cellules-témoins saines (TC) montrant un faible nombre de cellules en suspension. **B.** Échantillons de cellules-témoins traitées (TCT) dénotant un nombre relativement faible de cellules en suspension. **C.** Échantillons de cellules infectées et traitées (CTI) mettant en évidence un plus grand nombre de cellules en suspension. Les cellules en suspension ont une apparence de flocons de neige sur les photos.

A.



B.



C.

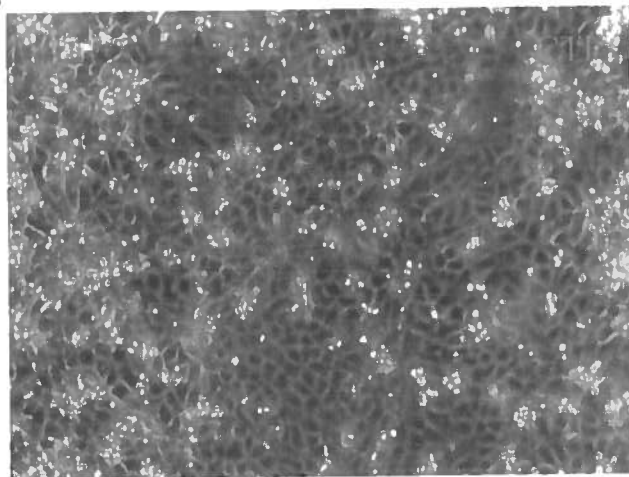
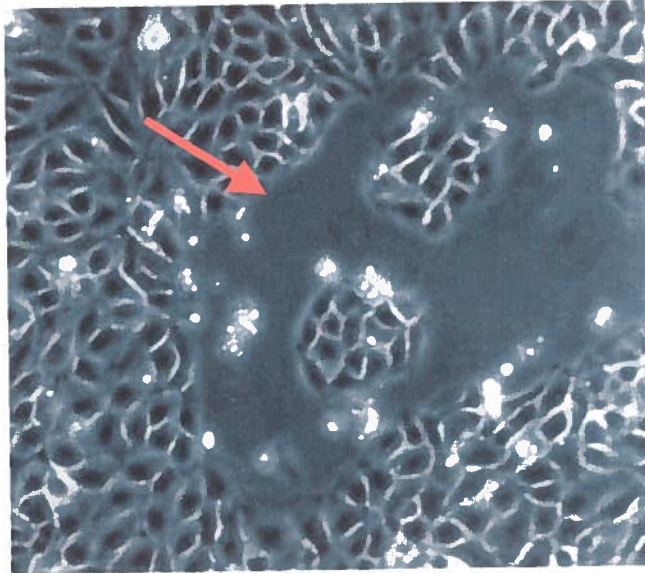


Figure 21

Observation au microscope optique d'un début de dégénérescence cellulaire suite à une infection au CVP2.

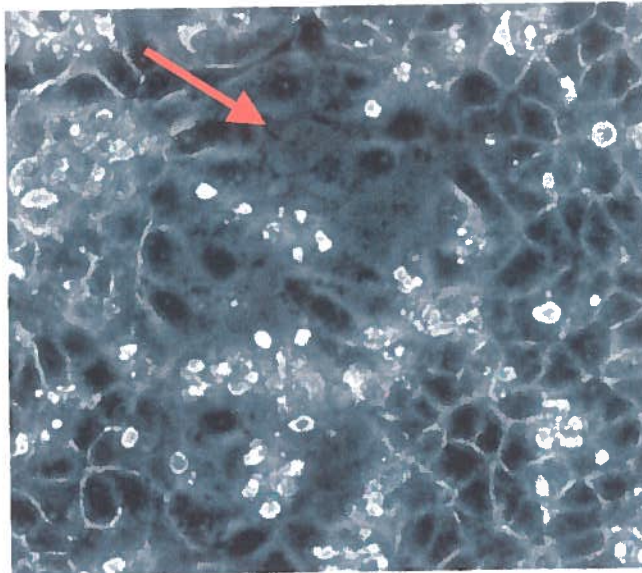
Mise en évidence au 4^e jour p.i. d'un début de dégénérescence d'une région du feuillet PK-15A suite à son infection au CVP2 et à un traitement à la glucosamine. **A.** Échantillon de cellules infectées avec un surnageant infectieux du IV^e passage de la souche 2897 du PCV2 présentant une région du feuillet non confluyente au 1^{er} jour p.i. **B.** Échantillon de cellules infectées avec le même surnageant et mettant en évidence une dégénérescence à certains endroits dans le feuillet cellulaire. Les régions concernées sont indiquées à l'aide d'une flèche orange

A.



Feuillet non confluent
au 2^e jour p.i.

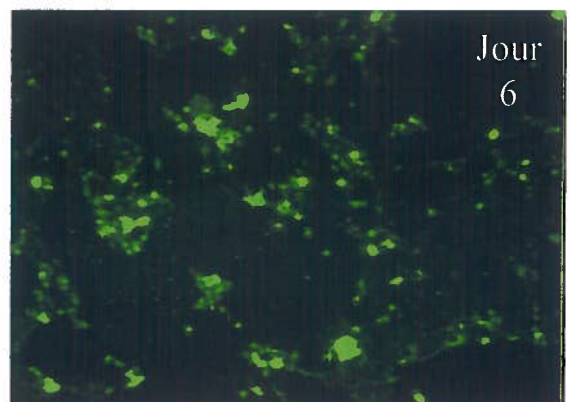
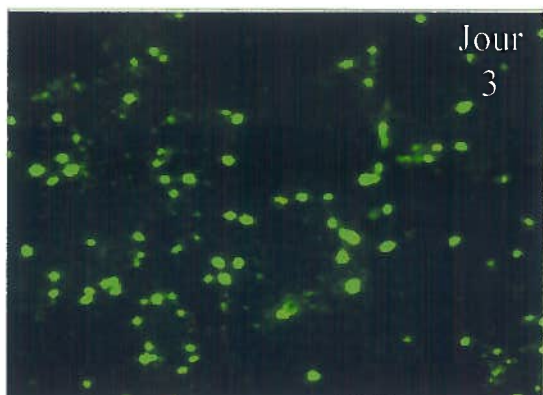
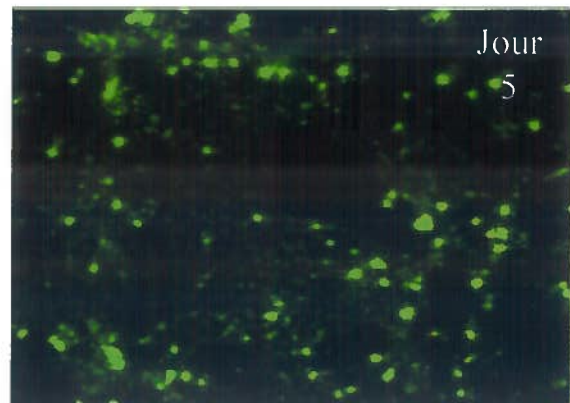
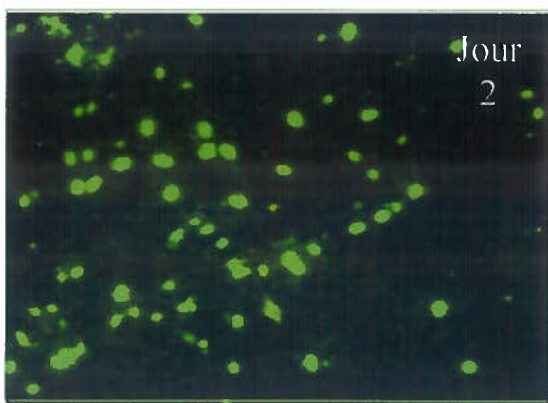
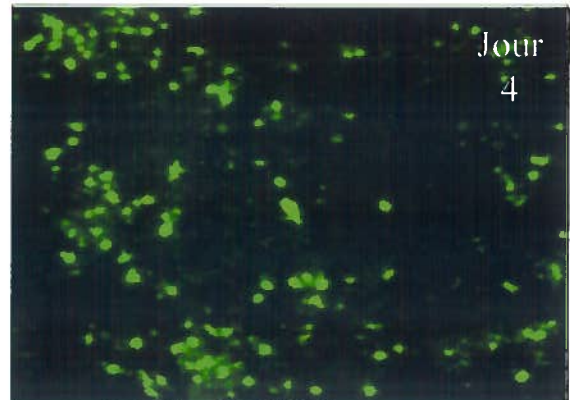
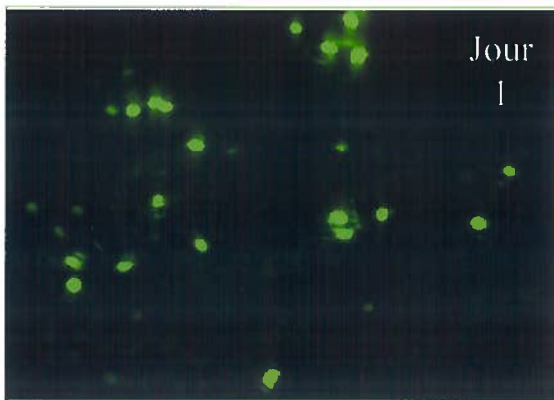
B.



Feuillet en dégénérescence
au 4^e jour p.i.

Figure 22**Index d'infectivité déterminé qualitativement à partir d'une cinétique de production du CVP2 dans les cellules PK-15A au cours d'un intervalle de 6 jours p.i.**

Résultats d'IFI obtenus suite à l'infection de feuillets cellulaires PK-15A avec le surnageant infectieux IAF2897. Le test sur l'index d'infectivité a permis d'estimer qualitativement le taux de cellules exprimant les antigènes du CVP2 et ce, depuis le jour suivant l'infection (Jour 1) jusqu'au jour de la quasi-totale destruction du feuillet cellulaire (Jour 6). Le jour 2 correspond au jour suivant le traitement à la glucosamine. Le jour 4 correspond au jour de la saturation de la production du CVP2 et celle de l'arrêt de la division cellulaire. Le test d'IFI a été effectué à l'aide d'un pool de sérums de porcs convalescents obtenus d'une ferme chroniquement affectée par des problèmes de SDPS, puis les cellules infectées ont été révélées suite à une seconde incubation en présence d'un conjugué FITC anti-IgG de porc.



que les noyaux fluorescents semblent se rétrécir après le 2^e jour p.i. et se stabiliser au 4^e jour p.i. La troisième caractéristique fut observée à partir du 3^e jour p.i., où la fluorescence commença à diffuser dans le cytoplasme. Au 4^e jour p.i., la fluorescence était plus diffuse dans le cytoplasme mais le nombre de cellules fluorescentes demeura inchangé. Néanmoins, c'est à ce moment, qu'une légère dégénérescence du feuillet cellulaire en foyers a commencé à apparaître. Ce phénomène s'amplifia dans les jours subséquents, pour finalement mener à la destruction quasi-totale du feuillet, au 6^e jour p.i. D'autre part, il fut possible de noter que cette période de dégénérescence concordait avec celle où la diffusion de la fluorescence dans le cytoplasme était observée.

En ce qui concerne les surnageants récoltés quotidiennement pendant cette période de 6 jours, ceux-ci contenaient les virions infectieux de la progéniture du CVP2 produits par les cultures PK-15A qui avaient été préalablement infectées avec un inoculum de $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml de CVP2 et traitées avec la glucosamine, à l'exception du surnageant du 1^{er} jour p.i. Le titre infectieux de chacun de ces surnageants fut déterminé par la méthode de dilution limite utilisant la méthode de calcul de Reed et Muench (voir exemple de calcul, **Annexe 1**). Les valeurs en TCID₅₀ de chacun de ces surnageants infectieux furent par la suite exprimées sous forme d'une courbe de tendance. Ainsi, à la **figure 23**, une courbe de tendance est présentée; cette dernière traduit les résultats de la cinétique de production obtenus à partir de la récolte de surnageants récoltés dans un intervalle de 6 jours.

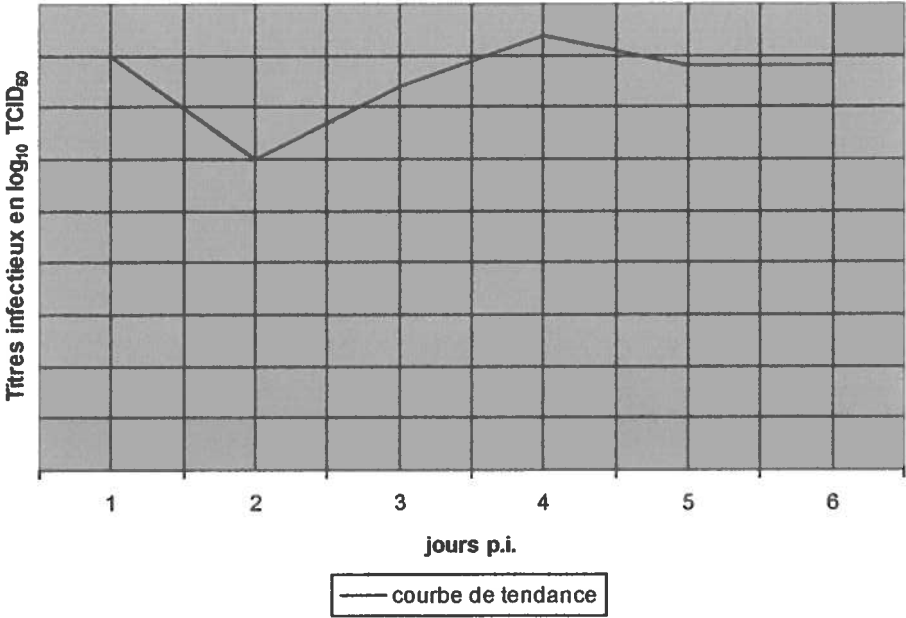
Le graphique obtenu débute avec un pic élevé au 1^{er} jour p.i., représentant la charge virale extracellulaire avant le changement du milieu infectieux et le traitement à la glucosamine. Au 2^e jour p.i., une baisse prononcée du titre infectieux avait été notée, celui-ci représente la charge virale produite après le traitement à la glucosamine et suite au remplacement par du milieu de maintenance frais. Au 3^e jour p.i., une augmentation du titre infectieux fut calculée et au 4^e jour p.i., la charge virale produite par les cellules infectées a semblé avoir atteint son maximum, au même jour que fut atteinte la confluence du feuillet cellulaire. Enfin, le graphique finit par une régression et une stabilisation du titre infectieux aux 5^e et 6^e jours p.i. En fait, cette régression coïncide avec la période de dégénérescence cellulaire.

Figure 23**Détermination des titres d'infectivité extracellulaire du CVP2 exprimés sous forme de courbe de tendance.**

Graphique présentant une courbe de tendance traduisant la cinétique de production extracellulaire du CVP2 durant un intervalle de 6 jours. Chaque point relatif à l'un des 6 jours correspond au résultat obtenu en TCID₅₀ suite à des dilutions limite du surnageant infectieux récolté en ce jour. Les titres infectieux ont été calculés selon la méthode de Reed et Muench. Sur l'axe des ordonnées se trouvent les valeurs des titres d'infectivité exprimées en log₁₀ TCID₅₀ à base et sur l'axe des abscisses se trouvent les jours p.i.

Jour 1: 10⁴ TCID₅₀/ml
Jour 2 : 10³ TCID₅₀/ml
Jour 3: 10^{3.7} TCID₅₀/ml
Jour 4: 10^{4.2} TCID₅₀/ml
Jour 5: 10^{3.9} TCID₅₀/ml
Jour 6: 10^{3.9} TCID₅₀/ml

**courbe de tendance
de la
cinétique de production virale du CVP2**



2.36 Production et purification des virus

CVP1

La purification du CVP1 a été réalisée à partir d'une production de cellules PK-15 infectées chroniquement, équivalent à 10 flacons de 150 cm³. Afin d'augmenter la productivité du virus, les cellules PK-15 ont été traitées à la D-glucosamine. Suite à une ultracentrifugation différentielle, le virus concentré fut purifié par une ultracentrifugation isopycniqne sur un gradient continu 1.2-1.4 g/ml de CsCl. Deux bandes fines opalescentes, l'une de haute densité (bande du bas) et une autre de plus faible densité (bande du haut) ont pu être obtenues. Chaque bande a été récoltée dans un volume de 1ml du gradient et a été diluée dans un volume égal de tampon TNE. Les analyses effectuées au service de M.E.T à partir d'une dilution 1/20 de chaque échantillon ont révélé une faible quantité de virions dans l'échantillon de la bande du haut, tandis qu'une concentration de virions très élevée fut récupérée dans l'échantillon de la bande du bas, soit 10¹⁰ particules virales/ml. Cette concentration a été obtenue à l'aide de la méthode de calcul suggérée par Robert Alain (Robert Alain, 1987). La formule de calcul est rapportée à l'annexe 2. Comme le démontre la figure 24, la suspension virale observée au microscope électronique semble être assez pure et exemptes de débris cellulaires. Les virions étaient de forme icosahédrique, non enveloppés et de 15-20 nm de diamètre. La micrographie de la figure 24 a été prise à un grossissement de 120 000 X.

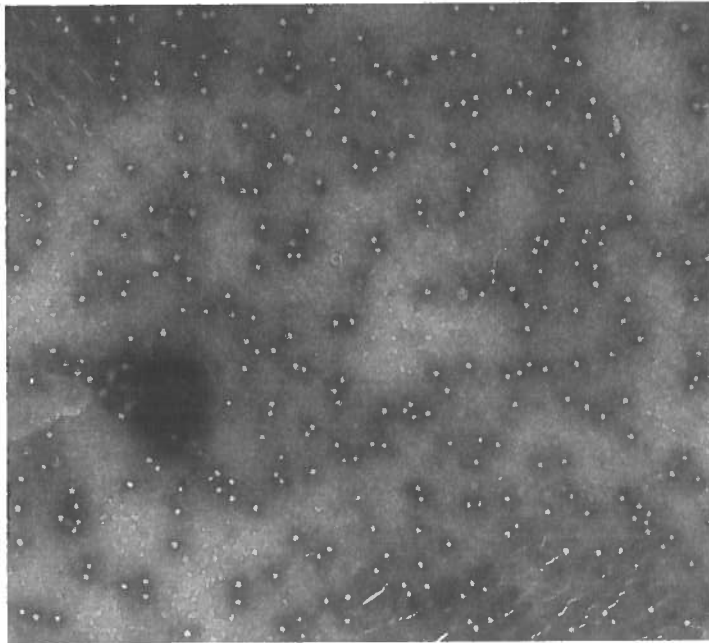
CVP2

La purification de l'isolat CVP2-IAF2897 a été effectuée à partir d'un total de 600 ml de surnageant infectieux récupéré à partir des expériences décrites auparavant. La charge virale contenue dans ces surnageants avait été jugée trop faible pour poursuivre leur propagation en culture. Le fait d'avoir regroupé ensemble les surnageants infectieux provenant de différentes expériences, a eu comme effet d'augmenter la quantité de débris cellulaires. Par conséquent, il a donc fallu ajouter une étape de plus dans la procédure de purification du CVP2. Cette stratégie de purification était basée sur trois étapes de centrifugation. La première étape a permis de clarifier le surnageant infectieux de toutes particules plus dense que le virus. La deuxième étape a permis non seulement de

Figure 24

Suspension virale du CVP1 observée au microscope électronique à transmission suite à sa production en culture cellulaire et sa purification par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de CsCl.

Résultat des analyses effectuées au microscope électronique à transmission (M.E.T) à partir d'une dilution 1/20 de l'échantillon de la bande de densité du haut. Les particules virales du CVP1 ont été produites dans des cultures de cellules PK-15 chroniquement infectées et traitées à la glucosamine. Suite à une ultracentrifugation différentielle, le virus concentré fut purifié par une ultracentrifugation isopycnique sur un gradient continu 1.2-1.4 g/ml de CsCl. Une goutte de la suspension virale purifiée a ensuite été déposée sur une grille de cuivre recouverte de formvar. Les particules virales colorées négativement au phosphotungstate de sodium ont été visualisées au M.E.T, sous un potentiel de 80 V, à un grossissement de 120 000x.



Particules virales du CVP1 observées en M.E.T.
(120 000x)

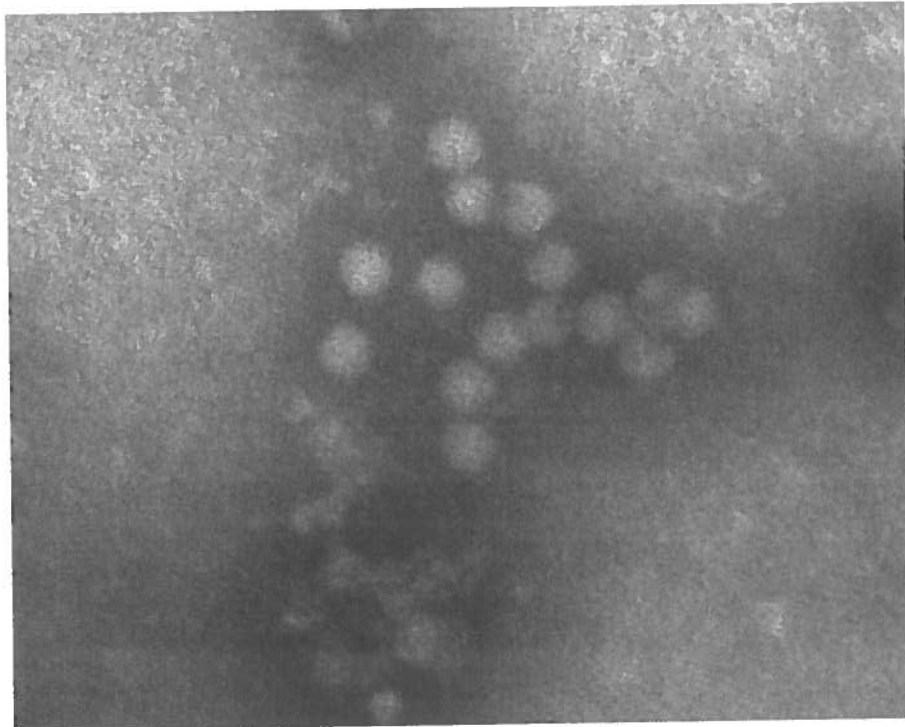
après coloration négative au PTA 3%, dans PBS
pH 7,0

concentrer le virus mais de le resuspendre dans un volume minimal de tampon, favorisant ainsi la troisième étape. Celle-ci consistait en une ultracentrifugation isopycnique sur un gradient linéaire de CsCl. Le résultat final de cette purification à trois étapes a donné les deux même bandes que dans le cas du CVP1. En effet, deux bandes ont pu être observées et récoltées et un volume de 2 ml a été recueilli de chacune d'entre elles. Après dialyse, les deux bandes ont été récoltées dans un tube et un échantillon de chaque a été envoyé au service de M.E.T. Les analyses microscopiques ont révélé que seulement l'échantillon de la bande inférieure contenait du virus. La bande supérieure semblait ne contenir que des protéines. Le produit de la bande inférieure a été pris en photo à un grossissement de 280 000 X et est présenté à la **figure 25**. Comme il est démontré, le produit de purification semble ne contenir que très peu de débris. La morphologie des particules virales qui étaient regroupées en aggrégats est similaire à celle du CVP1. Enfin, la concentration en virions a été estimée à seulement 10^8 particules virales /ml.

Figure 25

Suspension virale du CVP2 observée au microscope électronique à transmission suite à sa production en culture cellulaire et sa purification par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de CsCl.

Résultat des analyses effectuées au microscope électronique à transmission (M.E.T) à partir d'une aliquote concentrée de l'échantillon de la bande de densité du haut. Les particules virales ont été obtenues à partir d'un total de 600 ml de surnageant infectieux récupéré à partir des expériences de propagation du CVP2 sur des cultures de cellules PK-15A. Suite à une clarification et une ultracentrifugation différentielle, le virus concentré fut purifié par une ultracentrifugation isopycnique sur un gradient continu 1.2-1.4 g/ml de CsCl. Une goutte de la suspension virale purifiée a ensuite été déposée sur une grille de cuivre recouverte de formvar. Les particules virales colorées négativement au phosphotungstate de sodium ont été visualisées au M.E.T, sous un potentiel de 80 V, à un grossissement de 280 000x.



Particules virales du CVP2 vue en M.E.T.

(280 000x)

après coloration négative au PTA 3%, dans PBS
pH 7,0

2.4 Discussion

N'ayant été incriminé que très récemment dans la pathologie du SDPS, le CVP2 n'avait jusqu'à présent fait l'objet que de peu d'études. En effet, peu de travaux ont été notamment réalisés en regard de la propagation du virus en cultures cellulaires. Ce n'est en fait que durant la première année de ces travaux de maîtrise, alors que furent amorcées des tentatives pour propager un certain nombre d'isolats cliniques du CVP2 sur la lignée de cellules PK-15A, que des publications sur l'isolement de souches du CVP2 sont apparues dans la littérature (Allan & McNeilly *et al.*, 1998, Ellis *et al.*, 1998). Cependant, l'information véhiculée par ces articles ne se rapportait aucunement à l'étude de la biologie de ce virus, ne serait-ce que de constater la susceptibilité et la permissivité de la lignée cellulaire PK-15A au CVP2. Il en a été de même plus tard pour les publications d'autres investigateurs (Ellis et Krakowka *et al.*, 1999, Rodriguez-Arriola GM *et al.*, 2000). L'application de l'isolement de souches CVP2 en cultures par ces auteurs l'a été strictement à des fins d'analyses sérologiques, telles que la caractérisation de la spécificité des anticorps monoclonaux ou polyclonaux développés contre le CVP2, ou encore pour la différenciation des deux sérotypes de CVP. Ainsi, plusieurs aspects sur la biologie (tropisme) et biologie moléculaire de ce virus non pas été élucidés, en regard de son cycle de réplication, des molécules impliquées dans l'attachement du virus à la cellule-hôte, du mode d'entrée dans la cellule, du processus de maturation des virions, etc. Néanmoins, nos travaux sur la propagation *in vitro* de souches du CVP2, ont assurément apporté de nouvelles connaissances sur les besoins du CVP2 en cultures cellulaires.

Il existe un choix de méthodes variées pour propager et cultiver des virus. Ces procédures ont en commun le besoin pour le virus d'une cellule vivante pour se répliquer et produire sa progéniture. Ainsi, les virus sont propagés en laboratoire dans des systèmes d'hôte tels que les cultures cellulaires, les œufs embryonnés et les animaux (Burleson *et al.*, 1992). Dans le cas de travaux antérieurs sur le CVP1, ce dernier avait été rapporté comme contaminant apathogénique des cellules PK-15, mais d'autres lignées cellulaires s'étaient avérées permissives. Entre autre, il avait été rapporté que le CVP1 pouvait être propagé sur une lignée de cellules de rein de porc PK-15 exempte de papovavirus porcin,

mycoplasmes, PPV et CVP (Tischer *et al.*, 1982), nommé dans cet ouvrage PK-15A, ce qui servit de base pour nos travaux.

Les résultats obtenus au **tableau 10** rapportent que seulement 6 souches de CVP2 sur 28 cas cliniques ont pu être isolées sur la lignée cellulaire PK-15A. Or, tous ces échantillons cliniques s'étaient avérés positifs pour le CVP2 par la technique de PCR multiplex. La technique d'amplification enzymatique des gènes est reconnue comme étant d'une sensibilité supérieure à l'isolement sur cultures cellulaires, car d'une part la sensibilité de la PCR n'est pas entravée par la présence d'anticorps bloqueurs dans les tissus et le pouvoir infectieux des isolats. Ainsi, il est possible que les particules virales aient perdu de leur infectivité au cours de la période qui a suivi l'abattage des animaux malades, en raison d'une mauvaise température d'entreposage des tissus prélevés ou de conditions d'autolyse trop avancée. De plus, peu de particules virales infectieuses étaient probablement présentes dans les morceaux de tissus homogénéisés et utilisés pour l'isolement de CVP2 permettant leur détection par IFI après seulement deux passages sur cultures cellulaires.

Malgré qu'elle soit moins sensible que la PCR, la technique d'IFI permet de suivre la réplication du virus au niveau de l'expression des protéines virales, alors que la méthode PCR ne nous informe que sur la présence de l'ADN viral. Ainsi, en utilisant l'IFI, il était possible d'évaluer qualitativement les titres d'infectivité sur les feuillets cellulaires infectés, correspondant à la proportion de cellules exprimant les antigènes du CVP2 par rapport au nombre total de cellules observées dans le champ optique du microscope sous rayonnement UV. Finalement, la spécificité des antisérums utilisés dans les tests d'IFI pour le dépistage des cellules infectées avait été démontrée étant donné l'absence de réactivité contre les antigènes des différentes lignées cellulaires utilisées dans les expériences. De plus, il avait été démontré par PCR que les cultures cellulaires et les réactifs (milieux de culture, SFB, suppléments et antibiotiques) utilisés pour la propagation du virus étaient exempts de PPV, CVP2 et CVP1.

Également, les tests d'IFI démontrèrent que seul l'isolat IAF2897 conserva un titre infectieux relativement élevé après trois passages sur les cellules PK-15A. Certaines expériences sur l'optimisation des conditions de cultures cellulaires ont démontré qu'un d'homogénat riche en virus ne produit pas nécessairement un titre infectieux plus élevé. En effet, lorsque 100 mg d'homogénats de 5%, 7,4%, 8,75% et 20% de la souche IAF2897 ont été propagés sur les cellules PK-15A, l'échantillon dilué à 8,75% s'est révélé le plus productif. Ainsi, une infection productive dépend probablement de la quantité de virions infectieux dans l'homogénat, et qui varie selon le site de prélèvement du morceau de tissu utilisé pour sa préparation. L'infection n'est donc pas uniforme dans les poumons et les organes lymphoïdes.

En raison de son haut titre infectieux, l'isolat québécois CVP2-IAF2897 fut utilisé dans les expériences ultérieures. Trois types de cultures de cellules ont été utilisés pour la propagation *in vitro* de cet isolat de CVP2, à savoir la lignée cellulaire de rein de porc PK-15A, une culture primaire de macrophages alvéolaires porcins PAM, et la lignée de cellules de trompe de Fallope de porc PFT. Ainsi, il a été possible d'explorer le tropisme du CVP2 *in vitro*. Ces résultats sont présentés aux **figures 12 et 13** ont démontré que le CVP2 peut infecter aussi bien les cellules de rein que celles de la trompe de Fallope. Par ailleurs, il fut impossible de propager la souche CVP2 sur la culture primaire de macrophages matures, suggérant entre autre l'incapacité du virus à se répliquer dans des cellules qui se trouvent dans un état de différenciation terminale. Comparativement aux cellules PFT et PK-15A, les cellules PAM n'ont plus la capacité de se diviser et de proliférer. Par conséquent, elles ne sont plus aptes à fournir les métabolites (dNTP, enzymes, etc.) nécessaires à la réplication du virus. Ces résultats suggèrent que les CVP correspondent à la description de virus simples. D'une part, ils ne semblent pas disposer de protéines capables d'induire des conditions qui permettent la synthèse d'ADN dans les cellules en non division; d'autre part, ils semblent ne pouvoir se répliquer exclusivement dans des cellules en division pouvant leur fournir les enzymes et les précurseurs nécessaires à la synthèse de leur ADN, tout comme les virus simples (e.g.: Parvovirus) (Watson *et al.*, 1989). Aussi, ces résultats corroborent les conclusions d'autres auteurs,

ayant démontré que la réplication de l'ADN du CVP1 est dépendante des enzymes cellulaires de la phase S (Tischer *et al.*, 1987).

Par ailleurs, les résultats des études effectuées *in vitro* ne semblent pas appuyer ceux des études effectuées *in vivo*. Ces dernières ont permis de démontrer que le type de cellules prédominantes dans lequel les antigènes du CVP ont été retrouvés, semble appartenir à la lignée monocyte/macrophage (Ellis & Hassard *et al.*, 1998). Il est difficile de justifier la divergence observée dans ces études, d'une part, parce que les résultats observés en cultures cellulaires ne reflètent pas ce qui se produit dans les conditions naturelles. D'autre part, le fait que les antigènes CVP aient été détectés majoritairement dans les cellules phagocytaires, ne prouvent pas nécessairement leur permissivité au virus. Effectivement, dans une étude *in vitro* portant sur l'effet du CVP1 sur la fonction des macrophages, les auteurs ont réussi à détecter des antigènes dans le cytoplasme des macrophages, mais sans parvenir à démontrer la réplication du virus dans ce type de cellules (McNeilly *et al.*, 1996). Quoi qu'il en soit, aucune étude *in vivo* n'a permis de démontrer jusqu'à présent que le CVP peut se répliquer dans les macrophages. Toutefois, il serait intéressant d'effectuer des investigations sur ce sujet afin de vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, le fait que les antigènes du virus dans les cellules permissives (e.g.: PK-15, localisé dans le noyau) ne se localisent pas dans les mêmes compartiments que dans le cas des cellules qui ne permettent pas sa réplication (e.g.: PAM, localisé dans le cytoplasme), soulève certaines questions. Entre autre, il se pourrait que l'encapsidation des particules virales ait lieu dans le noyau, puisque les antigènes du virus y sont intensivement détectés dans les cellules en division.

Dans d'autres études, des auteurs ont rapporté que les isolats du CVP2 ont apparemment un tropisme cellulaire diversifié *in vivo*, incluant les cellules épithéliales et musculaires (Ellis, Krakowka *et al.*, 1999). Par contre, d'autres études effectuées *in vitro* ont révélé que le CVP1 peut aussi être propagé sur d'autres lignées cellulaires que les cellules PK-15 d'origine porcine, notamment sur les cellules de reins de singe telles les

cellules Vero (Allan, McNeilly *et al.*, 1999). Ces études en plus des résultats obtenus dans nos travaux permettent de conclure que le CVP est pantropique *in vivo* et *in vitro*. De plus, en raison de sa très petite taille, de sa simple complexité moléculaire et le fait que CVP2 peut infecter différents types cellulaires, permettent de présumer que le mode d'entrée emprunté par le virus est non spécifique, soit par phagocytose, endocytose, ou encore par l'intermédiaire d'une protéine membranaire communément retrouvée sur la surface de divers types cellulaires.

Les essais de propagation du CVP2 sur une différente lignée cellulaire, soit les cellules PFT, avaient pour but de tenter de trouver un type cellulaire plus permissif et plus productif que les cellules PK-15A sans nécessité le traitement des cellules avec la D-glucosamine. Toutefois, les résultats présentés à la **figure 15** ont été reproduites à trois reprises et, démontrent que l'effet de la D-glucosamine semble être indispensable à la production du CVP2 même dans les cellules PFT. Cependant, la propagation du CVP2 sur les cellules PFT, a permis de mettre en évidence des changements morphologiques distincts observés au 3^e jour p.i. (**figure 14**) plus accentués que ceux observés au 4^e jour p.i. sur les cellules PK-15A (**figures 20 et 21**). Malgré que cette expérience n'ait été reprise qu'à deux occasions, et puisque les cellules PFT contrôles traitées n'aient pas démontré de signes de dégénérescence, même jusqu'au 4^e jour d'incubation. (**figure 14**), il est fort possible que la lignée cellulaire PFT soit plus sensible à la réplication du CVP2 que le soit la lignée cellulaire PK-15A. Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier si à un nombre de passages plus élevé sur ces cellules des changements antigéniques au niveau du virus pourraient se produire, comme cela a été démontré dans le cas avec des cellules Vero. En effet, il a été observé que des passages prolongés sur ces dernières pouvaient entraîner des changements au niveau de l'antigénicité du virus (Allan *et al.*, 1994). De tels changements pourraient être évalués par des tests de réactivité croisée en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CVP2.

La lignée cellulaire de rein de porc PK-15A a été la première lignée à être utilisée pour la propagation du CVP2. La **figure 12** résume les résultats des expériences confirmant l'adaptation de l'isolat CVP2-IAF2897 sur ces cellules. Par contre, si le maintien de

l'isolat du CVP2-IAF2897 au cours des passages subséquents ait pu être réalisé, il n'en fut pas de même pour le maintien de l'infectivité du virus. Dans des études ultérieures, il fut démontré que certains facteurs étaient déterminants pour la propagation du virus infectieux. Ainsi, pour obtenir une infection productive stable, il fut en premier lieu démontré que l'infection de feuillets de cellules PK15A d'un niveau de confluence variant de 40 à 50% était préférable. Ceci permet entre autre d'augmenter la multiplicité d'infection au cours des premiers passages, ce qui résulte en une meilleure productivité du virus au cours des premiers passages qui semblent déterminants (**figure 12**). D'autres facteurs semblent avoir influencés le niveau de productivité de virions infectieux puisqu'un problème de reproductibilité avait été observé en ne considérant que le niveau de confluence des feuillets cellulaires infectés.

Le second facteur qui fut considéré pour la propagation *in vitro* du CVP2 fut l'âge du feuillet cellulaire lors de l'infection. Il fut démontré que des cellules propagées régulièrement durant leur phase exponentielle procuraient au virus un substrat plus adéquat que les feuillets cellulaires parvenus à leur phase stationnaire. Lors des expériences ultérieures, les passages des cellules étaient effectués durant leur phase exponentielle, soit à un degré de sous confluence (80-90%). L'importance de ce facteur fut déduit après avoir remarqué une diminution du taux d'infectivité suite à l'omission de sous-cultiver les cellules pendant leur phase de croissance. En effet, après avoirensemencé des cellules PK-15A, provenant d'une culture parvenue en phase stationnaire (surconfluence), et après les avoir inoculés avec du virus, une diminution du taux d'infectivité fut obtenue sous les mêmes conditions d'infection et avec le même matériel infectieux. Ces cellules avaient été infectées avec un surnageant de culture dont l'infectivité était normalement élevée. Donc, en plus de respecter le ratio virus/cellule et un pourcentage de confluence peu élevé, une attention particulière doit aussi être apportée quant à l'âge des cellules utilisées pour l'infection.

Le troisième facteur déterminant pour la propagation du virus fut certainement le traitement à la D-glucosamine. En fait, il était déjà connu que le traitement à la D-glucosamine facilitait la synthèse de l'ADN cellulaire tout en favorisant celui du CVP1 et

ce, en induisant la cellule à entrer dans la phase S (Tischer *et al.*, 1987). Durant cette phase, le virus a la possibilité de bénéficier des enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN et de se reproduire abondamment. En s'inspirant de ces travaux, des premiers essais de traitement des cellules PK-15A ont été faits afin d'en vérifier l'efficacité dans la production de la souche pathogène CVP2. Son effet bénéfique a été observé tant dans les expériences *in vitro* visant à produire du CVP1, que dans celles destinées à propager le CVP2. Toutefois, certains problèmes de toxicité semblent avoir compromis la reproductibilité des expériences, d'où des études supplémentaires plus approfondies ont été effectuées sur l'effet de la D-glucosamine sur la propagation *in vitro* du CVP2.

Il a été mentionné précédemment que pour qu'il puisse se multiplier chez un hôte, un virus à ADN, devait soit se répliquer exclusivement dans des cellules en division (virus simples), soit concevoir un moyen d'arriver à induire des conditions qui permettent la synthèse d'ADN (virus plus complexes). Puisque les CVP ne possèdent pas le bagage enzymatique pour leur permettre d'induire la cellule-hôte à entrer dans la phase S, d'autres approches doivent être envisagées pour y arriver. Le traitement à la D-glucosamine est l'une de ces approches qui avait été préalablement démontrée pour la réplication du CVP1 dans les cellules PK15 (Tischer *et al.*, 1987). Lors des toutes premières expériences visant à démontrer l'effet de la D-glucosamine sur la réplication du PCV2, une différence significative était difficilement observable par IFI en terme du taux d'infectivité dans les cultures infectées et traitées comparativement aux cellules qui furent infectées mais non-traitées à la D-glucosamine. Par contre, l'effet de ce traitement était beaucoup plus manifeste lorsque les cellules infectées étaient traitées au moment où une confluence des feuillets cellulaires de près de 60% au lieu de supérieure à 80% était atteinte. Ainsi, ces travaux ont démontré qu'il n'était non seulement possible d'induire la multiplication virale mais, si une confluence appropriée des feuillets cellulaires avait été atteinte au moment du traitement, il devenait possible d'optimiser la productivité des particules virales. Cependant, suite au traitement des cultures infectées à un niveau de confluence cellulaire inférieure (de plus de 20%), il était possible d'induire une multiplication plus élevée du virus, ainsi qu'une dégénérescence précoce du feuillet cellulaire. Ce nouveau phénomène fut mis en évidence même après avoir réduit le temps

de traitement à la D-glucosamine à 25 minutes. Dès lors, l'effet de toxicité fut considéré comme étant relié à l'induction de la multiplication virale par le traitement à la D-glucosamine. Au contraire, puisque les feuillet cellulaires contrôles ayant été traités ne semblaient pas avoir été affectés par le traitement à l'hexoamine, il était possible que la dégénérescence cellulaire soit due à l'augmentation du titre viral dans les cellules infectées et traitées. Or, le phénomène de dégénérescence n'était probablement pas toujours un signe d'une productivité élevée de CVP2. En effet, parfois une dégénérescence cellulaire fut observée, alors que le taux d'infectivité était demeuré relativement faible. Par contre, à chaque fois qu'un taux d'infectivité très élevé était obtenu, la dégénérescence du feuillet cellulaire infecté était observée. Toutefois, ces résultats n'étaient pas suffisants pour déterminer à quel point le phénomène de dégénérescence cellulaire était attribuable au virus.

Par ailleurs, il fut possible de constater que le traitement des cellules à la D-glucosamine pouvait leur être nocif, si le temps de contact n'était pas standardisé. En effet, les cellules ne parvenaient pas à se remettre du stress chimique, lorsque après infection par le CPV2, elles étaient traitées avec une solution de 300 mM de D-glucosamine pour plus de 30 à 40 minutes. La sensibilité des cellules PK-15A au traitement à la D-glucosamine a aussi été rapportée par d'autres auteurs (Allan et Ellis, 2000). Étant donné les difficultés rencontrées pour la reproductibilité des résultats, afin de parvenir à un équilibre entre les effets bénéfiques et nocifs du traitement à la D-glucosamine, d'autres variables ont dûes être investiguées.

La concentration de la solution de D-glucosamine a été le troisième paramètre à être modifié dans l'étude portant sur l'effet de la D-glucosamine. En diminuant la concentration de l'hexoamine, il devint possible de réduire son effet toxique. Effectivement, les résultats obtenus ont démontré qualitativement à plus de trois reprises qu'en traitant des cultures semi-confluentes, préalablement infectées par le CVP2, avec 200 mM au lieu de 300mM de D-glucosamine, les cellules parvenaient plus facilement à retrouver leur état normal. Par conséquent, 18 heures après le traitement, la prolifération des cellules infectées était évidente, ce qui n'était pas toujours le cas lorsqu'elles avaient

subi un traitement avec la solution de D-glucosamine à la concentration de 300mM. De plus, par comparaison les taux d'infectivité obtenus dans le cas des cellules PK-15A infectées et traitées avec la solution de 200 mM de D-glucosamine était presque 4 fois plus élevés que dans le cas des cellules infectées n'ayant pas subi ce traitement (**figure 17**). Par ailleurs, les taux d'infectivité obtenus dans le cas des cellules infectées et traitées avec la solution de 300 mM de D-glucosamine étaient plutôt 7 fois plus élevée que dans le cas des cultures infectées mais non traitées. L'utilisation de la solution de 300 mM de D-glucosamine pour le traitement des cellules infectées a permis d'obtenir des taux d'infectivité de plus de 3 fois supérieure à ceux obtenus avec la solution de 200 mM de l'hexoamine.

En comparant les résultats estimés qualitativement avec ceux estimés quantitativement, l'écart entre les taux d'infectivité dans le cas des trois types de cultures n'était pas aussi marqué que les résultats rapportés dans l'histogramme de la **figure 17**. Il est difficile de discuter sur ce point, étant donné l'impossibilité, d'une part, de certifier que l'une des variables discutées jusqu'à présent était en cause, malgré qu'elles soient souvent à l'origine du problème. D'autre part, il faut aussi considérer notre méconnaissance de la précision statistique de la méthode modifiée de Reed et Muench. En effet, il aurait fallu utiliser des méthodes statistiques plus précises afin de connaître la signification réelle et la précision de nos données en TCID₅₀. Ce concept sera traité plus tard. Néanmoins, quelle que soit la précision de l'approche quantitative utilisée, il n'en demeure pas moins que les interprétations qualitatives et quantitatives des résultats s'accordent sur les mêmes faits. Malgré la dégénérescence cellulaire occasionnelle qu'elle peut causer, la solution de 300 mM de D-glucosamine induit généralement des taux d'infectivité supérieurs à ceux résultant du traitement des cellules avec la solution de 200 mM de D-glucosamine, qui, à son tour produit des taux d'infectivité considérablement plus élevés que dans le cas des cultures cellulaires infectées n'ayant pas subi un tel traitement.

En dépit du fait qu'il était plus profitable de traiter des cultures PK-15A infectées avec la solution de 300 mM de D-glucosamine, la solution de 200 mM de D-glucosamine fut

retenue pour la poursuite des travaux décrits dans ce mémoire, particulièrement pour l'étude de la cinétique de production du CVP2 pour éviter toute confusion pour ce qui est de l'origine de la dégénérescence cellulaire observée. En effet, avec la solution de 200 mM, le problème de dégénérescence précoce des feuillets cellulaires infectés ne se manifestait pas comme c'est souvent le cas avec la solution de 300 mM de D-glucosamine.

La quatrième variable considérée fut le pH de la solution de D-glucosamine utilisée lors du traitement des feuillets de cellules PK-15A. Idéalement, le milieu dans lequel croissent les cellules en monocouche doit être constitué d'une solution de saline isotonique, vitamines, glucose, coenzymes, acides aminés et doit être tamponné entre les valeurs de pH se situant entre 7.0 et 7.4 (Flint *et al.*, 2000, Freshney, 2000), alors que les solutions de D-glucosamine utilisées lors du traitement avaient un pH relativement bas, autour de pH 5.5-6.0. Ainsi, l'effet de dégénérescence pouvait être due aussi aux conditions physiologiques dans lesquelles les cellules se trouvaient lors du traitement à l'héxamine. Dans l'une des expériences, aucun effet de toxicité ne fut rapporté et ce, après avoir traité les cultures avec les solutions de 200 et 300 mM de D-glucosamine, tamponnées à un pH d'environ 7. Par contre, une seconde expérience démontra que les taux d'infectivité avaient diminué dans 75% des cultures ayant été traitées avec la solution tamponnée (pH neutre) de D-glucosamine. Ces expériences ont démontré, d'une part, qu'une solution tamponnée de D-glucosamine est moins toxique pour les cellules, que si la solution est pré-ajustée à un pH acide. D'autre part, il semble que des conditions d'acidité, lors du traitement à la glucosamine, soient nécessaires à la multiplication du CVP2 dans les cellules PK-15A. Une autre possibilité est que l'action de l'héxamine ne peut s'exercer que dans des conditions acides, ce qui demeure à être démontré.

Enfin, l'étude sur l'effet de la D-glucosamine a permis d'établir les paramètres afin d'obtenir une production optimale de PCV2 à partir des cellules PK-15A. Quatre variables doivent nécessairement être contrôlées: le degré de confluence des feuillets cellulaires lors du traitement à la D-glucosamine, la concentration de la solution de D-glucosamine, le temps du traitement et finalement, les conditions physiologiques du

traitement. Afin d'assurer la reproductibilité lors des différentes expériences de production virale, l'un des facteurs cruciaux à considérer est sans aucun doute le traitement des feuillets cellulaires infectés avec la solution de D-glucosamine. En effet, l'importance de ce facteur a été réalisée après avoir identifié un certain nombre de variables. Cependant, afin de tirer profit des effets bénéfiques de la D-glucosamine, les autres paramètres doivent être rigoureusement contrôlés.

En ce qui concerne la dégénérescence des feuillets cellulaires infectés, elle survenait généralement dans des circonstances anormales, soit moins de 24 heures après le traitement à l'hexoamine, lorsque l'une (ou plus) des variables identifiées auparavant n'avait pas été adéquatement contrôlée. Dans des circonstances normales, lorsqu'éventuellement toutes les variables ont été contrôlées, les cultures de cellules infectées réussissent à se rétablir du stress chimique et à proliférer, après 24 heures de post-traitement, de la même manière que les cellules-témoins. En fait, dans des circonstances normales, il a été possible de constater à plusieurs reprises, dans les cultures de cellules infectées et traitées, que ce phénomène réapparaissait deux à trois jours plus tard suivant le traitement, alors que les témoins cellules (cultures saines et cultures traitées) demeuraient intactes. Ce phénomène était, présumément relié au virus plutôt qu'à l'effet toxique de la D-glucosamine. Ainsi, afin de démontrer, entre autres, si ce phénomène cellulaire pouvait être relié à la production de virus, une étude a été effectuée en regard de la cinétique de production du CVP2 *in vitro*.

Cette étude, reproduite à trois reprises, a permis non seulement de mieux établir les besoins du CVP2 et de mieux connaître les facteurs qui influent sur sa réplication *in vitro*, mais également les changements morphologiques qu'il entraîne chez son hôte. Elle a aussi permis de répondre à certaines des questions ayant été soulevées durant les investigations sur l'effet de la D-glucosamine et de subvenir aux besoins de standardisation. Ainsi, les deux objectifs de cette étude de la cinétique de production du virus résidaient d'une part à démontrer que la dégénérescence cellulaire était principalement attribuable à la multiplication du virus, et d'autre part, à déterminer le

matériel infectieux de choix et les conditions optimales de culture pour la production *in vitro* du CVP2.

Au cours des premiers travaux sur la propagation du CPV2 en cultures cellulaires tout changement anormal n'apparaissant pas dans les cultures cellulaires contrôles (TC et TCT) a été rapporté et ce, tant au niveau du feuillet cellulaire que dans le milieu extracellulaire. En fait, notre interprétation d'effet cytopathique avait été inspirée des définitions proposées et des exemples présentés dans certains ouvrages de référence (Davis *et al.*, 1990, Prescott *et al.*, 1995 et Flint *et al.*, 2000). Les altérations qui ont été décelées au niveau des cellules infectées sont apparues suite au traitement avec la D-glucosamine. Trois types de changements furent mis en évidence dans les cultures infectées par le PCV2. Au début, il y avait formation d'agrégats de cellules mortes dans les surnageants (**figure 19**) observables dès le 2^e jour p.i. Habituellement, ce phénomène survient suite à la lyse des cellules infectées par des virus à ADN tel que les adénovirus et même par des virus à ARN comme le poliovirus (Davis *et al.*, 1990, Flint *et al.*, 2000). De façon intéressante, ces deux virus sont non enveloppés comme le CVP2 et il est connu que les virus non enveloppés doivent généralement lyser les cellules infectées pour libérer les virions de la progéniture (Flint *et al.*, 2000). En plus de la formation d'agrégats, les cellules en suspension observées dans les surnageants des cultures infectées par le CVP2 étaient plutôt de forme irrégulière comparativement à celles observées dans le milieu extracellulaire des témoins cellulaires (TC et TCT), témoignant ainsi d'un certain degré de dégénérescence des cellules infectées.

L'arrondissement des cellules et le détachement de celles-ci (**figure 20**) des feuillets cellulaires infectées étaient aussi une caractéristique de l'effet cytopathique observée. Leur nombre augmentait depuis le 2^e jour p.i. jusqu'au 6^e jour p.i menant à la destruction quasi totale des feuillets cellulaires infectés. Ce phénomène est aussi observé dans le cas des cultures cellulaires infectées par les herpesvirus, rhabdovirus, adénovirus, poliovirus, etc (Flint *et al.*, 2000). Tous ces virus ont tendance à entraîner l'arrondissement des cellules ("rounding up") et le détachement de celles-ci du feuillet cellulaire à un certain moment dans le développement de l'ECP.

D'autres altérations cellulaires au niveau des feuillettes cellulaires furent également constatées tel que le grossissement des cellules dans les cultures infectées et traitées avec la D-glucosamine, et la présence de granules denses dans les cellules. En effet, malgré qu'ils ne furent pas considérés comme une évidence de dégénérescence cellulaire, le grossissement des cellules et la présence de granules permirent dans certains cas de distinguer les cultures infectées et traitées des témoins cellulaires (**figure 18**). En fait, ce phénomène de grossissement des cellules infectées apparaissait en réponse au traitement à la D-glucosamine témoignant du haut niveau d'activité des cellules au cours de la phase S. Par la suite, les cellules qui entrent dans la phase M (division cellulaire) se doivent de doubler leur volume et celui de leur noyau (2^e jour p.i. à la **figure 22**).

Par ailleurs, il est connu que le temps requis pour le développement d'un ECP varie d'un virus à l'autre (Flint *et al.*, 2000). Par exemple, dans une infection *in vitro* par le poliovirus, il est possible d'observer après moins de 5 h p.i., le phénomène d'arrondissement des cellules. Après 8 h p.i., il est envisageable de noter le phénomène de détachement en plus d'une augmentation du nombre de cellules arrondies. Après 24 h, il est possible d'observer dans le milieu extracellulaire des agrégats de cellules mortes, puis la lyse cellulaire. Malgré que ces phénomènes soient similaires à ceux ayant été observés dans le cas de l'infection par le CVP2, les premières évidences de dégénérescence cellulaires n'étaient observables qu'à partir du 2^e jour p.i. D'autres virus, tels que les enterovirus et le virus herpès simplex, sont connus pour produire leur ECP en dedans de 1 à 2 jours. Par contraste, le cytomégalovirus, le virus de la rubéole et certains adénovirus ne produisent un ECP caractéristique qu'après plusieurs semaines post-infection (Flint *et al.*, 2000).

Les changements morphologiques observées lors de l'isolement du CVP2 *in vitro* ne doivent pas être considérées comme seules indications d'une infection par le CVP2. En effet, ces changements peuvent aussi être induits suite à un traitement à la D-glucosamine des cultures préalablement infectées par le CVP2. D'autre part, la mise en évidence d'un ECP caractéristique n'a jamais été constaté dans des conditions naturelles (sans traitement à la D-glucosamine) de propagation *in vitro*. Cependant, suite aux conditions

d'infection préalablement déterminées, il s'est avéré possible de reproduire un environnement similaire à celui de l'hôte naturel, c'est-à-dire des cellules en phase de division ou S. En effet, les cellules de la plupart des organes des jeunes porcelets infectés par le CVP2 sont en pleine phase de développement biologique. Par conséquent, ces conditions d'infection ont permis d'étudier l'effet du CVP2 lors d'une simulation d'une infection aiguë *in vitro*.

Certaines expériences effectuées au cours des essais de transfection cellulaire par l'ORF2 du CVP2 (chapitre 3) et dans la seconde partie de l'étude sur la cinétique de production suggèrent que le mécanisme probable responsable de l'ECP observée est la surproduction de protéines virales toxiques, tel que démontré clairement dans le cas d'autres virus (Davis *et al.*, 1990, Prescott *et al.*, 1995).

Dans la seconde partie de l'étude sur la cinétique de production des particules virales, des résultats concernant des index d'infectivité obtenus à partir des six feuillets cellulaires infectés et de leurs surnageants respectifs, ont été rapportés avec pour particularité d'être exprimés sous forme d'une courbe de tendance. Afin de faciliter l'interprétation de ces résultats, il a été jugé plus commode et plus pratique de regrouper ensemble, dans le **tableau 11**, les observations sur l'état des cellules (première partie de l'étude), l'index d'infectivité et le titrage. Ce regroupement d'événements a rendu possible l'établissement de liens entre les résultats des différentes observations et d'émettre conséquemment des hypothèses quant aux besoins du CVP2 et la nature de sa virulence.

Le test sur l'index d'infectivité (figure 22) a permis d'estimer qualitativement le taux de cellules exprimant les antigènes du CVP2 et ce, depuis le jour suivant l'infection jusqu'au jour de la quasi totale destruction du feuillet cellulaire. Cette épreuve a permis de caractériser trois événements marquants de la cinétique de production du CVP2. Tout d'abord, le premier événement fut évidemment la mise en évidence d'une nette différence dans l'intensité de la fluorescence et le nombre de cellules fluorescentes suivant le jour du traitement à la D-glucosamine. Ainsi, en augmentant l'activité métabolique et en

Tableau 11 Alignement des événements de la cinétique de production dans les cellules PK-15A infectées et traitées.

	Jr 1	Jr 2	Jr 3	Jr 4	Jr 5-6
Observation au microscope optique					
<i>Feuillet:</i>	normal non confluent	cellules plus grosses non confluent	présence de granules denses quasi confluent	début de dégénérescence	dégénérescence progressive
<i>Milieu extracell.:</i>	normal	début de mort cellul. agrégat cellul.	↑ de mort cellul. agrégat cellul.	↑ de mort cellul. agrégat cellul.	↑ de mort cellul. agrégat cellul.
Observation au microscope à fluorescence (Indexes d'infectivité)					
	fluorescence spécifique	↑ fluorescence noyaux plus gros	légère ↑ de la fluorescence avec début de diffusion au cytoplasme rétrécissement des noyaux	saturation de la fluorescence ↑ de l'effet de diffusion	fluorescence diffuse
Observation au microscope à fluorescence (Titre infectieux)					
	Titre infect. élevé	↓ brute du titre infect.	↑ du titre infect.	Titre infect. le plus élevé	↓ du titre infect. avec stabilisation

induisant les cellules à entrer dans la phase S du cycle cellulaire, il a été possible d'observer une augmentation du taux d'expression des antigènes viraux dès le 2^e jour p.i.

Cette observation a révélé qu'une cellule qui a été stimulée à se diviser représente une cible de choix pour un virus simple à ADN comme le CVP2. Le second événement marquant fut observé entre le 3^e et 4^e jour p.i. démontrant qu'il existe une relation entre l'arrêt de la division cellulaire et la saturation du taux d'expression des antigènes viraux dans les feuillettes cellulaires infectés. En fait, cette observation corrobore avec les résultats publiés dans la littérature scientifique sur les virus simples à ADN confirmant que pour assurer leur survie, les virus simples à ADN, comme les parvovirus doivent se répliquer exclusivement dans les cellules en état de division (Watson *et al.*, 1989, Prescott *et al.*, 1995) ou obtenir de l'aide d'un autre virus, tels les virus à ADN défectifs (Davis *et al.*, 1990, Flint *et al.*, 2000). Ainsi, ce constat suggère qu'à cause de ses propriétés moléculaires, le CVP2 ne peut se multiplier que dans les cellules en division cellulaire. Le dernier événement marquant fut observé à partir du 4^e jour p.i., lorsqu'il fut possible de démontrer que la dégénérescence cellulaire survenait au même moment que le niveau maximal d'expression des antigènes du CVP2 était atteint, de même que la mise en évidence d'une fluorescence diffuse dans le cytoplasme des cellules infectées. De façon intéressante, cet événement est survenu aussi au même moment que furent déterminés les plus hauts titres infectieux dans le milieu extracellulaire (tableau 11). Comme précédemment discuté, le regroupement de toutes ces données suggèrent que la dégénérescence cellulaire est plutôt due en fait à l'effet toxique d'une charge virale élevée produite par les cellules.

Les essais sur la détermination des titres infectieux obtenus au cours de différentes expériences ont permis d'estimer quantitativement la concentration de CVP2 libérée par les cellules productrices de particules infectieuses depuis le 1^{er} jour p.i. jusqu'à la quasi-totale destruction des feuillettes cellulaires. En fait, le haut titre infectieux déterminé au 1^{er} jour p.i. (graphique de la **figure 23**) correspondait à la charge virale résiduelle qui ne fut pas vidangée suite au temps d'incubation alloué pour l'adsorption du virus (voir section 2.237). La baisse des titres observée au 2^e jour p.i. révèle qu'après avoir traité le feuillet

cellulaire avec la D-glucosamine et changé le milieu de culture, un début de libération de particules virales dans le cytoplasme survenait un peu moins de 48 h après l'infection. D'autre part, cette baisse de titres a permis d'extrapoler les véritables valeurs des titres infectieux au 1^{er} jour p.i., valeurs relativement faibles comparativement à celles déterminées au 2^e jour p.i. Entre le 2^e et 4^e jour p.i., les cellules infectées par le CVP2 produisaient probablement à un rythme exponentiel les virions de la nouvelle progéniture. En fait, c'est au 4^e jour p.i. qu'ont été enregistrés les plus hauts titres infectieux. C'est aussi à ce moment que fut atteinte la saturation du taux d'antigènes viraux dans les cellules infectées, que l'arrêt de la division cellulaire survint, de même que le début de dégénérescence cellulaire (**figure 21**). Enfin, au 4^e jour p.i., une stabilisation des titres infectieux dans les cultures en dégénérescence fut démontrée. La relation qui existe entre la stabilisation des titres infectieux extracellulaires et l'arrêt de la division des cellules observé vers le 4^e jour p.i., indique qu'il ne peut y avoir de production de CVP2 suite à l'arrêt de la division cellulaire. De plus, le fait que les plus hauts titres infectieux aient été enregistrés le même jour que fut observé un début de dégénérescence cellulaire, suggère qu'à ce moment le niveau de production de CVP2 a corroboré avec le niveau de toxicité affectant les cellules PK-15A.

Pour évaluer les titres infectieux (ou la charge virale extracellulaire) en $\log_{10} \text{TCID}_{50}$ /ml de surnageant de cultures infectées, la méthode de dilution limite et la méthode de calcul décrite par Reed et Muench (1938) ont été utilisées. La précision de nos valeurs en TCID_{50} n'a pas été vérifiée par d'autres techniques. Ainsi, afin d'éviter d'interpréter ces valeurs de façon absolue, il a été jugé plus utile d'exprimer ces résultats sous une forme de courbe de tendance (**figure 23**) ou d'histogramme (**figures 15 et 17**), ne serait-ce que de manière relative. Cependant, puisque les dilutions sérielles du virus ont été inoculées en quadriplata dans des plateaux de 96 puits contenant des feuillets cellulaires semi-confluent, il est probable que l'écart-type soit assez large. En effet, il est connu que la précision de la technique de calcul de Reed et Muench (1938) varie selon le nombre de répliquas effectués pour chaque dilution. Ainsi, plus le nombre de répliquas de chaque dilution est élevé, plus la précision de la technique est exacte (Burleson *et al.*, 1992). Par ailleurs, il est connu que plus le facteur de dilution (2, 5 ou 10) est petit, plus la valeur des

titres infectieux déterminés est précise (Burleson *et al.*, 1992). La quantification des particules virales extracellulaires a été déterminée selon la méthode suggérée précédemment par d'autres auteurs (Tischer *et al.*, 1987, Ellis J. & Krokowka S. *et al.*, 1999, Rodriguez-Arrioja GM *et al.*, 2000). D'autre part, quelle que soit la méthode quantitative utilisée en cultures cellulaires, la précision de la technique est affectée de façon défavorable dépendant de la variabilité de la susceptibilité des cellules en réponse à une infection virale (Davis *et al.*, 1990).

Finalement, les résultats obtenus dans l'étude sur la cinétique de production virale *in vitro* reflètent assez bien la pathogénèse des infections par le CVP2 chez les jeunes porcelets atteints du SDPS. En effet, le fait d'avoir démontré *in vitro* que le CVP2 requiert des cellules en phase de division et qu'il peut provoquer de la dégénérescence cellulaire lorsque les titres infectieux des virions produits sont élevés, sont autant d'arguments permettant de prétendre que le CVP2 est une souche pathogénique capable d'entraîner des signes cliniques manifestes chez des porcelets de trois à cinq semaines d'âge en pleine phase de développement biologique. D'autres part, en raison du stade de développement de ces jeunes porcelets, les cellules de la plupart de leurs organes représentent un environnement idéal pour divers virus simples à ADN. Ainsi, la possibilité d'une coinfection par le PPV ne peut être écartée. Par conséquent, il est possible que le PPV puisse jouer un rôle synergique dans la pathologie du SDPS.

Il existe diverses approches pour identifier les agents étiologiques impliqués dans une maladie donnée (Prescott *et al.*, 1995, Gillepsie & Bamford, 2000). Jusqu'à présent, la discussion a porté sur des méthodes de diagnostic moléculaire, telle que la PCR. Cette technique a permis de mettre en évidence la présence de l'acide nucléique du CVP2, d'abord au niveau des poumons de porcs atteints du SDPS (chapitre 1), puis lors des différents passages du CVP2 effectués *in vitro* sur les cellules PK-15A (**figure 16**). La valeur de différentes techniques de diagnostic sérologique, telles que l'IFI et différentes techniques d'ELISA indirectes ou de compétition utilisant des AcMo dirigés contre la protéine de la nucléocapside du virus a également été déterminée. L'utilisation d'un sérum de porc convalescent ayant été infecté par le CVP2, a permis de suivre la production des

antigènes au cours des différents passages *in vitro* d'un isolat de CVP ayant été associé à des épidémies de SDPS. Alternativement, l'IFI peut aussi servir pour la détection d'anticorps contre un certain pathogène donné dans un sérum d'un animal convalescent, Grâce à la culture *in vitro* du CVP2, il a été possible de diagnostiquer les sérums de porcelets qui ont été infectés par le CVP2 et ce, en détectant par IFI les sérums réagissant contre les antigènes du CVP2 présents dans les feuillettes de cellules PK-15A infectées. La troisième approche utilisée pour l'identification de l'agent étiologique fut l'isolement sur cultures cellulaires. Jusqu'à présent, cette approche demeure celle qui est la plus communément utilisée pour identifier les virus d'origine animale et ce, en se basant sur les changements dégénératifs qu'ils provoquent sur les cellules en culture (Davis *et al.*, 1990, Flint *et al.*, 2000, Gillepsie et Bamford, 2000). Comme il a été discuté antérieurement, cette approche ne peut s'appliquer pour l'instant aux souches pathogènes du CVP retrouvées dans la nature. Cependant, il a été rapporté qu'en amplifiant artificiellement (par traitement à la D-glucosamine) le nombre de particules infectieuses du CVP2, la technique d'isolement sur cultures cellulaires permet de caractériser les changements morphologiques induits par l'isolat pathogène CVP2-IAF2897 aux cellules PK-15A et PFT (**figures 14, 18-21**). De plus, il a été possible, grâce à cette technique, de quantifier la progéniture du CVP2 produite *in vitro* (**figures 15, 17 et 23**) et d'étudier le comportement du virus dans une étude de cinétique de production (**figure 22**). Enfin, la technique d'isolement sur cultures cellulaires, comme la technique de PCR, permet d'amplifier le nombre de pathogènes qui se trouvent souvent en trop faible quantité dans les spécimens cliniques pour être détectés directement par M.E.T. Cependant, lorsque le virus se retrouve en grande quantité dans un échantillon, des analyses au microscope électronique peuvent être utilisées pour identifier l'agent étiologique. En effet, grâce à cette approche, il a été possible d'identifier l'agent, isolé d'un spécimen présentant les lésions typiques du SDPS, après l'avoir produit et purifié par ultracentrifugation isopycnique sur un gradient de CsCl (**figure 25**). En plus, les analyses de microscopie électronique ont permis d'estimer la concentration de virions produits en cultures cellulaires. En effet, à partir d'une production de cellules PK-15 correspondant à 10 flacons de 150 cm², une récolte de 10¹⁰ particules de CVP1 /ml a été obtenue; comparativement, la récolte de seulement 10⁸ particules de CPV2 /ml provenant de 600

ml de surnageants infectieux recueillis à partir d'expériences ayant donné de faibles rendements. Finalement, les analyses microscopiques de la souche pathogène CVP2 propagée sur les cellules PK-15A (**figure 25**) ont permis de constater sa ressemblance morphologique avec celle de la souche non pathogène, CVP1 (**figure 24**). De plus, l'uniformité de la taille et de la forme des particules virales observées au microscope électronique (**figure 25**) corroborent les résultats obtenus par l'épreuve PCR (**figure 16**) et les tests d'héماغglutination. Selon les résultats obtenus dans ces différentes épreuves, seul le CVP2 a été propagé à travers les passages *in vitro* sur les cellules PK-15A, la présence de parvovirus ayant été éliminée.

CHAPITRE 3

volet génie génétique

3.1 Introduction

Au terme de ce qui précède et suite à l'analyse des résultats de séquençage, les deux sérotypes de CVP exhibent au niveau de leur séquence nucléotidique autour de 70% d'identité, tel que rapporté au premier chapitre. Le génome du CVP2 possède les mêmes caractéristiques d'organisation que celui du CVP1. Une analyse de l'ADN génomique complet, effectuée par Hamel *et al.* (1998), a révélé jusqu'à 11 ORFs dans le cas de l'ADN génomique des CVP1 et CVP2, alors que les travaux de Mankertz *et al.* (1998) suggèrent la présence de seulement 7 ORFs. Toutefois, les seuls ORFs dont les propriétés biochimiques et fonctionnelles du produit codé ont pu être définis sont l'ORF1 et l'ORF2. Ceux-ci couvrent le génome entier du CVP. En effet, la première moitié du génome, représentant l'ORF1, code pour une protéine associée à la réplication du virus et dont le poids moléculaire a été estimé à 35.7 kDa. La seconde moitié, représentant l'ORF2, code pour la protéine majeure de la nucléocapside du virus, dont le poids moléculaire a été estimé à 27.8 kDa. La protéine codée par l'ORF1 est celle qui est la plus conservée chez les deux souches de CVP avec plus de 85% d'identité en acides aminés (aa) (voir chapitre 1). Quant à la protéine ORF2, une plus grande variabilité dans les séquences peptidiques a été remarquée, soit moins de 62 à 66% d'identité (Hamel *et al.*, 1998 et chapitre 1). Ces études d'analyse génomique ont permis de démontrer que l'ORF2 représente une cible de choix pour le développement d'une stratégie visant à démontrer l'existence de deux sérotypes distincts de CVP. C'est sur la base de ces résultats qu'a été postulée la seconde hypothèse de travail de notre projet de recherche.

En effet, connaissant l'existence d'une plus grande variabilité pour la protéine codée par l'ORF2, il était logique de postuler que le développement des anticorps dirigés contre cette protéine permettrait de différencier entre les deux sérotypes de CVP. Des anticorps polyclonaux spécifiques aux CVP1 et CPV2 pourraient servir autant comme outil de recherche que comme outil de diagnostic. En effet de tels anticorps permettraient de caractériser d'avantage la structure antigénique et le rôle biologique de la protéine ORF2, et pourraient aussi servir au développement de tests sérologiques spécifiques. Ainsi,

l'objectif final de ce troisième volet était la production d'anticorps spécifiques à chacun des deux sérotypes de CVP.

Afin de réaliser cet objectif dans le cas de la souche pathogène (CVP2), différentes étapes préliminaires ont été réalisées, à savoir le clonage et l'expression de la protéine ORF2 du CVP2 (souche IAF2897) dans la bactérie *E.coli*, la purification de la protéine recombinante et la production d'anticorps suite à l'immunisation de souris Balb/c contre cette protéine recombinante. Toutefois, en raison des contraintes survenues au cours de l'accomplissement de ces différentes étapes, de nouvelles stratégies ont dû être préconisées, soit la construction d'un adénovirus recombinant et l'immunisation génétique (injection d'ADN plasmidique). Ce chapitre portant sur la caractérisation du produit de l'ORF2 du CVP2 a été divisé en trois parties, à savoir : l'expression procaryotique, l'expression eucaryotique et la production d'anticorps contre les CVP1 et 2. Par ailleurs, conjointement aux objectifs précités, des études complémentaires ont été réalisées sur la caractérisation biochimique et biologique de la protéine ORF2 du CVP2. Au terme de nos travaux, deux publications réalisées par des chercheurs de laboratoires américains et traitant sur le même sujet ont paru dans des revues scientifiques suite au clonage de l'ORF2 du CVP2 dans des vecteurs baculovirus et à son expression dans des cellules d'insectes (Nawagitgul *et al.*, 2000, Mahé *et al.*, 2000).

3.2 Matériel et Méthodes

3.21 Conception et synthèse d'amorces

Un certain nombre de paires d'amorces ont été conçues pour amplifier par la PCR le gène ORF2 qui a subséquemment été cloné dans des vecteurs d'expression procaryotique et eucaryotique. La conception de ces amorces oligonucléotidiques a été réalisée à partir de la séquence génomique de la souche IAF2897 du CVP2. Celle-ci fut analysée à l'aide du logiciel "Oligo", un programme d'analyse d'oligonucléotides ("Molecular Biology Insights inc, Plymouth, MN, USA") qui, non seulement a permis d'obtenir la meilleure combinaison d'amorces délimitant le gène ORF2 (1735-1034) mais aussi, de déterminer la température optimale d'appariement. Dépendant du vecteur utilisé pour le clonage, des sites d'enzymes de restriction ont été ajoutés aux amorces, à leurs extrémités 5'. Ces sites d'endonucléase ont été choisis judicieusement pour leur compatibilité avec le site de multiclonage de leurs vecteurs respectifs et parce qu'ils étaient absents dans le gène ORF2. Dans certains cas, des séquences consensus Kozak, représentant la séquence d'initiation de la traduction et favorisant l'expression des protéines dans les systèmes d'expression eucaryotique (Kozak, 1987), ont été ajoutées en aval à ces sites de restriction. De plus, toutes les amorces sens contenaient également le codon d'initiation ATG. La description et la séquence en nucléotides des amorces ainsi que leur vecteur de clonage sont présentés au **tableau 12**. Dans certains cas, un à deux nucléotides ont été ajoutés en amont de l'ATG du gène ORF2 afin de préserver le bon cadre de lecture dans les vecteurs de clonage. La synthèse des oligonucléotides a été effectuée à l'aide d'un synthétiseur automatique d'ADN "Gene assembler" (Amersham Pharmacia biotech, Pointe-Claire, Canada) au service de synthèse d'amorces du laboratoire de Dr François Shareck de l'INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada. Les amorces ont été diluées à une concentration de 30 pmol/ μ l et ont été entreposées à -20°C jusqu'à leur utilisation dans les épreuves de PCR.

Tableau 12 Description des paires d'amorces utilisées pour le clonage du gène ORF2 de la souche CVP2 de référence IAF2897 dans divers vecteurs.

A. Système d'expression procaryotique.

Amorces	Séquences d'oligonucléotide	Vecteur
Cirorf2 s (<i>Bam</i> HI)	<i>cgggatccgcccgc</i> ccatg acgtatccaaggaggcg	pGEX4T1
Cirorf2 as (<i>Bam</i> HI)	<i>cgggatccttaggg</i> tttaagtgggggggt	
Cirorf2.FP (<i>Bam</i> HI)	<i>cgggatccgaatg</i> acgtatccaaggaggcg	pRSET-C
Cirorf2.RP (<i>Hind</i> III)	<i>cccaagc</i> tttagggtttaagtgggggggt	
Cirorf2 s (<i>Bam</i> HI)	<i>cgggatccgcccgc</i> ccatg acgtatccaaggaggcg	pMAL-c2e
Cirorf2.RP (<i>Hind</i> III)	<i>cccaagc</i> tttagggtttaagtgggggggt	

site de restriction d'enzyme : marqué en italique
codon d'initiation : marqué en gras

B. Système d'expression eucaryotique.

Amorces	Séquences d'oligonucléotide	Vecteur
Cirorf2 s (<i>Hind</i> III)	<i>ccaagc</i> ttgccgccc ccatg acgtatccaaggaggcg	pRc/CMV2
Cirorf2 as (<i>Apa</i> I)	<i>gcgggccc</i> tttagggtttaagtgggggggt	
Cirorf2 s (<i>Bam</i> HI)	<i>cgggatccgcccgc</i> ccatg acgtatccaaggaggcg	pAdCMV5 & pAdMLP5. K7.His1.GFP
Cirorf2 as (<i>Bam</i> HI)	<i>cgggatccttaggg</i> tttaagtgggggggt	

site de restriction d'enzyme : marqué en italique, codon d'initiation : marqué en gras et la séquence de Kozak : en caractère souligné.

3.22 Amplification du gène ORF2 par PCR

Tout d'abord, l'extraction de l'ADN de l'isolat IAF2897 du CVP2 fut réalisée à l'aide du réactif commercial Tripure, selon les directives du manufacturier (Roche Diagnostic, Laval, Qc, Canada). L'ADN récolté a été resuspendu dans 0.3 ml de 8 mM de NaOH, en présence de 0.1 M HEPES permettant à l'ADN de se stabiliser durant l'entreposage à -20°C. Des aliquots de 2.25 µl des suspensions d'ADN, ont été prélevés et ajoutés à un volume total de 0.1 ml du mélange réactionnel de PCR. Ce mélange était composé de 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ (GIBCO-BRL), 200 µM de chacun des dNTPs, 2.6 U de l'enzyme Expand™ High Fidelity DNA polymerase (Roche Diagnostic, Laval, Qc, Canada) et 30 pmol de chaque amorce dont les extrémités sont compatibles avec le site de multiclonage des vecteurs présentés dans le tableau 12.

Les conditions d'amplification du gène ORF2 ont été programmées dans un thermocycleur (model PT-100 Hot Bonnet, MJ Research) et consistaient d'abord en une étape de pré-dénaturation à 95°C pour 3 minutes, avec pour but de mieux dénaturer les régions riches en GC, suivie en premier lieu d'une étape de 10 cycles à 94°C pour 15 sec, 54°C pour 30 sec. et 72°C pour 1.5 min.; puis, d'une seconde étape de 30 cycles à 94°C pour 15 sec., 54°C pour 30 sec. et 72°C pour 2 min. 20 sec, le tout suivi d'une étape d'extension finale de 72 °C pour 7 min.

Des aliquots de 10 µl du produit de la réaction d'amplification étaient chargés dans les puits des gels de 1% d'agarose (Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada), préalablement préparée dans une solution de TAE (0.04 M Tris-acetate [pH8.5], 0.002 M EDTA), laquelle était mélangée avec 0.05 ml d'une solution de 50 mg/ml de bromure d'éthidium. La migration de l'ADN amplifié était réalisée par électrophorèse à un potentiel de 90 volts pendant 1h 30 min. et les amplicons étaient visualisés dans les gels sous illumination au UV.

Le produit de PCR représentant l'insert de l'un des vecteurs d'expression était purifié à l'aide de la trousse "QIAquick PCR purification kit" (Qiagen Inc., Ontario, Canada). L'ADN purifié était resuspendu dans 30 µl d'une solution de 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (Qiagen). Un aliquot de cette suspension d'ADN préalablement dilué 1/50 était d'abord

dosé au spectrophotomètre "GenQuant RNA/DNA Calculator" (Amersham Pharmacia). Cet appareil permet de déterminer la concentration de la suspension d'ADN, à une longueur d'onde de 260 nm et la pureté de celle-ci est déterminée selon la valeur du rapport D.O. 260/D.O. 280nm. La concentration de l'ADN était obtenue en multipliant la valeur de la D.O. par le facteur de dilution (50) et par 50 µg/ml afin de convertir la D.O. en µg/ml d'eau pour l'ADN double brin (Sambrook et al., 1989).

3.23 Clonage du gène ORF2 de la souche IAF2897 du CVP2

3.231 Préparation des bactéries compétentes

La préparation de cellules *E. coli* compétentes (souches BL21 et DH5α) a été réalisée par la méthode utilisant le RbCl, procédure adaptée par le personnel de l'Institut John Innes (Norwich, England) sous la direction du Dr Joseph Utermohlen (University of Arizona). Ce traitement chimique des cellules bactériennes est une variante du protocole de préparation de cellules compétentes du Dr Hanahan (Hanahan *et al.*, 1991). À partir d'un stock congelé, des bactéries non compétentes étaient prélevées à l'aide d'un manche de Koch et striées sur une gélose SOB (2 % de tryptone, 0.5% d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM de MgSO₄). La culture était incubée pour la nuit à 37°C. Le lendemain, une colonie de 2-3 mm de diamètre était repiquée et inoculée dans 2 ml de milieu de culture LB, puis incubée à 37°C pour une autre nuit. Le lendemain, une sous-culture était entamée dans 125 ml de milieu LB à partir d'une dilution 1/100 de la culture de la veille. Après avoir atteint une densité optique de 0.5, la culture bactérienne était centrifugée à 5000 rpm à 4°C pour 5 minutes. Le culot cellulaire était par la suite resuspendu dans 50 ml de TFBI stérilisé à froid (30 mM de KOAc, 100 mM de RbCl, 10 mM de CaCl₂, 50 mM de MnCl₂ et 15 % de glycérol, le tout ajusté à un pH de 5.8 avec une solution d'acide acétique) et placé dans un bac de glace pour 5 minutes. La suspension était de nouveau centrifugée et le culot de bactéries resuspendu dans 5 ml de TFBII stérilisé à froid (10 mM de MOPS, 75 mM de CaCl₂, 10 mM de RbCl₂ et 15 % de glycérol, le tout ajusté à un pH de 6.5 avec une solution de KOH) et mis dans un bac de glace pour 60 minutes. La suspension de bactéries compétentes était finalement aliquotée

dans des microtubes de 1.5 ml, immédiatement immergés dans un bac de glace sèche additionnée de 100 % d'éthanol pendant 30 secondes. Les tubes de cellules compétentes étaient par la suite transférés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3.232 Digestion enzymatique et déphosphorylation

Les vecteurs et leurs inserts analogues (produits de PCR) ont été digérés avec l'endonucléase de restriction (Amersham Pharmacia) qui leur avait été assigné (**tableau 12**). La réaction de digestion était réalisée dans 50 µl d'une solution contenant de 2 à 5 µl du tampon de restriction One-Phor-All 10x (OPA; Amersham Pharmacia), dépendant du besoin en sel de l'enzyme choisi, 5 unités d'endonucléase par µg d'ADN (Ausubel *et al.*, 1992), et environ 1.2 µg d'ADN; le tout étant complété avec un volume déterminé d'eau. Les conditions d'incubation propres à chaque endonucléase étaient déterminées selon les recommandations du manufacturier (Amersham Pharmacia). En général, les endonucléases de restriction complètent la digestion de l'ADN en 2 heures dans un bain incubateur préalablement ajusté à 37°C.

Une fois le temps d'incubation terminé, un aliquot du produit de digestion était tout d'abord analysé par électrophorèse dans un gel d'agarose puis, dépendant de la nature du clonage, unidirectionnel ou bidirectionnel, le produit de digestion était ensuite purifié ou soumis à une étape de déphosphorylation avant d'être purifié. L'étape de phosphorylation ne concernait que les vecteurs digérés par une seule endonucléase de restriction pour éviter que le vecteur se referme sur lui-même. Ainsi, dans le cas où le vecteur était digéré simultanément par des endonucléases de restriction différentes (clonage unidirectionnel), le produit de digestion était purifié à l'aide de la trousse "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" et resuspendu dans 30 µl d'une solution de 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (Qiagen). Dans le cas où le vecteur était digéré par une même enzyme de restriction (clonage bidirectionnel), le produit était soumis à une déphosphorylation avant d'être purifié à l'aide de la même trousse et resuspendu dans un même volume de tampon Tris. Les solutions d'ADN étaient toutes entreposées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

L'étape de déphosphorylation était réalisée en ajoutant à la réaction de digestion 1U de phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIAP; GIBCO-BRL), préalablement diluée dans du tampon de dilution (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂ et 50% glycérol, v/v), et 5 µl du tampon de déphosphorylation (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1 mM EDTA). Puis, la réaction de déphosphorylation était réalisée dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes. La CIAP était désactivée à 85°C pour 20 minutes. L'ADN déphosphorylé était purifié à l'aide de la trousse "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" et resuspendu dans 30 µl d'une solution de 10 mM Tris-HCl, pH 8.5.

3.233 Réaction de ligation

La concentration des vecteurs et de leurs inserts analogues était estimée, après leur digestion et purification, et électrophorèse sur un gel d'agarose par comparaison avec l'intensité des fragments d'ADN contenu dans la préparation du marqueur de poids moléculaire "High DNA Mass™ Ladder" ou "Low DNA Mass™ Ladder" (GIBCO-BRL). À partir de cette estimation, il devenait possible de calculer les nombre de moles des bouts cohésifs ("moles of ends") de chaque molécule d'ADN à partir de la formule citée ici-bas.

$$\text{Moles of ends} = 2 \times (\text{g d'ADN}) \div [(\# \text{ de pb}) \times (649 \text{ Daltons/pb})]$$

(Amersham Pharmacia Biotech)

La ligation des bouts cohésifs du vecteur et de l'insert était réalisé en considérant des ratios moléculaires de 1:2 et 1:3, respectivement. Les réactions de ligation s'effectuaient dans un volume total de 20 µl contenant les ADN, 2 µl du tampon 10x OPA, 2 µl de 10mM ATP (GIBCO-BRL), 1U T4 ADN ligase (Amersham Pharmacia), le tout incubé à 23°C pendant 1 heure.

3.234 Transformation bactérienne

Les bactéries compétentes étaient transformées soit avec les produits de ligation, préalablement dilués 1:5 dans de l'eau bidistillée et stérilisée, soit avec 20-50 ng d'ADN plasmidique recombinant. Ainsi, un aliquot de 2 ou 5 µl d'ADN était utilisé pour transformer 100 µl de bactéries compétentes DH5α, HB101 (GIBCO-BRL), BL21-(DE3) Gold, BL21(DE3) pLysS (Stratagene, San Diego, USA) ou DH11S (New England BioLabs Mississauga, Ont., Canada) (gracieusement fournie par le Dr François Shareck, de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Le mélange était par la suite transféré dans un contenant de glace pour 45 minutes. Le transfert des vecteurs recombinants dans les bactéries était réalisé suite à un choc thermique à 42°C pour 45 secondes, suivi d'une période de 2 minutes sur glace. Par la suite, les bactéries transformées étaient mises en culture à 37°C, dans 500 µl de milieu de culture Luria Bertani LB (10 g/l de tryptone, 5 g/l de d'extrait de levure et 10 g/l de NaCl) (Difco Laboratories, Détroit, MI, USA). Les microtubes, dans lesquels se trouvaient les cultures de bactéries transformées, étaient disposés en position horizontale et agités vigoureusement pendant 1 heure. Après leur incubation, 10 µl et 50 µl des différentes suspensions bactériennes étaient étalés sur des pétris contenant du milieu LB gélifié (1.5 % d'agar noble ; Difco Laboratories) supplémenté de 100 µg/ml de carbénicilline (Cb) (Boehringer Mannheim). Les pétris étaient finalement incubés à 37°C pour une période de plus de 14 heures nécessaire à la croissance de colonies de bactéries transformées de 2 à 3 mm de diamètre.

3.235 Sélection de clones positifs

Les colonies correspondant à des clones recombinants étaient identifiées d'après leur résistance à la carbénicilline. Afin d'obtenir davantage d'informations sur la nature et l'orientation de l'insert, l'identification de clones recombinants positifs (contenant le gène ORF2) sur pétri était suivi par la mise en culture des clones, l'extraction de l'ADN plasmidique et la digestion par les endonucléases de restriction enzymatique choisies pour le clonage ou plus directement par la technique de PCR dans le cas où les clones recombinants avaient été obtenus suite à un clonage bidirectionnel.

La technique traditionnelle d'identification de clones positifs impliquait tout d'abord, la mise en culture des clones sélectionnés dans 4 ml de milieu LB additionné de 60 µg/ml Cb, dans un incubateur à 37°C sous une agitation à 300 rpm pendant environ 14-16 heures. Par la suite, des 4 ml de cultures, 0.5 ml étaient transférés dans des microtubes, contenant une solution de glycérol à une concentration finale de 20% et entreposés à -80°C jusqu'à l'identification des clones positifs, tandis que 3 ml de chaque culture étaient transférés dans d'autres tubes eppendorfs et centrifugés à 13 000 x g pendant 30 secondes. À partir des culots bactériens, l'ADN était extrait par la méthode de lyse alcaline standard (Sambrook et al., 1989) ou à l'aide de la trousse commerciale "Qiagen Plasmid Mini Kit" (Qiagen). L'ADN purifié était resuspendu dans 30-50 µl de 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, et dosé au spectrophotomètre "GenQuant RNA/DNA Calculator". Les échantillons d'ADN étaient ensuite soumis à une digestion enzymatique (voir section 3.232) pour la détection de l'insert d'environ 750 pb correspondant au gène de l'ORF2 du CVP2.

La méthode d'identification de clones positifs par la PCR permettait d'identifier ceux ayant été transformés par le vecteur plasmidique porteur du transgène orienté dans la bonne direction. Pour ce faire, l'amorce sens était sélectionnée à l'intérieur du vecteur plasmidique, autour de la région du promoteur, alors que l'amorce anti-sens correspondait à l'extrémité C-terminale du gène de l'ORF2 du CVP2. Ainsi, une amplification par la PCR n'était possible que si le transgène était dans la bonne orientation. Tout d'abord, un certain nombre de colonies apparues sur les géloses contenant la Cb étaient piquées à l'aide d'un cure-dent stérile et inoculées dans un volume total de 20 µl du tampon de la réaction PCR. Celui-ci contenait 16.5 µl d'eau stérile, 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 200 µM de chacun des dNTPs 2.5 U de la Taq DNA polymérase (GIBCO-BRL) et 30 pmol de chaque amorce. Les conditions d'amplification ont été programmées dans le thermocycleur et comportaient en plus d'une étape de pré-dénaturation à 95°C pour 5 minutes, 33 cycles de 94°C pour 1 min., 50°C pour 1 min. et 72°C pour 1.5 min., suivis d'une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 min. Des aliquots de 10 µl de ces produits ont été analysés de la même manière que dans la section du PCR précitée. Évidemment, chaque colonie piquée était

striée sur une gélose LB additionnée de 100 µg/ml de Cb et incubée à 37°C pour plus de 14 heures. Par la suite, seuls les clones recombinants positifs étaient entreposés à -80°C.

3.236 Production des vecteurs recombinants

À partir des stocks congelés à -80°C, les bactéries transformées par l'un des vecteurs recombinants étaient striées sur une gélose LB additionnée de 100 µg/ml de Cb et incubées à 37°C pour plus de 14 heures. Par la suite, une colonie isolée était piquée et inoculée dans 2 ml de milieu LB additionné du même antibiotique. La culture bactérienne était incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O.₅₉₀ d'environ 0.5-0.6 correspondant à la phase exponentielle du cycle de croissance. Puis, la production des vecteurs recombinants était réalisée dans 100 ml du milieu LB additionné de 60 µg/ml Cb, en utilisant une dilution 1:100 de la culture en phase log, pour un maximum de 16 heures à 37°C sous agitation à 300 rpm. L'extraction et la purification des vecteurs recombinants étaient effectuées à l'aide de la trousse commerciale "Qiagen Plasmid Maxi kit", selon les directives du manufacturier. L'ADN purifié était resuspendu dans 500 µl de 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, et dosé au spectrophotomètre "GenQuant RNA/DNA Calculator", avant d'être entreposé à -20°C.

3.237 Séquençage du gène cloné

Les vecteurs recombinants étaient envoyés au service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier, afin de vérifier si le gène ORF2 s'était inséré correctement dans le vecteur de transfert. Ainsi, 10 µl d'une concentration de 80-160 ng/µl du plasmide recombinant et 5 µl d'une concentration de 50 pmol/µl de l'amorce correspondant au vecteur étaient envoyés au personnel du laboratoire de séquençage. La réaction de séquençage était réalisée à l'aide d'un "ABI Prism DNA Sequencer" (PE Applied Biosystems, Mississauga, Ontario) utilisant une version modifiée de la technique de Sanger *et al.* (1977), basée sur l'arrêt de la synthèse de la double chaîne d'ADN suite à l'incorporation de résidus de didéoxynucléotides-triphosphate. À leur réception, les

séquences d'ADN déterminées étaient analysées à l'aide du programme informatique GeneWorks 2.4 (IntelliGenetics Inc., Mountain View, CA, USA).

3.24 Système d'expression procaryotique

3.241 Hôte d'expression procaryotique

3.2411 Bactéries *E. coli*, souche BL21

La souche BL21 d'*E. coli* [F⁻ *ompT* *hsdS*_B(r⁻_{BM}_B) *gal dcm*] (Stratagene, La Jolla, CA, USA) est parmi les hôtes bactériens les plus utilisés pour l'expression des protéines hétérologues. Comme toutes les souches d'*E. coli* B, elles possèdent des mutations dans les gènes *lon* et *ompT* qui codent respectivement pour la protéase ATPase-dépendant et la protéase de la membrane externe. Ces deux protéases sont souvent la cause de dégradation de protéines lors de la procédure de purification (Grodberg and Dunn, 1988, Matsuo *et al.*, 1999). Par ailleurs, cette souche est idéalement utilisée pour les systèmes de fusion de gènes, tel que le vecteur d'expression pGEX. De même génotype, la souche BL21 (DE3) contient en plus le prophage λ DE3 qui code pour le gène de l'ARN polymérase ADN-dépendante du bactériophage T7 (ARNP T7), lequel se trouve sous le contrôle du promoteur inductible *lacUV5*. Cette souche est spécifiquement utilisée pour les systèmes d'expression de gènes sous le contrôle exclusif du promoteur T7 (**figure 32**), tel que pET ou pRSET. Également de même génotype que les souches précédentes, BL21 (DE3) pLysS possède en plus du prophage λ DE3, un plasmide pLysS qui code pour la lysozyme T7, un inhibiteur naturel de l'ARNP T7. Cette souche d'*E. coli* est utilisée pour l'expression de protéines recombinantes toxiques. En l'absence d'IPTG, il existe une faible expression basale de l'ARNP T7 qui est responsable de l'instabilité du gène cloné et de la toxicité de protéines recombinantes produites. La lysozyme T7 qui est exprimée constitutivement dans BL21 (DE3) pLysS inhibe la transcription basale du gène cloné en se fixant à l'ARNP T7 et, par le fait même, stabilise le gène recombinant (Moffat & Studier, 1987, Studier, 1991). Afin de préserver le plasmide pLysS pour l'expression de

la lysozyme T7, il est nécessaire de sélectionner les bactéries sur un milieu contenant l'antibiotique chloramphénicol (Cam) (Roche Diagnostics).

3.2412 Bactérie *E. coli*, souche DH11S

La souche DH11S (BRL-GIBCO) d'*E. coli* a été obtenue gracieusement du Dr François Shareck de l'INRS-IAF. Cette bactérie-hôte convient pour le clonage d'inserts dans les vecteurs M13 et phagemides, à des fins de production de simple brin d'ADN hautement purifié. Cette bactérie peut également servir d'hôte pour l'expression de protéines recombinantes ou de fusion transcrites par des vecteurs d'expression inducibles sous le contrôle du promoteur *lac* et ses proches relatifs, tel que *lacUV5*. Le génotype de la souche DH11S [F' *mcrA* Δ (*mrr hsdRMS mcrBC*) Δ (*lac-proAB*) Δ (*recA1398*) *deoR supE rpsL srl thi/F'* *proAB+* *lacI^qZ* Δ M15] possède des caractéristiques uniques. Brièvement, le trait *endA* permet d'améliorer la pureté de la production d'ADN simple brin. La souche DH11S possède une délétion dans les gènes du système de modification-restriction (*hsdRMS*, *mcrBC* et *mrr*), permettant de cloner de l'ADN méthylé plus efficacement et de secourir le plasmide. Elle possède aussi une délétion dans le gène *recA1398* qui a pour conséquence d'augmenter la stabilité de l'insert cloné.

3.242 Vecteur d'expression pGEX4T1

Le plasmide pGEX4T1 (Amersham Pharmacia, Pointe-Claire, Qc, Canada) (**figure 26**) est un vecteur d'expression procaryote permettant d'obtenir les protéines recombinantes sous forme de protéines fusionnées à la glutathione S-transférase (GST) dont le gène dans le plasmide sous le contrôle du promoteur *tac* (**figure 32**). Ce dernier permet un niveau élevé d'expression de la protéine de fusion lorsqu'il est induit chimiquement par l'isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). En effet, lorsqu'il est induit, le promoteur *tac* permet l'accumulation de polypeptides jusqu'à environ 15-30 % du contenu protéique total des bactéries (Baneyx, 1999). Le gène de la GST dont le produit sert d'appât lors de la purification de la protéine de fusion, est situé directement

Figure 26

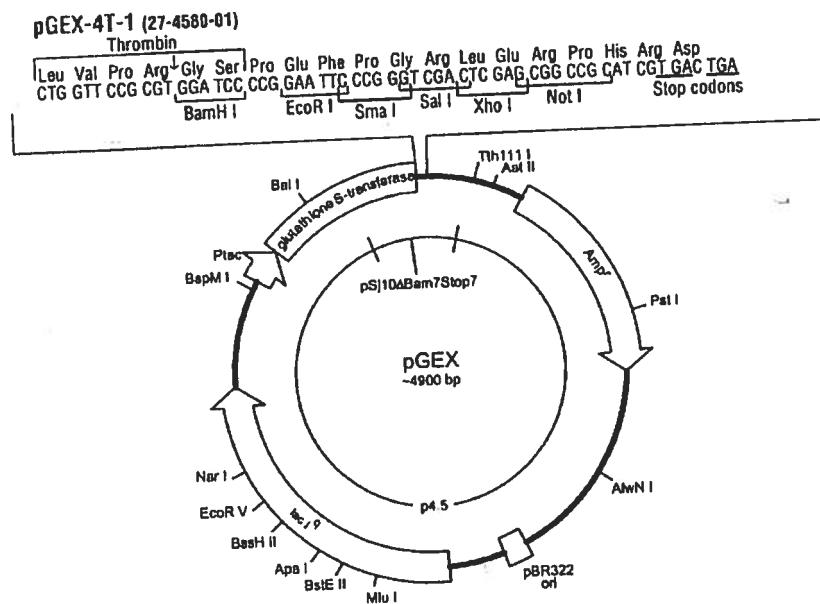


Schéma tiré du manuel " GST Gene Fusion System ".
© 1997 " Pharmacia Biotech, Inc ".

Régions contrôles du pGEX-4T-1:

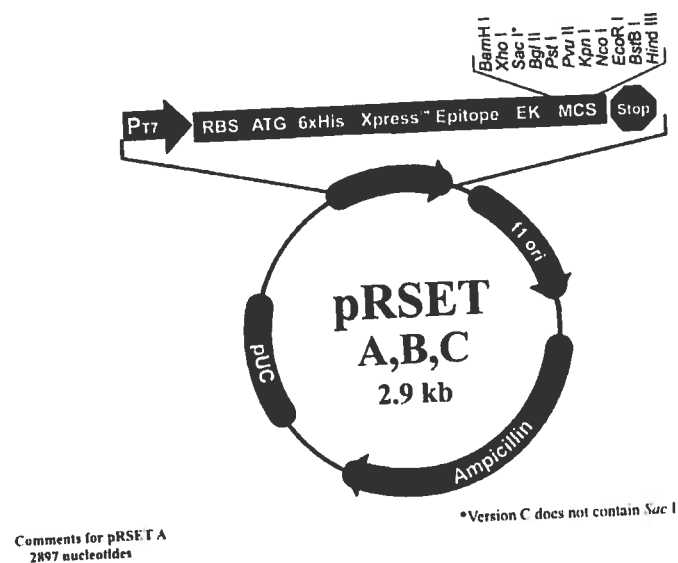
- * Région du gène Glutathione S-transferase: promoteur *tac*: -10: 205-211; -35: 183-188; operateur *lac*: 217-237; site de fixation ribosomal pour GST: 244; codon d'initiation (ATG) pour GST: 258; région codée pour le clivage de la thrombine: 918-935
- * SMC: 930-966
- * Région du gène Beta-lactamase: Promoteur: -10: 1330-1335; -35: 1307-1312; codon ATG: 1377; codon Stop (TAA): 2235
- * Région du gène *lacIq*: codon d'initiation (GTG): 3318; codon Stop (TGA): 4398
- * Région de réplication du plasmide: Site d'initiation de réplication: 2995;
- Région nécessaire pour la réplication: 2302-2998
- * Amorces pour séquençage: 5' pGEX Sequencing Primer se fixe aux nucléotides 869-891;
- 3' pGEX Sequencing Primer se fixe aux nucléotides 1041-1019.

en amont du site multiple de clonage (SMC), dans lequel est introduit le transgène. Ce dernier doit être inséré dans le même cadre de lecture que l'ATG du gène GST, afin que la protéine de fusion soit exprimée. D'autre part, immédiatement en aval du gène de la GST, on retrouve un site de reconnaissance de la thrombine afin de permettre le clivage de la protéine désirée du produit de fusion. De plus, le vecteur est doté du gène *lac I_q* qui code pour un répresseur apte à réguler l'expression des protéines induites. Le système d'expression pGEX4T1 utilise l'ARN polymérase II de la cellule hôte (*E. coli*) pour transcrire les gènes. La souche bactérienne BL21 qui est déficiente en protéases (*ompT*) est l'hôte suggéré par le manufacturier (Amersham Pharmacia)

3.243 Vecteur d'expression pRSET-C

Le plasmide vecteur pRSET-C (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (**figure 27**), gracieusement fourni par le Dr François Denis de l'INRS-IAF, fait partie des systèmes d'expression basés sur l'ARN polymérase ADN-dépendante du bactériophage T7 (Studier & Moffat, 1986) (**figure 32**). L'expression de la protéine recombinante à partir du vecteur pRSET-C ne peut se faire que dans la souche d'*E. coli* BL21(DE3). Une fois que le gène de l'ARNP T7 est induit par l'IPTG, il permettra une expression très élevée de l'ARNP T7. Celui-ci, à son tour, va spécifiquement transcrire le transgène à partir du son promoteur T7 du vecteur pRSET-C. En fait, la transcription de la protéine recombinante par l'ARNP T7 est indépendante de celle des protéines bactériennes, puisque que la protéine cible ne partage pas la même ARNP avec les autres milliers de protéines de l'hôte. De cette façon, il est possible de produire en grande quantité la protéine recombinante, soit jusqu'à 40-60% du contenu protéique total des bactéries (Fernandez & Hoeffler, 1999, Baneyx, 1999). La protéine recombinante produite par le système d'expression pRSET-C est fusionnée en 5' avec une queue de 6 résidus histidine, permettant sa purification par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel

Figure 27



Comments for pRSET A
2897 nucleotides

T7 promoter: bases 20-39
6x His tag: bases 112-129
T7 gene 10 leader: bases 133-162
Anti-Xpress™ epitope: bases 169-192
Multiple cloning site: bases 202-248
pRSET 1 reverse priming site: bases 295-314
T7 transcription terminator: bases 256-385
f1 origin: bases 456-911
bla promoter: bases 943-1047
Ampicillin (*bla*) resistance gene (ORF): bases 1042-1902
pUC origin (C): bases 916-2852
(C) = Complementary strand

Schéma tiré du manuel " pRSET Expression and Purification Kit ",
©1995-2001 " Invitrogen Corporation ".

21 AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA RBS

91 GATATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr Polyhistidine (6xHis) region

148 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG ATC
Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Arg Trp Ile Xpress™ Epitope BamHI

205 CGA GCT CGA GAT CTG CAG CTG GTA CCA TGG AAT TCG AAG CTT GAT CCG GCT GCT AAC
Arg Pro Arg Asp Leu Gln Leu Val Pro Trp Asn Ser Lys Leu Asp Pro Ala Ala Asn EK recognition site EK cleavage site

3.244 Vecteur d'expression pMal-c2e

Le plasmide pMal-c2e (New England BioLabs, Mississauga, Ont., Canada) (**figure 28**), gracieusement fourni par le Dr Francois Shareck de l'INRS-IAF, est un vecteur d'expression de protéines de fusion au même titre que le système pGEX4T1. Toutefois, un certain nombre de caractéristiques nous permettent de les différencier. Tout d'abord, le gène désiré est inséré en aval du gène *malE* d'*E. coli* qui code pour la protéine MBP ("Maltose-Binding Protein"), ce qui résulte en l'expression d'une protéine recombinante fusionnée à la MBP (Guan *et al.*, 1987). Deuxièmement, lorsque le système pMal-c2e est induit par l'IPTG à partir du promoteur *tac*, il permet l'accumulation de la protéine de fusion dans le cytoplasme pouvant représenter jusqu'à 20-40 % du contenu protéique total des bactéries. Troisièmement, la purification de la protéine de fusion se fait par l'intermédiaire de la protéine MBP qui, en raison de son affinité pour l'amylose, se fixe à ce polymère lors de la procédure de chromatographie d'affinité. Par ailleurs, il a été rapporté que certains partenaires de fusion (GST, MBP, thioredoxin), fusionnés au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine recombinante, peuvent grandement améliorer la solubilité et prévenir son accumulation sous forme de corps d'inclusion (Baneyx, 1999). Dans le cas du partenaire MBP, des études comparatives sur l'effet de la solubilité des protéines hétérologues par les partenaires de fusion ont démontré qu'il était de loin supérieur à la GST et la thioredoxine (Kapust et Waugh, 1999). Finalement, l'expression de la protéine de fusion par le système pMal-c2e peut se faire dans de nombreuses souches d'*E. coli*, qu'elles soient déficientes ou non en protéases, telles que JM83 ou JM107.

3.245 Expression de l'ORF2 du CVP2 et cinétique d'induction

Pour l'expression de l'ORF2 du CVP2 à partir de bactéries *E. coli* transformées (souches BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS ou DH11S) par l'un des plasmides recombinants (pGEX-, pRSET-, pMal- ORF2), les stocks de bactéries transformées entreposés à -80°C ont été d'abord remis en culture sur des géloses LB additionné de l'antibiotique approprié (BL21, DH11S: 100µg/ml Cb, BL21pLysS: 100µg/ml Cb +

Figure 28

pMAL-2ce

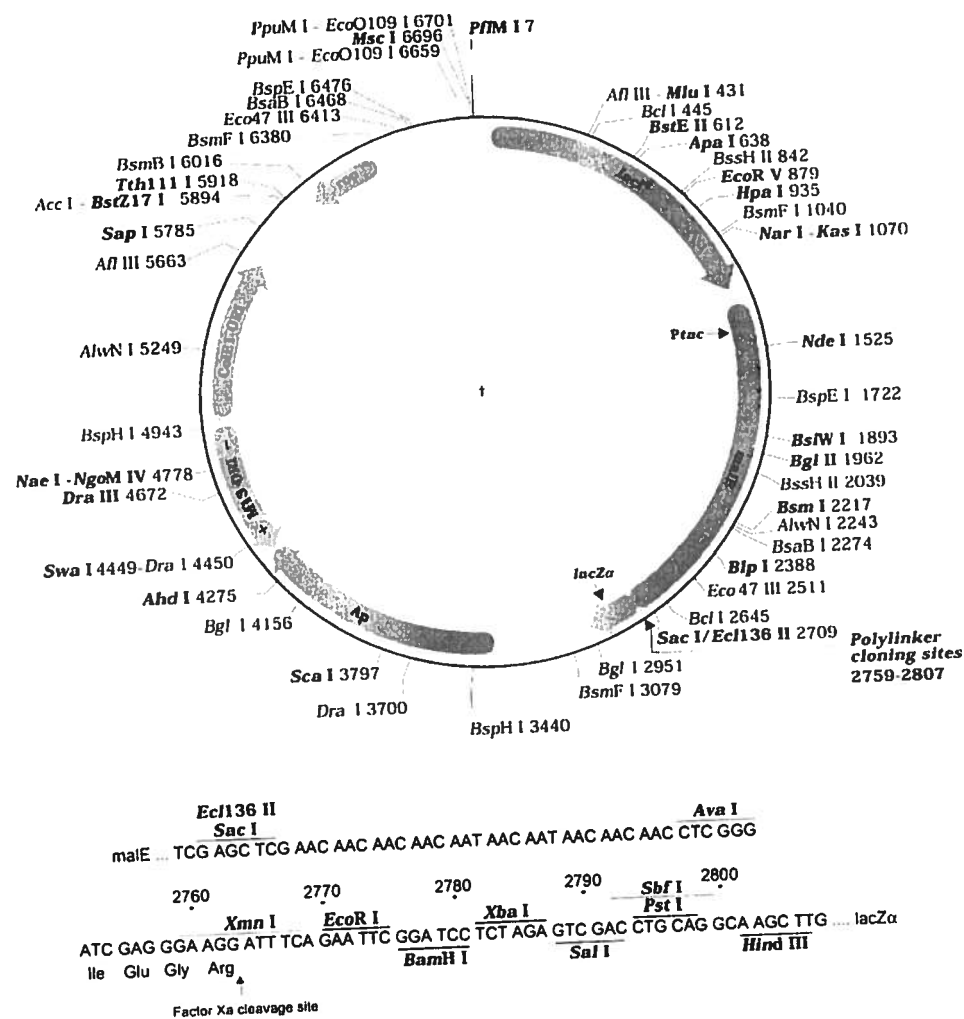


Schéma tiré du manuel " pMAL™ Protein Fusion and Purification System ".
© 1991-2001 " New England Biolabs ".

35 µg/ml Cam), par la méthode de striation. Suite à une incubation d'une nuit à 37°C, une colonie a été piquée et inoculée dans 2 ml du milieu LB contenant l'agent sélectif approprié et mis en incubation pour une période de 12-15 hrs à 37 °C sous une agitation de 300 rpm. Une expérience-pilote de l'expression de l'ORF2 était réalisée dans 25 ml de milieu LB dans lequel la culture était initialement ajustée à une D.O.₆₀₀ de 0.1 et mis en incubation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O.₆₀₀ de 0.4-0.6. Puis, 1 ml des différentes cultures était récolté avant l'induction, représentant l'échantillon non induit au temps (0). Après avoir induit les cultures par l'addition de 0.6 à 1 mM d'IPTG, ces dernières étaient soit transférées dans un incubateur à 28°C ou 37°C sous une agitation de 250 rpm. La cinétique d'induction correspondait à l'intervalle de temps entre la première heure et la cinquième heure post-induction. Ainsi, un échantillon était prélevé des cultures à toutes les heures post-induction (t = 0-5).

3.246 Lyse des cellules bactériennes

Les échantillons de 1 ml prélevés des cultures bactériennes, lors des expériences sur l'expression de l'ORF2 chez les différentes souches *E. coli*, étaient d'abord centrifugés à 10 000 x g pour 20 secondes. Puis, les surnageants étaient vidangés et les culots cellulaires resuspendus dans 100 µl d'un tampon 20 mM de phosphate de sodium, pH 7.1, ou directement dans un tampon 2x de dénaturation. La lyse cellulaire était effectuée par 3 cycles de gel/dégel (dans la glace sèche/méthanol, puis dans un bain à 42°C) suivi d'un bref vortexage à vibration maximale entre chaque cycle. La séparation du culot cellulaire du surnageant était réalisée suite à une centrifugation à 13 000 x g pour 10 minutes. Chaque partie était mélangée à 100 µl d'un tampon 2x de dénaturation (0.125 M de Tris-HCl, pH 6.8, 20% (v/v) de glycérol, 4% (p/v) de SDS, 2% (v/v) de 2-mercaptoéthanol et 0.001 % de bleu de bromophénol). Finalement, les échantillons étaient entreposés à -80°C jusqu'à leur migration par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.

3.25 Système d'expression eucaryotique

3.251 Hôte d'expression eucaryotique

3.2511 Lignée cellulaire PK-15A

La lignée cellulaire de rein de porc PK-15A a été obtenue du "The National Veterinary Service Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa, É.-U.". Cette lignée, à l'opposé des cellules PK-15 conventionnelles, est dépourvue de CVP1. Les cellules PK-15A étaient ensemencées à des concentrations de 60 000 cellules/ml (infection) et 75 000 cellules/ml (transfection) dans des pétris de 60 mm de diamètre (Corning Glass Works, NY, É.-U.) ou dans des plateaux de 6 puits (Corning), respectivement. Les cellules ont été cultivées dans le milieu minimal essentiel contenant une base saline de Earle (MEM-Earle) (GIBCO-BRL Laboratories Inc., Grand Island, NY, É.-U.) auquel étaient ajoutés 100 unités (U) par millilitre (ml) de pénicilline (GIBCO-BRL) et 100 µg/ml de streptomycine (GIBCO-BRL), 0,2% de gentamycine sulfate (25 µg/ml), 1% de pyruvate de sodium (GIBCO-BRL), 1% de L-glutamine (0,584 g/L) (GIBCO-BRL), 1% d'acides aminés non essentiels (GIBCO-BRL) et 2% v/v (pour le maintien des cellules) ou 5% v/v (pour la croissance des cellules) de sérum fœtal bovin (SFB; Multi Ser™). Ce dernier avait été préalablement décomplémenté suite à une incubation à 56°C pendant 30 minutes. Enfin, les cultures cellulaires étaient incubées à une température de 37°C en présence de 5% de CO₂ pendant 2 jours, avant d'être transfectées avec les vecteurs recombinants eucaryotiques ou infectées avec la souche de référence du CVP2.

3.2512 Lignée cellulaire HEK-293A

Les cellules HEK-293A sont dérivées de cellules rénales embryonnaires humaines. Cette lignée a été gracieusement obtenue du Dr Bernard Massie de l'Institut de recherche en Biotechnologie (IRB), Conseil National de la Recherche du Canada (CNRC). Ces cellules ont été transformées suite à leur transfection avec une copie du gène précoce E1 de l'adénovirus humain de sérotype 5 (Ad5), par la technique de précipitation au calcium (Graham *et al.*, 1977). Les cellules 293A peuvent être infectées efficacement par les sérotypes 1,2,5,7 d'adénovirus. Les cellules 293A étaient ensemencées à une

concentration de 150 000 cellules/ml dans des pétris de 60 mm de diamètre ou dans des plateaux de 24 puits (Corning). Les cellules étaient cultivées dans le milieu minimal modifié de Dulbecco avec une base saline de Eagle (DMEM) (GIBCO-BRL), auquel étaient ajoutés 100 unités (U)/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, 1% de L-glutamine (0,584 g/L), 2% de 1M d'HEPES et 5% v/v (pour le maintien des cellules) ou 10% v/v (pour la croissance des cellules) de SFB. Finalement, les cultures cellulaires étaient incubées à une température de 37°C en présence de 5% de CO₂ pour un peu plus de 24 heures, avant d'être transfectées avec les vecteurs recombinants eucaryotiques.

3.252 Vecteur d'expression pRc/CMV2

Le plasmide pRc/CMV2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (**figure 29**) a été conçu tant pour l'expression transitoire que stable dans les cellules hôtes de mammifère. Dans ce plasmide l'expression du transgène est sous le contrôle du promoteur immédiat-précoce du cytomégalovirus humain (CMV). Ce vecteur possède aussi des séquences de terminaison de la transcription et des signaux de polyadénylation (poly A) provenant du gène de l'hormone de croissance bovine (BGH). De plus, le plasmide pRc/CMV2 code pour un gène de résistance à la néomycine qui permet la sélection de transfectants stables. Ainsi, seules les cellules ayant inséré le plasmide pRc/CMV2 recombinant dans leurs chromosomes, pourront survivre en présence de l'antibiotique néomycine et, par conséquent, produire de façon stable la protéine recombinante. Le plasmide recombinant peut se répliquer de façon épisomale dans les lignées cellulaires infectées de façon latente avec le virus SV40 ou exprimant l'antigène T du SV40, telle que la lignée cellulaire de fibroblaste de rein du singe vert africain (COS-1 ou COS-7).

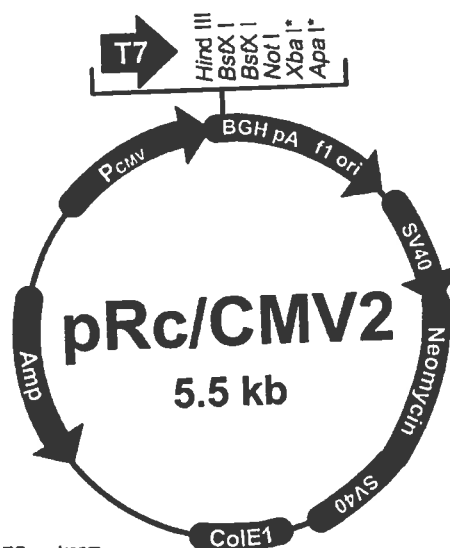
3.253 Vecteur d'expression pAdCMV5 et pAdMLP5.K7.His1.GFP

Les vecteurs pAdCMV5 et pAdMLP5.K7.His1.GFP ont été développés à l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB) par le Dr Bernard Massie et commercialisés par "Quantum Biotechnologies" sous les désignations respectives pQBI-AdCMV5 et pQBI-AdBM5-GFP (**figures 30, 31**). Ils ont été conçus pour obtenir des niveaux d'expression

Figure 29

Comments for pRc/CMV2:
5520 nucleotides

CMV promoter: bases 209-864
T7 promoter: bases 865-883
Polylinker: bases 890-1003
BGH poly A signal: bases 1014-1228
f1 origin: bases 1284-1805
SV40 Promoter: bases 1868-2193
SV40 origin of replication: bases 2061-2148
Neo ORF: bases 2229-3023
SV40 poly A: bases 3197-3326
ColE1 origin: bases 3706-4378
Ampicillin resistance gene: bases 4524-5384



* There is an ATG upstream of the Xba I site.

A-160308

Schéma tiré du manuel " pRc/CMV2 ".
©1995-2001 " Invitrogen Corporation ".

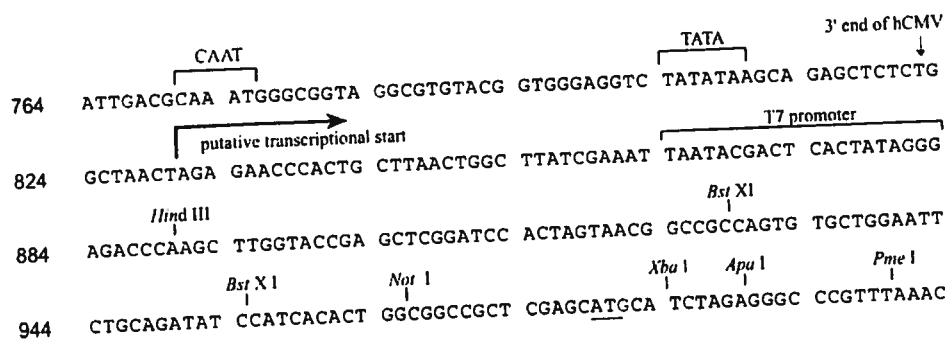


Figure 30

pAdCMV5

Features Location

Ad5 ITR	217-319
Encapsidation signal	410-573
Beta Globin poly A	691-597
CMV5 promoter/enhancer	1767-719
Ad5 9.4-15.5 map unit	1994-4453
Origin of replication	4919-5570
Ampicillin	6594-5734

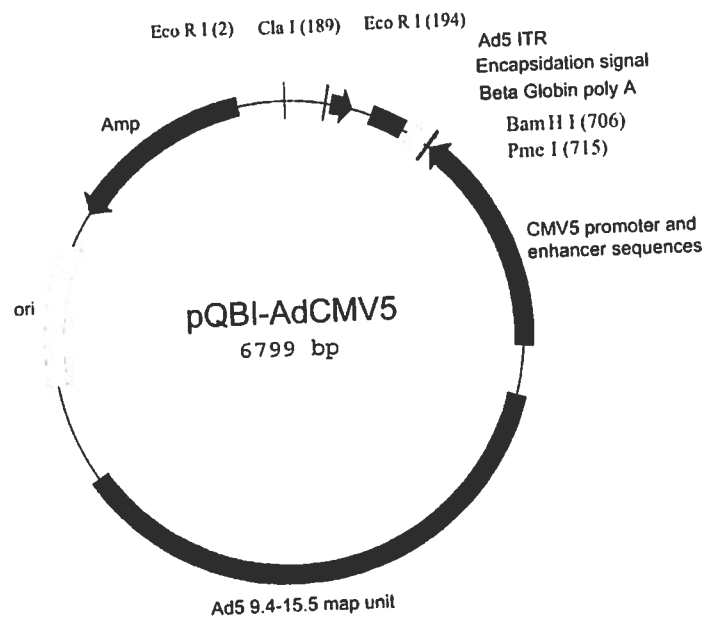


Schéma tiré du manuel " ADENO-QUEST™ KIT ".
© 2001 Q-biogene ".

Figure 31

pAdMLP5.k7.his1.GFP

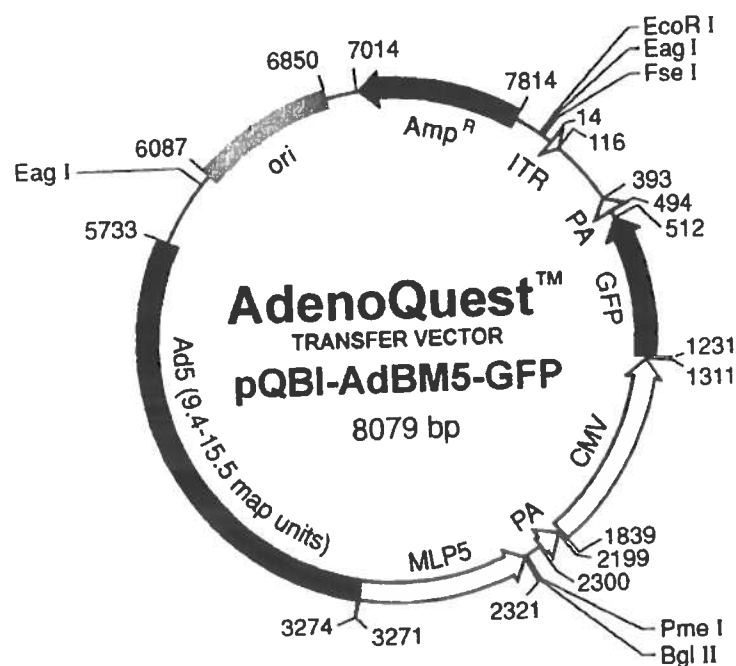
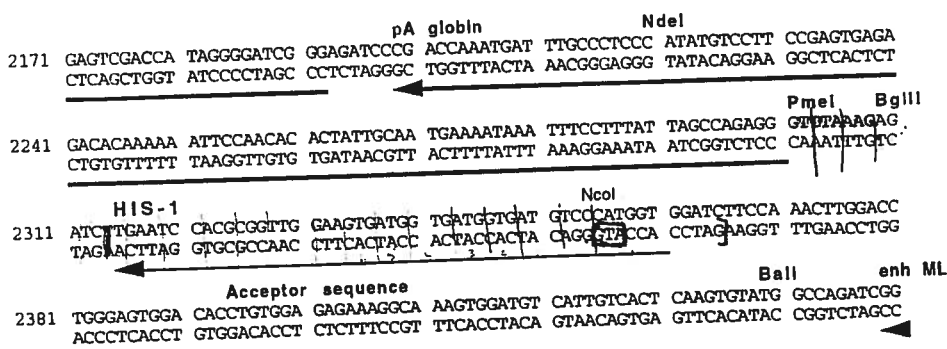


Schéma tiré du manuel " ADENO-QUEST™ KIT ".
© 2001 Q-biogene ".



maximums dans les cellules de mammifères. Ils peuvent être utilisés comme vecteur d'expression pour l'expression transitoire de protéines recombinantes dans diverses lignées cellulaires ou comme vecteur de transfert pour la construction d'adénovirus recombinants. De plus, le vecteur pAdCMV5 est efficace pour le développement d'immunité protectrice suite à l'immunisation génétique de jeunes porcelets (Pirzadeh et Dea, 1998). L'expression des protéines recombinantes est sous le contrôle du promoteur-enhancer CMV dans le vecteur d'expression pAdCMV5 alors qu'elle est sous celui du puissant promoteur majeur tardif (MLP) de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5) dans le vecteur d'expression pAdMLP5.His1.k7.GFP. Ces deux vecteurs possèdent aussi des sites poly A de la globine β et un signal d'encapsidation, ainsi que 2 régions Ad5, soient celle de l'origine de répllication ITR et celle du génome viral (9.4-15.5 unités sur la carte de l'Ad5), lequel est suffisamment long pour générer des recombinants homologues de haute fréquence. En plus, des sites de clivages uniques situés en 5' de l'ITR sont inclus dans ces plasmides afin qu'ils puissent être linéarisés avant la cotransfection avec l'ADN linéaire d'Ad5. Dans ces plasmides, le SMC a été limité à 2 sites de clonage (voir figures respectives). Ainsi, en minimisant le nombre de bases non traduites, entre le promoteur et le codon d'initiation, ces vecteurs permettent d'obtenir des taux d'expression optimales. En effet, une fois qu'ils sont transfectés dans la lignée cellulaire de rein d'embryon humain HEK-293A, ils permettent la synthèse de la protéine recombinante à des niveaux représentant de 15-20% du contenu protéique des cellules. Les nouvelles générations de vecteurs d'expression tel que le plasmide pAdMLP5.His1.k7.GFP permettent grâce au gène reporteur GFP de mieux identifier les cellules productrices de protéines recombinantes. De plus, la protéine recombinante produite par ce système est fusionnée en 5' avec une queue de 6 résidus histidine permettant une purification efficace par chromatographie d'affinité sur une colonne de Ni-NTA.

3.254 Expression transitoire de l'ORF2-CVP2 dans les cellules HEK-293A et PK-15A.

Des cellules 293A ou PK-15A ont été propagées sur des plateaux de 6 puits ou de 24 puits dans le milieu DMEM, contenant 1% de pénicilline-streptomycine, 1% de

glutamine, 2% d'HEPES et 5% de SFB, et amenées à une confluence de 50-70%. Dès lors, les feuillets cellulaires ont été transfectés goutte à goutte avec 100µl d'un mélange d'ADN et de liposomes cationiques "Fugene 6 Reagent" (Roche Diagnostics, Laval, Canada). Les cellules étaient transfectées avec 1.5-4.5 µg de l'ADN plasmidique recombinant à un ratio préférentiel de 1:3 (µg d'ADN/µl de Fugene 6) selon la procédure suggérée par le manufacturier. Après une période de 24, 48 ou 96 heures, le taux de transfection et le taux d'expression de la protéine ORF2 du CVP2 furent vérifiés, soit avant la fixation des cellules transfectées pour la présence de GFP, soit après l'immunomarquage des cellules transfectées avec un sérum de porc anti-CVP2.

Dans une expérience unique, nous avons transfecté les cellules 293A avec le plasmide recombinant pAdMLP5.His1.GFP:ORF2 par la même procédure. Suite à une expression transitoire de 24 hrs, nous avons procédé au radiomarquage des cellules transfectées et à la détection de l'ORF2 par la technique de RIPA.

3.255 Expression des protéines virales du CVP2 dans les cellules PK- 15A.

Dans cette expérience unique, des pétris de 60 mm de diamètre, contenant des cultures cellulaires PK-15A semi-confluentes, ont été infectées avec 0.5 ml du surnageant infectieux CVP2-IAF2897IV, puis incubées à 37°C avec une légère agitation. Après une incubation de 90 min., 5 ml de milieu de croissance MEM E (5% SFV) ont été rajoutés aux cultures infectées qui furent de nouveau remises en incubation. Le lendemain, soit de 14 à 16 hrs post-infection (p.i.), les cultures infectées ont été vidangées du surnageant infectieux, lavées à deux reprises avec une solution de PBS (pH 7.4) et traitées avec une solution de 200mM de D-glucosamine pour un maximum de 30 minutes. À la fin du traitement, les feuillets de cellules ont été immédiatement lavés à deux reprises avec une solution de PBS et 4 ml de milieu de maintien MEM E (2% SFV) ont été ajoutés aux cultures. Finalement, ces cultures ont été ré-incubées jusqu'à leur radiomarquage à la methionine [³⁵S].

3.256 Lyse des cellules de mammifères

Les feuillets cellulaires 293A et PK-15A ont été lysés par l'une ou l'autre des procédures suivantes.

- 1- Les cellules ont été lavées avec du PBS et délicatement lysées avec un tampon hypotonique (25 mM de Tris-HCl pH 7.5, 2 mM de $MgCl_2$) pour 5 min., puis avec un tampon de lyse (0.25 M de Tris-HCl, 0.5% de Triton X-100) pour 5 min. Le lysat cellulaire a été ensuite transféré dans des microtubes. Une centrifugation à 13 000 x g pour 1 min. s'en est suivie pour sédimenter les noyaux et débris membranaires, réduisant ainsi la viscosité du lysat. Le surnageant fut ensuite transféré dans de nouveaux tubes et mélangé avec un même volume de tampon 2x de dénaturation (voir 3.246). Finalement, les échantillons étaient entreposés à -80°C jusqu'à leur analyse suivie à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.
- 2- Les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon de lyse cellulaire (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM $MgCl_2$, 0.5% Triton X-100, 100 µg/ml AEPSF et 2 µg/ml d'aprotinine). Le lysat a été clarifié suite à une centrifugation de 13 000 x g pour 10 min., puis transféré dans de nouveaux tubes eppendorf et mélangé avec un même volume de tampon 2x de dénaturation (voir 3.246). Finalement, les échantillons étaient entreposés à -80°C jusqu'à leur analyse suivie à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.
- 3- Les cellules radiomarquées ont été solubilisées dans un tampon de lyse contenant 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1% desoxycholate de sodium, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 0.2 mg d'aprotinine. En fait, 1 ml du tampon de lyse a été ajouté au premier pétri pour 5 min. et puis transvidé dans un second pétri (1 ml/2pétris), afin de concentrer davantage le lysat cellulaire. Ce dernier a été transféré dans un tube eppendorf et soumis à une épreuve de RIPA.

3.257 Radiomarquage métabolique

Après 24 hrs ou 48 hrs (post-infection ou post-transfection), les cellules ont été lavées avec du PBS stérile et remises en culture dans 2 ml du milieu DMEM sans méthionine (BRL-GIBCO) pendant 45-60 min. à 37°C en présence de CO₂. Suite à cette période de privation en méthionine, les cellules ont été mises en présence de la L-méthionine [³⁵S] (Amersham Searle Co, Oakville, Ont., Canada) à une concentration finale de 75 µCi/ml pendant 4-5 hrs. Puis, les cultures ont été soumises à une lyse cellulaire (voir 3.256 –3).

3.258 RIPA

Les cellules radiomarquées ont été lavées à deux reprises avec du PBS froid et solubilisées dans un tampon de lyse (voir 3.256 –3). Le lysat a ensuite été clarifié suite à une centrifugation à 10 000 x g pour 30 minutes. Puis, 40 µl de chaque échantillon radioactif ont été mélangés à 8 ml de liquide de scintillation. Les mélanges ont été envoyés au service de cytoscintillation de l'INRS-IAF pour calculer la radioactivité contenue dans chaque échantillon. Des aliquots de 5 x 10⁶ cpm de chaque échantillon ont été mélangés avec 7 µl du sérum de porc anti-CVP2 ou de sérum de porc sain et incubés à 4°C sous agitation pour la nuit. Les complexes immuns ont été recueillis suite à 2 hrs d'incubation, en présence de billes de sépharose-A CL4B (Amersham Pharmacia), reconstituées selon les directives du manufacturier. Finalement, les culots contenant les complexes immuns liés aux billes de sépharose, ont été lavés 2X dans tampon de lyse et 1X dans du PBS), puis resuspendus dans 40 µl de tampon 2X de dénaturation (voir 3.246). Les échantillons ont été soumis à une migration par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide-SDS.

3.259 Test d'immunofluorescence

Les plateaux de cellules transfectées étaient fixés avec une solution d'acétone:méthanol (1:1) pendant 20 minutes à 4°C. Une fois que les plateaux furent séchés, les cellules étaient lavées une première fois avec une solution de PBS, pH 7.4,

puis deux autres fois avec une solution de blocage (PBS, pH 7.4, 0.15% de Tween 20) pendant 5-10 min. à chaque fois. Les cellules étaient par la suite incubées à 37°C pendant 60 min. en présence de sérum de porcs convalescents positifs en anticorps anti-CVP2 dilués 1:150 dans le PBS. Cinq lavages au PBS sous forte agitation ont suivi et une seconde incubation fut effectuée en présence d'un conjugué FITC anti-IgG de porc dilué 1:80 (Roche Diagnostics), pendant 45 min. à 37°C. Après une seconde série de lavages au PBS et un lavage à l'eau bidistillée, les plateaux furent visualisés pour la mise en évidence de cellules fluorescentes sous un microscope à rayonnement U.V. (Leitz DM IL, Wetzlar, Allemagne).

3.26 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

La présence des protéines de fusion et des protéines recombinantes, produites par les systèmes d'expressions procaryotiques et eucaryotiques, était tout d'abord vérifiée par SDS-PAGE en utilisant le système d'électrophorèse "Mini-PROTEAN II" (Bio-Rad, Mississauga, Ont., Canada). Brièvement, un gel de séparation de polyacrylamide, contenant 12 % (p/v) d'acrylamide/Bis-acrylamide, 0.38 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% (v/v) SDS, 0.05% (p/v) persulfate d'ammonium, 0.05% (v/v) TEMED, était ajouté par dessus le gel de concentration ("stacking gel") contenant 5% de polyacrylamide.

Dès que les gels furent polymérisés, les lysats bactériens, cellulaires (radioactifs ou non) et les complexes immuns radioactifs furent dénaturés à 100°C pour 5 min. dans le tampon 2X de dénaturation. Puis, ces échantillons étaient chargés dans les puits d'un gel de polyacrylamide. La migration des protéines était effectuée sous une première tension de 80 volts (V) pour 15 min. suivi d'une tension de 200 V, pendant environ 35 min dans un tampon d'électrophorèse (120 mM de Tris, 1 M de glycine, 0.5% (p/v) SDS). Dans le cas des échantillons radiomarqués, la migration était réalisée durant toute la nuit sous une tension de 30 V. Le profil des bandes correspondant aux protéines a été visualisé suite à une coloration au bleu de coomassie, préparé selon Sambrook *et al.*, 1989. Alternativement, le profil des bandes sur gel de polyacrylamide a été révélé par

immunobuvardage de type Western ou par fluorographie (Amplify, Amersham Searle Co.).

3.27 Immunobuvardage de type Western et autoradiographie

Les protéines séparées par SDS-PAGE étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose d'une porosité de: 45 μ m (Bio-Rad) dans un appareil "Trans Blot Cell" (Bio-Rad). Le transfert était effectué sous une tension constante de 60 V appliquée pour 2 hrs dans un tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM de glycine, 20% (v/v) de méthanol et 0.02% de SDS, pH 8.3). Par la suite, les membranes sur lesquelles le transfert des protéines avait été effectué étaient incubées dans une solution de blocage (PBS, pH 7.4, 5% de lait écrémé et 0.15% de Tween 20) pendant au moins 2 hrs ou durant toute la nuit à la température de la pièce.

Les membranes étaient ensuite incubées en présence d'un sérum de porc anti-CVP2, préalablement dilué 1:150 dans la solution de blocage, pendant 1 h 30 min. à la température de la pièce. Après une série de 3 lavages de 10 min. dans du PBS, les membranes étaient remises en incubation dans une solution d'anti-IgG de porc conjugués à la peroxydase, préalablement diluée 1:2 000 dans du PBS. Finalement, les complexes immuns étaient décelés suite à l'immersion des membranes dans une solution de révélation contenant 80% de TBS, 20% 4-chloro-1- naphtol (Sigma) et 0.67% de peroxyde d'hydrogène à 3% (Sigma). La réaction enzymatique était arrêtée par un lavage à l'eau.

Les gels contenant les protéines radioactives ont été fixés dans une solution de Fixation (50% méthanol, 7% acide acétique) pendant 30 min. à la température de la pièce. Ils ont été lavés 2 à 3 fois avec de l'eau puis, imbibés dans une solution d'amplification "Amplify™" pour 15-30 min. à la température de la pièce. Les gels ont été séchés entre deux pellicules de cellophane à l'aide du "Gel Dryer" (modèle 583, Bio-Rad). L'autoradiographie s'est effectuée en exposant les gels sur un film Kodak X-

OMAT RP à -80°C pendant 48 heures placé dans une cassette Rx avec un écran d'amplification.

3.28 Construction d'un adénovirus recombinant

Un adénovirus recombinant a été généré par recombinaison homologue *in vivo* entre le vecteur de transfert linéarisé et l'ADN de l'adénovirus type 5 déficient (Ad5ΔE1/ΔE3) après co-transfection dans les cellules 293A. Tout d'abord, 5 µg du plasmide recombinant pAdMLP5.His1.GFP:ORF2, provenant de la souche HB101 ont été digérés par l'enzyme de restriction *Cla* I durant toute nuit, déphosphorylés et purifiés selon les procédures décrites à la section 3.232. Le long bras de l'ADN de l'Ad5ΔE1/ΔE3 a été obtenu de la part du Dr Carl Gagnon sous forme digérée par *Cla* I à une concentration de 0.9µg/µl. Un jour avant la transfection, 1 x 10⁶ cellules 293A ont été mises en culture dans un pétri de 60 mm de diamètre. Puis, 3 µg du plasmide de transfert linéarisé par *Cla* I ont été mélangés dans une solution de liposomes avec 3 µg de l'ADN de l'Ad5ΔE1/ΔE3, puis co-transfectés dans la culture de cellules 293A sous confluence, selon la procédure décrite à la section 3.254.

Le lendemain, après une incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂, les cellules 293A ont été délicatement lavées à deux reprises avec du PBS stérile, préalablement réchauffé à 37°C, puis séparées par pipettage dans deux pétris de 100 mm de diamètre, contenant 7 ml de milieu complet DMEM (10% SFV, 1% glutamine). Après adhésion complète des cellules à la surface du pétri (5-6 hrs), le milieu a été enlevé délicatement avec une pipette et les cellules ont été recouvertes avec 10 ml (par pétri) d'un mélange de DMEM contenant 5% SFB et 5% d'agarose SeaPlaque^R (Flowgen, Leicestershire, UK), tous deux préalablement réchauffés à 42°C pour 15 min. Les pétris ont été laissés sous la hotte biologique pour 10 min. et remis en incubation à 37°C en présence de 5% CO₂ pendant 1 à 2 semaines, jusqu'à l'observation de foyers fluorescents ou de plages de lyse.

Suite à l'identification de foyers fluorescents, ceux-ci étaient piqués et élués dans un puits d'un plateau de 24 puits contenant 1ml de milieu DMEM, suivi d'une période

d'incubation de 24 hrs à 37°C en présence de 5% CO₂. Enfin, le virus élué a été entreposé à -80°C jusqu'à l'étape d'amplification.

3.29 Production d'anticorps contre les CVP1 et CVP2

3.291 Immunisation avec du CVP1

Les anticorps contre le CVP1 ont été produits chez des souris Balb/c femelles âgées de 6 semaines. Tout d'abord, une suspension de CVP1 (produite à la section 2.41 et estimée au M.E.T. à environ 10¹⁰ particules /ml) diluée dans du PBS stérile a été homogénéisée dans un volume égal d'adjuvant complet de Freund. Puis, chaque souris a été inoculée avec 0.5 ml de l'inoculum de CVP1 par la voie intra-péritonéale. Deux semaines plus tard, une seconde dose du même inoculum, mais homogénéisée dans de l'adjuvant incomplet de Freund, a été injectée aux souris par la même voie. Une prise de sang a été prélevée aux deux semaines à partir du premier jour d'immunisation. Le sang des souris non immunisées a également été prélevé à titre de contrôle négatif. Les sérums récoltés ont subi des dilutions sérielles à base 2, de 1:16 à 1:512, avant d'être soumis à des tests d'IFI.

3.292 Immunisation génétique

Les anticorps contre l'ORF2 du CVP2 ont été produits chez des souris femelles de souches Balb/c, âgées de 5-6 semaines et, chez de jeunes porcelets âgés de 6-7 semaines. Ces derniers ont été immunisés avec une préparation d'ADN contenant un ou deux plasmides recombinants en tant que système d'expression de l'ORF2 du CVP2 (pRc/CMV2 :ORF2, pAdCMV5 :ORF2), des séquences motifs CpGs (GCTAGACGTTAGCGT + TCAACGTT) servant à stimuler le système immunitaire (Krieg *et al.*, 1995) et un complexe de poloxamères Sp1017 (Supratek Pharma Inc., Laval, Qc, Canada) pour augmenter la transfection du transgène dans les muscles squelettiques (Lemieux *et al.*, 2000). L'immunisation des souris n'a été faite qu'avec l'ADN plasmidique et le Sp1017. Tout d'abord, la suspension d'ADN plasmidique (dilué 1:1

dans PBS stérile) a été mélangée à un volume égal de la préparation Sp1017. Dans le cas des porcelets, ce mélange a été additionné de 50 µg des motifs de séquences CpG.

Ainsi, à leur première immunisation, les souris ont été inoculées par injection intra-dermique avec 100 µl d'un mélange pRcCMV2:ORF2/Sp1017 à raison de 0.5 µg/µl d'ADN. Elles ont obtenu leur deuxième dose au 21^e jour post-injection (p.i.) consistant en 100 µl du même mélange, mais additionné du pAdCMV5:ORF2, à raison de 1 µg/µl d'ADN. Les récoltes de sang ont été effectuées à toutes les deux semaines et analysées en IFI. Le sang de souris Balb/c non immunisées a également été prélevé à des fins de contrôle négatif.

Les jeunes porcelets ont été inoculés, de façon intra-dermique, sous l'oreille avec 200 µl du complexe contenant les deux plasmides, les motifs CpG et le Sp1017 en raison de 1 µg/µl d'ADN. Un mois plus tard, ils ont obtenu une deuxième dose du même mélange. À la 9^e semaine p.i., ils ont été inoculés avec 50 µl de CVP2 (préparation virale produite à la section 2.42 et estimée au M.E.T. à environ 10⁸ particules /ml). Les récoltes de sang ont été effectuées à toutes les deux semaines et analysées en IFI. Le sang des porcelets non immunisés a aussi été prélevé comme contrôle négatif.

3.293 Évaluation de la production d'anticorps par IFI

Après leur récolte, les sangs porcins et murins provenant des animaux immunisés et non immunisés ont été entreposés à la température de la pièce pour 2-4 hrs et les sérums furent récoltés suite à une centrifugation à 3 000 x g pour 15-20 minutes. Durant les épreuves d'IFI, la présence d'anticorps contre le CVP1 a été mise en évidence sur des feuillets de cellules PK-15 dans des plateaux de 96 puits, tandis que les anticorps contre le CVP2 ont été détectés sur des feuillets de cellules PK-15A.

Les cellules cultivées dans des plateaux de 96 puits ont été préalablement fixées avec une solution de 80% d'acétone, avant d'être incubées en présence des dilutions de sérums murins et porcins. Les sérums susceptibles d'être positifs en anticorps contre le CVP1 ont

été dilués 1/100, tandis que les sérums susceptibles d'être positifs pour le CVP2 ont pour leur part été soumis à des dilutions sérielles à base 2 (1/16-1/512). La réaction immunologique s'est déroulée à 37°C pendant 1h sous une légère agitation. Puis, cinq lavages ont été faits sous forte agitation dans du PBS. Une seconde étape d'incubation fut effectuée en présence d'un conjugué FITC anti-IgG de souris dilué 1/80 ou de porc dilué 1/80 pendant 45 min. à 37°C. Après 5 autres lavages au PBS et un court lavage à l'eau distillée, les échantillons furent visualisés au microscope à rayonnement U.V. pour la mise en évidence de cellules fluorescentes.

3.3 Résultats

3.31 Expression procaryotique de l'ORF2 du CVP2

Parmi les objectifs du volet génie génétique figuraient en premier lieu le clonage du gène de l'ORF2 de la souche pathogène du CVP (IAF2897) dans un vecteur d'expression procaryotique de fusion, et en second lieu, la production d'une protéine de fusion dans une souche d'*E. coli* déficiente en protéase. Le premier système de fusion du transgène utilisé pour cloner l'ORF2 a été le vecteur d'expression pGEX4T1. Toutefois, en raison des difficultés rencontrées au cours de l'expression de la protéine de fusion GST-ORF2 produite par le système pGEX, le clonage de l'ORF2 a été effectué dans deux autres systèmes d'expression, soit dans les systèmes pMAL-2ce et pRSET-C. Évidemment, la version de ces vecteurs et le site de clonage du gène ORF2 ont été choisis de sorte que l'ATG du gène ORF2 se retrouve dans le même cadre de lecture que la protéine (ou peptide) de fusion située à son extrémité N-terminale.

3.311 Construction de bibliothèques de plasmides recombinants

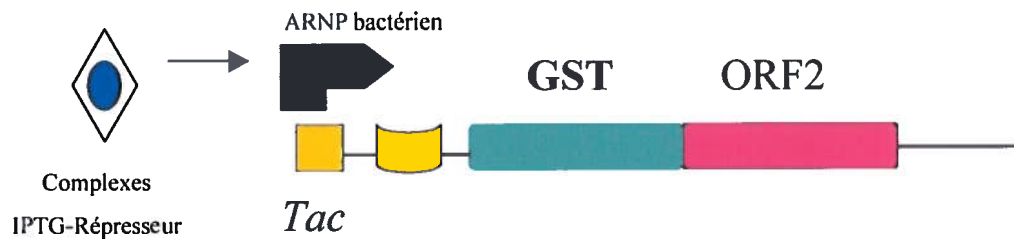
Dans tous les cas, l'amplification spécifique par la PCR du gène ORF2 du CVP2 a été réussie, à l'aide des amorces présentées au **tableau 12**. Le produit de PCR obtenu à partir de ces amorces a été analysé sur un gel d'agarose et la longueur du fragment amplifié fut estimée à l'aide d'un marqueur de longueur d'ADN à environ 750 pb.

Figure 32**Comparaison du mécanisme transcriptionnel des différents systèmes d'expression procaryotique employés.**

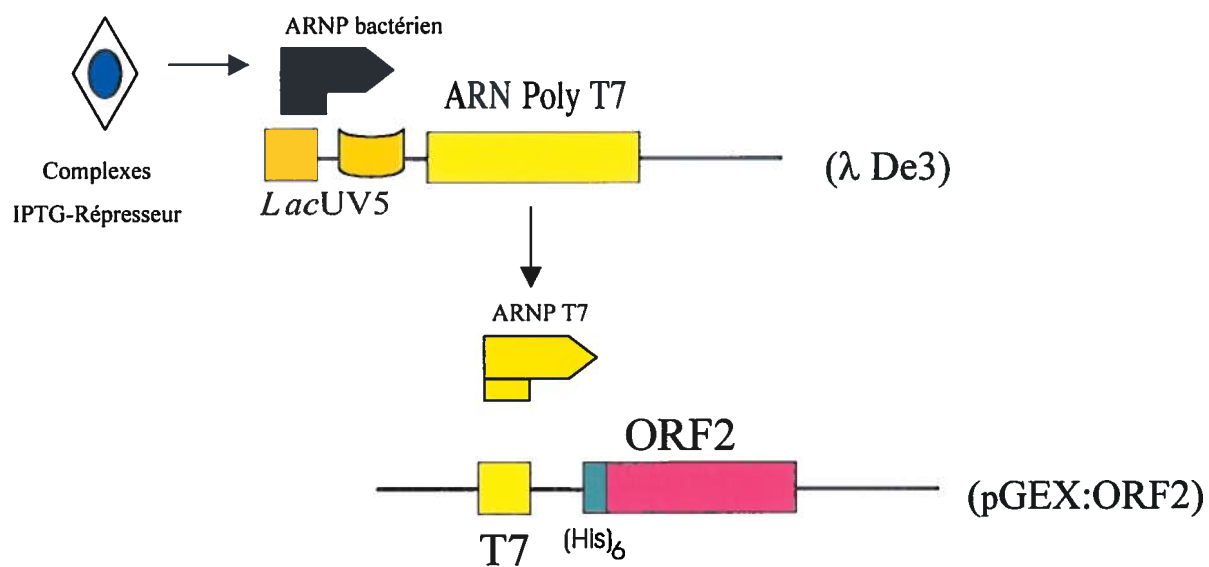
A. Les systèmes d'expression de protéine de fusion, tel que pGEX4T1 et pMAL-2ce, utilisent l'ARN polymérase de leur hôte afin de transcrire leur gène. Dans des conditions d'induction, l'IPTG (ovale bleu) va se fixer au répresseur (losange), permettant ainsi à l'ARN polymérase bactérienne (flèche en noir) de transcrire le gène en aval du promoteur *Tac* (carré jaune) et subséquemment de transcrire le gène de fusion GST-ORF2 (rectangle vert et rouge).

B. Les systèmes d'expression basés sur l'ARN polymérase du prophage T7, tel que pRSET-C, utilisent indépendamment l'ARN polymérase T7 pour transcrire le gène sous le contrôle du promoteur spécifique T7. Premièrement, en présence d'IPTG (ovale bleu), l'ARN polymérase bactérienne (flèche en noir) permettra la transcription de l'ARN polymérase T7. Deuxièmement, une fois traduite, cette dernière se fixera à son promoteur T7 (carré jaune) et permettra la transcription exclusive du peptide de fusion (His)-ORF2 (rectangle vert et rouge).

**A. Système d'expression de protéine de fusion
(ARN polymérase bactérien dépendant)**



**B. Système d'expression basé sur l'ARNP du prophage T7
(ARN polymérase indépendante de la bactérie)**



La première construction de plasmides recombinants fut obtenue suite au clonage bidirectionnel du gène ORF2 dans le plasmide pGEX4T1. Pour ce faire, la digestion du gène ORF2 et de son vecteur par l'endonucléase *Bam*HI a été effectuée avant d'être soumise à une réaction de ligation. Subséquemment, le produit de ligation a été utilisé pour transformer les bactéries compétentes DH5 α . Le lendemain, un tapis confluent de colonies recombinantes a été observé sur les géloses sélectives. Afin d'identifier les clones possédant le gène ORF2 orienté dans la bonne direction, 16 colonies ont été sélectionnées au hasard et soumises à un criblage par un test de PCR. Le concept de cette technique de criblage consistait à amplifier le gène ORF2 par l'utilisation des amorces qui délimitait d'un côté, une région négligeable du plasmide et de l'autre, la fin du gène ORF2. Si bien que, l'amorce sens spécifique au vecteur s'hybridait autour du promoteur alors que l'amorce anti-sens spécifique à l'ORF2 s'hybridait à l'extrémité C-terminale du gène. Ainsi, un clone était reconnu comme positif si un amplicon d'un peu plus de 750 pb était mis en évidence sur gel d'agarose. Après la migration des produits de PCR, 6 clones positifs (bonne orientation du gène) ont pu être obtenus. Parmi eux, trois ont été remis en culture à partir de leur réplique sur gélose et entreposés à -80°C. La librairie de transformants DH5 α /pGEX-ORF2 fut constituée à partir de ces bactéries recombinantes congelées.

La deuxième construction de plasmides recombinants fut obtenue suite au clonage directionnel du gène ORF2 dans le plasmide pRSET-C. L'insert et le vecteur ont été digérés par les endonucléases *Bam* HI et *Hind* III, puis soumis à des réactions de ligation. Subséquemment, les produits de ligation ont été utilisés pour transformer des bactéries compétentes DH5 α . Le lendemain, un tapis d'environ une centaine de colonies recombinantes a été obtenu sur les géloses sélectives. Étant unidirectionnel, le clonage a été vérifié par une simple détection par PCR, à l'aide d'amorces spécifiques à l'ORF2. Tous les clones évalués par cette technique se sont avérés porteurs de l'ORF2, quatre d'entre eux ayant été remis en culture à partir de leur réplique sur gélose, puis entreposés à -80°C. La librairie de DH5 α /pRSET-ORF2 fut constituée à partir de ces bactéries recombinantes congelées.

La troisième construction de plasmides recombinants fut obtenue suite au clonage directionnel du gène ORF2 dans le plasmide pMAL-2ce. Ce plasmide et son insert ont été digérés par les endonucléases *Bam* HI et *Hind* III, puis soumis à une réaction de ligation. Subséquemment, les produits de ligation ont été utilisés pour la transformation des bactéries compétentes DH5 α . Dans ce cas-ci, il a été possible d'obtenir en moyenne un tapis d'environ 200 colonies recombinantes sur les géloses sélectives. Le clonage a été vérifié de la même façon que dans le cas du pREST-C. Tous les clones évalués par cette technique se sont avérés porteurs de l'ORF2, trois d'entre eux ont été remis en culture à partir de leur réplica sur gélose et entreposés à -80°C. La librairie de DH5 α /pMAL-ORF2 fut constituée à partir de ces bactéries recombinantes congelées.

3.312 Expression de la protéine de fusion GST-ORF2 et MBP-ORF2

L'ADN pGEX:ORF2 extrait des bactéries DH5 α a été utilisé pour transformer la souche d'*E. coli* BL21. Après les réactions de transformation, un tapis confluent de transformants BL21/pGEX:ORF2 a été obtenu. Trois colonies mises en culture ont été entreposées à -80°C en perspective d'une expérience-pilote sur l'expression de la protéine de fusion.

L'expérience-pilote visait à vérifier d'une part, l'expression de la protéine de fusion GST-ORF2 et, d'autre part, à trouver les conditions optimales pour sa production. Elle a été réalisée à partir de trois types de culture: une culture bactérienne BL21(DE3) non transformée, une autre BL21(DE3) transformée avec un plasmide seul pGEX4T1 et une dernière transformée avec un plasmide recombinant pGEX:ORF2. Après avoir amené les cultures bactériennes à une D.O. de 0.4-0.6, un premier échantillonnage a été prélevé et correspondait aux cultures non induites. L'induction des cultures BL21/pGEX4T1 et BL21/pGEX:ORF2 a été réalisée avec trois différentes concentrations d'IPTG (0.6, 0.8 et 1 mM), avant leur remise en incubation à 30°C. Un échantillonnage a été prélevé à toutes les heures pour une période de 3 hrs et évalué par SDS-PAGE et coloration au bleu de coomassie ou par immunobuvardage de type Western.

Le recours à ces deux techniques pour la recherche des bandes inhérentes à la protéine de fusion GST-ORF2 ne s'est pas révélé positif (**figure 33**). En effet, une bande correspondant au poids moléculaire de la protéine GST-ORF2 évaluée à environ 57 kDa (à raison de 29 kDa pour la GST et 28 kDa pour l'ORF2) n'a pas pu être mise en évidence. Par contre, il a été possible de déceler clairement, par coloration au bleu de coomassie sur SDS-PAGE, une bande correspondante à la protéine GST, estimée à environ 30 kDa. Aussi, il était possible d'observer une progression d'intensité de la GST depuis la première heure post-induction jusqu'à la troisième heure post-induction. Aucune différence n'a pu être observée entre les échantillons induits par différentes concentrations d'IPTG.

En ce qui concerne l'expression de l'ORF2 à partir du système de protéine de fusion pMAL-2ce, les bactéries DH11S ont été transformées avec le produit de ligation pMAL:ORF2. Contrairement aux autres réactions de transformation, le produit de ligation n'a pas été préalablement introduit dans la souche DH5 α , mais directement incorporé dans la souche DH11S (souche utilisée pour l'expression de protéines hétérologues). Vingt et un transformants DH11S /pMAL:ORF2 ont été obtenus sur géloses sélectives, dont deux utilisés dans une expérience-pilote pour la production de la protéine de fusion.

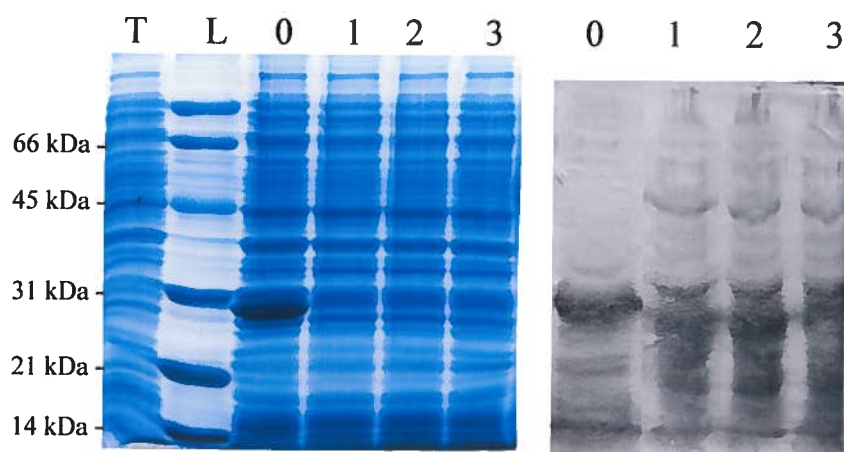
Quatre types de cultures bactérienne furent considérées pour l'expérience-pilote : 1) culture bactérienne DH11S non transformée, 2) DH11S transformée avec un plasmide seul pMAL-2ce et 3-4) transformées avec un plasmide recombinant pMAL:ORF2, en provenance de clones différents. Des prélèvements d'échantillonnage ont été faits lorsque la D.O. des cultures bactériennes fut évaluée entre 0.4 et 0.6 et la même procédure de traitement que dans le cas de l'expérience-pilote précédente fut suivie. Néanmoins, la recherche des bandes par SDS-PAGE, suite à la coloration au bleu de Coomassie, correspondant à la protéine de fusion MBP-ORF2 et à la MBP s'est avérée infructueuse (**figure 34**). En effet, l'observation de bandes correspondant au poids moléculaire estimé de la protéine de fusion MBP-ORF2 et MBP, soit respectivement de 71 kDa et 43 kDa, n'a pas pu être démontrée.

Figure 33

Profil électrophorétique des protéines bactériennes BL21/pGEX:ORF2 obtenues suite à une coloration au bleu de Coomassie et par immunobuvardage.

Photo de gauche. Gel de polyacrylamide (12%) dans lequel des protéines, provenant de bactéries non transformées (T) et transformées (0 à 3), ont été colorées au bleu de coomassie.

Photo de droite. Membrane de nitrocellulose sur laquelle des protéines, provenant du gel de polyacrylamide, ont été marquées, une première fois, avec un sérum de porc anti-CVP2 (SDPS) et une seconde fois, avec une solution d'anti-IgG de porc conjuguée à la peroxydase.



T: BL21

L: Échelle de P.M.

0: BL21/pGEX4TI

1: BL21/pGEX:ORF2

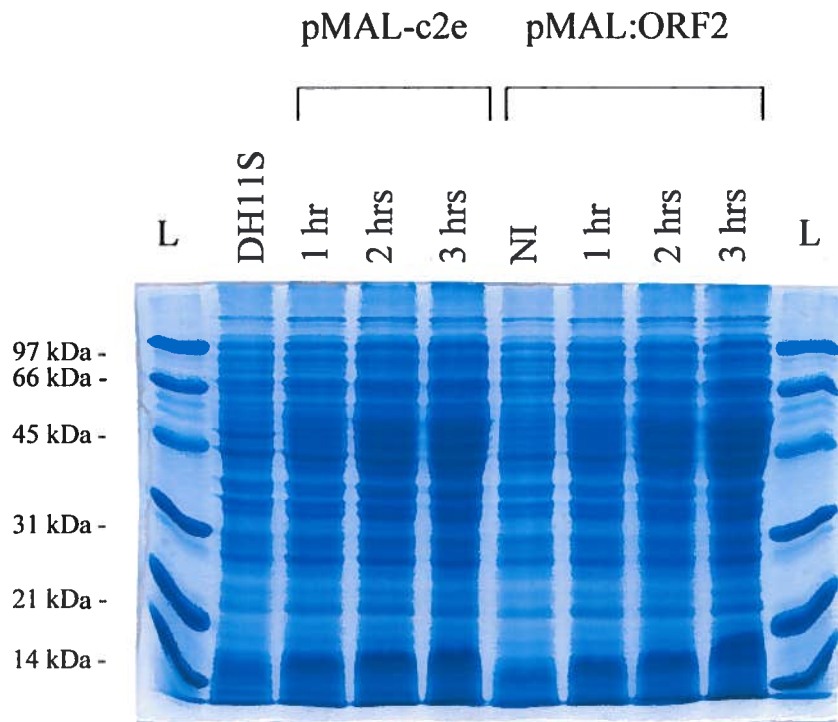
2: BL21/pGEX:ORF2

3: BL21/pGEX:ORF2

Figure 34

Profil électrophorétique des protéines bactériennes DH11S/pMAL:ORF2 obtenues suite à une coloration au bleu de Coomassie.

Gel de polyacrylamide (12%) dans lequel des protéines, provenant de bactéries transformées avec pMAL-2ce et avec pMAL:ORF2, ont été colorées au bleu de Coomassie.



pMAL-2ce: bactéries transformées avec le plasmide vide

pMAL:ORF2: bactéries transformées avec le plasmide recombinant

DH11S: bactéries non transformées

1-2-3 hrs: temps post-induction

NI: bactérie transformée non induite

L: marqueur de P.M.

3.313 Expression du peptide de fusion (His)₆-ORF2

La production d'ADN recombinant pRSET:ORF2, à des fins d'utilisation pour la transformation des bactéries compétentes BL21(DE3), BL21(DE3)Gold et BL21(DE3) pLysS, provenait de trois clones DH5α /pRSET:ORF2. Trois transformations différentes ont été conduites sur trois souches BL21. Concernant les souches BL21(DE3) et BL21(DE3) pLysS, deux des trois transformations auxquelles elles ont été soumises, ont permis l'obtention sur géloses sélectives de plus de 300 colonies de transformants. Quant à la souche BL21(DE3)Gold, les trois réactions ont respectivement permis d'obtenir plus de 300 colonies de bactéries transformées.

Pour réaliser l'expérience-pilote, des échantillonnages prélevés de deux des clones de bactéries transformées, soit BL21(DE3)Gold /pREST:ORF2 et BL21(DE3)pLysS /pREST:ORF2, ont été utilisés pour les essais d'expression de la protéine (His)₆-ORF2. En parallèle, deux contrôles des cultures bactériennes (non transformées et transformées avec le vecteur seul) ont été traités de façon similaire. Tous ces échantillons ont été soumis à la même procédure de traitement que celle suivie dans les expériences-pilotes antécédentes.

Les échantillons des deux clones de transformants, qui ont été évalués par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie et soumis à des réactions d'immunobuvardage de type Western, n'ont pas permis de révéler de bandes correspondant au poids moléculaire de la protéine (His)₆-ORF2 (**figure 35**). En effet, une bande correspondant à son poids moléculaire, évaluée à environ 31 kDa (à raison de 3 kDa pour (His)₆ et 28 kDa pour l'ORF2), n'a pas été décelée par ces deux techniques de marquage.

3.314 Analyse de la composition en acides aminés de l'ORF2

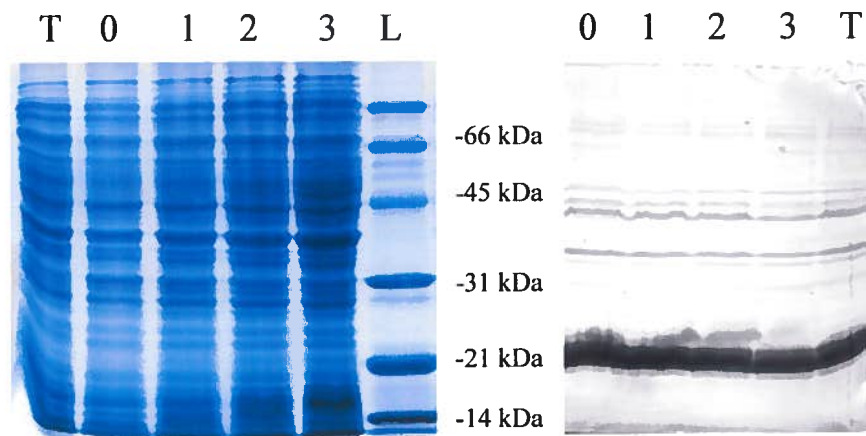
Suite aux échecs cumulés lors de l'utilisation de divers systèmes d'expression procaryotes, la décision d'envoyer au service de séquençage l'ADN recombinant extrait des clones utilisés pour l'expression des protéines et peptides de fusion, a été prise; elle

Figure 35

Profil électrophorétique des bandes de protéines bactériennes BL21/pRSET:ORF2 obtenues suite à une coloration au bleu de Coomassie et par immunobuvardage.

Photo de gauche. Gel de polyacrylamide (12%) dans lequel des protéines, provenant de bactéries non transformées (T) et transformées (0 à 3), ont été colorées au bleu de Coomassie.

Photo de droite. Membrane de nitrocellulose sur laquelle des protéines, provenant du gel de polyacrylamide, ont été marquées, une première fois, avec un sérum de porc anti-CVP2 (SDPS) et une seconde fois, avec une solution d'anti-IgG de porc conjuguée à la peroxydase.



0: BL21/pRSET:ORF2 (0hr)
 1: BL21/pRSET:ORF2 (1hr)
 2: BL21/pRSET:ORF2 (2hr)
 3: BL21/pRSET:ORF2 (3hr)
 L: Échelle de P.M.

devait permettre de vérifier si le problème était attribuable à un mauvais cadre de lecture ou dans une quelconque mutation génétique, survenue durant le clonage. Les résultats de séquençage présentés à la **figure 36** démontrent clairement que dans les deux types de système d'expression (3.312 et 3.313) le gène ORF2 se retrouvait dans le bon cadre de lecture. Aussi, des études ont été entreprises pour l'analyse de la composition en acides aminés de l'ORF2 du CVP2.

À l'aide du programme "ORF search" disponible au site du "National Center of Biotechnology Information (NCBI)" d'Internet, la séquence nucléotidique du gène ORF2 du CVP2 a été traduite en séquence d'acides aminés (**figure 37**). Le recours successif au logiciel GenWorks a rendu possible l'obtention d'un histogramme représentant la fréquence de chaque acide aminé dans la chaîne polypeptidique de l'ORF2 (**figure 38**). Les acides aminés retrouvés en plus grand nombre étaient l'arginine (R; 13%), la thréonine (T; 8.5%) et la proline (P; 8%). À partir de ces trois codons, une étude comparative sur la fréquence de leur usage respectif chez les bactéries Gram - versus les organismes eucaryotes a été réalisée, en se basant sur la charte de l'usage des codons et leur fréquence d'utilisation chez divers organismes (**Annexe 3** ; Ausubel *et al.*, 1992). Les résultats présentés au **tableau 13** permettent de constater que les codons AGG et AGA constituent respectivement à eux seuls 20% et 32% des codons d'arginine de l'ORF2 du CVP2, tandis que les codons ACA de la thréonine et CCC de la proline représentent respectivement 32% et 68% des codons de l'ORF2 du CVP2. De plus, ils mettent en évidence la rareté des codons dominants de l'ORF2 dans les bactéries Gram-, en opposition à leur fréquence plus grande chez les mammifères.

3.32 Expression eucaryotique de l'ORF2 du CVP2.

Alternativement à l'objectif précédent (section 3.31), des tentatives ont été déployées pour exprimer l'ORF2 du CVP2 dans les cellules 293A, à l'aide de divers systèmes d'expression eucaryotes. Le clonage du transgène s'est effectué dans trois différents vecteurs d'expression : le vecteur d'expression transitoire pRc/CMV2 sous

Figure 36**Analyse de séquençage des constructions pGEX:ORF2 et pRSET:ORF2.**

En haut. La séquence du plasmide recombinant théorique pGEX:ORF2 (pGEX4T1-ORF2 BamHI) a été construite à l'aide du programme informatique GenWorks. Elle a été alignée avec la séquence expérimentale du pGEX:ORF2 (pGEXORF2) obtenue par clonage. Le codon ATG de l'ORF2 du CVP2 a été marqué d'une flèche en gras.

En bas. La séquence du plasmide recombinant théorique pRSET:ORF2 (complement of pRSET-C) a été construite à l'aide du programme informatique GenWorks. Elle a été alignée avec la séquence expérimentale du pRSET:ORF2 (C3 MOURAD TND T7.Seq) obtenue par clonage. Le codon ATG de la queue de 6 résidus d'histidine du pRSET-C, situé à l'extrémité 5' de l'ORF2, a été marqué d'une flèche en gras.

Construction pGEX:ORF2

Expérience n° 60
Alignement pGEX411-ORF2 (théo.) vs pGEXORF2 (exp.)
Induction de GST-ORF2 le 24 Mars '00

```
pGEX411-ORF2 (BamHI)  CAC GTT TGG TGG TGG CGA CCA TCC TCC AAA ATC GGA TCT G 920
cons.pGEXORF2         --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- 13
pGEX411-ORF2 (BamHI)  GTT CCG CGT GGA TCC GCC GCC GCC ATG ACG TAT CCA AGG A 960
cons.pGEXORF2         GTT CCG CGT GGA TCC GCC GCC GCC ATG ACG TAT CTA AGG A 53
pGEX411-ORF2 (BamHI)  GGC GTT ACC GCA GAA GAA GAC ACC CCC CCC GCA GGC ATC T 1000
cons.pGEXORF2         GGC GTT ACC GCA GAA GAA GAC ACC CCC CCC GCA GGC ATC T 93
pGEX411-ORF2 (BamHI)  TGG CCA GAT CCT CCG CCG CCG CCC CTG GCT CGT CCA CCC C 1040
cons.pGEXORF2         TGG CCA GAT CCT CCG CCG CCG CCC CTG GCT CGT CCA CCC C 133
pGEX411-ORF2 (BamHI)  CGC CAC CGC TAC CGT TGG AGA AGG AAA AAT GGC ATC TTC A 1080
cons.pGEXORF2         CGC CAC CGC TAC CGT TGG AGA AGG AAA AAT GGC ATC TTC A 173
pGEX411-ORF2 (BamHI)  ACA CCC GCC TCT CCC GCA CCT TCG GAT ATA CTG TCA AGG C 1120
cons.pGEXORF2         ACA CCC GCC TCT CCC GCA CCT TCG GAT ATA CTG TCA AGG C 213
pGEX411-ORF2 (BamHI)  TAC CAC AGT CAG AAC GCC CTC CTG GGC GGT GGA CAT GAT G 1160
cons.pGEXORF2         TAC CAC AGT CAG AAC GCC CTC CTG GGC GGT GGA CAT GAT G 253
pGEX411-ORF2 (BamHI)  AGA TTT AAT ATT GAC GAC TTT GTT CCC CCG GGA GGG GGG A 1200
cons.pGEXORF2         AGA TTT ACA CTT GAC GAC TTT GTT CCC CCG GGA GGG GGG A 293
pGEX411-ORF2 (BamHI)  CCA ACA AAA TCT CTA TAC -CC TTT GAA TAC TAC AGA ATA A 1238
cons.pGEXORF2         CCA ACA AAA TCT CTC TAC TCC TTT GAA TAC TAC AGA ATA A 333
pGEX411-ORF2 (BamHI)  GAA AGG TTA AGG TTG AAT TCT GGC CCT GCT CCC CCA TCA C 1279
cons.pGEXORF2         GAA AGG TTA AGG TTG AAT TCT GGC CCT GCT CCC CCA TCA C 373
pGEX411-ORF2 (BamHI)  CCA GGG TCA TAG GGG AGT GGG CTC CAC TGC TGT TAT TCT A 1312
cons.pGEXORF2         ACA GGG CGA TAG GGG AGT GGG CTC CAC TGC TGT TAT TCT A 413
pGEX411-ORF2 (BamHI)  GAT GAT AAC TTT GTA ACA AAG GCC ACA GCC CTA ACC TAT G 1359
cons.pGEXORF2         GAT GAT AAC TTT GTA ACA AAG GCC ACA GCC CTA ACC TAT G 453
pGEX411-ORF2 (BamHI)  ACC CAT ATG TAA ACT ACT CCT CCC GCC ATA CAA TCC CCC A 1399
cons.pGEXORF2         ACC CAT ATG TAA ACT ACT CCT CCC GCC ATA CAA TCC CCC A 493
pGEX411-ORF2 (BamHI)  ACC CTT CTC CTA CCA CTC CCG TTA CTT CAC ACC CAA ACC T 1439
cons.pGEXORF2         ACC CTT CTC CTA CCA CTC CCG TTA CTT CAC ACC CAA ACC T 533
pGEX411-ORF2 (BamHI)  GTT CTT GAC TCC ACT ATT GAT TAC TTC CAA CCA AAT AAC A 1479
cons.pGEXORF2         GTT CTT GAC TCC ACT ATT GAT TAC TTC CAA CCA AAT AAC A 573
pGEX411-ORF2 (BamHI)  AAA GGA CTC AGC TTT GGC TGA GGC TAC AAA CCT CTA GAA A 1519
cons.pGEXORF2         AAA GGA ATC AGC TTT GGC TGA GGC TAC AAA CCT CTA GAA A 613
pGEX411-ORF2 (BamHI)  TGT GGA CCA CGT AGG CCT CGG CAC TGC GTT CGA AAA CAG T 1559
cons.pGEXORF2         TGT GGA CCA CGT AGG CCT CGG CAC TGC GTT CGA AAA CAG T 653
pGEX411-ORF2 (BamHI)  ATA TAC GAC CAG GAC TAC AAT ATC CGT GTA ACC ATG TAT G 1594
cons.pGEXORF2         AAA TAC GAC CAG GAC TAC AAT ATC CGT GTA ACC ATG TAT G 693
pGEX411-ORF2 (BamHI)  TAC AAT TCA GAG AAT TTA ATC TTA AAG ACC CCC CAC TTA A 1639
cons.pGEXORF2         TAC AAT TCA GAG AAT TTA ATC TTA AAG --- --- --- --- - 720
```

Construction pRSET:ORF2

Alignement pRSET:ORF2 (théo.) vs pRSET:ORF2 (exp.)

```
Complement of pRSET-C  ATC TCG ATC CCG CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA G 40
C3 MOURAD TND T7.Seq  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Complement of pRSET-C  ACC ACA ACG GTT TCC CTC TAG --A TAA TTT TGT TTA ACT T 78
C3 MOURAD TND T7.Seq  ACC ACC CCG GTT TCC CTC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT T 45
Complement of pRSET-C  TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT C 118
C3 MOURAD TND T7.Seq  TAA CAA GGA GAT ATA CAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT C 85
Complement of pRSET-C  ATC ATC ATG GTA TGG CTA GCA TGA CTG GTG GAC AGC AAA T 158
C3 MOURAD TND T7.Seq  ATC ATC ATG GTA TGG CTA GCA TGA CTG GTG GAC AGC AAA T 125
Complement of pRSET-C  GGG TCG GGA TCT GTA CGA CGA TGA CGA TAA GGA TCG ATG G 198
C3 MOURAD TND T7.Seq  GGG TCG GGA TCT GTA CGA CGA TGA CGA TAA GGA TCG ATG G 165
Complement of pRSET-C  ATC CGA GCT CGA GAT CTG CAG CTG GTA CCA TGG AAT TCG A 238
C3 MOURAD TND T7.Seq  ATC CGA CCT CGA GAT CTG CAG CTG GTA CCA TGG AAT TCG A 205
Complement of pRSET-C  AGC TTG ATC CGG CTG CTA ACA AAG CCC GAA AGG AAG CTG A 278
C3 MOURAD TND T7.Seq  AGC TTG ATC CGG CTG CTA ACA AAG CCC GAA AGG AAG CTG A 245
Complement of pRSET-C  GTT GGC TGC TGC CAC CGC TGA GCA ATA ACT AGC ATA ACC C 318
C3 MOURAD TND T7.Seq  GTT GGC TGC TGC CAC CGC TGA GCA ATA ACT AGC ATA ACC C 285
Complement of pRSET-C  CTT GGG GCC TCT AAA CGG GTC TTG AGG GGT TTT TTG CTG A 358
C3 MOURAD TND T7.Seq  CTT GGG GCC TCT AAA CGG GTC TTG AGG GGT TTT TTG CTG A 325
Complement of pRSET-C  AAG GAG GAA CTA TAT CCG GAT CTG GCG TAA TAG CGA AGA G 398
C3 MOURAD TND T7.Seq  AAG GAG GAA CTA TAT CCG GAT CTG GCG TAA TAG CGA AGA G 365
Complement of pRSET-C  GCC CGC ACC GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG A 438
C3 MOURAD TND T7.Seq  GCC CGC ACC GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CTC AGC CTG A 405
Complement of pRSET-C  ATG CGC AAT GGG ACG CGC CCT GTA GCG CGC CAT TAA CGC C 478
C3 MOURAD TND T7.Seq  ATG CGC NAT GGG ACG CGC CCT GTA HCG CGC CAT C-- --- - 439
Complement of pRSET-C  GGC GGG TGT GGT GGT TAC CGC CAG CGT GAC CGC TAC ACT T 518
```

Figure 37**Séquence nucléotidique et peptidique de l'ORF2 de la souche québécoise IAF2897 du CVP2.**

Séquences en nucléotides et en acides aminés de l'ORF2 de la souche IAF2897 du CVP2 obtenues à partir du programme "ORF search", disponible au site d'Internet NCBI. Après avoir soumis au programme d'informatique la séquence du génome entier de notre souche CVP2, 10 ORFs ont pu être obtenus (voir figure 11). La taille observée de la séquence du gène ORF2 est de 702 pb alors que celle de sa séquence protéique est de 175 acides aminés. Le gène se retrouve sur le brin complémentaire du génome ambisense. Son codon de départ est un ATG et son codon de terminaison est un TAA (*). Les triplets ombragés de couleur correspondent aux codons de l'arginine.

Séquence nucléotidique et peptidique de l'ORF2 de la souche CVP2-IAF 2897.

```
702 atgacgtatccaaggaggcggtacgcagaagagacaccggccc  
M T Y P R R R Y R R R R H R P  
657 cgcagccatcttggccagatcctcgcgcgcgcctggctcgtc  
R S H L G Q I L R R R P W L V  
612 caccctggccacggctacggtggagaaggaaaaatggcatcttc  
H P R H R Y R W R R K N G I F  
567 aacaccggcctctccggcacttcggatatactgctaaggctacc  
N T R L S R T F G Y T A K A T  
522 acagtcagaacgccctcctgggcagtgacatgatgagattaca  
T V R T P S W A V D M M R F T  
477 cttgacgactttgttccccgggaggggggaccaacaaaatctct  
L D D F V P P G G T N K I S  
432 ctaccctttgaatactacagaatagaaggttaaggttgaattc  
L P F E Y Y R I R K V K V E F  
387 tggcctgtctccccatcaccagggcgataggaggagtggtgctcc  
W P C S P I T Q G D R G V G S  
342 actgctgttattctagatgataactttgtaacaaaggccacagcc  
T A V I L D D N F V T K A T A  
297 ctaacctatgaccatattgtaactactcctccggcataacaatc  
L T Y D P Y V N Y S S R H T I  
252 ccccaacccttctcctaccactccggtacttcacacccaaacct  
P Q P F S Y H S R Y F T P K P  
207 gttcttgactccactattgattactccaaccaaataacaaaagg  
V L D S T I D Y F Q P N N K R  
162 aatcagctttggctgggctacaaacctctagaatgtggaccac  
N Q L W L R L Q T S R N V D H  
117 gtaggcctcgccactgcgttcgaaaacagtaaatacgaccaggac  
V G L A T A F E N S K Y D Q D  
72 tacaatatccgtgaacctgtatgtacaattcagagaatttaat  
Y N I R V T M Y V Q F R E F N  
27 cttaaagacccccacttaaacctaa l  
L K D P P L K P *
```

Figure 38

Histogramme portant sur la fréquence des acides aminés de l'ORF2 du CVP2 (IAF2897).

Histogramme obtenu par le logiciel d'analyse de séquence GenWorks. Cet histogramme représente la fréquence en pourcentage de chaque acide aminé contenu dans la protéine majeure de la nucléocapside du CVP2. Il permet de déceler des acides aminés qui sont les plus présents dans la protéine ORF2. En effet, il est possible de constater la présence dominante de l'acide aminé arginine (R), suivi par les acides aminés thréonine (T) et proline (P).

Histogramme des a.a. codées par l'ORF2 du CVP2

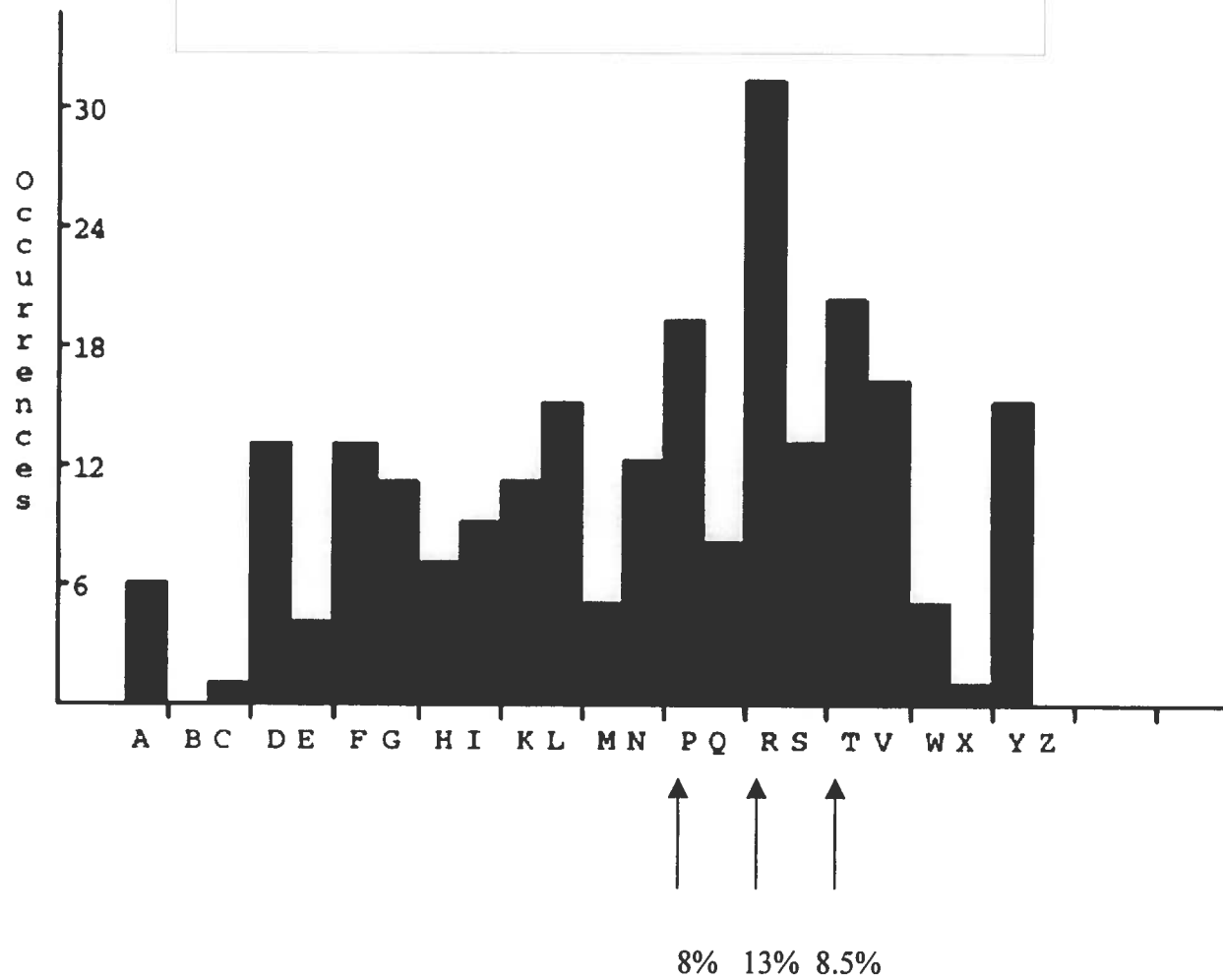


Tableau 13 Pourcentage de l'usage des codons dominants trouvés dans l'ORF2 du CVP2 et leur correspondance chez les bactéries Gram – et les mammifères.

			Occurrence		*
			ORF2	Gram (-)	Mammifères
Pro	8%	(CCC)	68%	13%	33%
Arg	13%	(AGG)	20%	3%	21.5%
		(AGA)	32%	4%	21%
Thr	8.5%	(ACA)	32%	11.5%	26.4%

* Tiré du *Current Protocols in Molecular Biology*, © 1990 John Wiley & Sons, Inc.

(voir annexe 3)

contrôle du promoteur CMV, le vecteur de transfert d'adénovirus pAdCMV5 sous contrôle du promoteur CMV et enfin, le vecteur de transfert d'adénovirus pAdMLP5.His1.GFP sous contrôle du promoteur MLP. Leur rendement a été évalué en perspective d'une nouvelle stratégie pour produire l'ORF2

3.321 Analyse de l'expression transitoire de l'ORF2

La première tentative d'expression eucaryotique de l'ORF2 a été réalisée suite à la transfection des cellules 293A avec le plasmide recombinant pRc/CMV:ORF2. Comme le démontrent les résultats d'IFI à la **figure 39**, l'expression de la protéine codée par l'ORF2 du CVP2 a pu être obtenue suite à l'utilisation de ce système d'expression. Cependant, les résultats de cette expression transitoire de l'ORF2 dans les cellules 293A étaient relativement faibles.

La seconde tentative d'expression eucaryotique de l'ORF2 a été réalisée suite à la transfection des cellules 293A avec un des vecteurs de transfert utilisés pour la génération d'adénovirus recombinants. Comme l'indiquent les résultats de la **figure 40**, le niveau d'expression transitoire de l'ORF2 dans les cellules 293A obtenue à l'aide du plasmide recombinant pAdCMV:ORF2 était nettement supérieur au niveau d'expression obtenu avec le plasmide pRc/CMV:ORF2. De façon qualitative, il a été possible d'observer en IFI jusqu'à 30-35% des cellules du tapis cellulaire exprimant la protéine codée par l'ORF2. Les résultats d'IFI obtenus avec le plasmide recombinant pAdMLP-GFP:ORF2 étaient similaires à ceux obtenus avec le vecteur pAdCMV:ORF2. En outre, grâce à l'expression de la GFP, il a été possible de déceler le temps requis, soit 48 hrs post-transfection, pour atteindre le taux de transfection optimal, qualitativement estimé à environ 35-40% des cellules (**figure 41**).

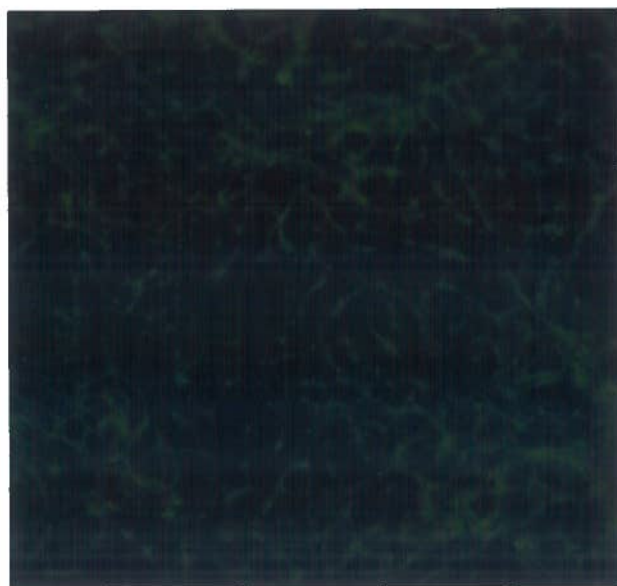
3.322 Construction d'un système adénovirus recombinant

La construction d'un adénovirus recombinant a été envisagée comme stratégie alternative à la production de la protéine codée par l'ORF2 du CVP2 (souche IAF2897)

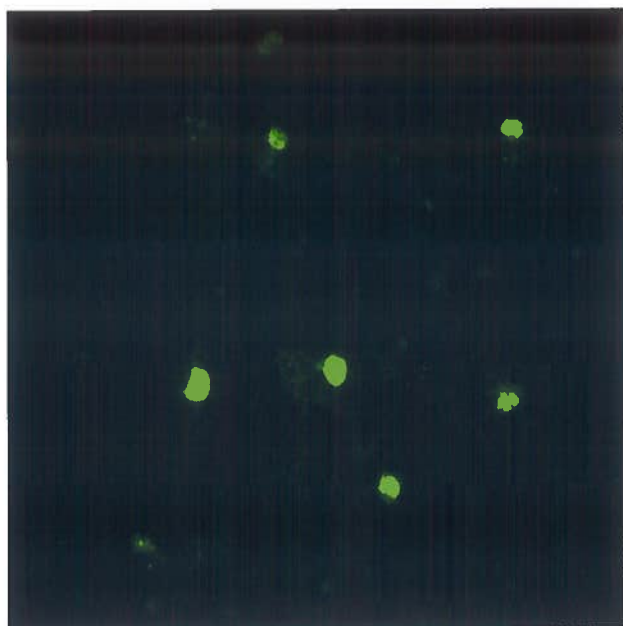
Figure 39

Expression transitoire de l'ORF2 du CVP2 dans les cellules 293A à partir du vecteur recombinant pRc/CMV:ORF2.

Résultats de l'expression transitoire de l'ORF2 du CVP2, obtenus suite à une épreuve d'IFI sur un feuillet cellulaire 293A transfecté avec le plasmide recombinant pRc/CMV:ORF2. Le test d'IFI s'est effectué à l'aide d'un pool de sérums de porcs convalescents obtenus d'une ferme chroniquement affectée par des problèmes de SDPS, puis la réaction Ag-Ac a été révélée suite à une seconde incubation en présence d'un conjugué FITC anti-IgG de porc. Le test d'IFI s'est effectué 48 heures post-transfection. Les cellules fluorescentes représentent celles qui expriment les protéines ORF2 du CVP2.



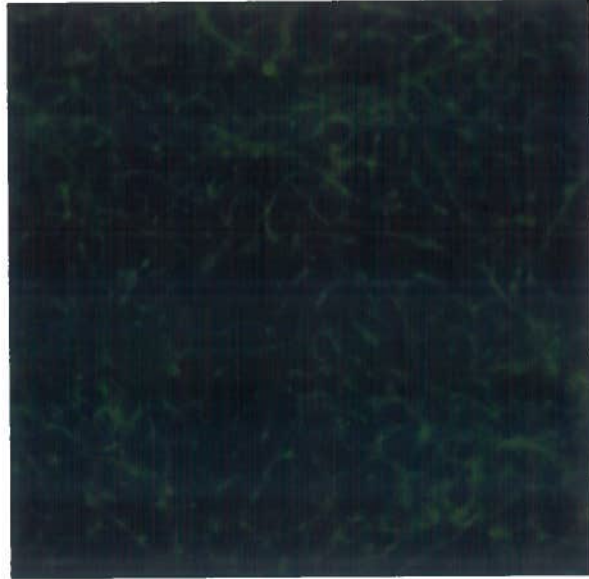
Témoin cellule 293A



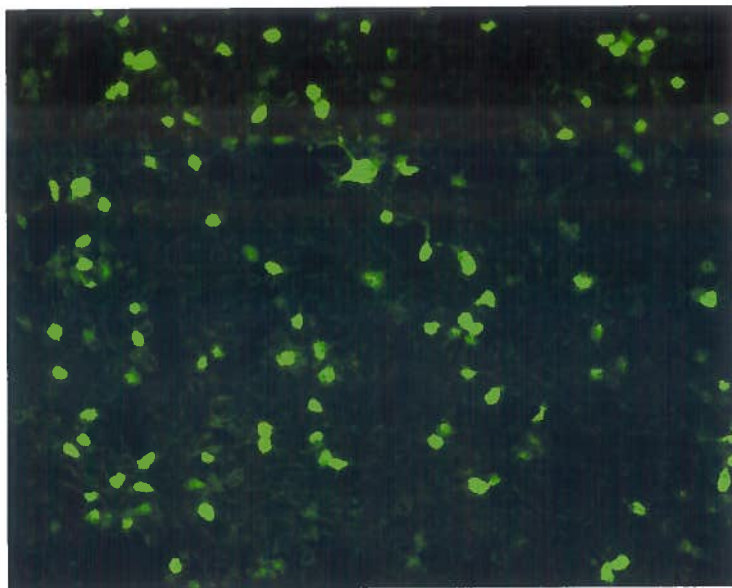
Cellules transfectées avec pRcCMV:ORF2

Figure 40**Expression transitoire de l'ORF2 du CVP2 dans les cellules 293A à partir des vecteurs de transfert d'adénovirus.**

Résultats de l'expression transitoire de l'ORF2 du CVP2, obtenus suite à une épreuve d'IFI sur un feuillet cellulaire 293A transfecté avec le plasmide recombinant pAdCMV:ORF2 ou pAdMLP-GFP:ORF2. Le test d'IFI s'est effectué à l'aide d'un pool de sérums de porcs convalescents obtenus d'une ferme chroniquement affectée par des problèmes de SDPS, puis les complexes immunologiques ont été révélées suite à une seconde incubation en présence d'un conjugué FITC anti-IgG de porc. Le test d'IFI s'est effectué 48 heures post-transfection. Les cellules fluorescentes représentent celles qui expriment les protéines ORF2 du CVP2.



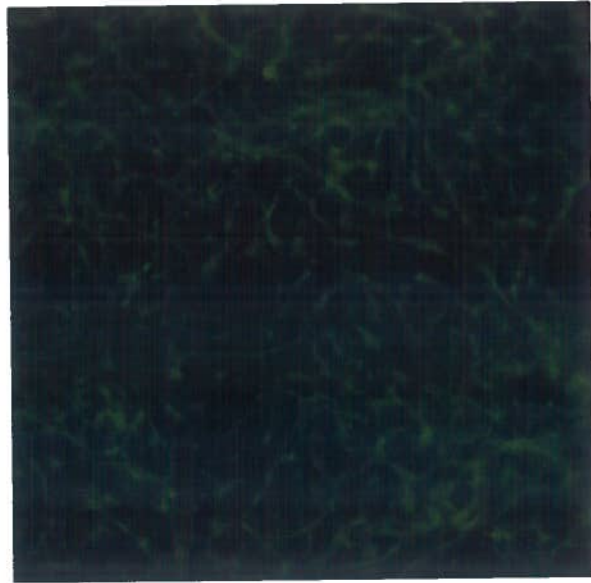
Témoin cellule 293A



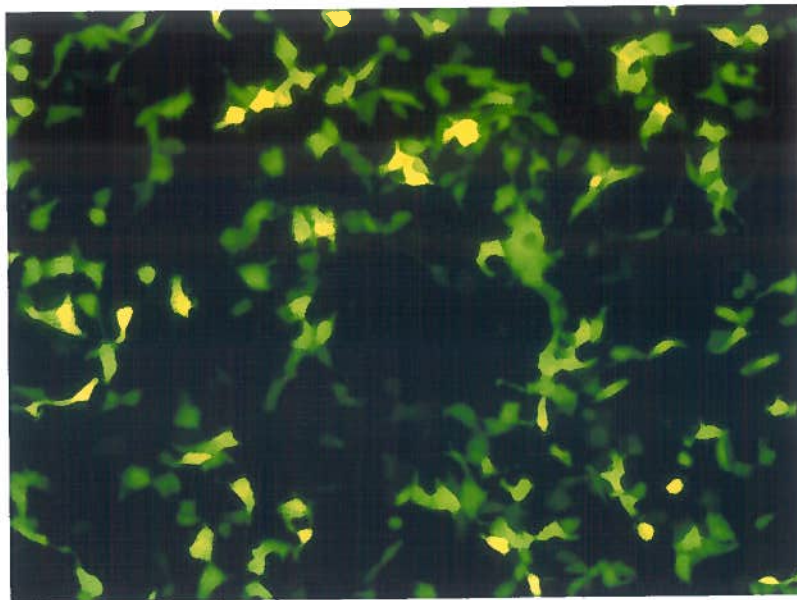
Cellules transfectées avec
pAdCMV:ORF2 ou pAdMLP-GFP:ORF2

Figure 41**Expression transitoire de la GFP dans les cellules 293A à partir du vecteur de transfert pAdMLP-GFP:ORF2.**

Résultats de l'expression transitoire de la GFP dans les cellules 293A transfectées avec le plasmide recombinant de transfert pAdMLP:ORF2. Ils ont été obtenus suite à l'observation des cellules vivantes au microscope à fluorescence. La fluorescence observée ici représente le taux de transfection atteint 48 heures post-transfection. Les cellules vivantes fluorescentes représentent celles qui expriment la protéine GFP suite à leur incorporation du vecteur recombinant.



Témoin cellule 293A



Cellules transfectées avec pAdMLP-GFP:ORF2

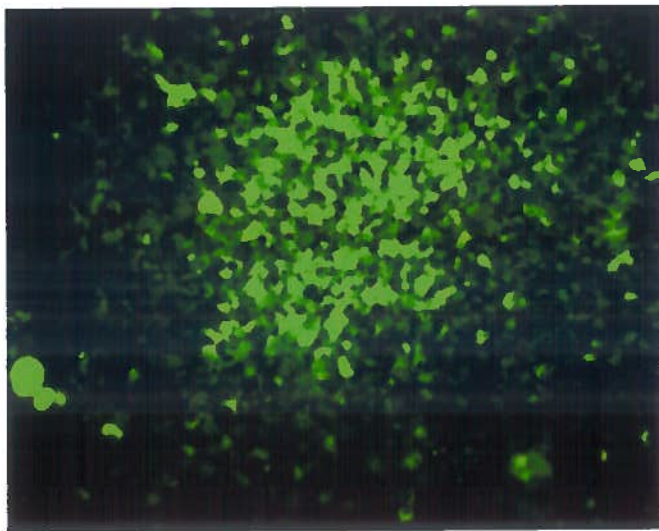
chez *E. coli*, compte tenu du haut taux d'expression de l'ORF2 dans les cellules 293A transfectées par les vecteurs de transfert d'adénovirus utilisés précédemment. Les adénovirus recombinants ont été obtenus par recombinaison homologue, suite à la co-transfection des cellules 293A avec le plasmide recombinant pAdMLP-GFP:ORF2 et le long bras de l'ADN génomique de l'Ad5 Δ E1/ Δ E3. À l'intérieur des deux semaines d'incubation, il a été possible de détecter 3 plages virales fluorescentes, caractéristiques de l'effet cytopathique produit par la multiplication massive des adénovirus recombinants. L'effet cytopathique qui a été observée était caractérisée par un arrondissement des cellules infectées et la formation de plages de cellules surconfluentes. Cependant, les plages virales étaient facilement distinguables au microscope à fluorescence étant donné la co-expression de la GFP (**figure 42**). Enfin, l'amplification et la purification du virus recombinant n'ont pu être réalisées en raison du manque de temps.

3.323 Analyse de l'expression des protéines virales du CVP2

Le but de l'analyse consistait à déterminer le poids moléculaire de la protéine codée par l'ORF2 du CVP2. Pour ce faire, les cellules 293A ont été transfectées avec le plasmide recombinant pAdMLP.GFP:ORF2, puis soumises à un radiomarquage métabolique pour une durée moyenne de 4-5 hrs. Des échantillons des cultures cellulaires ont été lysés après 24 hrs, alors que d'autres n'ont été lysés qu'après 48 hrs. La détection de l'ORF2 dans les lysats cellulaires a été effectuée par la technique de RIPA, à l'aide du sérum de porc anti-CVP2. Les résultats de l'expression transitoire dans les cellules 293A n'ont pas abouti à l'identification de la protéine virale ORF2. En effet, aucune bande d'environ 28 kDa n'a pu être observée par fluorographie ni à 24 hrs et ni à 48 hrs post-transfection. Par contre, il a été possible d'observer au microscope à fluorescence le même taux de transfection que dans les expériences précédentes, soit qualitativement d'environ 30 et 40% des cellules après 24 hrs et à 48 hrs post-transfection, respectivement.

Figure 42**Détection d'une plaque virale de l'adénovirus recombinant pAdORF2.**

Résultat observé au microscope à fluorescence une semaine après avoir co-transfecté le plasmide recombinant de transfert pAdMLP-GFP:ORF2 avec le long bras d'ADN Ad5 Δ E1/ Δ E3 dans les cellules 293A. La plaque virale détectée ici émet une fluorescence due à la présence du gène reporteur GFP qui est exprimé par le virus recombinant pAdORF2.



Plage d'adénovirus recombinant pAdORF2

Dans cette même étude, des cultures de cellules PK-15A ont été infectées avec le surnageant infectieux de l'isolat IAF2897. Après une incubation de 30 min en présence de 200 mM de D-glucosamine, les cultures ont été soumises à un radiomarquage métabolique et à une lyse cellulaire sous les mêmes conditions que les cultures 293A. Il a été possible de mettre en évidence l'expression de la protéine codée par l'ORF2 par RIPA à partir des lysats de cellules infectées. En effet, il a été possible de caractériser, suite à une autoradiographie, une protéine virale d'un poids moléculaire légèrement inférieur à 30 kDa (**figure 43**). En comparant ces lysats à ceux des cellules contrôles, soit les lysats des cellules PK-15A non infectées immunoprécipités avec le sérum de porc séropositif et les lysats de cellules PK-15A infectées immunoprécipités avec le sérum de porc séro négatif, une bande d'environ 28 kDa a pu être observée, correspondant au poids moléculaire estimé de la protéine codée par l'ORF2 du CVP2.

Dans une expérience ultérieure visant à étudier les effets de l'expression de l'ORF2 du CVP2 dans les cellules de porc PK-15A, des feuillets cellulaires PK-15A confluents à 50-70 % ont été transfectés avec 3 µg et 5 µg du plasmide recombinant pRc/CMV:ORF2. Après 24 hrs d'incubation, il a été possible d'observer davantage de cellules mortes ayant été éliminées dans le milieu extracellulaire et ce phénomène était plus évident dans les cultures transfectées avec 5 µg d'ADN. La mort cellulaire s'accroissait davantage après 48 hrs, la proportion de cellules en suspension dans les cultures transfectées avec 5 µg d'ADN recombinant étant la plus élevée. Par contre, peu de cellules mortes ont été observées dans les cultures contrôles transfectées avec le plasmide non transformé (pRc/CMV2) ou traitées avec la solution de liposomes "Fugene 6" seulement.

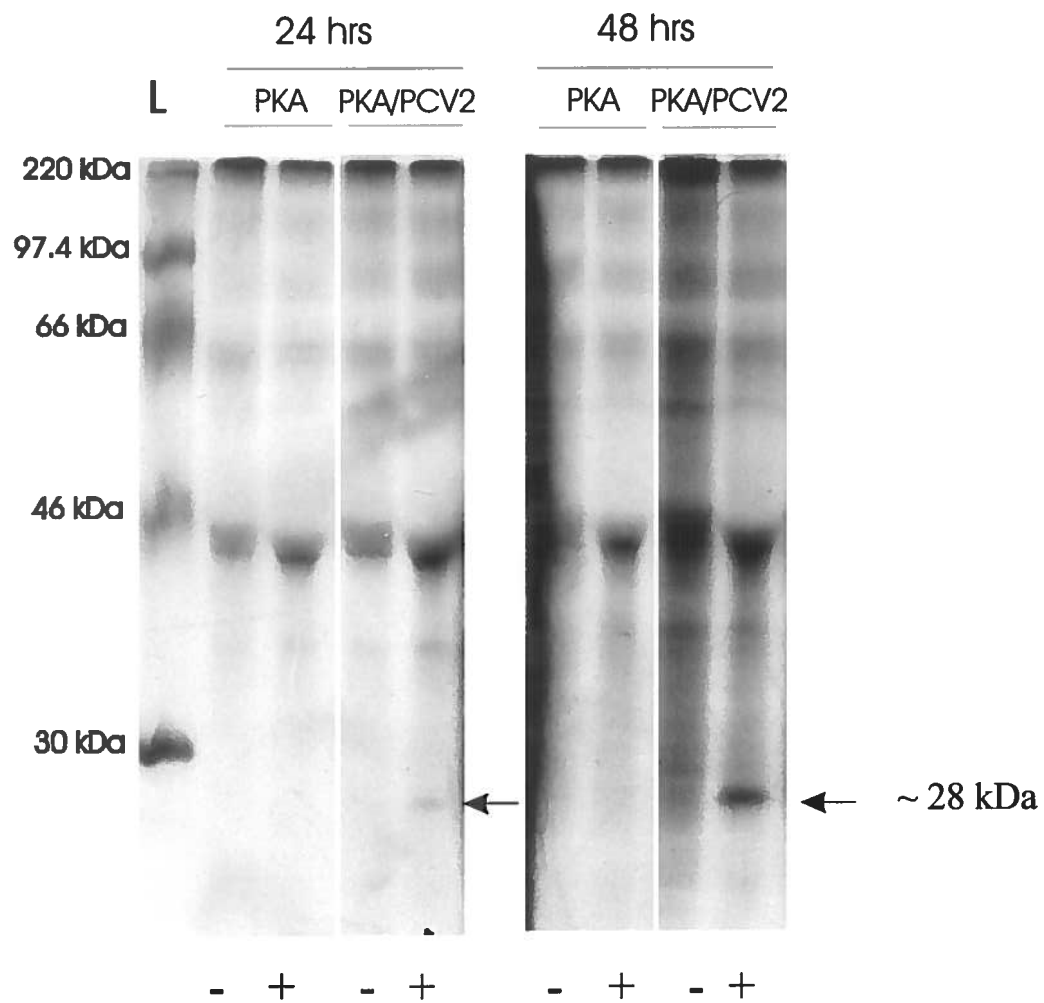
3.33 Production d'anticorps

L'un des objectifs de ce dernier volet visait la production d'antisérums polyclonaux contre la souche apathogène (CVP1), par l'immunisation conventionnelle des souris Balb/c, avec la suspension de CVP1 purifiée. Un autre objectif consistait en la production d'antisérums polyclonaux contre la souche pathogène (CVP2) suite à l'immunisation

Figure 43**Détection de l'expression de l'ORF2 du CVP2 dans les cellules PK-15A par la technique de RIPA.**

Résultats de RIPA obtenus à partir de cellules PK-15A infectées avec un surnageant infectieux du CVP2-IAF2897 et traitées à la glucosamine 12 heures post-infection (PKA/CVP2). Les cellules PK-15A saines ont été utilisées comme contrôle négatif (PKA). Après avoir soumis les cultures infectées à un radiomarquage et à une immunoprécipitation, les échantillons de 24 et 48 heures ont été migrés sur un gel de polyacrylamide de 12%. La mise en évidence de l'expression de l'ORF2 du CVP2 a été réalisée suite à une autoradiographie. À l'aide du sérum de porc positif (+), il a été possible d'observer dans les échantillons PKA/CVP2 de 24 heures une légère bande de poids moléculaire légèrement inférieure à 30 kDa qui est d'autant plus évidente dans les échantillons PKA/CVP2 de 48 heures. Aucune bande similaire n'est décelée dans les mêmes échantillons à l'aide du sérum de porc négatif (-).

Détection de l'ORF2 du CVP2 par la technique RIPA



- : sérum porc CVP négatif

+ : sérum porc CVP positif

génétique de souris Balb/c et C3H et de jeunes porcelets avec un mélange d'ADN recombinant exprimant le gène de l'ORF2 du CVP2 (isolat IAF2897).

3.331 Évaluation des antisérums murins produits contre le CVP1

Des souris Balb/c ont été immunisées une première fois avec une suspension du CVP1 homogénéisée dans un volume égal d'adjuvant complet de Freund et, une seconde fois, avec la même suspension virale dans de l'adjuvant incomplet de Freund. La production d'anticorps par les 3 souris a été évaluée en IFI à partir de la dilution 1/100 des sérums récoltés (poolés ensemble après chaque saignée) sur des feuillets de cellules PK-15 (exprimant les antigènes du CVP1). Les sérums de souris non immunisées ont également été mis en contact avec les antigènes du CVP1 présentés par les cellules PK-15. La spécificité des sérums a été évaluée par la même technique sur des feuillets PK-15A contrôles et infectés avec du CVP2. Les résultats des tests d'IFI sont rapportés dans le **tableau 14**. Il est possible de constater que les trois récoltes de sérum ont réagi positivement avec les antigènes du CVP1 exprimés dans les cellules PK-15, mais ont réagi négativement avec les cellules PK-15A contrôles et PK-15A infectées avec du CVP2.

3.332 Évaluation des antisérums murins et porcins produits contre le CVP2

Deux groupes de 3 souris Balb/c et 3 souris C3H ont été immunisés à plusieurs reprises. La première injection fut réalisée avec un mélange d'ADN contenant un plasmide/ORF2, des séquences motifs CpGs et le poloxamère Sp1017. La deuxième injection a été effectuée au début de la troisième semaine avec une préparation contenant un plasmide recombinant additionnel. Finalement, la dernière injection eut lieu à la 21^e semaine et fut réalisée avec une suspension purifiée du CVP2. Au total, six récoltes de sérum ont été effectuées dans l'intervalle de 2 à 4 semaines. Les sérums des deux groupes de souris ont été évalués en IFI à partir des dilutions sérielles (1/16-1/128) sur des feuillets cellulaires PK-15A infectées par le CVP2. Leur spécificité a été évaluée sur des feuillets de cellules PK-15A contrôles. Quant aux sérums prélevés chez les souris Balb/c

Tableau 14 Réactivité des sérums de souris Balb/c immunisées avec du CVP1 sur des feuillets de cellules présentant diverses sources d'antigènes.

Sérums Balb/c	Sources d'antigènes		
	PK-15A	PK-15	PK-15A/CVP2
Non immunisé	-	-	-
1 ^{er} Récolte ¹	-	+	-
2 ^e Récolte ²	-	+	-
3 ^e Récolte	-	+	-

1. Récolté 2 semaines suivant la première immunisation.

2. Récolté 2 semaines suivant la dose de rappel.

non immunisées, ils se sont avérés négatifs dans les épreuves d'IFI. Les résultats des tests IFI réalisés à partir des six récoltes de sérum se sont avérés négatifs, sauf dans le cas d'une souris Balb/c qui succomba à la 5^e récolte et dont le sérum s'était avéré positif.

Trois porcelets ont été immunisés sur une période d'un peu plus de 8 semaines et reçurent simultanément deux doses identiques d'un mélange d'ADN recombinant (deux plasmides/ORF2), des séquences CpGs hypométhylés et le poloxamère Sp1017. Puis, une dose de rappel, consistant en une suspension du CVP2 purifiée, a été injectée aux sujets à la 11^e semaine d'âge. Au total, six récoltes de sérum ont été effectuées dans un intervalle de 2 semaines. La production d'anticorps anti-ORF2 par les porcelets a été évaluée en IFI à partir des dilutions sérielles (1/16-1/512) sur des feuillets de cellules PK-15A infectées par du CVP2. Le sérum prélevé d'un porcelet non immunisé a été utilisé comme contrôle négatif dans les tests d'IFI. La spécificité des sérums porcins hyperimmuns a été évaluée sur des feuillets de cellules PK-15A contrôles et PK-15 conventionnelles (porteuses du CPV1). Le **tableau 15** résume les résultats des tests d'IFI. Ceux-ci ne concernent que 2 porcelets, sachant que le troisième, ayant perdu son étiquette d'identification, n'a pas compté parmi les sujets expérimentaux. Tout d'abord, il est à noter que de la 1^{ère} à la 4^e récolte suite à la première injection d'ADN recombinant, aucun porcelet n'a répondu positivement à l'immunisation génétique. Ce n'est qu'à partir de la 5^e récolte et suite à la deuxième injection d'ADN recombinant que les porcelets ont commencé à réagir de façon positive. Leur réactivité aux antigènes du CVP2 s'accroît à la 6^e récolte et suite à l'injection de rappel avec du virus purifié.

Il était possible d'observer une fluorescence nucléaire positive dans les cellules infectées par le CPV2 en utilisant une dilution de 1/250 des antisérums porcins. Par contre, lorsque les antisérums porcins étaient utilisés à une dilution de 1/128, une faible réaction croisée avec les antigènes du CVP1 était également décelée par IFI.

Tableau 15 Réactivité des sérums de porcs, immunisés génétiquement avec les plasmides pRc/CMV:ORF2 et pAdCMV:ORF2, sur des cellules PK-15 et PK-15A infectées par du CVP 2.

Sérums Porcins	Sources d'antigènes		
	PK-15A	PK-15	PK-15A/CVP2
Non immunisé	-	N/A	-
1 ^{er} Récolte	-	N/A	-
2 ^e Récolte	-	N/A	-
3 ^e Récolte	-	N/A	-
4 ^e Récolte	-	N/A	-
5 ^e Récolte ¹	-	N/A	2/2
6 ^e Récolte ²	-	2/2 F	2/2

3. Récolté 2 semaines suivant la deuxième immunisation.

4. Récolté 2 semaines suivant la dose de rappel avec 50 µl de 10⁸ particules/ml du CVP2.

F: Réponse faible (☐ 1/128).

N/A: non applicable

3.4 Discussion

La première série de résultats enregistrés au niveau du troisième volet sont en regard du clonage et à l'expression de la protéine majeure de la nucléocapside du CVP2 (isolat IAF2897), dans les bactéries *E. coli*. Malgré les différentes stratégies préconisées, aucune ne s'est révélée adéquate pour l'expression de la protéine recombinante, en dépit des efforts déployés afin d'optimiser les principaux paramètres à envisager pour une expression optimale dans *E. coli*.

Le premier système d'expression à être utilisé fut le système de fusion de la protéine recombinante à la GST. Celui-ci devait théoriquement produire la protéine de fusion GST-ORF2 de poids moléculaire d'environ 57 kDa (à raison de 29 kDa pour GST et 28 kDa pour l'ORF2), à partir du vecteur recombinant pGEX:ORF2 dans les souches d'*E. coli* BL21. Les résultats obtenus par SDS-PAGE, suivie d'une coloration au bleu de Coomassie ou d'une révélation immunologique par immunobuvardage (**figure 33**), n'ont pas permis de révéler une bande protéique ayant le poids moléculaire attendu. Pourtant, et à l'appui des résultats de séquençage, le gène ORF2 avait bien été cloné au complet et dans le bon cadre de lecture (**figure 36**). Ce qui conduisit à déduire que l'expression d'une protéine ORF2 fusionnée à une autre (e.g. la GST), ne s'avérait pas réalisable. L'une des raisons serait la production de protéine de fusion instable et par conséquent sujette à une dégradation protéolytique.

Le gène de l'ORF2 a donc été cloné dans un second vecteur d'expression, soit le plasmide pRSET. Contrairement au système pGEX:ORF2, le système d'expression pREST:ORF2 avait pour finalité la production de la protéine ORF2 sous une forme quasi-native, caractérisée par la liaison de son extrémité N-terminale à une simple queue de six résidus histidine. L'expression de la protéine virale, à partir du vecteur pREST:ORF2 a aussi été réalisée dans la même souche d'*E. coli*, que dans le système pGEX, soit *E. coli* BL21. Malgré tout, les résultats négatifs obtenus (**figure 35**) suggèrent que le problème précédemment rencontré ne résidait pas dans la production d'une protéine de fusion instable. En effet, aucune bande protéique correspondant au poids

moléculaire estimé à environ 31 kDa n'a pu être observée en utilisant ce système d'expression malgré que les résultats de séquençage ont démontré que le transgène avait été correctement inséré dans le plasmide. (**figure 36**). Ce qui permet de suspecter que l'origine du problème ne résidait pas dans le type du vecteur d'expression, mais plutôt avec la souche-hôte.

En suivant ce raisonnement, le dernier système d'expression mis à l'épreuve fut le vecteur recombinant pMAL:ORF2. Contrairement aux systèmes précédents, la souche DH11S de *E. coli* fut utilisée en tant que bactérie-hôte d'un génotype différent. Comme dans les expériences antécédentes, les mêmes paramètres ont été expérimentés. Une fois de plus, la bande protéique attendue, correspondant à la protéine de fusion MBP-ORF2 d'environ 71 kDa (43 kDa pour MBP et 28 kDa pour l'ORF2), n'a pu être observée par SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie (**figure 34**). Enfin, en raison de l'absence de vérification par séquençage du clonage de l'ORF2 dans le vecteur pMAL-c2e, aucune explication concluante n'a pu être émise en réponse à l'absence d'expression de la protéine recherchée. Quoi qu'il en soit, en examinant de façon récapitulative les résultats obtenus par les différentes stratégies de production de la protéine ORF2 chez *E. coli*, la poursuite de l'expression de l'ORF2, à partir du système pMAL:ORF2, s'est avérée inutile.

Puisque les analyses de séquençage suggéraient que le problème ne résidait pas dans une mauvaise construction du vecteur d'expression et n'était pas d'ordre technique, nous avons considéré la possibilité que le problème était de nature intrinsèque et probablement généré par un facteur génétique prédisposant la protéine virale à ne pas s'exprimer dans les bactéries. En suivant ce raisonnement, des études ont été entreprises pour l'analyse de la composition en acides aminés de la protéine de la nucléocapside de l'isolat IAF2897 du CVP2. Parallèlement à ces études, des expériences sur l'expression transitoire de l'ORF2, à partir du vecteur d'expression eucaryotique pRc/CMV:ORF2, avaient été tentées dans les cellules 293A. Les résultats préliminaires de ces expériences se sont avérés positifs et ont davantage renforcé le bien-fondé de l'hypothèse d'une restriction génétique.

L'analyse de la séquence d'acides aminés de la protéine de la nucléocapside du CVP2 a démontré qu'elle est constituée majoritairement d'arginine (13%) et, à des concentrations moins élevées, de thréonine (8.5%) et de proline (8%) (**figure 38**). Par ailleurs, la forte teneur en acides aminés hydrophiles (e.g.: arginine) suggère qu'une grande partie de la protéine est exposée à la surface du virion, ce qui corrobore sa fonction structurale. L'analyse de la fréquence des codons utilisés pour la traduction des trois acides aminés prédominants a été faite. Après identification, les codons les plus communément utilisés pour le codage des acides aminés Arg: (AGG et AGA), Pro (CCC), et Thr (ACA et ACT) ont été confrontés à la charte d'usage de ces codons par divers organismes (**Annexe 3**; Ausubel *et al.*, 1992). Celle-ci a permis de comparer la fréquence de leur utilisation dans les bactéries Gram- versus les organismes eucaryotes (**tableau 13**).

En se basant sur cette charte, il a été possible de constater que les codons prédominants dans l'ORF2 du CVP2, particulièrement ceux codant pour l'arginine, sont très faiblement utilisés par *E. coli*, eu égard à leur rareté, soit 3.2% pour AGG et 4.3% pour AGA. À eux seuls, les codons AGA, AGG représentent 52% des codons correspondant à l'arginine et 7% (16/233) de la globalité des codons du gène ORF2. De plus, les codons de l'arginine se retrouvent en forte concentration au niveau de l'extrémité N-terminale de l'ORF2. D'autre part, il a été constaté, à la lumière de la charte précitée, que la fréquence des mêmes codons est plus élevée chez les eucaryotes, soit 21.5% pour AGG et 21% pour AGA (**tableau 13**). Ces observations pourraient justifier notre incapacité à produire la protéine virale dans *E. coli*, ne serait-ce que sous une forme tronquée et expliquent en outre, la mise en évidence par IFI de l'expression de l'ORF2 dans les cellules eucaryotes 293A, à partir du vecteur d'expression pRc/CMV:ORF2.

Toutefois, la découverte des codons rares utilisés par *E. coli* en regard à leur fréquence moyenne chez les eucaryotes a été rapportée par certains auteurs (Goldman et Zubay, 1994, Schenk *et al.*, 1995, You *et al.*, 1999). Parmi eux, quelques-uns sont parvenus à expliquer l'absence d'expression des protéines désirées (dont les codons AGA/AGG

représentaient de 1.8 à 7.8% du nombre total des codons des gènes homologues) dans la bactérie *E. coli* (Schenk *et al.*, 1995) en accord avec les résultats obtenus pour le produit de l'ORF2 du CVP2, tandis que d'autres, ont abouti à une faible expression de la protéine recherchée, associée à une mauvaise incorporation d'acides aminés, soit une lysine au lieu d'une arginine dans la protéine désirée (You *et al.*, 1999). De plus, en procurant à la bactérie le gène *argU*, codant pour l'ARNt_{UCU}^{Arg}, ces auteurs sont parvenus à améliorer de façon significative la production de leur protéine recombinante, en partie constituée par le codon rare AGA.

Quoi qu'il en soit, après avoir pris conscience de l'impossibilité de produire la protéine majeure de la nucléocapside du CVP2 chez *E. coli*, d'autres stratégies ont été considérées, notamment le clonage du gène dans des vecteurs eucaryotes et l'expression de la protéine virale ORF2 du CVP2 dans les cellules de mammifères. Pour ce faire, deux systèmes eucaryotiques aux caractéristiques bien distinctes ont été utilisés. Le premier système permet d'exprimer de façon transitoire ou stable la protéine recombinante. Le deuxième système utilisé consistait au clonage du transgène dans des vecteurs de transfert à des fins d'expression transitoire ou pour la génération d'adénovirus recombinants.

Comme il a été mentionné plus-haut, l'expression de l'ORF2 du CVP2 a finalement été réalisée, à l'aide du système pRc/CMV2, suite à la transfection des cellules 293A avec le plasmide recombinant (**figure 39**). Cependant, le taux d'expression de l'ORF2 obtenu par ce système, s'est avéré relativement faible. Cela pourrait s'expliquer par la faible compatibilité du plasmide avec les cellules-hôtes. En effet, le plasmide pRc/CMV2 contient une origine de réplication du SV40 et un promoteur SV40. En étant transfecté dans des cellules transformées par l'antigène T du SV40, et sous l'effet de ce dernier, ce plasmide est en mesure de se répliquer plus efficacement et d'exprimer la protéine recherchée. Or, dans l'expérience effectuée l'expression de la protéine ORF2, transcrite par pRc/CMV:ORF2, a été tentée dans les cellules 293A transformées par le gène E1 de l'adénovirus 5 et non avec l'antigène T du SV40. Ainsi, pour optimiser les conditions d'expression de l'ORF2 en expression transitoire, il serait plus recommandable d'utiliser le vecteur recombinant pRc/CMV:ORF2 avec les cellules COS.

Après avoir démontré que l'expression de l'ORF2 n'était possible que dans des cellules eucaryotes, deux approches furent préconisées pour la production d'anticorps spécifiques au CVP2 : la première consista en la construction d'un adénovirus recombinant, et la seconde approche considérée fut l'immunisation génétique. Bien que le niveau d'expression du système adénovirus soit plus bas que celui des systèmes d'expression procaryotes inductibles, certains avantages lui sont néanmoins reconnus. En effet, contrairement aux systèmes procaryotes, les adénovirus recombinants permettent d'exprimer la protéine recombinante sous sa forme native, en la soumettant à des modifications post-traductionnelles (particulièrement la N-glycosylation) tout en préservant la conformation de la protéine native (Fernandez et Hoeffler, 1999).

Pour la génération d'adénovirus recombinants, l'efficacité des vecteurs de transfert utilisés pour le clonage de la protéine de la nucléocapside du CVP2 fut évaluée par des expériences d'expression transitoire dans les cellules 293A. Les résultats obtenus en IFI à partir des systèmes d'expression pAdCMV:ORF2 et pAdMLP:ORF2 ont surpassé largement les résultats obtenus avec le vecteur pRc/CMV:ORF2, puisque de 30 à 35% des cellules exprimaient le produit de l'ORF2 (**figure 40**). Considérant le système pAdMLP:ORF2, il a été possible, grâce au gène rapporteur (GFP), de déterminer la période d'incubation nécessaire pour obtenir le taux optimal de transfection, soit 48 hrs pour un taux de transfection de 35-40% des cellules (**figure 41**). De ce taux, seulement 85 à 88% des cellules exprimaient réellement la protéine de la nucléocapside du CVP2. Les raisons qui justifient que 12 à 15% de ces cellules n'aient pas permis l'expression de la protéine virale, sont multiples. Il est possible qu'elles représentent une proportion de cellules mortes, émettant de la fluorescence résiduelle et menant à une surestimation de l'expression de l'ORF2. Il est également possible qu'une proportion de cellules exprimant l'ORF2 aient perdu leur adhérence suite à leur fixation dans une solution de 1:1 acétone/méthanol, ce qui aurait engendré une perte de cellules représentatives.

Quoi qu'il en soit, la nette supériorité du système d'expression d'adénovirus peut s'expliquer, entr'autre par la forte compatibilité des vecteurs adénovirus défectifs pour la

réplication avec la lignée cellulaire 293A complétant les fonctions de la région E1. En effet, les cellules 293A ont été transformées avec le gène E1 de l'adénovirus type 5. Celui-ci provient du même type d'adénovirus que les composantes cruciales de ces vecteurs (les promoteurs CMV5 et MLP5, séquences amplificatrices ou enhancers, l'origine de réplication ITR). De plus, le taux d'expression très élevé atteint par ce système est probablement dû aussi à la présence des 3 séquences enhancers. Contrairement au système pRc/CMV2 qui n'en contient qu'une seule, intégrée au promoteur CMV.

Pour des raisons pratiques, la construction de l'adénovirus recombinant a été entreprise à partir du vecteur de transfert pAdMLP:ORF2. Ce dernier permet d'une part, de suivre l'expression de l'ORF2 *in vivo*, grâce à l'expression simultanée du gène rapporteur GFP, et d'autre part, grâce à la queue de 6 résidus histidine fusionnée à l'extrémité N-terminale de l'ORF2, facilite la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel. Ainsi, après avoir démontré, en expression transitoire dans les cellules 293A, l'expression de l'ORF2 du CVP2 à partir du plasmide recombinant pAdMLP:ORF2, une recombinaison homologue *in vivo* entre ce vecteur de transfert recombinant (linéarisé avec *Clal*) et le long bras d'ADN Ad5ΔE1ΔE3 (linéarisé avec *Clal*) a été effectué dans le même type de cellules. Les adénovirus recombinants qui ont été produits par cette co-transfection furent sélectionnés selon leur capacité à exprimer la protéine du gène rapporteur GFP (conjointement avec l'ORF2) et à se répliquer (formation de plages). Cependant, il a semblé plus difficile d'observer les plages de virus recombinant au microscope optique que d'identifier les plages fluorescentes au microscope à fluorescence. En effet, grâce à l'expression de la GFP, il a été possible de distinguer au microscope à fluorescence les plages produites par le virus recombinant de celles produites par le virus du type sauvage.

En utilisant environ 3 µg de chaque type d'ADN (plasmide recombinant et long bras de l'Ad5), il n'a été possible d'obtenir par recombinaison homologue que 3 plages de virus recombinants (**figure 42**). La très faible quantité de plages de virus recombinants obtenues peut être d'origine multiple. Il est probable que la digestion enzymatique

partielle du vecteur de transfert soit à l'origine du faible nombre de plages de virus recombinants obtenues. De plus, une digestion incomplète de l'ADN du long bras d'adénovirus pourrait être aussi responsable de faux positifs lors du criblage de plages de virus recombinants. D'autre part, il est aussi possible que la quantité d'ADN utilisée pour la co-transfection était insuffisante pour obtenir un rendement optimal. De plus, des 3 µg de chaque ADN utilisés, une certaine proportion des molécules d'ADN avaient été digérées partiellement.

Toutefois, à défaut de temps suffisant, il n'a pas été possible de purifier les trois clones d'adénovirus recombinants par la technique de plages ("plaque assay"). Ce qui n'a pas permis de réaliser les objectifs fixés avant d'entreprendre la construction d'adénovirus recombinants, soient : 1) la préparations de stocks de la nucléoprotéine du CVP2 suite à l'infection des cultures de cellules 293A avec un adénovirus recombinant purifié; la purification de la protéine recombinante par chromatographie d'affinité et, 3) la production d'antisérums polyclonaux suite à l'injection de la nucléoprotéine purifiée aux souris Balb/c. La dernière série de résultats obtenus est en regard de l'immunisation de souris et porcelets SPF pour la production d'antisérums polyclonaux spécifiques à chacun des deux variants de CVP, pathogène et non-pathogène. Concernant la souche pathogène, l'immunisation génétique a servi d'alternative à l'utilisation du système d'adénovirus recombinant, pour la production d'anticorps contre le CVP2. L'immunisation conventionnelle a été utilisée pour produire les antisérums contre le CVP1. Finalement, les antisérums produits par les deux différentes procédures d'immunisation ont été évalués par des tests d'IFI.

L'immunisation génétique utilisant un mélange d'ADN recombinant visait dans un premier temps deux groupes de souris (Balb/c et C3H) et dans un autre, un groupe de porcelets. Toutefois, elle s'est avérée négative dans le cas des deux groupes de souris, à l'exception d'une souris Balb/c dont le sérum de la 5^e récolte commençait à réagir contre les antigènes du CVP2 mais dont la mort a interrompu la poursuite de l'investigation.

En revanche, l'immunisation génétique de deux porcelets a été un succès (**tableau 15**). Les résultats d'IFI ont révélé qu'à partir de la cinquième saignée (10^e semaine), les deux porcelets présentaient des titres en anticorps contre les antigènes du CVP2. À la sixième saignée (12^e semaine) et suite à une injection de rappel avec l'inoculum de CVP2, la réponse immunologique aux antigènes du CVP2 s'est avérée plus intense. Il semble donc que l'immunisation génétique à l'aide des plasmides recombinants utilisés aient été au moins suffisante pour stimuler ou établir une mémoire immunologique chez les animaux, d'où une réponse anamnétique était rapidement stimulée chez les animaux immunisés ayant reçu une injection de virus pur. D'autre part, la détection des anticorps anti-CVP2 par la technique IFI n'était probablement pas assez sensible pour la détection d'une réponse immune précoce. Plusieurs auteurs préconisent la technique d'immunobuvardage pour le suivi des animaux immunisés génétiquement, puisqu'une réponse TH1 peut plutôt être favorisée, d'où les faibles titres en anticorps de type IgG1.

Les résultats d'IFI ont aussi permis de révéler qu'à la dilution 1/250 une réponse plus spécifique au CVP2 était observée, tandis qu'à une dilution inférieure une réactivité de l'antisérum contre le CVP1 pouvait être décelée (**tableau 15**). Ce qui signifie qu'à de faibles dilutions, les anticorps produits chez les porcs démontraient une réactivité plus spécifique à la souche homologue et la réaction croisée entre les CVP1 et CVP2 n'était pas détectable. Les antisérums polyclonaux étaient donc enrichis en anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques spécifiques au CVP2. D'autre part, il aurait été intéressant d'évaluer la réactivité de ces antisérums polyclonaux porcins contre la protéine ORF2 purifiée. Pour évaluer leur spécificité, il aurait été plus adéquat d'effectuer des tests d'IFI sur des feuillettes cellulaires transfectés avec un vecteur recombinant exprimant l'ORF2. D'autres techniques pourraient être déployées pour confirmer les résultats des tests d'IFI, telle une épreuve d'immunobuvardage de type western.

L'immunisation conventionnelle des souris Balb/c avec un inoculum du CVP1 en présence d'adjuvant de Freund a permis de produire des antisérums polyclonaux ne réagissant en IFI que contre les cellules PK-15 conventionnelles, donc des antisérums ne réagissant que contre le CVP1 (**tableau 14**). Ce qui signifie que les antisérums

polyclonaux produits par immunisation conventionnelle des souris Balb/c se sont avérés spécifiques seulement à la souche non-pathogène du CVP, alors que le sérum de souris non immunisées n'avait démontré aucune réactivité contre les cellules PK-15.

Connaissant le degré d'homologie existant entre les deux souches, il est surprenant que les antisérums contre le CVP1 n'aient démontré aucune réaction croisée avec les antigènes du CVP2. Quoi qu'il en soit, les résultats d'IFI effectuée avec les antisérums produits contre CVP1 ont permis de démontrer, dans les élevages québécois, l'existence de deux souches distinctes de CVP et du même fait, confirmaient la première hypothèse de ce projet de recherche.

Conjointement aux objectifs visés dans ce volet, des expériences complémentaires ont aussi été réalisées dans le but de caractériser la protéine ORF2 du CVP2 et de tenter d'étudier sa fonction biologique. Dans une première expérience, des cultures de 293A avaient été transfectées avec le plasmide recombinant pAdMLP:ORF2 et soumises ensuite à une épreuve de RIPA. Les résultats de RIPA obtenus à partir des lysats de cellules exprimant de façon transitoire et préparés après 24 et 48 hrs n'ont pas permis de visualiser une bande protéique correspondant au poids moléculaire estimé de la protéine codée par l'ORF2, soit d'environ 28 kDa. Sachant que les protéines recombinantes produites en expression transitoire s'accumulent normalement en faible quantité dans les cellules transfectées, il est probable que les enzymes protéolytiques aient eu le temps de dégrader les protéines recombinantes. En effet, une fois la lyse effectuée, un grand nombre d'enzymes protéolytiques sont libérées et, possiblement comme chez *E. coli*, les premières protéines à avoir été dégradées par les protéases ont été celles qui étaient étrangères aux cellules 293A (Goldberg, 1972). Cependant, le fait que la lyse se soit déroulée à la température de la pièce au lieu d'être effectué à 0-4°C, pourrait également expliquer la rapidité du processus de dégradation protéolytique.

Dans une seconde expérience, des cultures de PK-15A ont été infectées par la souche CVP2 (isolat IAF2897) et traitées avec une solution de 200 mM de glucosamine. Puis, les lysats de cellules infectées préparés après 24 et 48 hrs, ainsi que les lysats de cellules

contrôles non infectées ont tous été soumis à une épreuve de RIPA en utilisant un sérum de porc négatif et un sérum de porc positif, provenant d'un animal chroniquement infecté par du CVP2. Suite à une autoradiographie, les résultats de RIPA se sont avérés négatifs dans les échantillons contrôles de même que les échantillons infectés avec le sérum négatif. Par contre, il a été possible de détecter avec le sérum positif, dans les lysats de cellules infectées et récoltées après 24 hrs, une faible bande d'environ 28 kDa. Cette bande, révélée par le même sérum, était d'autant plus volumineuse dans l'échantillon infecté préparé après 48 hrs (**figure 43**). Ce qui signifie qu'après 48 hrs, une plus grande quantité de protéines ORF2 était produite. Ce qui s'explique par le fait que le temps entre le traitement à la glucosamine et la lyse cellulaire était trop court dans le cas des lysats préparés après 24 hrs, pour permettre à la glucosamine d'induire la multiplication virale. Alors que dans le cas des lysats préparés après 48 hrs, cet interval de temps était suffisant pour permettre à la glucosamine d'exercer son action et ainsi, augmenter le nombre de particules virales et conséquemment la quantité de protéines ORF2 (voir section 2.34 du chapitre 2). Par ailleurs, le poids moléculaire de l'ORF2 du CVP2 obtenu (environ 28 kDa) par cette expérience corrobore celui déduit par la séquence d'acide nucléique de l'ORF2 du CVP2, à partir des programmes d'informatique d'analyse séquentielle d'ADN. Or, le poids moléculaire de la protéine ORF2 obtenu récemment par d'autres auteurs a été estimé plutôt à 30 kDa. Dans un cas, les auteurs ont produit une protéine de fusion (GST-ORF2) à l'aide d'un système d'expression baculovirus (Mahé *et al.*, 2000), tandis que dans l'autre cas, les auteurs l'ont produit sous forme de capsides vides auto-assemblées, à l'aide du même système d'expression eucaryote et dans les mêmes types de cellules d'insectes (Nawagitgul *et al.*, 2000).

De plus, il a été possible d'observer que l'infection des cultures PK-15A pour la détection de l'ORF2 était plus productive que leur simple transfection. En effet, suite à son infection, le virus peut se répliquer de façon autonome, grâce à sa réplicase (ORF1), et effectuer de nombreux cycles de réplication dans la cellule, ce qui va lui permettre de produire une grande quantité de protéines structurales (pour son encapsidation). Tandis que dans le cas d'une expression transitoire, le plasmide recombinant ne peut pas se

répliquer de façon autonome car il ne possède pas de réplicase, d'où la production de protéine recombinante limitée.

Malgré qu'il ait été possible de détecter la protéine majeure de la nucléocapside du CVP2 par RIPA à partir de cellules PK-15A infectées, il reste que ce système d'expression n'est pas le plus efficace. La production de l'ORF2, dans les cellules PK-15A infectées par du CVP2, est une approche donnant de faibles rendements, mais également complexe et très limitée, comparativement à l'infection des cellules 293A avec un adénovirus recombinant. Celui-ci ne requiert pas de traitement à la glucosamine et ne doit pas se répliquer exclusivement dans des cellules en division. La raison est qu'il possède des protéines précoces pour induire des conditions qui permettent la synthèse de son ADN dans des cellules en phase stationnaire. Le système d'expression adénovirus est reconnu pour la production de hauts titres viraux et peut donc efficacement servir de modèle d'expression pour étudier la fonction des protéines de virus dans les cellules infectées (Fernandez et Hoeffler, 1999). Il serait donc plus rentable de produire la protéine virale du CVP2 dans les cellules 293A, à l'aide de l'adénovirus recombinant purifié, construit à la section 3.322.

Dans le but d'essayer d'étudier la fonction de la protéine ORF2 du CVP2 dans des cellules d'origine porcine, des feuillettes cellulaires PK-15A ont été transfectés avec le vecteur d'expression pRc/CMV:ORF2. Malgré le faible rendement d'expression de ce système, il a été malgré tout possible d'observer un phénomène ne se produisant pas dans les feuillettes PK-15A contrôles (cellules transfectées avec plasmide natif ou seulement incubées avec la préparation liposomale). En effet, après 24 hrs, il était possible d'observer qualitativement, dans les échantillons transfectés avec 3 µg du plasmide recombinant, un début de mort cellulaire. Après 48 hrs, le phénomène était plus avancé. De plus, la quantité de cellules en suspension était plus marquée dans les échantillons transfectés avec 5 µg d'ADN recombinant. Ce qui suggère qu'à un certain niveau d'expression, la protéine ORF2 pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse (voir discussion sur les mécanismes d'ECP au chapitre 2). De plus, ce résultat suggère que la protéine ORF2 du CVP2 pourrait avoir une fonction apoptotique, tout comme la protéine

homologue du virus de l'anémie du poulet (CAV). En effet, une étude portant sur l'une des protéines du CAV, a démontré qu'elle a à elle seule la capacité d'induire l'apoptose dans des cellules mononucléaires (Noteborn *et al.*, 1994). Enfin, ces résultats préliminaires peuvent ouvrir la voie à de nouvelles investigations sur les fonctions possibles de la protéine ORF2 *in vitro*. Grâce à son efficacité, le système d'expression adénovirus recombinant pourrait représenter un modèle d'étude de choix en regard à ce sujet.

CONCLUSION

Inscrit dans le cadre de l'élaboration d'une maîtrise en virologie-immunologie, ce projet de recherche avait pour but de procéder à l'investigation d'un nouvel agent étiologique plausible en cause dans les épidémies du syndrome de dépérissement des porcelets nouvellement sevrés et rencontrés chez des éleveurs de l'Est canadien. Sachant que cet agent est un virus apparenté de par son ultrastructure et son organisation moléculaire aux membres de la famille *Circoviridae*, les hypothèses qui ont présidé à cette recherche soutiennent que l'agent viral est similaire au circovirus porcin, un contaminant non-pathogène de la lignée cellulaire PK-15, mais génétiquement et antigéniquement distinct de ce dernier.

En effet, au terme de ce projet de recherche, tout contribue à mettre en cause un virus structurellement identique au CVP retrouvé dans la lignée cellulaire PK-15, mais distinct de ce dernier par sa virulence. Pour y arriver, trois méthodes d'approche ont été utilisées à cette fin : moléculaire, cellulaire et sérologique. Elles ont permis non seulement de satisfaire nos hypothèses de travail avec l'apport de nouvelles connaissances sur la biologie du virus, mais aussi, la création d'outils et le développement de tests de diagnostic à même de prêter à des transferts de technologie.

L'approche moléculaire a permis de confirmer la présence de CVP chez les porcs atteints du SDPS et de différencier ses deux génotypes. Grâce aux tests de diagnostic développés, particulièrement le multiplex PCR, il a été possible de détecter la présence de l'ADN d'une nouvelle souche de CVP, distinct de celle contaminant la lignée PK-15 ou CVP1, et de mettre en évidence la faible fréquence d'une possible co-infection des porcs positifs par les deux génotypes de CVP. Finalement, le séquençage de l'ADN de trois isolats de CVP2 québécois et leur analyse génomique ont réaffirmé davantage les hypothèses de travail : par la révélation de la présence dans l'ORF1 de similitudes très élevées avec les protéines Rep de nombreux circovirus, la détection de trois éléments caractéristiques de l'origine de réplication chez tous les circovirus et la variabilité génomique des deux génotypes.

L'approche cellulaire a contribué à la propagation sur des cultures cellulaires d'un isolat CVP2. À cet effet, plusieurs études axées sur différents centres d'intérêt ont été menées avec soin. Parmi ces études, il y a lieu de mentionner l'étude portant sur le tropisme du CVP2, qui a révélé que le virus étudié est de nature pantropique, propre à ne se répliquer qu'exclusivement dans des cellules en division. Une autre étude destinée à mieux cerner les besoins du CVP2 en culture a abouti à l'identification et à l'interrelation de trois facteurs déterminants pour le maintien d'un titre d'infectivité élevé à travers les passages. D'où la conduite d'une étude complémentaire traitant de l'effet de la D-glucosamine sur la réplication du virus. Celle-ci démontra qu'un traitement à la D-glucosamine a cet avantage d'augmenter de façon significative le taux d'infectivité à des doses adéquates et selon des paramètres respectés. La cinétique de production du CVP2 a permis de mettre en évidence la possibilité pour le CVP2 de générer *in vitro* de l'ECP dans des conditions artificielles d'infection aiguë. Ce qui laisse suggérer que la souche CVP2 est distincte par sa virulence de celle retrouvée dans la lignée cellulaire PK-15.

L'analyse sérologique a rendu possible la discrimination des sérotypes de CVP et la caractérisation biochimique de la protéine majeure de la nucléocapside du CVP2. Ensemble, l'immunisation génétique à l'aide d'ADN plasmidique exprimant la protéine ORF2 du CVP2 et l'immunisation standard avec une suspension de CVP1 purifié ont mené à la production d'antisérums spécifiques à chacun des sérotypes de CVP, et par voie de conséquence, à leur distinction au niveau de leur antigénicité. Par ailleurs, les études qui ont porté sur l'expression de la protéine virale ORF2, à partir des systèmes d'expression procaryotique et eucaryotique, ont abouti à la découverte d'un phénomène de restriction d'hôte. En effet, l'incapacité d'*E. coli* de produire la protéine structurale du CVP2 a été élucidée par la découverte de codons rares utilisés par les bactéries Gram – et ce, à l'intérieur du gène ORF2 et à l'aide de l'analyse de sa séquence nucléotidique et protéique. Ce qui ne fut pas le cas lors de sa production dans les systèmes d'expression eucaryotiques. En effet, la détection d'une protéine d'environ 28 kDa a été possible. Celle-ci à l'opposé de celle récemment caractérisée par d'autres chercheurs, fut exprimée dans des cellules d'origine porcine et coïncidait en plus avec le P.M. prédit par les programmes d'analyse de séquence d'ADN.

Enfin, suite aux observations d'ECP notées lors de l'étude sur la cinétique de production et à travers les études complémentaires sur l'expression de l'ORF2 du CVP2 dans les cellules d'origine porcine, tout laisse croire que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse du SDPS. Ainsi, en utilisant le système d'adénovirus recombinant construit au cours du troisième chapitre, une nouvelle voie d'investigation pourrait être envisagée dans le cadre d'un projet futur, autant sur les rôles biologiques plausibles de la protéine ORF2 du CVP2 que sur son implication dans l'apoptose.

Contributions des collaborateurs

Chapitre 1 : Toutes les mises au point des techniques et des résultats présentés dans ce chapitre ont été réalisés par l'étudiant chargé du projet.

Louise Wilson, reproduction des tests de PCR des figures 1, 2 et 4 contenues dans l'article publié.

Raymonde Jetté, participation dans le maintien en culture et la production du premier lot du CVP1.

Dr Claude Montpetit, responsable du service de diagnostic du MAPAQ, a fourni les spécimens cliniques de SDPS.

Dr Serge Dea, directeur et initiateur du projet et correcteur de l'article scientifique avant soumission.

Les génomes des trois souches de CVP2 ont été séquencés au service de séquençage par les techniciens de ce service.

Chapitre 2 : Toutes les mises au point des techniques, la conception des études et les résultats présentés dans ce chapitre ont été réalisés par l'étudiant chargé du projet.

La lignée cellulaire de rein de porc PK-15 (ATCC-CCL 33) a été donnée par Dr A.Afshar, Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada, La lignée cellulaire de rein de porc PK-15A a été obtenue du " National Veterinary Service Laboratory, U.S. Department of Agriculture".

La lignée cellulaire PFT a été donnée par le Dr Alain Bouillant, Animal Diseases Research Institute, Agriculture Canada.

Les cultures primaires de macrophages alvéolaires porcins (PAM) ont été préparées par Dominique Thérien et Dr Serge Dea.

Le virus purifié PPV et l'antisérum spécifique au PPV ont été fournis par le service de diagnostic du MAPAQ.

Chapitre 3 : Toutes les mises au point des techniques, la conception des études et les résultats présentés dans ce chapitre ont été réalisés par l'étudiant chargé du

projet, à l'exception du test de RIPA présenté à la figure 43 dont la mise au point et les résultats obtenus a été réalisé par Ali Kheyyar .

Les plasmides pRSET-C, pMAL-2ce et les plasmides d'adénovirus ont été donnés respectivement par les Dr François Denis, François Shareck de l'INRS-IAF et le Dr Bernard Massie de l'IRB, CNRC.

Le long bras de l'ADN génomique de l'Ad5 a été donné digéré par Dr Carl Gagnon. Les immunisations des sujets expérimentaux ont été fait en partie par Dr Serge Dea avec la participation par rotation, dans le cas des cochons, de Carl Gagnon, Patrick Cléroux, Dominique Thérien, Kane Cheikh Saad et moi-même.

Remerciements

L'acquisition d'une formation autant académique que professionnelle n'aurait jamais eu lieu sans que l'on m'ait donné l'opportunité de l'acquérir. Je me dois donc de remercier profondément Dr Serge Dea pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de développer un esprit scientifique et ce, en m'accordant le privilège de mener à bien mon projet de recherche. Ce qui m'a permis de développer davantage mon autonomie et de prendre conscience de mes faiblesses et de mes forces. Également, je souhaite le remercier pour être aussi sensible et à l'écoute de ses étudiants.

De nombreuses personnes m'ont encouragé, conseillé et même fourni de la documentation pertinente ou du matériel scientifique, je voudrais leur exprimer ma profonde gratitude, tant pour leur faveur que le temps qui m'ont accordés. Particulièrement, Dr François Shareck qui m'amena à réaliser, en outre, que le savoir ne sert à rien si l'on ne sait comment le communiquer, Dr Peter Tijssen, Dr Pierre Payment, Dr Jit Arora pour son hospitalité et son expertise scientifique. Je voudrais témoigner de ma reconnaissance également aux techniciens de l'IAF que j'ai eu la chance de rencontrer et qui m'ont fait don de leur expérience scientifique. Particulièrement, Roger Dubuc pour son expertise en PCR, Louise Wilson pour son aide et ses conseils, Raymonde Jetté pour sa coopération et ses conseils en cultures cellulaires, Lise Forget pour sa qualité de service, Robert Alain du service M.E.T. et Nicole Saywer pour ses efforts déployés au développement d'hybridomes. De même que mes collègues de laboratoire pour leur compagnie tout au long de ces années passées ensemble. Plus particulièrement, Kane pour son bon sens critique tant moral que scientifique et Anne-Marie pour sa si paisible compagnie.

Je voudrais offrir spécialement mes remerciements à mon père pour m'avoir assisté et offert son support pour la correction de ce manuscrit, de même que tout au long de mes études universitaires. De même qu'à Bernard Gendron pour la correction de ce manuscrit.

Enfin, le projet sur Circovirus porcin n'aurait pas eu lieu sans le soutien financier des organismes. Je désire donc remercier les organismes subventionnaires le MAPAQ et la compagnie Biovet inc.

LISTE DES RÉFÉRENCES

1. **Allan, G. M., Phenix K.V., Todd D. and McNulty M.S.** 1994. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *J. Vet. Med. B.* 41: 17-26.
2. **Allan, G. M., F. McNeilly, J. P. Cassidy, Reilly G.A.C., Adair B., Ellis W.A. and McNulty M.S.** 1995. Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.* 44: 49-64.
3. **Allan, G. M., McNeilly F., Daft B., Clarke E. G., Ellis J. A., Haines D. M., Meehan B. and Adair B. M.** 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.
4. **Allan G., Meehan B., Todd D., Kennedy S., McNeilly F., Ellis J., Clark E., Harding J., Espuna E., Botner A. and Charreyre C.** 1998. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet. Rec.* 4: 467-468.
5. **Allan G., Kennedy S., McNeilly F. et al.,** 1999. Experimental reproduction of wasting disease and death by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121: 1-11.
6. **Allan G., McNeilly F., Meehan B., Kennedy S., Mackie D.P., Ellis J.A., Clark E.G., Espuna E., Saubi N., Riera P., Bötner A. and Charreyre C.E.** 1999. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol.* 66:115-123
7. **Allan G.M. and Ellis J.A.** 2000. Porcine circoviruses : a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 3-14.
8. **Allan, G. M., McNeilly F., Curran M.D., Walker I., Ellis J. A., Konoby C., Kennedy S. and Meehan B.** 2000. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheeps. *Arch. Virol.* 145: 853-857.
9. **Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K.** 1992. Current protocols in molecular biology, published by John Wiley & Sons,

New York, USA.

10. **Balasz M, Segales J, Rosell C, Domingo M, Mankertz A, Urniza A and Plana-Duran J.** 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol*; 121:139-48.
11. **Beneyx F.** 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, vol.10: 411-421.
12. **Bridson RW and Markham PG.** 1995. The Geminiviridae. In : **Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. (eds).** *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on taxonomy of Viruses.* Springer, Wien New York, pp 158-165.
13. **Clark E.G.** 1996. Pathology of post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs. *Proc. Western Can. Assoc. Swine Pract.* pp 22-25.
14. **Clark E.G.** 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 28: 499-501.
15. **Choi C. and Chea C.** 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*; 123:302-5.
16. **Daft B., Nordhausen R.W., Latimer K.S. and Niagro F.D.** 1996. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six-week-old piglet. *Proc Am Assoc Vet Lab Diagn* 39: 32.
17. **Davis B., Dulbecco R., Eisen H.N. and Ginsberg H.S.** 1990. *Microbiology*, fourth edition. Published by J.B. Lippincott Company. Chapter 44 ; p785-89.
18. **Dubuc, Roger.** 1996. Mise au point et contrôle de la qualité de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) appliquée en diagnostic des parvovirus porcin (PPV). Mémoire de maîtrise de l'Université du Québec.

19. **Dulac G.C. and Ahmad A.** 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.
20. **Edwards S. and Sands J.J.** 1994. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet. Rec.* 134: 680-681.
21. **Ellis J., Hassard L., Clark E., Harding J., Allan G., Wilson P., Strokappe J., Martin K., McNeilly F., Meehan B., Todd D., and Haines D.** 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39: 44-51.
22. **Ellis J., Krakowka S., Allan G. and al.,** 1999. The clinical scope of PRRSV infection has expanded since 1987; an alternative perspective. *Vet. Pathol.* 36 :262-265.
23. **Ellis J., Krakowka S., Lairmore M., Haines D., Bratanich A., Clark E., Allan G., Konoby C., Hassard L., Meehan B., Martin K., Harding J., Kennedy S., and McNeilly F.** 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest* 11: 3-14.
24. **Ellis J., Bratanich A., Clark E., Allan G., Meehan B., Haines D., Harding J., West K.H., Krakowka S., Konoby C., Hassard L., Martin K. and McNeilly F.** 2000. Coinfection by porcine circovirus and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 21-27.
25. **Fenaux M., Halbur P.G., Gill M., Toth T.E. and Meng X-J.** 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 PCV1 and PCV-2. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2494-2503.
26. **Fernandez J.M. and Hoeffler J.P.** 1999. Gene expression systems : using nature for the art of expression. Academic Press. San Diego, California, pp 480.

27. **Flint S.J., Enquist L.W., Krug R.M., Racaniello V.R. and Skalka A.M.** 2000. Principles of virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM Press. Washington D.C. pp 804.
28. **Freshney R.I.** 2000. Culture of animal cells. A manual of basic technique, 4^e edition. Published by Wiley-Liss Inc, Toronto, Canada. pp 577.
29. **Gillespie Stephen and Bamford Kathleen.** 2000. Medical Microbiology and Infection at a glance. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. pp 128.
30. **Goldberg A.** 1972. Degradation of abnormal proteins in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69: 422-426.
31. **Goldman E. and Zubay G.** 1994. Investigating codon usage in *Escherichia coli*. Methods in Mol. Gene. Vol.3 (9): 159-178.
32. **Graham F.L., Smiley J., Russell W.C. and Nairn R.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen. Virol. 36: 59-72.
33. **Grodberg J. and Dunn J.J.** 1988. OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. J. Bacteriol. 170: 1245-1253.
34. **Guan C., Li P., Riggs, P.D. and Inouye H.** 1987. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. Gene 67: 21-30.
35. **Hamel A.L., Lin L.L., and Nayar G.P.S.** 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. J. Virol. 72: 5262-5267.
36. **Hanahan D., Jessee J., and Bloom R.** 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. Methods in enzymology vol. 204, pp 63-113.

37. **Harding J.** 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome : Preliminary epidemiology and clinical finding. preliminary epidemiology and clinical presentation. Proc. Am. Assoc. Swine Pract. : p.28.
38. **Harding J.** 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 28: 503.
39. **Harding J. and Clark E. G.** 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) . Swine Health and Product. 5: 201-203.
40. **Harding J., Clark E. G. and Strokappe J.H.** 1998. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): epidemiology and clinical presentation. Swine Health and Product.6: 249-254.
41. **Hinrichs U., Ohlinger V.F., Pesch S., and al.** 1999. First report of porcine circovirus type 2 infection in Germany. Tieraerztl Umsch 54: 255-258.
42. **Horner G.** 1991. Pig circovirus antibodies present in New Zealand pigs. Surveil Wellington 18: 23.
43. **Illanes O., Lopez A., Miler L., McLearn J., Yason C., Wadowska D. and Martinez J.** 2000. Lesions associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs from Prince Edward Island, Canada. J. Vet. Diagn. Invest. 12: 146-150.
44. **Kapust R.B. and Waugh D.S.** 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. Protein Sci., 8: 1668-1674.
45. **Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Adair B.M., Hughes A. and Spillane P.** 1999. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. Vet. Rec. 142: 495-496.
46. **Kiupel, M., Stevenson G. W., Mittal S. K., Clark E. G., and Haines D. M.** 1998. Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. Vet. Pathol. 35: 303-307.

47. **Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A. and Klinman D.M.** 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 6; 374: 546-549.
48. **Larochelle R., Bielanski A., Muller P. and Magar R.** 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4629-4632.
49. **LeCann, P., Albani E., Madec F., Carillet R., and Jestin A.** 1997. Piglet wasting disease. *Vet. Rec.* 141: 660.
50. **Lemieux P., Guérin N., Paradis G., Proulx R., Chistyakova L., Kabanov A. and Alakhov V.** 2000. A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther.* 7; 11: 986-91.
51. **Lewin B.** 1995. *Genes V.* Oxford University Press. New York. P 349-373.
52. **Liu Q., Wang L., Willson P. and Babiuk L.A.** 2000. Quantitative, competitive PCR analysis of Porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3474-3477.
53. **Lukert P.D., de Boer G.F., Dale J.L., Keese P., McNulty M.S., Randles J.W., Tisher I.** 1995. The Circoviridae. In : **Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. (eds).** *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on taxonomy of Viruses.* Springer, Wien New York, pp 166-168.
54. **Madec F., Eveno E., Morvan P., Hamon L., Blanchard P., Cariolet R., Ammen N., Morvan H., Truong C., Mahé D., Albina E. and Jestin A.** 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France : clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science* (in press).
55. **Magar R., Larochelle R et al.,** 2000. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *J Comp Pathol*; 123 : 258-69.

56. **Magar R., Muller P. and Laroche R.** 2000. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can. J. Vet. Res.* 64: 184-186.
57. **Mahé D., Blanchard P., Truong C., Arnauld C., Le Cann P., Cariolet R., Madec F., Albina E. and Jestin A.** 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.
58. **Mankertz A., Persson F., Mankertz J., Blaess G. and Buhk H-J.** 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J. Virol.* 71: 2562-2566.
59. **Mankertz A., Mankertz J., Wolf K. and Buhk H-J.** 1998. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J. Gen. Virol.* 79: 3811-384.
60. **Mankertz J., Buhk H-J., Blaess G. and Mankertz A.** 1998. Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes* 16: 267-276.
61. **Mankertz A., Domingo M., Folch J.M., LeCann, P., Jestin A., Segales J., Chmielewicz B., Plana-Duran J. and Soike D.** 2000. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Research* 66: 65-77.
62. **Matsuo E., Sampei G., Mizobuchi K., and Ito K.** 1999. The plasmid F OmpP protease, homologue of OmpT, as a potential obstacle to *E.coli* based protein production. *FEBS Lett* 112 : 6-8.
63. **McNeilly F., Allan G.M., Foster J.C., Adair B.M. and McNulty M.S.** 1996. Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function. *Vet. Immun. and Immunopat.* 49: 295-306.
64. **Meehan B. H., Creelan J. L., McNulty M.S., and D. Todd** 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 78: 221-227.

65. **Meehan B. H., McNeilly F., Todd D., Kennedy S., Jewhurst V. A., Ellis J. A., E. Hassard L., Clark E. G., Haines D. M., and Allan G. M.** 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79: 2171-2179.
66. **Miyata H., Tsunoda A., Kazi A., Yamada A., Khan M.A., Murakami J., Kamahora T., Shiraki K. and Hino S.** 1999. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J. Virol.* 73: 3582-3586.
67. **Moffat B.A. and Studier F.W.** 1987. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*, 24: 221-7.
68. **Molnar Z. and Bekesi J.G.** 1972. Cytotoxic effects of D-glucosamine on the ultrastructure of normal and neoplastic tissues in vivo. *Cancer Res.* 32: 756-65.
69. **Morozov I., Sirinarumitr T., Sorden S.D., Halbur P.G., Morgan M.K., Yoon K-J, and Paul P.S.** 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2535-2541.
70. **Mushahwar I.K., Erker J.C., Muerhoff A.S., Leary T.P., Simons J.N., Birkenmeyer L.G., Chalmers M.C., Pilot-Matias T.J. And Desal S.M.** 1999. Molecular and biophysical characterization of TT virus; evidence for a new virus family infecting humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 3177-3182.
71. **Nayar G.P.S., Hamel A. and Lin L.** 1997. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can. Vet. J.* 38: 385-386.
72. **Nayar G.P.S., Hamel A., Lin L., Sachvie C., Grudeski E. and Spearman G.** 1999. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can. Vet. J.* 40: 277-278.

73. **Nawagitgul P., Morozov I., Bolin S.R., Harms P.A., Sorden S.D. and Paul P.S.** 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81: 2281-2287.
74. **Niagro F.D., Forsthoeft A.N., Lawther R.P., Kamalanathan L., Ritchie B.W., Latimer K.S., and Lukert P.D.** 1998. Beak and feather disease virus porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circovirus. *Arch. Virol.* 143: 1723-1744.
75. **Nishizawa T., Okamoto H., Konishi K., Yoshizawa H., Miyakawa Y. and Mayumi M.** 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 92-97.
76. **Noteborn M.H., Todd D., Verschueren C.A., de Gauw H.W., Curran W.L., Veldkamp S, Douglas A.J., McNulty M.S., Van der E.B. A.J. and Koch G.** 1994. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J. Virol.* 68 : 346-351.
77. **Onuki A, Abe K., Togashi K., Kawashima K. Taneichi A. and Tsunemitsu H.** 1999. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 1119-1123.
78. **Ouardani M., Wilson L., Jetté R., Montpetit C., Dea S.** 1999. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3917-3924.
79. **Pirzadeh B., and Dea S.** 1998. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.*, 79: 989-999.
80. **Reed L.J. and Muench H.** 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. of Hyg.* 2: 493-97.
81. **Robert Alain.** 1987. Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. *J. Virol. Meths.* 16: 209-216.

82. **Robinson H.L. and Pertmer T.M.** 2000. DNA vaccines for viral infection : basics studies and application. Adv. in Virus Res., 55: 1-75.
83. **Rossel C., Segales J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodriguez-Arrioja G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S., and Domingo M.** 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.
84. **Rodriguez-Arrioja G.M., Segales J., Balasch M., Rossel C., Quintana J., Folch J.M., Plana-Duran J., Mankertz A. and Domingo M.** 2000. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. Vet. Rec. 146: 762-764.
85. **Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning : A laboratory manual, vol.1-3. Cold Spring Harbor laboratory Press.
86. **Sanger N.S. and Coulson A.R.** 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74 : 5463-5467.
87. **Schenk P.M., Baumann S., Mattes R. and Steinbiß H-H.** 1995. Improved high-level expression system for eucaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare ^{Arg}tRNAs. Biotechniques 19: 196-200.
88. **Segales J., Sitjar M., Domingo M., Dee S., DelPozo M., Noval R., Sacristan C., DeLasHeras A., Ferro A., and Latimer K. S.** 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. Vet. Rec. 141: 600-601.
89. **Sirinarumitr T., Morozov I., Nawagitgul P., Sorden S.D., Harms P.A. and Paul P.S.** 2000. Utilization of a rate enhancement hybridization buffer system for rapid in situ hybridization for the detection of porcine circovirus in cell culture and in tissues of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. J. Vet. Diagn. Invest. 12: 562-565.
90. **Sorden S.D., Harms P. A., Nawagitgul P., Cavanaugh D. and Paul P.S.** 1999. Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. J. Vet. Diagn.

Invest. 11: 528-530.

91. **Spillane P., Kennedy S., Meehan B. and Allan G.** 1998. Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.* 143: 511.
92. **Studier F.W., and Moffat B.A.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
93. **Studier F.W.** 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219: 37-44.
94. **Tan P.H.N., Wong S.M., Wu M., Bedford I.D. and Stanley J.** 1995. Genome organization of ageratum yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. *J. Gen. Virol.* 76: 2915-2922.
95. **Tischer I., Rasch R., and Tochtermann G.** 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.*, 226: 153-167.
96. **Tischer I., Gelderblom H., Vettermann W. and Koch M.A.** 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295: 64-66.
97. **Tischer I., Mielsch W., Wolff D., Vagt M., and Greim W.** 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91: 271-276.
98. **Tischer I., Peters D., Rasch R., and Pociuli S.** 1987. Replication of porcine circovirus-induction by glucosamine and cell-cycle dependence. *Arch. Virol.*, 96: 39-57.
99. **Tischer I. and Buhk H.-J.** 1988. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene, series A* 270: 280-287
100. **Tischer I., Bode L., Peters D., Pociuli S., and Germann B.** 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.*

140: 737-743.

101. **Tischer I., Bode L., Apodaca J., Timm H., Peters D., Rasch R., Pociuli S. and Gerike E.** 1995. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice and cattle. *Arch Virol* 140: 1427-1439.
102. **Tischer I., Peters D. and Pociuli S.** 1995. Occurrence and role of an early antigen and evidence for transforming ability of porcine circovirus. *Arch Virol* 140: 1799-1816.
103. **Todd. D., Niagro F. D., Ritchie B. W., Curran W., Allan G. M., Lukert P. D., Latimer K. S., Steffens, W. L. and McNulty M. S.** 1991. Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Arch. Virol.* 117:129-135.
104. **You J., Cohen R.E. and Pickart C.M.** 1999. Construct for high-level expression and low misincorporation of lysine for arginine during expression of pET-encoded eucaryotic proteins in *Escherichia coli*. *Biotechniques* vol.27: 950-954.
105. **Walker I.W. Carrie A., Konoby C., Jewhurst V. A., McNair I., McNeilly F., Meehan B. H., Cottrell T.S., Ellis J. A. and Allan G. M.** 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.
106. **Watson J.D., Hopkins NH., Roberts J.W., Steitz J.A. and Weiner A.M.** 1988. *Molecular biology of the gene*, fourth edition. Benjamin/Cummings Publishing Company. Menlo park, California. p898-959.
107. **West K.H., Bystrom J.M., Wojnarowicz C., Shantz N. Jacobson M. Allan G.M., Haines D.M., Clark E. G., Krakowka S. McNeilly F., Martin K. and Ellis J.A.** 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 530-532.

Annexes

Annexe 1

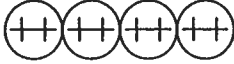
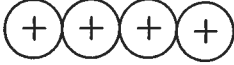
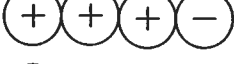
Exemple de calcul : - titre infectieux (selon la méthode Reed & Muench) - multiplicité d'infection

- Le **titre infectieux** du surnageant 2897 IV^e passage utilisé dans l'expérience sur la cinétique de production (section 2.35).

Facteur de dilution : 5

Nombre (Nb) de réplica : 4

Volume final/puits : 0.08 ml

		<u>Nb puits</u>		<u>Nb cumulatif</u>			
		I	NI	I	NI	Ratio	%
1/5							
1/25							
1/125		4	0	14	0	14/14	100
1/625		3	1	10	1	10/11	91
1/3 125		3	1	7	2	7/9	78
1/15 625		3	1	4	3	4/7	57
1/78 125		1	4	1	7	1/8	13
1/390 625							
1/1 953 125							

Formule :

Distance: (valeur au dessus de 50% - 50%)

proportionnelle (valeur au dessus de 50% - valeur au dessous de 50%)

$\log \text{TCID}_{50} = (\log \text{ de la dilution au dessus de } 50\%) + (\text{distance proportionel.} \times \log \text{ du facteur de dilution})$

$$\text{distance proportionel.} = \frac{(57\% - 50\%)}{(57\% - 13\%)} = \frac{7}{44} = 0.16$$

$$\begin{aligned}\log \text{TCID}_{50} &= (\log \text{ de } 1/15\ 625) + (0.16 \times \log \text{ de } 5) \\ &= (-4.2) + (0.16 \times -0.7) \\ &= -4.3\end{aligned}$$

$$\text{TCID}_{50} = 10^{-4.3}$$

Cette valeur représente la dilution nécessaire pour infecter 50% des puits de cellules.

Le titre infectieux est donné par la réciproque de la valeur de TCID_{50} / volume total inoculé. Ainsi, le titre infectieux égal à $10^{4.3} \text{ TCID}_{50} / 0.08 \text{ ml}$ ou $10^{5.4} \text{ TCID}_{50} / \text{ml}$.

- La **multiplicité d'infection ou m.o.i** correspond au nombre de particules virales par cellule. Dans l'expérience sur la cinétique de production (section 2.35), la m.o.i utilisée pour infecter en moyenne 6.75×10^5 cellules a été calculée grossièrement comme suit :

Titre infectieux de l'inoculum : $10^{5.4} \text{ TCID}_{50} / \text{ml}$

Volume de l'inoculum : 0.5 ml

Nombre de cellules : 6.75×10^5 cellules

$$\begin{array}{ccc} 10^{5.1} \text{ TCID}_{50} / 0.5 \text{ ml} & \Longrightarrow & 6.75 \times 10^5 \text{ cellules} \\ \text{m.o.i} & \Longleftarrow & 1 \text{ cellule} \end{array}$$

$$\text{m.o.i} = 0.2$$

Cette valeur de m.o.i (0.2) représente le rapport du nombre de particules virales utilisées ($10^{5.1} \text{ TCID}_{50}$) pour infecter en moyenne un certain nombre de cellules (6.75×10^5 cellules). Ainsi, les particules défectives ont été négligées dans ce calcul et ne représentent qu'une estimation grossière. Autrement dit, elle ne tient pas compte de la proportion réelle de particules virales qui initient l'infection (a) dans la relation $m = aN/C$, où N représente le nombre total de particules virales dans l'inoculum et C, le nombre total de cellules à infecter (Davis *et al.*, 1990).

Annexe 2

Méthode de calcul suggérée pour estimer la concentration d'une suspension virale analysée au M.E.T. (Robert Alain, INRS-IAF)

$$C = \frac{\text{Nb de virus comptés}}{\text{Nb de sphères de latex}} \times \text{concentration connue des sphères/ml}$$

Où C = concentration des particules virales/ml

Table A.1.4 Percentage of Codon Synonymous Usage and Frequency of Codon Occurrence in Various Organisms (see description below)

AA	Codon	Mammal	Other vert.	Dicot	Monocot	Invertebrate	Yeast	Chloroplast	Yeast mito.	Gram neg.	Gram pos.
		%	freq.	%	freq.	%	freq.	%	freq.	%	freq.
Gly	GGG	22.8	16.6	20.7	14.8	11.6	9.4	25.0	20.5	8.4	6.0
Gly	GGA	25.5	18.5	29.2	20.9	37.9	30.6	21.2	17.4	32.4	23.3
Gly	GGU	17.6	12.8	21.3	15.2	35.6	28.8	15.2	12.4	21.4	15.6
Gly	GGC	34.1	24.7	28.9	20.7	14.9	12.1	38.6	31.6	37.8	25.7
Glu	GAG	60.1	40.4	55.9	42.3	48.9	29.3	72.5	31.9	66.0	38.4
Glu	GAA	39.9	26.8	44.1	33.4	51.1	30.6	27.5	12.1	34.0	20.7
Asp	GAU	42.6	20.9	50.9	26.2	60.1	26.4	29.7	10.2	53.0	25.2
Asp	GAC	57.4	28.1	49.1	25.3	39.9	17.5	70.3	24.1	47.0	22.4
Val	GUG	48.1	29.5	42.0	25.7	28.6	19.3	38.0	23.4	41.6	22.8
Val	GUA	9.9	6.1	13.1	8.0	14.0	9.4	9.5	5.8	10.6	6.1
Val	GUU	16.4	10.0	22.0	13.5	40.0	26.9	18.8	11.6	21.1	12.0
Val	GUC	25.6	15.7	22.9	14.0	17.4	11.7	33.7	20.8	26.8	15.3
Ala	GCG	9.9	7.0	8.8	6.5	6.6	4.8	25.3	21.7	18.1	13.9
Ala	GCA	21.0	14.9	26.7	19.6	27.0	19.4	18.0	15.5	18.2	14.7
Ala	GCU	28.8	20.4	33.2	24.4	44.6	32.0	21.8	18.7	21.4	17.3
Ala	GCC	40.2	28.5	31.3	23.0	21.8	15.6	34.9	30.0	42.4	33.0
Arg	AGG	21.5	11.8	21.4	12.0	25.1	11.9	24.4	12.7	14.1	9.4
Arg	AGA	21.0	11.5	23.6	13.2	32.6	15.4	13.0	6.8	14.6	9.8
Ser	AGU	13.4	10.0	13.2	9.6	16.4	12.8	7.7	5.5	12.4	10.4
Ser	AGC	24.8	18.6	25.8	18.7	17.3	13.5	22.1	15.6	22.4	18.4
Lys	AAG	62.4	36.1	58.4	38.0	57.7	33.0	80.5	28.8	70.6	37.0
Lys	AAA	37.6	21.7	41.6	27.1	42.3	24.2	19.5	7.0	29.4	15.5
Asn	AAU	41.4	15.5	43.8	17.0	45.9	20.7	25.9	7.6	44.1	18.9
Asn	AAC	58.6	22.0	56.2	21.8	54.1	24.4	74.1	21.9	55.9	24.3
Met	AUG	100	22.6	100	23.4	100	22.3	100	20.6	100	23.2
Ile	AUA	13.1	5.9	16.8	7.8	18.9	9.9	13.6	5.5	15.6	7.1
Ile	AUU	33.3	14.9	35.8	16.7	46.2	24.2	27.5	11.1	33.8	15.4
Ile	AUC	53.6	24.0	47.4	22.0	34.9	18.2	58.9	23.8	50.6	23.5
Thr	ACG	11.8	6.6	11.3	6.3	8.5	4.7	21.1	10.7	24.7	13.8
Thr	ACA	26.4	14.8	30.3	17.1	29.3	16.1	18.9	9.6	21.8	12.7
Thr	ACU	23.4	13.1	26.0	14.7	35.0	19.3	20.9	10.6	18.0	10.2
Thr	ACC	38.5	21.6	32.4	18.3	27.2	15.0	39.0	19.8	35.5	20.2
Trp	UGG	100	14.4	100	12.5	100	14.7	100	13.0	100	11.6
End	UGA	59.6	2.6	58.1	2.9	51.4	3.8	60.3	3.7	56.2	3.9
Cys	UGU	42.7	10.0	39.7	8.7	49.3	8.9	27.0	5.5	31.5	7.3
Cys	UGC	57.3	13.4	60.3	13.2	50.7	9.2	73.0	14.9	68.5	15.1
End	UAG	17.2	0.7	13.8	0.7	18.0	1.3	21.3	1.3	15.3	1.0
End	UAA	23.2	1.0	28.0	1.4	30.6	2.3	18.4	1.1	28.5	2.0
Tyr	UAU	40.2	11.5	41.6	11.2	46.9	14.9	25.7	7.3	36.9	9.4
Tyr	UAC	59.8	17.2	58.4	15.8	53.1	16.3	74.3	21.1	63.1	16.2
Leu	UUG	12.2	11.4	13.8	12.0	26.1	23.0	15.7	13.0	16.8	13.4
Leu	UUA	5.4	5.0	6.5	5.6	11.1	9.8	4.6	3.8	7.0	5.6
Phe	UUU	40.7	15.3	44.2	14.6	49.5	21.3	30.6	10.1	34.8	11.3
Phe	UUC	59.3	22.3	55.8	18.4	50.5	21.8	69.4	22.9	65.2	21.2

(continued)

AA	Codon	Mammal		Other vert.		Dicot		Monocot		Invertebrate		Yeast		Chloroplast		Yeast mito.		Gram neg.		Gram pos.	
		%	freq.	%	freq.	%	freq.	%	freq.	%	freq.	%	freq.	%	freq.	%	freq.	%	freq.		
Ser	UCG	5.9	4.4	6.0	4.3	5.8	4.5	17.0	12.0	19.5	15.7	8.0	6.5	7.0	4.5	4.0	3.0	15.4	9.1	8.6	5.8
Ser	UCA	14.2	10.6	15.4	11.0	19.7	15.3	16.0	11.3	11.4	9.9	19.0	15.3	16.1	10.5	44.0	31.5	10.7	6.4	22.2	15.0
Ser	UCU	18.3	13.8	19.3	14.0	23.6	18.3	15.3	10.8	11.3	9.7	32.0	25.4	27.1	17.6	25.0	17.7	16.1	9.6	23.4	15.9
Ser	UCC	23.5	17.6	20.4	14.8	17.2	13.4	21.9	15.5	23.0	18.9	18.0	14.8	20.0	13.0	7.0	4.8	18.0	10.7	10.7	7.3
Arg	CGG	18.2	10.0	13.3	7.5	5.0	2.4	16.4	8.6	13.8	8.7	2.0	1.0	6.1	4.1	4.0	1.2	9.6	5.6	10.8	4.1
Arg	CGA	10.7	5.8	9.4	5.3	9.5	4.5	9.0	4.7	14.1	9.3	5.0	2.1	20.1	13.5	1.0	0.2	5.6	3.3	10.5	4.0
Arg	CGU	9.1	5.0	13.4	7.5	18.8	8.9	11.2	5.8	16.5	10.9	17.0	7.3	25.5	17.2	13.0	3.6	36.9	21.4	19.9	7.6
Arg	CGC	19.5	10.7	18.9	10.6	9.0	4.2	26.0	13.6	27.0	17.0	4.0	1.9	8.9	6.0	1.0	0.4	40.4	23.5	15.8	6.0
Gln	CAG	73.9	32.7	69.2	30.2	39.7	15.2	40.1	43.4	65.0	32.8	26.0	10.3	26.8	9.9	17.0	4.4	70.2	29.4	36.4	15.3
Gln	CAA	26.1	11.6	30.8	13.5	60.3	23.1	59.9	64.8	35.0	18.2	74.0	29.7	73.2	27.1	83.0	21.9	29.8	12.5	63.6	26.7
His	CAU	38.8	9.2	43.1	10.0	53.0	12.0	38.2	8.1	41.6	12.1	60.0	12.5	71.5	14.3	83.0	19.5	50.1	11.1	70.4	15.8
His	CAC	61.2	14.5	56.9	13.3	47.0	10.7	61.8	13.2	58.4	16.5	40.0	8.3	28.5	5.7	17.0	4.0	49.9	11.1	29.6	6.6
Leu	CUG	42.8	40.1	40.3	34.9	11.0	9.6	28.2	23.2	38.1	30.0	9.0	8.5	6.2	5.7	5.0	6.4	53.7	51.5	18.5	15.9
Leu	CUA	6.8	6.4	7.2	6.3	9.8	8.6	9.8	8.1	8.6	7.0	13.0	11.8	15.4	14.1	6.0	8.0	3.3	3.1	7.4	6.4
Leu	CUU	12.1	11.3	14.8	12.8	25.2	22.2	13.4	11.0	12.4	10.3	11.0	9.6	19.6	17.9	5.0	6.0	9.9	9.5	21.6	18.6
Leu	CUC	20.8	19.5	17.4	15.0	16.9	14.8	28.3	23.3	17.2	14.3	4.0	4.0	5.7	5.2	1.0	1.4	12.1	11.6	8.0	6.9
Pro	CCG	11.2	6.8	11.0	6.0	8.2	4.6	25.7	20.5	27.3	15.5	9.0	4.1	12.8	6.3	5.0	2.0	54.4	23.7	30.3	10.8
Pro	CCA	27.3	16.5	30.4	16.7	41.9	23.6	40.9	32.6	30.1	17.9	49.0	21.9	23.3	11.4	39.0	15.6	17.1	7.4	28.9	10.3
Pro	CCU	28.8	17.4	28.6	15.7	34.1	19.2	15.0	12.0	14.6	8.9	29.0	12.7	43.3	21.1	48.0	19.3	15.2	6.6	33.2	11.9
Pro	CCC	32.7	19.7	30.0	16.4	15.9	8.9	18.3	14.6	28.0	16.1	13.0	5.7	20.6	10.0	8.0	3.4	13.3	5.8	7.6	2.7

Annexe 4

I. Communications scientifiques

- 1- S. Racine, **M. Ouardani**, A. Kheyar and S. Dea. Utilisation d'un adénovirus recombinant portant l'ORF2 du circovirus porcin de type 2 (CVP2) comme outil de diagnostic et pour la production des stocks de nucléoprotéine du virus. Congrès INRS-Institut Armand-Frappier (Ste-Adèle, Québec), présentation en affiche (November 2, 2001). **Troisième prix, meilleur communication étudiante.**
- 2- **Ouardani, M.**, R. Jetté, C. Montpetit and S. Dea. "Stabilisation génomique et antigénique de la protéine de la nucléocapside du *circovirus porcin type 2*". Colloque en production animale (Sainte-Foy, Québec), Santé animale et Immunologie (May 21, 2000).
- 3- Caron, J, **M.Ouardani**, Cheikh Saad Bouh and S. Dea. "PCR Multiplex pour la détection et la différenciation des infections à *Mycoplasma hyopneumoniae* et *Mycoplasma hyorhinis* chez le porc". Premier colloque international de bactériologie vétérinaire de langue française (Saint-Hyacinthe, Québec), présentation en affiche (May 17-19, 2000).
- 4- **Ouardani, M.**, L. Wilson, R. Jetté, C. Montpetit and S. Dea. "Caractérisation moléculaire d'isolats de circovirus porcin associés au syndrome de dépérissement multisystémique en postsevrage des porcs au Québec". 1^{er} Congrès Interne INRS-Institut Armand-Frappier (Sherbrooke, Québec), présentation en affiche (November 5, 1999). **Troisième prix, meilleur communication étudiante.**
- 5- **Ouardani, M.**, L. Wilson, R. Jetté, C. Montpetit and S. Dea. "Multiplex PCR for Detection and Typing of Porcine Pircoviruses". The 42nd Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, AAVLD (San Diego, California). Présentation en affiche (October 11, 1999).
- 6- J.Caron, **M.Ouardani** and S. Dea. "Multiplex PCR Assay for Detection and Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* Infections in Pigs". The 42nd Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, AAVLD (San Diego, California). Présentation en affiche (October 11, 1999).
- 7- **Ouardani, M.**, L. Wilson, R. Jetté, C. Montpetit and S. Dea. "Identification of a Genomic Variant of Porcine Circovirus Associated with Postweaning Wasting Syndrome in Pigs in Quebec". The 49th Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiology, CSM (Montreal, Quebec), Veterinary microbiology session (June 15, 1999).
- 8- Caron, J, **M.Ouardani**, B.B.A. Moumem, K.C.S. Bouh and S. Dea. "Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Pigs by PCR Amplification of DNA Fragments of the

p36 and p46 genes". The 79th Annual Meeting of the Conference Research Workers in Animal Diseases, CRAWD (Chicago, États-Unis), Respiratory Diseases. Présentation en affiche (November 9, 1998).

- 9- Dea, S, **M.Ouardani**, L. Wilson, J. Caron and R. Jetté. "Detection and Differentiation of *Porcine Circovirus* (PCV) Strains by Multiplex PCR". The 79th Annual Meeting of the CRAWD (Chicago, États-Unis), Viral pathogenesis (November 9, 1998).
- 10- Caron, J, **M. Ouardani**, B.B.A. Moumem and S. Dea. "Diagnostic de l'infection par *Mycoplasma hyopneumoniae* par amplification enzymatique des gènes codant pour deux protéines immunodominantes (p36 et p46)". Colloque en Production animale (Sainte-Foy, Québec), Santé animale (May 21, 1998).

II. Publications scientifiques

1. **OUARDANI, M**, L. WILSON, R. JETTÉ, C. MONTPETIT and S. DEA. 1999. Multiplex PCR for Detection and Typing of Porcine Circoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.37, n° 12 :1957-1968.
2. J.CARON, **M.OUARDANI** and S. DEA.2000. "Multiplex PCR Assay for Detection and Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in Pigs". *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.38, n° 4 : 1390-1396.

III. Contributions à la librairie de GENBANK

1. **AF118095 : Ouardani, M.**, Wilson, L., Jette, R., Montpetit, C. and Dea, S. Porcine circovirus type 2 isolate IAF-614 complete genome.
2. **AF118097 : Ouardani, M.**, Wilson, L., Jette, R., Montpetit, C. and Dea, S. Porcine circovirus type 2 isolate IAF-4370 complete genome.
3. **AF408635 : Ouardani, M.** and Dea,S. Porcine circovirus type 2 isolate IAF-2897 complete genome.