

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**THÈSE
PRÉSENTÉE À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE**

PAR

JOËL HEPPELL

**ÉTUDES DES VARIATIONS GÉNOMIQUES ENTRE
DIFFÉRENTES SOUCHES DU VIRUS DE LA NÉCROSE
PANCRÉATIQUE INFECTIEUSE (VNPI)**

OCTOBRE 1995

TABLE DES MATIÈRES

	page
LISTE DES TABLEAUX	iv
LISTES DES FIGURES	v
SOMMAIRE	vii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1. 1 - INTRODUCTION	7
1. 2 - LE VIRUS DE LA NÉCROSE PANCRÉATIQUE INFECTIEUSE	8
1.2.1 - Classification	8
1.2.2 - Structure virale et propriétés physico-chimiques	9
1.2.3 - Le génome viral	10
1.2.4 - Les protéines virales	11
1. 3 - LA MULTIPLICATION VIRALE	16
1.3.1 - Variations phénotypiques et particules défectives	16
1.3.2 - Pénétration du virus et effet cytopathique (ECP)	17
1.3.3 - Réplication du génome viral et production des ARNm	18
1.3.4 - Synthèse des protéines virales	20
1. 4 - CARACTÉRISATION SÉROLOGIQUE DU VIRUS	21
1.4.1 - Classification sérologique des <i>Aquabirnavirus</i>	21
1.4.2 - Principaux épitopes du virus	22
1. 5 - MALADIE CAUSÉE PAR LE VNPI	24
1.5.1 - Symptômes de la nécrose pancréatique infectieuse	24
1.5.2 - Espèces atteintes et distribution géographique	25
1.5.3 - Essais de vaccination	26
1. 6 - CONCLUSION	28
CHAPITRE 2: ÉTUDES DES VARIATIONS GÉNOMIQUES ENTRE LES SOUCHES DE VNPI	30
ARTICLE I: <i>Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles</i>	35
ARTICLE II: <i>Comparison of amino acid sequences deduced from a cDNA fragment obtained from infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different serotypes</i>	59

	page
CHAPITRE 3: LOCALISATION DES DOMAINES VARIABLES ET DES PRINCIPAUX DÉTERMINANTS ANTIGÉNIQUES DE LA PROTÉINE VP2	76
ARTICLE III: <i>Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus</i>	79
CHAPITRE 4: CARACTÉRISATION DU CADRE DE LECTURE DE LA PROTÉINE VP5 ET DE LA RÉGION NON CODANTE À L'EXTRÉMITÉ 5' DU SEGMENT GÉNOMIQUE A	112
ARTICLE IV: <i>Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus</i>	115
DISCUSSION GÉNÉRALE	133
1 - VARIATIONS GÉNOMIQUES ENTRE LES SOUCHES DE VNPI	134
1.1 - Classification en trois génogroupes	134
1.2 - Le cas des deux souches Jasper	137
1.3 - Distribution géographique des isolats québécois	138
1.4 - Site de clivage entre les protéines NS et VP2	139
2 - CARTOGRAPHIE DES PRINCIPAUX ÉPITOPE ET DES RÉGIONS VARIABLES DE LA VP2	140
3 - ÉTUDE DE LA VP5 ET DE SON CADRE DE LECTURE	141
4 - CARACTÉRISATION DE LA RÉGION NON CODANTE SITUÉE À L'EXTRÉMITÉ 5' DU SEGMENT A	142
CONCLUSION	144
REMERCIEMENTS	148
RÉFÉRENCES	151
ANNEXE A: LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS	169
ANNEXE B: COPIE DES ARTICLES PUBLIÉS	174

LISTE DES TABLEAUX

	page
TABLEAU 1 Liste des souches de VNPI utilisées dans l'article I. (<i>Table 1: List of IPNV strains used in article I.</i>)	4 8
TABLEAU 2 Liste des souches de VNPI utilisées dans l'article II. (<i>Table 2: List of IPNV strains used in article II.</i>)	6 8
TABLEAU 3 Pourcentages d'homologie entre les séquences en acides aminés déduites des fragments d'ADNc de 310 pb obtenus de 17 souches de VNPI ainsi que de leur portion correspondante sur les séquences publiées. (<i>Table 2: Percentages of homology between amino acid sequences deduced from the 310 bp cDNA fragments obtained from 17 IPNV strains and their corresponding portion on three published sequences</i>).	6 9
TABLEAU 4 Pourcentages d'homologie entre les séquences en acides aminés correspondant à la région codant pour la préVP2 de huit souches de VNPI. (<i>Table 4: Percentages of homology between deduced amino acid sequences of the preVP2 coding region of 8 different IPNV strains</i>).	9 4
TABLEAU 5 Localisation des substitutions identifiées dans la séquence des mutants d'échappement de la souche VR-299. (<i>Table 5: Localization of mismatches in the sequence of escape mutants of the VR-299 strain</i>).	9 5
TABLEAU 6 Pourcentages d'homologie entre les séquences nucléotidiques et protéiques correspondant au petit cadre ouvert de lecture sur le segment génomique A de huit souches de VNPI. (<i>Table 6: Percentage similarity between nucleotide and deduced amino acid sequences of the small ORF on genome segment A of eight IPNV strains</i>).	126

LISTE DES FIGURES

	page
FIGURE 1 Électrophorèse des ARN génomiques viraux provenant de 12 souches prototypes de VNPI. (Figure non publiée).	3 3
FIGURE 2 Profils de restriction obtenus après digestion d'un fragment d'ADNc de 359 pb amplifié à partir de 37 souches de VNPI. (<i>FIGURE 2: Restriction fragment profiles obtained after digestion of a 359 bp cDNA fragment amplified from 37 IPNV strains</i>).	5 0
FIGURE 3 Dendrogramme représentant les relations entre les souches de VNPI telles que déterminées par l'analyse de regroupement des profils de restriction. (<i>FIGURE 3: Dendrogram representing the relationships between IPNV strains as determined by cluster analysis of the restriction profiles</i>).	5 5
FIGURE 4 Localisation géographique des isolats québécois du VNPI. (Figure non publiée).	5 7
FIGURE 5 Séquences nucléotidiques obtenues des 17 fragments d'ADNc de 310 pb amplifiés par PCR. (Figure non publiée).	7 1
FIGURE 6 Séquences en acides aminés déduites des 17 fragments d'ADNc amplifiés ainsi que de la portion correspondante sur des séquences publiées de VNPI et de l'IBDV. (<i>FIGURE 6: Amino acid sequences deduced from the 17 amplified fragments and their corresponding portion on the published sequences of IPNV and IBDV</i>).	7 4
FIGURE 7 Dendrogramme représentant les relations entre les souches de VNPI déterminées à partir des homologies de séquence en acides aminés. (<i>FIGURE 7: Dendrogram representing the relationships between IPNV strains as determined by amino acid sequence homology</i>).	7 5
FIGURE 8 Méthode employée pour fabriquer les clones de délétion utilisés lors de l'expression des VP2 tronquées. (<i>FIGURE 8: Construction of the deletion clones used for the expression of truncated VP2s</i>).	9 6
FIGURE 9 Séquence nucléotidique des ADNc correspondants à la pVP2 et à la portion 5' non-codante, obtenue de cinq souches de VNPI. (Figure non publiée).	9 8

FIGURE 10	Séquences en acides aminés déduites de l'ADNc obtenu des cinq souches virales utilisées dans l'article III ainsi que la portion correspondante sur les séquences publiées de VNPI. (<i>FIGURE 10: Dduced amino acid sequences obtained from the five viral strains used in article III and their corresponding portion on the published sequences of IPNV</i>).	103
FIGURE 11	Profils d'hydrophilicité calculés pour les cinq souches de VNPI séquencées dans l'article III. (<i>FIGURE 11: Hydrophilicity profiles calculated for the five IPNV strains sequenced in article III</i>).	105
FIGURE 12	Expression chez <i>E. coli</i> des VP2 tronquées et détection des protéines spécifiques suite à un transfert de type Western. (<i>FIGURE 12: Expression of truncated VP2s in bacteria and detection of specific proteins by Western blot</i>).	107
FIGURE 13	Profils d'hydrophilicité calculés pour les mutants d'échappement de la souche VR-299. (Figure non publiée).	109
FIGURE 14	Graphiques montrant la probabilité de surface de la VP2 des mutants d'échappement de la souche VR-299, calculée à l'aide du logiciel MacVector. (Figure non publiée).	111
FIGURE 15	Comparaison des séquences de la protéine putative de 17 kDa (ou de sa forme tronquée) déduites à partir des ADNc de différentes souches de VNPI. (<i>FIGURE 15: Comparison of amino acid sequences of the putative 17 kDa protein (or its truncated form) of IPNV, as deduced from cDNA sequences</i>).	128
FIGURE 16	Expression chez <i>E. coli</i> de la protéine de 17 kDa de la souche VR-299 du VNPI, fusionnée à la MBP (<i>maltose binding protein</i>) codée par le vecteur pMal-c2. (<i>FIGURE 16: Expression in E. coli of the 17 kDa protein of IPNV strain VR-299 fused to the maltose binding protein (MBP) of the pMAL-c2 vector</i>).	130
FIGURE 17	Détection de la protéine VP5 dans des préparations de virus concentrés. (<i>FIGURE 17: Detection of VP5 in concentrated virus preparations</i>).	132
FIGURE 18	Dendrogramme représentant les relations entre des souches de VNPI, telles que déterminées par les pourcentages d'homologie au niveau de la protéine pVP2. (Figure non publiée).	136

SOMMAIRE

Le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI) est un pathogène très commun dans les élevages de poissons. Bien qu'il soit surtout associé aux salmonidés chez lesquels il peut être responsable d'un taux de mortalité très élevé des alevins, le VNPI a aussi été isolé dans plusieurs autres familles de poissons à travers le monde. Ce virus est classé dans la famille *Birnaviridae* et son génome est constitué de deux segments d'ARN bicaténaire linéaire. Le plus grand des deux, nommé segment A, code pour les protéines structurales du virus et serait responsable de certaines variations phénotypiques observées entre les souches du VNPI. Des études sérologiques ont aussi démontré une grande hétérogénéité antigénique chez cet agent pathogène mais jusqu'à présent aucune étude détaillée ne s'est attardée sur la variabilité génomique.

Dans le but d'établir une classification génétique et de localiser les régions du segment A qui pourraient être responsables des variations phénotypiques et antigéniques du VNPI, nous avons comparé 37 souches virales. Pour chacune d'elles, un fragment de 310 pb a été amplifié par PCR, puis digéré de façon séquentielle par cinq enzymes de restriction. Sur la base des profils de restriction obtenus, 17 souches ont été sélectionnées et séquencées au niveau du même fragment. L'analyse comparative des séquences obtenues et de celles publiées préalablement a permis de classer les souches en trois génogroupes majeurs. Cinq souches représentatives des variations observées ont ensuite été séquencées dans la région comprise entre l'extrémité 5' du brin positif du segment A et l'extrémité 3' de la portion du génome qui code pour la protéine majeure de la capsid, la VP2 (nucléotides 1 à 1737 d'après la séquence publiée de la souche Jasper). La comparaison des séquences en acides aminés déduites des ADN complémentaires a révélé la présence d'un domaine variable au centre de la protéine qui contient deux petites régions hydrophiles et hypervariables. L'expression chez *Escherichia coli* de diverses portions de

la VP2 d'une souche du VNPI, de même que la sélection et le séquençage de trois mutants du même virus qui échappent à la neutralisation par des anticorps monoclonaux (AMC), ont permis de localiser les principaux épitopes sur la séquence primaire de la protéine. Les deux sections hypervariables semblent impliquées dans la formation d'un déterminant antigénique discontinu reconnu par des AMC neutralisants, alors que les autres anticorps se sont fixés sur des sites adjacents à l'intérieur du domaine variable ou à proximité. Les cinq souches virales sélectionnées précédemment ont ensuite été comparées au niveau de la portion non codante de l'extrémité 5' ainsi qu'au niveau d'un petit cadre ouvert de lecture chevauchant partiellement celui de la VP2 et pouvant coder pour une protéine de 17 kDa nommée VP5. Alors que la partie non codante du génome est apparue très bien conservée entre les souches, les divergences étaient très importantes au niveau du cadre de lecture de la VP5. Par ailleurs, ce dernier était absent dans une des souches virales alors qu'il était tronqué dans deux autres. Néanmoins, à l'aide d'un antisérum monospécifique, il a été possible de détecter la VP5 dans les cellules infectées par une souche de VNPI contenant le cadre de lecture en entier.

Les différences importantes observées au niveau de la région qui code pour la VP5 pourraient être à l'origine de certaines variations phénotypiques entre les souches virales. Quant à la diversité antigénique, elle semble surtout reliée à la région centrale de la VP2 qui est la portion la plus variable de la protéine et la principale cible des anticorps. Ce domaine pourrait être suffisant pour induire une réponse immunitaire protectrice chez les poissons, pourvu que la chaîne polypeptidique se replie correctement.

INTRODUCTION

L'industrie aquicole est en pleine expansion presque partout dans le monde. Bien que peu d'études aient été réalisées sur son impact économique, l'*International Food and Agriculture Organization* (FAO) estimait qu'en 1990, les ventes de poissons d'élevage atteignaient 22 milliards de dollars US, comptant ainsi pour 15% de la consommation mondiale (Fischetti, 1991). À cause de la diminution importante des réserves naturelles de poissons, ce pourcentage ne pourra qu'augmenter dans les années à venir. Au tournant du siècle, le FAO estime que l'aquaculture détiendra 20% du marché mondial et représentera une source appréciable de protéines pour les pays en développement. En effet, le taux de conversion de la nourriture, c'est-à-dire la quantité de nourriture donnée par rapport à la masse de chair animale récoltée, est plus élevé pour les poissons (1,5 pour 1) que pour les mammifères herbivores (12 pour 1) et même les races améliorées de volailles (1,7 pour 1) (Liu *et al.*, 1990).

Avec l'accroissement des élevages, les problèmes sanitaires vont aussi s'amplifier. Bien que les pertes encourues par les pisciculteurs soient de nature variée, les maladies constituent de loin le facteur de mortalité le plus important. Aux États-Unis par exemple, les éleveurs de truites ont déclaré une perte de 20,7 millions de poissons en 1988, dont la moitié à cause de maladies, ce qui équivaut au minimum à 2,5 millions de dollars US (Meyer, 1991). Outre les virus, d'autres pathogènes importants tels que les bactéries, les champignons, les protozoaires et autres parasites sont fréquemment retrouvés dans les piscicultures, mais plusieurs d'entre eux peuvent être contrôlés efficacement par divers agents anti-parasitaires ou antimicrobiens, comme les antibiotiques (Munn, 1994). Les maladies virales constituent un problème particulier puisque la seule façon de s'en débarrasser est de détruire les individus infectés, puis de nettoyer et désinfecter tout l'équipement avant de réintroduire de nouveaux animaux (Meyer, 1991).

Les poissons les plus communs dans les piscicultures canadiennes sont les truites et les saumons. Parmi les virus qui infectent ces espèces, les plus importants sont le VNPI

ou virus de la nécrose pancréatique infectieuse (ou IPNV pour *infectious pancreatic necrosis virus*), de même que deux rhabdovirus, soit l'IHNV (*infectious hematopoietic necrosis virus*) et le VHSV (*viral hemorrhagic septicemia virus*, également appelé *Egtved virus*) (Wolf, 1988; Meyer, 1991). Très peu de données existent quant aux pertes économiques engendrées par ces virus, mais on a estimé qu'au niveau mondial elles s'élèvent à 5 millions de dollars US annuellement, pour l'IHNV seulement (Meyer, 1991).

Le cas du VNPI est particulier puisque d'une part, il démontre une grande variabilité antigénique et phénotypique, et d'autre part, ce birnavirus peut infecter un grand nombre d'espèces de poissons presque partout à travers le monde. Les risques de contamination à partir des animaux sauvages sont donc très importants, d'où la nécessité de développer un vaccin efficace contre les nombreuses souches virales. Il n'existe actuellement aucun traitement disponible commercialement pour prévenir la nécrose pancréatique infectieuse, bien que certains chercheurs travaillent à l'élaboration d'un vaccin recombinant (Munn, 1994).

Si la recherche appliquée sur le VNPI est importante, la partie fondamentale ne doit pas pour autant être abandonnée. Plusieurs éléments ne sont pas encore bien connus, notamment en ce qui concerne le mécanisme de réPLICATION du virus. Ces connaissances pourraient permettre éventuellement de développer des traitements curatifs alternatifs, telle que l'utilisation de substances antivirales, en plus de favoriser la mise en place de mesures prophylactiques visant à limiter l'introduction de souches virales dans des élevages ou territoires qui en sont exempts.

Dans notre laboratoire, la recherche sur le VNPI s'oriente selon deux axes parallèles, soit la caractérisation du virus au niveau antigénique et au niveau moléculaire. Le présent travail ne concerne que la seconde partie, qui est l'étude du VNPI du point de vue moléculaire. Le but principal du projet est d'étudier les variations génomiques entre les différents isolats et souches du VNPI afin de localiser des régions sur l'ARN viral qui

soient possiblement impliquées dans les variations antigéniques et phénotypiques observées chez ce virus. D'une façon plus spécifique, les objectifs poursuivis sont de: 1) établir une classification des souches et isolats du VNPI sur la base de leurs variations génomiques; 2) localiser, sur le génome viral, les régions variables et les principaux épitopes de la protéine structurale et immunogénique majeure du virus (la VP2), reconnus par les anticorps monoclonaux disponibles au laboratoire; 3) vérifier si la protéine VP5 (ou son cadre de lecture) est universellement répandue parmi les souches de VNPI; 4) étudier les homologies de séquences au niveau de la région 5' non codante du brin d'ARN positif du segment A.

La majorité des résultats obtenus dans la poursuite de ces objectifs ont été publiés ou sont en voie de l'être. Au total, quatre articles originaux ont été écrits et, au moment d'imprimer ce texte, trois d'entre eux sont déjà parus tandis que le quatrième est sous presse. Ces articles sont reproduits intégralement dans leur version originale anglaise et constituent la majeure partie de cette thèse. Les références qu'ils contiennent ont toutefois été actualisées, de façon à ce que les mentions "sous presse" ou "en préparation" soient remplacées par les références complètes, et leur présentation a été uniformisée afin de les regrouper toutes ensemble dans la section bibliographique de la thèse, évitant ainsi les répétitions inutiles. Chaque article constitue un chapitre différent, à l'exception du premier et deuxième qui ont été regroupés dans une seule section puisqu'ils concernent deux aspects complémentaires du même objectif de recherche. Dans chacun des cas cependant, les articles sont précédés d'une courte introduction permettant, d'une part, de les situer dans le contexte de ma thèse de doctorat et, d'autre part, de présenter les quelques figures supplémentaires non incluses dans les publications originelles. Elles sont identifiées par la mention "figure non publiée" dans leur légende, qui est rédigée en français, ce qui permet de bien les distinguer des autres figures. Finalement, dans un but d'uniformité, de simplicité et de facilité de lecture, tous les tableaux et figures ont été renumérotés de façon séquentielle du début à la fin de la thèse et ont été insérés à la suite

des articles auxquels ils se rapportent. À cause de ces modifications au texte original et parce que certains éditeurs introduisent des changements mineurs de style dans les publications, une copie de chaque article publié a été incluse en annexe.

Afin de situer l'ensemble de nos travaux dans le contexte global de la problématique du VNPI, une revue de la littérature concernant principalement la biologie moléculaire du virus, de même que les perspectives de développement d'un vaccin, sont présentées dans le premier chapitre. La question de la classification des souches virales est ensuite discutée dans le chapitre 2, qui inclus les articles I et II. La section suivante (chapitre 3), traite de la localisation des épitopes et des régions variables de la protéine VP2. Enfin, l'étude de la protéine VP5 et de son cadre de lecture apparaît dans le chapitre 4, qui aborde également la question de la région non codante à l'extrémité 5' du brin positif du segment d'ARN A. Une discussion et une conclusion générales figurent à la fin de la thèse.

CHAPITRE 1

Revue bibliographique

1.1- INTRODUCTION

Le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI) a été identifié pour la première fois en 1960 (Wolf *et al.*, 1960). Toutefois, la maladie dont il est la cause était connue depuis longtemps dans les élevages de truites en Amérique du Nord, sous le nom de "entérite catarrhale aiguë" (M'Gonigle, 1941). Il n'est donc pas surprenant que le VNPI fût le premier virus de poisson à être cultivé *in vitro*. Bien qu'à l'origine on le considérait comme un pathogène spécifique des salmonidés, de nombreux rapports font aujourd'hui mention de la présence de cet agent infectieux dans des poissons appartenant à d'autres familles et même dans des types d'organismes aquatiques différents, tels que les mollusques et les crustacés (Wolf, 1988). Dans ces derniers cas, l'appellation "VNPI" est conservée puisque tous les isolats testés semblent sérologiquement apparentés aux virus provenant des poissons, quoique certains auteurs préfèrent parler de *VNPI-like* ou de "birnavirus aquatiques" (Hill et Way, 1983, 1988).

Parmi tous les pathogènes viraux connus des organismes aquatiques, le VNPI est probablement celui qui est le plus répandu à travers le monde. Des rapports font régulièrement mention de l'isolement de ce virus dans de nouvelles espèces animales ou de nouveaux territoires, tant en eau douce qu'en eau salée. Les nombreuses souches virales diffèrent les unes des autres par leur virulence et leur antigénicité. Il est prévisible que de nouveaux isolats de VNPI fassent leur apparition dans les élevages d'espèces de poissons qui autrefois n'étaient pas gardées en captivité. Par conséquent, il devient de plus en plus important de disposer d'un vaccin qui soit à la fois économique à produire et efficace contre toutes les souches du virus.

Les premières études effectuées sur le VNPI consistaient principalement à caractériser ce dernier du point de vue biochimique et morphologique, de même qu'à décrire la maladie induite. Quelques bonnes revues de littérature ont d'ailleurs été

publiées sur le sujet (McAllister, 1979; Pilcher et Fryer, 1980; Dobos et Roberts, 1983; Wolf, 1988). Ces dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés concernant l'étude du génome et des protéines structurales du VNPI, mais ces résultats n'ont pas encore fait l'objet d'une synthèse dans un article publié.

Dans cette revue bibliographique, l'ensemble de la problématique du VNPI est soulevé, bien que l'emphase soit mise sur les aspects biomoléculaires du virus. L'objectif poursuivi est de situer le travail effectué au cours de cette thèse de doctorat dans un contexte plus global, c'est-à-dire celui de la recherche fondamentale, en y incluant des perspectives d'application à moyen et long terme. Ainsi, l'historique de la maladie, de même que l'aspect clinique et son diagnostic ne sont que peu ou pas abordés. Par contre, tout ce qui concerne le virus lui-même, c'est-à-dire sa composition biochimique et son organisation structurale, sera discuté d'une façon plus exhaustive dans la première section de la revue. Par la suite, la multiplication virale sera décrite, puis, dans la dernière section, il sera brièvement question de la maladie engendrée par le VNPI, du point de vue de son importance dans les piscicultures et des essais de vaccination qui ont été réalisés, afin de bien saisir les difficultés entourant le développement de moyens prophylactiques visant à contrôler la nécrose pancréatique infectieuse.

1.2- LE VIRUS DE LA NÉCROSE PANCRÉATIQUE INFECTIEUSE

1.2.1- Classification

Le VNPI est classé dans la famille des *Birnaviridae*, qui a été établie officiellement par le Comité international de taxonomie des virus en 1984 (Brown, 1986). Celle-ci a été divisée récemment en trois genres se distinguant par leur spectre d'hôtes (Murphy *et al.*, 1995). Ainsi, le genre *Aquabirnavirus* regroupe tous les membres de la famille isolés d'organismes aquatiques tels que poissons, mollusques et crustacés, mais qui constituent

une seule espèce virale nommée VNPI. Les deux autres genres, *Avibirnavirus* et *Entomobirnavirus*, ne comptent eux aussi qu'une seule espèce chacun, soit, respectivement, le virus de la bursite infectieuse ou IBDV (*infectious bursal disease virus*) et le virus X de la drosophile ou DXV (*drosophila X virus*). L'IBDV infecte les volailles et induit une maladie immunodépressive grave. À cause des pertes économiques importantes encourues par les éleveurs de poulets et de dindons à travers le monde, l'IBDV a été étudié par plusieurs chercheurs et continue de faire l'objet de nombreuses recherches, notamment dans le but de développer de nouveaux vaccins. Quelques revues de questions ont été publiées sur ce virus (Kibenge *et al.*, 1988; Müller *et al.*, 1992). Quant au DXV, il n'a été étudié principalement qu'à titre comparatif (Dobos *et al.*, 1979), puisqu'il ne représente pour le moment aucun intérêt pour l'économie ou la santé humaine.

1.2.2- Structure virale et propriétés physico-chimiques

Le VNPI est un virus icosaédrique non enveloppé de taille moyenne, avec un diamètre compris entre 50 et 75 nm. La capsid du VNPI n'est pas double comme celle des réovirus, mais elle possède tout de même une structure similaire. Elle est formée de 180 sous-unités structurales partiellement partagées en 92 unités morphologiques tubulaires (capsomères), qui sont elles-mêmes réparties selon une symétrie 5:3:2 avec un nombre de triangulation égal à 9 (Cohen et Scherrer, 1972). D'autres auteurs ont toutefois suggéré un nombre de triangulation $T = 13$ (Özel et Gelderblom, 1985).

La densité de flottation des particules virales en gradient de CsCl est évaluée entre 1,33 et 1,35 g/ml, tandis que celle des capsides vides est de 1,29 à 1,31 g/ml (Cohen *et al.*, 1973; Chang *et al.*, 1978). Le coefficient de sédimentation est égal à 435S et la masse moléculaire des virions est de 55×10^6 Da. Le génome viral représente 8,7% ($4,8 \times 10^6$ Da) de la masse totale des particules (Dobos *et al.*, 1977).

1.2.3- Le génome viral

Le génome du VNPI, comme celui de tous les birnavirus, est composé de deux segments d'ARN bicaténaire et linéaire, présents en quantités équimolaires dans chaque particule. Le contenu en GC a été évalué à 54% (Macdonald *et al.*, 1977) et la masse moléculaire de chacun des deux segments, identifiés A et B, est respectivement de $2,5 \times 10^6$ et $2,3 \times 10^6$ Da, pour la souche LWVRT 60-1 (VR-299) (Dobos, 1976; Macdonald et Yamamoto, 1977). Ces valeurs peuvent cependant varier d'une souche virale à l'autre.

Les ARN génomiques ne possèdent ni coiffe, ni queue poly-A (Dobos *et al.*, 1991). Par contre, à l'extrémité 5' des brins d'ARN, on retrouve une protéine d'environ 100 kDa associée de façon covalente à l'acide nucléique par un lien phosphodiester sérine-5' GMP (Persson et Macdonald, 1982; Calvert *et al.*, 1991), et qui serait l'ARN-polymérase ARN-dépendante du virus (Cohen, 1975; Mertens *et al.*, 1982; Dobos, 1993). Des études en microscopie électronique, utilisant le VNPI ou l'IBDV comme modèle, ont démontré que les segments d'ARN ne se retrouvent généralement pas seuls sous forme linéaire, mais sont plutôt reliés bout à bout ou encore sont circularisés. C'est la VPg (*i.e.* la protéine fixée aux extrémités 5' de l'ARN) qui maintiendrait les extrémités des molécules ensemble, possiblement par la formation de dimères de protéines (Persson et Macdonald, 1982; Müller et Nitschke, 1987).

Seulement six segments d'ARN, provenant de trois souches de VNPI différentes, ont été séquencés entièrement. Il s'agit des segments A et B des souches Jasper (Duncan et Dobos, 1986; Duncan *et al.*, 1991) et DRT (Chung *et al.*, 1993a, 1993b), du segment A de la souche N1 (Håvarstein *et al.*, 1990a) et du segment B de la souche SP (Duncan *et al.*, 1991). Des séquences partielles des deux segments ont également été publiées (Wu *et al.*, 1992; Pryde *et al.*, 1993). À noter que la souche Jasper séquencée par Duncan et Dobos (1986) est différente de la souche Jasper provenant de l'ATCC (*American Type Culture Collection*), tel que démontré dans notre laboratoire (Berthiaume *et al.*, 1992). Afin

d'éviter toute confusion au cours de ce travail, la souche provenant de l'ATCC sera toujours identifiée par "Jasper (ATCC)" et l'autre par "Jasper (Dobos)" ou simplement "Jasper".

L'analyse des séquences publiées a révélé que le segment A est composé d'environ 3100 pb, mais ce nombre peut varier d'une souche à l'autre (3097 pb pour Jasper, 3104 pb pour N1 et 3155 pb pour DRT). Le pourcentage d'homologie entre ces ARN est de 79,5% pour les souches Jasper et N1 (Håvarstein *et al.*, 1990a). Aucun rapport publié ne mentionne le degré de similitude de DRT par rapport aux autres souches séquencées. Toutefois, nous avons calculé qu'il est de 97% avec la souche Jasper.

Le segment B est plus court que le précédent. Sa taille varie de 2630 à 2784 pb, pour les souches SP et Jasper respectivement. Le pourcentage d'homologie entre ces segments est de 88% (Duncan *et al.*, 1991), comparativement à 90% entre ceux de Jasper et DRT (observation personnelle). Toutefois, à la différence du segment A, les variations au niveau de la séquence nucléotidique du segment B sont réparties assez uniformément le long de la molécule d'ARN. Il ne semble pas y avoir de régions plus conservées ou plus variables.

À l'exception du VNPI, le seul autre birnavirus dont la séquence nucléotidique a été déterminée est l'IBDV. En comparant les deux virus, un pourcentage d'homologie d'environ 54% a été déterminé pour le segment A (Håvarstein *et al.*, 1990a), alors qu'il est de 41% pour le segment B (Duncan *et al.*, 1991).

1.2.4- Les protéines virales

Une certaine confusion existe concernant le nombre exact, la masse et la nomenclature des protéines du VNPI. Celle-ci provient en partie du fait que la synthèse des protéines virales passe par la production préalable d'une polyprotéine qui subit plusieurs clivages avant de donner naissance aux polypeptides matures. L'interprétation des

résultats est d'autant plus complexe que les produits intermédiaires, tout comme la polyprotéine non clivée, peuvent être détectés dans les cellules infectées par le virus.

D'une façon générale, les protéines du VNPI peuvent être regroupées en trois classes différentes selon leur taille (Cohen *et al.*, 1973; Dobos, 1977; Chang *et al.*, 1978; Macdonald et Dobos, 1981). Ainsi, on retrouve les composants de haut poids moléculaire, dénommés "α" par certains auteurs. Ceux-ci comprennent la polyprotéine (α_1), codée par le segment A, ainsi que la protéine VP1 (α_2), codée par le segment B (Dobos, 1977).

À cause de leur taille similaire et de leur faible abondance, ces protéines ont parfois été confondues lors des premières études. VP1 est l'ARN-polymérase ARN-dépendante du virus qui se retrouve associée à l'extrémité 5' des acides nucléiques viraux, tel que mentionné précédemment. On peut également la retrouver sous forme libre dans les virions (Persson et Macdonald, 1982; Calvert *et al.*, 1991). Sa taille varie selon les rapports, de 90 à 110 kDa. L'activité maximum de l'enzyme est atteinte à 30°C, à un pH de 8 et en présence de 6 mM d'ions magnésium (Mertens *et al.*, 1982). Bien qu'on retrouve dans la VP1 des séquences consensus communes aux ARN-polymérases ARN-dépendantes des virus à ARN monocaténaire, elle ne possède pas le motif Gly-Asp-Asp caractéristique de cette famille d'enzymes (Duncan *et al.*, 1991).

On a évalué très sommairement qu'en moyenne 1,4 molécules de VP1 sont attachées à chaque segment d'ARN bicaténaire (Persson et Macdonald, 1982), mais il est possible qu'en réalité il y en ait deux, une pour chaque brin d'acide nucléique (Calvert *et al.*, 1991). Quoi qu'il en soit, en comptant les molécules libres dans les virions, il y aurait au total 22 molécules de VP1 par particule virale, ce qui représente environ 3-4% des protéines totales (Cohen *et al.*, 1973; Dobos et Roberts, 1983; Dobos *et al.*, 1991). Cependant, étant donné que la VP1 fut parfois confondue avec la polyprotéine, ces chiffres ne sont probablement pas tout à fait exacts. En effet, ce n'est que récemment que la polyprotéine non clivée, ayant une masse de 100-106 kDa, a pu être détectée dans des

préparations de virus purifié (Magyar et Dobos, 1994a, 1994b), démontrant ainsi la présence de deux protéines distinctes de haut poids moléculaire dans les particules virales.

Le clivage de la polyprotéine engendre trois polypeptides différents qui sont, dans l'ordre à partir de l'extrémité NH₂: VP2, NS/VP4 et VP3 (Huang *et al.*, 1986; Duncan *et al.*, 1987; Nagy *et al.*, 1987). La VP2 (50-57 kDa) est le produit final de la maturation de la préVP2 ou pVP2 (60-62 kDa). Ensemble, elles constituent les principaux éléments de la deuxième classe de protéines du VNPI, appelées aussi polypeptides "β". Bien que jusqu'à cinq constituants β, nommés β₁ à β₅ (Dobos, 1977), aient été identifiés dans les cellules infectées, seule la forme β₃ (57 kDa) a été retrouvée, au début, dans les particules virales purifiées (Dobos et Rowe, 1977; Dobos *et al.*, 1977). Le polypeptide β₃, en absence d'agents réducteurs, peut s'agréger et former des dimères ou trimères, ce qui a contribué à augmenter la confusion entourant les protéines α. En effet, on a cru pendant un certain temps que α₁ (la polyprotéine) n'était en réalité qu'un dimère de β₃ (Dobos et Rowe, 1977).

Toutes les formes de β sont des sous-produits de la pVP2, mais c'est probablement β₃ qui correspond à la VP2 mature retrouvée majoritairement dans les virions. Néanmoins, des quantités variables de pVP2 peuvent aussi être détectées dans les préparations de virus purifié, probablement à cause d'un clivage post-traductionnel incomplet (Dobos *et al.*, 1991). Ainsi, les polypeptides β représentent, tous ensemble, environ 62 à 68% du poids total des protéines du virus, ce qui fait approximativement 544 molécules par virion (Cohen *et al.*, 1973; Dobos *et al.*, 1977). Ce sont ces protéines structurales qui constituerait la capsid du VNPI (Dobos *et al.*, 1977). Il a été démontré également que des sucres sont associés à la VP2 et que la glycosylation est probablement de type N (Estay *et al.*, 1990).

Les protéines VP3 et NS (ou VP4 dans le cas de l'IBDV) constituent la troisième classe de polypeptides nommés "γ". On les retrouve dans les cellules infectées, comme dans

les particules virales purifiées. À l'instar de la VP2, il existe plus d'une forme de chaque protéine et il est parfois difficile de déterminer à quel constituant les auteurs font référence, puisque leur taille est similaire. Le fait que les sérum anti-VNPI ne réagissent pas ou peu contre le polypeptide NS a également contribué à établir la confusion entre les deux constituants viraux. Les protéines VP3 (γ_1) et VP3a (γ_{1a}) ont une masse moléculaire de 29-32 kDa et 28-29 kDa respectivement. Elles ont initialement été identifiées comme des protéines internes des virions (Dobos *et al.*, 1977), mais des résultats plus récents semblent démontrer que des portions de la chaîne polypeptidique de VP3 pourraient être présentes à la surface des particules virales (Caswell-Reno *et al.*, 1986). Environ 550 molécules de VP3 sont retrouvées par virion, ce qui représente 28% des protéines totales. Comparativement, la protéine NS (γ_2) est beaucoup moins abondante puisqu'elle ne constitue que 6% des protéines, soit environ 122 molécules par virion (Dobos *et al.*, 1977). Au moment où ces données ont été obtenues, toutefois, les auteurs ne faisaient pas bien la distinction entre les polypeptides NS et VP3, ce qui explique qu'on n'ait pas vu de contradiction avec le fait que la protéine NS fut considérée pendant longtemps comme un constituant non structural (d'où son nom "NS"). Il a été démontré par la suite que les deux formes de cette protéine, soit NS_t ou γ_2 (27 kDa) et NS_{ta} ou γ_3 (25 kDa), sont présentes dans les préparations de virus purifiés (Magyar et Dobos, 1994a, 1994b).

Le rôle biologique de la protéine NS a été déterminé. Il s'agit d'une protéase virale responsable du clivage de la polyprotéine et qui serait active en *cis* seulement, puisque son activité en *trans* n'a pu être démontrée (Duncan *et al.*, 1987; Manning et Leong, 1990; Manning *et al.*, 1990; Magyar et Dobos, 1994a). La recherche d'homologies avec d'autres protéases connues n'a cependant pas révélé de similarité, si ce n'est une faible ressemblance de la protéine NS avec les protéases de type sérine (Koonin *et al.*, 1992). Le site actif de l'enzyme a été localisé dans le tiers C-terminal de sa séquence primaire (Duncan *et al.*, 1987; Magyar et Dobos, 1994a), mais l'endroit exact du clivage sur la

polyprotéine n'a pas encore été déterminé. Il a été suggéré que la coupure se fasse au niveau d'un dipeptide Tyr-Leu, qu'on retrouve de part et d'autre de la protéine NS (Duncan *et al.*, 1987). Dans le cas du virus IBDV cependant, Hudson *et al.* (1986) ont plutôt suggéré qu'un dipeptide basique (Arg-Arg ou Lys-Arg) ou encore la séquence Ala-X-Ala-Ala-Ser, constitue le site de clivage reconnu par l'enzyme. Ces structures ne se retrouvent cependant pas chez le VNPI. Par conséquent, il est possible que les deux virus utilisent des protéases distinctes ayant des spécificités différentes, ce qui expliquerait le peu d'homologie entre la protéase de l'IBDV et celle du VNPI (Azad *et al.*, 1987; Håvarstein *et al.*, 1990a).

Chez le virus IBDV, la protéine NS est désignée "VP4" (Kibenge *et al.*, 1988). Certains auteurs ont tendance à utiliser la même terminologie pour le VNPI (Murphy *et al.*, 1995), ce qui respecterait la logique établie pour les autres protéines. Toutefois, le nom VP4 a également été utilisé par certains chercheurs (Dobos *et al.*, 1979; Caswell-Reno *et al.*, 1986; Dobos *et al.*, 1991) pour désigner la VP3a. En l'absence d'une nomenclature officielle des protéines du VNPI, l'abréviation NS sera utilisée au cours de ce travail afin d'éviter toute confusion.

À noter que les lettres "ICP" (pour *infected cell protein*) ou encore "VP" (pour *viral protein*) suivies d'un nombre représentant la masse moléculaire, ont également été utilisées pour désigner les protéines du VNPI. Par exemple, ICP 57 et VP57 désignent la VP2 (Dobos et Roberts, 1983; Roberts et Dobos, 1983)

En plus des protéines appartenant aux classes α , β et γ , un nouveau polypeptide, VP5, a été identifié récemment chez le VNPI et l'IBDV. Il s'agit d'une molécule basique de 17 kDa, riche en arginine, codée par le segment génomique A dans un cadre de lecture chevauchant celui de la polyprotéine (Håvarstein *et al.*, 1990a; Magyar et Dobos, 1994b; Mundt *et al.*, 1995). La présence de cette protéine peu abondante a été démontrée dans les cellules infectées, mais elle pourrait aussi se retrouver dans les particules virales

purifiées, bien que ce ne soit pas encore certain (Håvarstein *et al.*, 1990a; Magyar et Dobos, 1994b). On a toutefois estimé que si VP5 est incluse dans les virions, sa concentration molaire ne dépasserait pas quatre molécules par virus, soit environ une molécule pour chacune des VP1 liées au génome viral (Magyar et Dobos, 1994b).

Le rôle biologique de la VP5 est encore inconnu. Néanmoins, à cause de sa nature fortement basique, entre autres, Magyar et Dobos (1994b) ont suggéré qu'il puisse s'agir d'une protéine fixant l'ARN, jouant un rôle dans la synthèse des acides nucléiques viraux.

1.3- LA MULTIPLICATION VIRALE

1.3.1- Variations phénotypiques et particules défectives

Les nombreuses souches de VNPI qui ont été isolées ne montrent pas toutes les mêmes caractéristiques de croissance *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, certaines d'entre elles ne produisent pas d'effet cytopathique (ECP) sur des lignées cellulaires déterminées (Chou *et al.*, 1993), tout comme leur virulence n'est pas la même pour les diverses espèces de poissons susceptibles (McAllister et Owens, 1995; Novoa *et al.*, 1995). De plus, on observe des variations entre les virus au niveau de la taille et de la forme des plages de lyse, ainsi qu'au niveau de la température de croissance optimale (Macdonald, 1978; Macdonald et Gower, 1981; Wolf, 1988). La stabilité des particules et la proportion de virus non infectieux produits lors de la réplication varient également (Wolf et Quimby, 1971; McMichael *et al.*, 1978; Nicholson et Pochebit, 1981). Certaines de ces variations phénotypiques, soit la virulence et la taille des plages, ont été associées au plus grand des deux segments d'ARN génomique (Sano *et al.*, 1992, 1994).

La production de particules défectives interférentes (DI) est certainement le caractère phénotypique qui a été le plus étudié. L'apparition de ces particules a été associée

à des délétions au niveau du segment génomique A dans la région codant pour la VP2 en particulier, ce qui apporte des variations antigéniques mineures (Lo *et al.*, 1991; Chi *et al.*, 1993). Les virus DI seraient aussi responsables du phénomène de persistance observé chez les poissons et en culture cellulaire (Macdonald et Yamamoto, 1978; Hedrick et Fryer, 1982; Kennedy et Macdonald., 1982). Cependant, certaines souches de VNPI seraient plus susceptibles que d'autres à produire des particules DI (Dobos et Roberts, 1983).

1.3.2- Pénétration du virus et effet cytopathique (ECP)

Comme pour tous les virus des animaux, l'infection d'une cellule susceptible par le VNPI débute par l'attachement de la particule virale au récepteur cellulaire. Dans le cas du VNPI, ce récepteur serait une protéine de 120 kDa retrouvée dans les cellules CHSE (*Chinook salmon embryo cells*) et EPC (*Epithelial carp*) (Marshall et Dobos, 1994). À cause de sa localisation externe, on pourrait s'attendre à ce que ce soit la VP2 qui se fixe au récepteur de la cellule. Cependant, la VP3 pourrait également être impliquée, puisqu'il a été démontré, dans le cas de l'IBDV, qu'un anticorps monoclonal dirigé contre cette protéine inhibe l'attachement du virus à la cellule, ce qui n'est pas le cas de certains monoclonaux anti-VP2 (Reddy *et al.*, 1992). Il pourrait donc y avoir au moins un épitope de la VP3 de l'IBDV qui est impliqué dans l'attachement du virus à la cellule-cible.

Une fois la reconnaissance virus-cellule effectuée, le VNPI pénètre dans les cellules par endocytose (Couve *et al.*, 1992), sans provoquer par la suite une inhibition rapide de la synthèse d'ARN et de protéines cellulaires (Dobos, 1977). Il faut entre 16 et 20 heures au virus pour effectuer un cycle complet de réPLICATION (à 20-22°C) et produire un ECP caractéristique (Malsberger et Cerini, 1965), c'est-à-dire un arrondissement des cellules, suivi d'une granulation du cytoplasme, puis de la lyse cellulaire. L'assemblage des virus semble se faire dans le cytoplasme, là où ils

s'accumulent (Piper *et al.*, 1973). Le VNPI peut se multiplier dans une grande variété de lignées cellulaires de poisson, à une température comprise entre 4 et 24°C (Dobos et Roberts, 1983; Wolf, 1988). Il semblerait toutefois que la croissance de la plupart des souches soit inhibée à 28°C (Roberts et Dobos, 1983), bien que, dans certains cas, un ECP ait été observé à des températures aussi élevées que 34°C (Chou *et al.*, 1993).

1.3.3- RéPLICATION DU GÉNOME VIRAL ET PRODUCTION DES ARNm

Peu de choses sont connues sur la réPLICATION et la transcription du génome viral. On sait cependant que la synthèse des ARN atteint un maximum entre 8 et 10 h post-infection et qu'elle diminue considérablement après 12 à 14 h (Somogyi et Dobos, 1980). En tout temps lors de l'infection, la synthèse reste très sensible à la présence de cycloheximide, ce qui laisse présumer que les protéines virales (au moins la VP1) jouent un rôle actif et qu'elles doivent être produites continuellement pour que la synthèse des ARN ait lieu (Dobos et Roberts, 1983).

L'initiation de la réPLICATION pourrait se faire par la polymérase elle-même. En effet, la VP1 a la capacité de fixer un résidu guanine, par l'intermédiaire d'un lien phosphodiester, formant ainsi un complexe VP1-pG. Ce dernier peut ensuite fixer une deuxième guanine, en présence d'une matrice, pour donner VP1-pG-pG (Dobos, 1993). Or, les quatre brins d'ARN qui constituent le génome du VNPI se terminent tous par au moins un résidu guanine (Duncan et Dobos, 1986; Duncan *et al.*, 1991), à l'exception du brin négatif du segment A de la souche N1 (Håvarstein *et al.*, 1990a). Si on ne tient pas compte de cette dérogation, tout confirme que la VP1 pourrait elle-même servir à l'initiation de la synthèse d'ARN puisque cette protéine se retrouve à la fois fixée à l'extrémité des ARN et sous forme libre dans les virions, tel que mentionné précédemment. D'autres auteurs ont suggéré que les répétitions terminales inversées des segments d'ARN

génomique puissent jouer un rôle dans la réPLICATION et/ou l'encapsidation (Håvarstein *et al.*, 1990a), mais il n'y a aucune preuve directe ou indirecte de cela.

La transcription de l'ARN génomique en ARNm est mieux connue que sa réPLICATION. En effet, il a été démontré que, *in vitro*, la transcription s'effectue par un mécanisme de "déplacement de brin" (*strand displacement*) asymétrique et semi-conservatif (Mertens *et al.*, 1982; Dobos, 1995). Ce type de mécanisme semble aussi prévaloir chez d'autres birnavirus tels que le DXV (Bernard, 1980) et pourrait être responsable de la réPLICATION du génome viral. Par contre, il diffère du mécanisme de transcription opérant chez les réovirus, qui est plutôt de type conservatif (Banerjee et Shatkin, 1970). L'initiation de la transcription s'effectue par la polymérase elle-même (Dobos, 1995), mais on ne sait pas si cette synthèse requiert la participation d'une seule molécule de VP1 ou de deux (une servant d'amorce et l'autre de polymérase pour l'elongation de la chaîne d'ARN naissante). On ne sait pas non plus si la protéine VP1 est relâchée des ARNm avant leur traduction par les ribosomes.

L'étude des acides nucléiques viraux a permis de révéler l'existence de trois formes d'ARN intermédiaires: 1) un intermédiaire de transcription qui migre dans un gel de polyacrylamide parallèlement à l'ARN génomique, après traitement à la RNase, 2) un ARNm 24S de longueur égale à celle de l'ARN génomique et qui apparaît comme deux bandes après électrophorèse, 3) un ARN bicaténaire 14S qu'on ne peut pas distinguer des ARN du virion. Il n'y aurait donc que deux espèces de messagers, un pour chaque segment d'ARN génomique, et ceux-ci ne seraient pas polyadénylés (Somogyi et Dobos, 1980; Macdonald et Dobos, 1981). Les deux messagers sont produits dans les mêmes proportions relatives, c'est-à-dire deux fois plus de A que de B, tout au long de l'infection.

Alors que l'ARNm provenant du segment B est structurellement et fonctionnellement monocistronique (Macdonald et Dobos, 1981; Duncan *et al.*, 1991), la situation du second messager est longtemps restée plus ambiguë. En effet, avant la

détermination de la première séquence du segment A, on croyait plutôt en l'existence d'un messager unique et polycistronique pour ce segment, puisqu'on n'avait pas encore réussi à détecter la polyprotéine (Mertens et Dobos, 1982). Toutefois, des expériences subséquentes ont démontré que, *in vitro* tout au moins, l'initiation interne de la traduction (*i.e.* la traduction des ARNm à partir d'un codon ATG autre que le premier, mais qui est dans le même cadre de lecture que l'ATG initial de la polyprotéine) était possible (Mertens et Dobos, 1982; Huang *et al.*, 1986; Duncan *et al.*, 1987; Manning et Leong, 1990). Il n'existe actuellement aucun indice permettant d'affirmer que ce phénomène se produit également *in vivo*, mais il pourrait néanmoins expliquer le fait que les diverses protéines ne se retrouvent pas toutes en quantités équimolaires dans les cellules infectées (Dobos, 1977). Il a été suggéré, de plus, que des structures secondaires potentielles en épingle à cheveux, dans la région 5' non codante des ARNm, puissent jouer un rôle dans la régulation de la traduction (Håavarstein *et al.*, 1990a; Kibenge *et al.*, 1991; Mundt et Müller, 1995), mais là encore, il n'y a pas de preuve.

Avec la découverte récente de la VP5, la question de l'existence d'un second messager de petite taille, non encore identifié et spécifique pour ce polypeptide, se pose de nouveau (Magyar et Dobos, 1994b). Une telle molécule d'ARNm n'a néanmoins jamais été observée, ce qui suggère que le segment A n'engendre qu'un seul messager polycistronique.

1.3.4- Synthèse des protéines virales

Les trois classes de protéines spécifiques au VNPI, α , β et γ , sont synthétisées dans les mêmes proportions relatives tout au long de l'infection, à partir de la troisième heure (Dobos, 1977). Il ne semble donc pas y avoir de protéines précoces et tardives. En fait, le ratio molaire relatif indique que la fréquence de synthèse d'un polypeptide est inversement proportionnelle à sa masse moléculaire (Dobos, 1977), exception faite de la VP5. Dans ce dernier cas, malgré tout, la variation du taux de synthèse en fonction du temps de

l'infection est similaire à celle des autres protéines du virus (Magyar et Dobos, 1994b), à savoir un début vers 3 h post-infection, un plateau entre 5 et 10 h, suivi d'un déclin après 11 h.

Tous les polypeptides, à l'exception de la VP1 et de la VP5, subissent un clivage post-traductionnel afin d'atteindre leur taille finale. Le clivage de la polyprotéine par la protéase virale NS se produit très rapidement, d'où la difficulté de la détecter dans les cellules infectées. Toutefois, ce processus étant autocatalytique, il a pu être observé lors de la production de la polyprotéine dans des systèmes hétérologues tels que les lysats de réticulocytes de lapin, les bactéries, ou encore les cellules d'insectes, avec le vecteur baculovirus (Duncan *et al.*, 1987; Manning et Leong, 1990; Magyar et Dobos, 1994a). Pour ce qui est des autres clivages (pVP2 en VP2, VP3 en VP3a et NS_t en NS_{ta}), leur mécanisme n'a pas été étudié, mais on sait qu'ils s'effectuent assez rapidement, sauf pour la protéine NS qui disparaît lentement via l'intermédiaire de 25 kDa (Dobos et Roberts, 1983). À noter que ce clivage ne semble jamais complet puisqu'il est toujours possible de détecter les produits intermédiaires. Certains de ceux-ci pourraient néanmoins être le résultat d'un mécanisme de traduction alternatif, en admettant l'hypothèse que l'initiation interne puisse se produire *in vivo*.

1.4- CARACTÉRISATION SÉROLOGIQUE DU VIRUS

1.4.1- Classification sérologique des *Aquabirnavirus*

Les nombreuses souches du VNPI montrent beaucoup de variation au niveau antigénique, comparativement à l'IBDV. Bien qu'aucune classification officielle n'existe encore, plusieurs études ont été faites à ce sujet. Déjà, les premières souches européennes, Ab et SP, se sont avérées différentes de la souche de référence originelle,

LWVRT 60-1 (souvent appelée VR-299, du numéro de catalogue de l'ATCC), isolée aux États-Unis (Jørgensen et Kehlet, 1971; Wolf et Quimby, 1971). Jusqu'en 1983, toutefois, seuls ces trois sérotypes principaux étaient reconnus (Macdonald et Gower, 1981; Okamoto *et al.*, 1983). Faisant appel à un test de séroneutralisation croisée avec des antisérum de lapin, une étude sommaire de près de 200 souches a révélé l'existence de deux groupes majeurs d'*Aquabirnavirus*, nommés "sérogroupes" I (ou A) et II (ou B). Le séro groupe A contient la grande majorité des virus et se divise lui-même en neuf sérotypes différents (Hill et Way, 1983, 1988), nommés provisoirement A1 à A9 (Christie *et al.*, 1990). Cette classification a été partiellement confirmée par d'autres auteurs en utilisant des anticorps monoclonaux (Caswell-Reno *et al.*, 1989; Christie *et al.*, 1990) et un dixième sérotype, représenté par la souche N1, a été proposé (Christie *et al.*, 1988). Des tests subséquents semblent toutefois démontrer que la souche N1 (sérotype A10) est apparentée de près au sérotype A2, dont fait partie la souche SP (Tarrab, *et al.*, 1993).

Le séro groupe B, quant à lui, ne contenait à l'origine que six isolats qui n'étaient pas neutralisés par des antisérum produits contre les souches du séro groupe A. Ces virus ont montré malgré tout beaucoup de réactions croisées entre eux et ont donc été classés dans un seul sérotype, à l'intérieur du séro groupe B (Hill et Way, 1988). Au meilleur de mes connaissances, seulement deux articles publiés font mention de l'isolement d'*Aquabirnavirus* appartenant au séro groupe B (Olesen *et al.*, 1988; Ahne *et al.*, 1989), mais ce ne sont pas tous les isolats qui ont été caractérisés du point de vue sérologique.

1.4.2- Principaux épitopes du VNPI

Plusieurs études sérologiques ont été réalisées avec le VNPI, mais la plupart des informations disponibles sur la localisation et la structure des épitopes des birnavirus proviennent des travaux effectués avec l'IBDV. Chez ce virus, une région variable de 145

acides aminés, localisée au centre de la VP2 (résidus 206 à 350), a été reconnue comme étant la cible des anticorps monoclonaux neutralisants. Cette région serait très hydrophobe mais avec une petite portion hydrophile localisée près de chacune des extrémités (Azad et al., 1987; Bayliss et al., 1990). Plusieurs auteurs ont par la suite confirmé la présence de ce site majeur de neutralisation sur la VP2 de l'IBDV, qui contient des épitopes continus et discontinus, spécifiques ou non de sérotype (Becht et al., 1988; Fahey et al., 1989, 1991a; Reddy et Silim, 1991). L'analyse des séquences primaires, obtenues pour la VP2 de l'IBDV, a également démontré que la plupart des substitutions d'acides aminés entre les souches de ce virus sont localisées dans la portion centrale de la protéine, notamment au niveau des deux petites régions hydrophiles des extrémités, ce qui entraîne parfois des modifications importantes dans le domaine des épitopes discontinus (Bayliss et al., 1990; Kibenge et al., 1990, 1991; Heine et al., 1991; Öppling et al., 1991a; Brown et al., 1994; Vakharia et al., 1994b). Des épitopes reconnus par des anticorps non neutralisants ont aussi été localisés près de l'extrémité C-terminale de la VP2, mais il ne semble pas y avoir de site antigénique important dans la région N-terminale de la protéine (Azad et al., 1987; Schnitzler et al., 1993).

Les quelques données disponibles sur le VNPI apparaissent corroborer les résultats obtenus avec l'IBDV. Tous les anticorps monoclonaux neutralisants dirigés contre le VNPI se fixent sur la VP2 et reconnaissent des épitopes continus ou discontinus (Caswell-Reno et al., 1986; Nagy et Dobos, 1987; Christie et al., 1990; Tarrab et al., 1993, 1995). De même, en comparant deux séquences du segment génomique A, une région variable a été identifiée au centre de la VP2 (Håvarstein et al., 1990a), mais ce n'est que très récemment que des épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux spécifiques ou non de sérotype ont pu être associés directement à cette portion de la protéine (Frost et al., 1995; Liao et Dobos, 1995).

Comparativement à la VP2, peu de travaux ont été effectués en vue de caractériser les épitopes de la VP3. Dans le cas de l'IBDV comme dans celui du VNPI, seuls des épitopes continus reconnus par des anticorps non neutralisants (ou faiblement neutralisants) ont pu être identifiés sur cette protéine (Azad *et al.*, 1986; Caswell-Reno *et al.*, 1986; Christie *et al.*, 1990; Öppling *et al.*, 1991b; Tarrab *et al.*, 1993). De plus, certains de ces déterminants antigéniques sont partagés par plusieurs souches alors que d'autres sont plus spécifiques de sérotypes (Wolski *et al.*, 1986; Öppling *et al.*, 1991b; Tarrab *et al.*, 1993; Mahardika et Becht, 1995). Dans le cas de l'IBDV, le site de fixation de quelques anticorps monoclonaux anti-VP3 a été localisé dans quatre régions distinctes réparties également le long de la séquence primaire de la protéine (Jagadish et Azad, 1991; Mahardika et Becht, 1995).

1.5- MALADIE CAUSÉE PAR LE VNPI

1.5.1- Symptômes de la nécrose pancréatique infectieuse

Bien que la nécrose pancréatique infectieuse soit reconnue comme une maladie aiguë causant la mort des jeunes alevins, la pathologie est assez complexe. Des facteurs tels que l'âge, l'espèce et la condition physiologique de l'hôte, de même que la température de l'eau et la souche virale, ont une grande influence sur la maladie (Frantsi et Savan, 1971; Dorson et Torch, 1981; Silim *et al.*, 1982; Lapierre *et al.*, 1986; Wolf, 1988). Dans les piscicultures, les infections varient de non apparentes ou subcliniques avec peu ou pas de perte, à très virulente avec un taux de mortalité qui approche les 100% (Wolf, 1988). Les survivants peuvent devenir des porteurs sains pendant toute leur vie et ainsi contribuer à la dissémination du virus (Dorson, 1988).

Pour les éleveurs, le premier signe d'une épidémie est l'accroissement soudain du taux de mortalité parmi les jeunes poissons, le plus souvent des individus plus forts et

plus robustes. Du point de vue clinique, la maladie est caractérisée par une nage tourbillonnante, une couleur plus foncée, et une distension de l'abdomen parfois accompagnée d'hémorragies ventrales et d'une exophthalmie légère ou modérée (Wolf, 1988).

Le nom de la maladie provient de la nécrose sévère du pancréas, mais des changements histopathologiques peuvent être observés dans les tissus adipeux adjacents, les reins, l'intestin et le foie. En fait, le virus peut être isolé d'un grand nombre de tissus et organes, incluant les muscles, les ovaires, l'estomac, en plus de ceux nommés précédemment (Wolf, 1988).

1.5.2- Espèces atteintes et distribution géographique

Le VNPI, ou des particules *VNPI-like*, ont été observés chez un très grand nombre d'espèces de poissons, appartenant à une vingtaine de familles différentes (Wolf, 1988). L'association de ce virus aux salmonidés provient probablement du fait que ce sont les poissons les plus souvent retrouvés dans les piscicultures. D'ailleurs, avec le développement récent de l'élevage des poissons plats comme le turbot et le flétan, on voit paraître des rapports mentionnant la présence du VNPI chez ces animaux, parfois accompagnée d'une épidémie (Castric *et al.*, 1987; Mortensen *et al.*, 1993; Novoa *et al.*, 1993a, 1993b; Biering *et al.*, 1994). Des particules *VNPI-like* ont aussi été observées dans d'autres types d'organismes tels que des mollusques et des crustacés (Lo *et al.*, 1988; Wolf, 1988; Mortensen *et al.*, 1990; Mortensen, 1993; Rivas *et al.*, 1993), mais leur multiplication active n'a pu être démontrée dans ces hôtes. Ils pourraient néanmoins servir de réservoir (Mortensen *et al.*, 1992; Rivas *et al.*, 1993), ce qui peut représenter un danger réel pour les élevages de poissons puisque les virus provenant de mollusques ou de poissons autres que les salmonidés peuvent se montrer tout aussi virulents pour les

truites que le sont certains isolats provenant d'espèces apparentées (McAllister et Owens, 1995).

Le VNPI a une répartition mondiale. Il a d'abord été isolé aux États-Unis, puis en Europe, mais on sait aujourd'hui qu'il est également présent en Asie et en Amérique du Sud (Wolf, 1988). Toutefois, la présence du virus dans certains endroits résulte probablement des échanges internationaux de poissons adultes, d'oeufs et d'alevins. Il existe au moins un cas documenté où la présence du VNPI a été associée à l'importation d'oeufs de salmonidés (McAllister et Reyes, 1984).

1.5.3- Essais de vaccination

Quelques études ont été réalisées en vue de produire un vaccin qui puisse protéger les poissons d'intérêt commercial contre le VNPI. Ces travaux sont toutefois difficiles à comparer puisqu'il faut tenir compte de nombreux facteurs tels que la méthode d'immunisation, le type de vaccin et son mode de préparation, sans compter les conditions qui dépendent des poissons eux-mêmes et de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Les premiers essais réalisés semblent néanmoins démontrer que l'injection directe des antigènes induit une bonne réponse immunitaire chez les salmonidés (Wolf et Quimby, 1969; Sano *et al*, 1981; Dixon et Hill, 1983). Bien que cette méthode soit difficilement envisageable lorsqu'on a de grandes quantités d'alevins, l'injection de virus inactivés avec la formaline peut procurer une protection totale, ce qui n'est pas le cas de l'immunisation orale (par la nourriture) ou de l'infiltration hyperosmotique, qui n'offrent aucune protection. De même, les vaccins atténués par passage en culture cellulaire ou constitués de souches virales sauvages non pathogènes ou encore de protéines virales dénaturées, ne se sont pas avérés plus protecteurs (Dorson, 1988). Dans certains cas seulement, l'immersion des poissons dans une solution de virus inactivés avec la formaline a permis d'obtenir un niveau de protection contre la mort de l'ordre de 45-50% chez les alevins,

sans toutefois prévenir l'infection (Bootland *et al.*, 1990). L'utilisation de la β -propiolactone pour inactiver les virions procure aussi une bonne protection, bien qu'on note une diminution de l'antigénicité comparativement aux protéines traitées à la formaline (Dorson, 1988).

L'utilisation de protéines virales recombinantes pour la vaccination des poissons a été testée, mais peu de rapports détaillés ont été publiés jusqu'à maintenant sur le sujet (Munn, 1994). Manning et Leong (1990) ont observé que l'immersion des animaux dans une solution contenant un lysat de bactéries exprimant la polyprotéine au complet pouvait protéger contre la maladie. Cependant, il a été noté que les bactéries n'exprimant que la VP2 ou une portion de celle-ci ne procurent pas une aussi bonne protection, soit 31,7% et 12% respectivement, au lieu de 60% (Bootland *et al.*, 1993). Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que les principaux épitopes de la VP2 sont de type discontinu, alors que ceux de la VP3 sont continus. Il est possible que la protéine ne se replie pas correctement dans les bactéries. D'ailleurs, des expériences avec l'IBDV ont démontré que l'utilisation de vecteurs d'expression eucaryotes procure une meilleure protection (Azad *et al.*, 1991). Toujours pour la même raison, les premiers travaux effectués sur le pouvoir protecteur de la VP3 de l'IBDV ont amené une certaine confusion. En effet, il a été démontré que la VP3 et non la VP2 pouvait induire la production d'anticorps neutralisants *in vitro* et protecteurs pour les volailles (Fahey *et al.*, 1985; Azad *et al.*, 1986). Ces résultats en apparence contradictoires ont été obtenus parce que la VP2 a été utilisée sous sa forme dénaturée.

Dans le cas de l'IBDV, probablement à cause de son importance économique plus grande comparativement à celle du VNPI, de nombreux travaux ont déjà été effectués concernant l'utilisation de protéines recombinantes pour vacciner les volailles. Outre les expériences mentionnées précédemment portant sur la VP3, plusieurs chercheurs ont démontré l'effet protecteur de la VP2 seule exprimée dans des levures (Macreadie *et al.*,

1990; Fahey *et al.*, 1991b), ou à l'aide du virus de la variole aviaire (*fowlpox*) recombinant (Bayliss *et al.*, 1991; Heine et Boyle, 1993; Heine *et al.*, 1994). Le vecteur viral baculovirus a également été utilisé afin d'exprimer la polyprotéine entière, ce qui a aussi conféré une bonne protection (Vakharia *et al.*, 1993, 1994a; Snyder *et al.*, 1994). Toutefois, il semblerait que dans certains cas la VP2 seule soit plus efficace que l'injection combinée de VP2, VP3 et VP4 (Heine et Boyle, 1993; Heine *et al.*, 1994).

1.6- CONCLUSION

Depuis vingt ans, les connaissances fondamentales sur le VNPI ont beaucoup progressé, grâce notamment aux techniques de la biologie moléculaire. Il reste néanmoins de nombreux points à éclaircir avant de comprendre parfaitement toutes les étapes de la multiplication virale. Par exemple, le site de clivage exact reconnu par la protéase NS, le rôle biologique de la VP5 de même que les mécanismes de réPLICATION du génome et de traduction des ARNm n'ont pas encore été déterminés.

L'abondance de nouvelles données portant sur certains aspects du virus rappelle aussi la nécessité d'établir des règles précises, entre autres pour la nomenclature des protéines virales et la classification des souches, afin d'éviter d'éventuelles confusions. Par exemple, l'appellation de la protéase virale, qui a maintenant été détectée dans les virus purifiés, devrait être modifiée puisque NS (pour "non structurale") ne correspond plus à la situation de cette protéine. De même, avec le développement des techniques de séquençage, il apparaît évident que la division des nombreuses souches du VNPI en groupes distincts ne pourra se faire sans une connaissance accrue des variations génomiques et non plus seulement sérologiques. Ces recherches pourraient servir à établir de meilleures normes et méthodes à suivre afin de limiter la dissémination des souches virulentes du VNPI.

Du point de vue de la recherche appliquée, les efforts sont surtout dirigés vers l'élaboration d'un vaccin sous-unitaire. Des résultats intéressants ont été obtenus avec l'IBDV, mais il est difficile de transposer directement ces connaissances au cas du VNPI. En effet, le système immunitaire des poissons est différent de celui des oiseaux. Par exemple, s'il est possible de protéger les poussins grâce aux anticorps maternels se retrouvant dans les oeufs (Azad *et al.*, 1990; Fahey *et al.*, 1991b), ceci n'a jamais été démontré dans le cas des poissons (Dorson, 1988), bien que la présence d'immunoglobulines ait été rapportée dans les oeufs de certaines espèces (Hayman et Lobb, 1993). Il pourrait donc être nécessaire de vacciner directement les alevins en très bas âge, en autant que leur système immunitaire soit suffisamment mature. Un autre problème particulier au VNPI est sa grande hétérogénéité antigénique. Il n'est pas certain que la réponse immunitaire contre une souche donnée puisse protéger l'animal contre les autres souches du virus, d'autant plus qu'il a été démontré que le système immunitaire des salmonidés peut faire la distinction entre deux souches du VNPI (Håvarstein *et al.*, 1990b). Avec l'IBDV, la protection croisée a pu être augmentée par génie génétique, en insérant un épitope spécifique d'une souche dans la VP2 d'une autre souche (Snyder *et al.*, 1994). Le problème de variation, avec l'IBDV, est toutefois moindre que pour le VNPI. Par conséquent, un vaccin efficace devrait: 1) protéger les poissons dès leur très jeune âge, 2) être facile à administrer et 3) protéger contre une variété de souches virales. Plus important encore, un vaccin, si efficace soit-il, devra être économiquement rentable pour les pisciculteurs. Étant donné la faible valeur monétaire des alevins et la courte période durant laquelle ils peuvent développer la maladie, ce dernier objectif est certes le plus difficile à atteindre.

Bref, malgré les progrès intéressants réalisés jusqu'à présent, la recherche sur le VNPI, tant fondamentale qu'appliquée, doit se poursuivre, non seulement à cause de l'intérêt du virus en soi, mais aussi parce qu'il peut servir de modèle pour l'IBDV ou pour les autres virus de poissons.

CHAPITRE 2

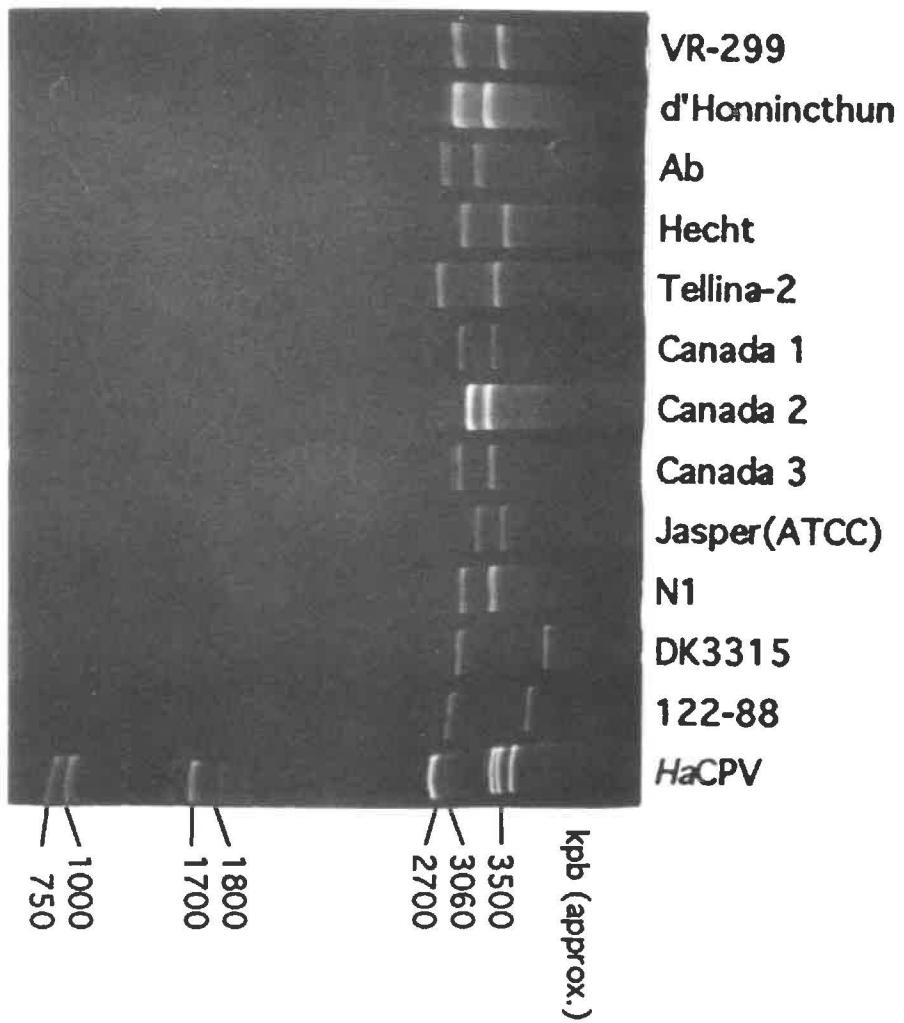
**Études des variations génomiques entre les souches
de VNPI**

Les variations génomiques entre les diverses souches de VNPI disponibles dans notre laboratoire au début du mon projet de doctorat ont été étudiées. Les résultats obtenus concernant cette partie de ma recherche ont été publiés dans deux articles différents. Ces derniers sont présentés intégralement et constituent la presque totalité de ce chapitre. Trois figures supplémentaires ont cependant été ajoutées. Alors que deux d'entre elles illustrent des résultats non publiés mais se rapportant à l'objectif de recherche de ce chapitre, la troisième présente les séquences nucléotidiques correspondant aux numéros d'accession de GenBank mentionnés dans l'article II. La légende de ces figures additionnelles est rédigée en français et porte la mention "non publiée", ce qui permet de les distinguer des figures accompagnant les articles originaux.

Les variations sérologiques entre les nombreuses souches de VNPI ont fait l'objet de plusieurs études. Cependant, très peu de publications font mention des divergences au niveau génomique. Afin d'étudier ces dernières, nous avons d'abord comparé la taille des segments d'ARN A et B. Pour ce faire, 12 souches prototypes du virus ont été sélectionnées et multipliées *in vitro*. Les acides nucléiques viraux ont ensuite été extraits avec du phénol et du chloroforme à partir des cellules infectées, tel que décrit dans l'article I, puis les segments A et B ont été purifiés par migration dans un gel d'agarose préparatif de 0,8% suivie d'une élution à l'aide de la trousse RNaid (Bio 101). La comparaison des profils de migration des segments d'acide nucléique viral sur gel de polyacrylamide a révélé des différences parfois importantes entre les souches prototypes, notamment entre celles appartenant à des sérogroupe différents. Ainsi, les segments A des souches 122-88 (obtenue du Dr W. Ahne, Université de Munich, Allemagne) et DK3315 (obtenue du Dr N. J. Olesen, National Veterinary Laboratory, Danemark), qui appartiennent au sérogroupe B, sont nettement plus grands que la moyenne des segments A des autres souches, qui sont reliées au sérogroupe A (Fig. 1). Ceci suggère que les différences majeures observées au niveau sérologique se reflètent au niveau génomique. Il faudrait néanmoins tester plus de

FIGURE 1: Électrophorèse des ARN génomiques viraux provenant de 12 souches prototypes de VNPI. (Figure non publiée).

Environ 200 à 400 ng des segments A et B purifiés ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 10% et la migration a été effectuée à 15 mA pendant 29 h. Les acides nucléiques ont ensuite été colorés avec du bromure d'éthidium. L'ARN génomique extrait d'un réovirus d'insecte (*HaCPV*) a été utilisé comme marqueur de taille.



souches du sérogroupe B afin de vérifier si la grande taille de leur segment A constitue une généralité ou une exception. La longueur des ARN viraux extraits des autres souches disponibles au laboratoire a aussi été comparée. Dans tous les cas, les profils de migration étaient similaires à ceux des souches prototypes du sérogroupe A testées précédemment.

Les 37 virus disponibles au laboratoire au début de mon projet de doctorat ont également été comparés au niveau de leur profil de restriction. Pour ce faire, un fragment d'ADN complémentaire (ADNc) amplifié par la réaction en chaîne de polymérisation (PCR) a été digéré à l'aide d'endonucléases de restriction, pour chacun des virus¹ (voir l'article I, *Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles*, à la page suivante). Ceci nous a permis de classer les VNPI en trois groupes majeurs et dix sous-groupes. Les résultats obtenus ont également permis de révéler que la souche Jasper disponible à l'ATCC n'était pas la même que celle séquencée par Duncan et Dobos en 1986. Cette observation est mentionnée brièvement dans l'article mais elle est analysée plus en détail dans la discussion générale à la fin de la thèse.

¹ Les souches du sérogroupe B (122-88 et DK3315) n'étaient pas disponibles dans notre laboratoire au moment où les articles I et II ont été rédigés. Elles ne sont donc pas incluses dans les 37 souches mentionnées.

ARTICLE I

Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles

Joël Heppell, Laurent Berthiaume, Esther Tarrab, Jacqueline Lecomte et Maximilien Arella

Institut Armand-Frappier, Centre de recherche en virologie, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

Article publié dans: *Journal of General Virology* (1992), **73**, 2863-2870.

ABSTRACT

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is the etiological agent of an important disease in hatchery-reared salmonid fish in North America, Europe and Japan. It belongs to the family *Birnaviridae* and shows a high antigenic heterogeneity. However, genomic variations between the ten identified serotypes have not been studied yet. In order to correlate genomic heterogeneity with the different serotypes, oligonucleotides were synthesized according to the published sequence of the Jasper strain (serotype A9)². They were used as primers for the amplification of a 359 bp cDNA fragment of the viral genome using the polymerase chain reaction (PCR). Fragments amplified from 37 strains were digested with five different restriction enzymes. Restriction profiles obtained on agarose gels showed heterogeneity not only between strains of different serotypes but also among those belonging to serotype A1. A cluster analysis of the restriction patterns showed that IPNV strains can be divided in three major groups, corresponding approximately to serotypes A1, A2 and A3, and ten subgroups which do not correlate with the serotyping of the strains.

² Les résultats obtenus suite à la publication de cet article ont permis de confirmer que la souche Jasper séquencée par Duncan et Dobos (1986) appartient en réalité au sérotype A1. C'est la souche Jasper (ATCC), dont la séquence n'a pas encore été déterminée entièrement, qui serait reliée au sérotype A9.

INTRODUCTION

Infectious pancreatic necrosis is a common viral disease of fish worldwide. It affects mainly young salmonids, though many other species, such as pike and carp, can be infected (Pilcher and Fryer, 1980). Mortalities are highest in fry at first feeding but become negligible by approximately six months of age (Frantsi and Savan, 1971; Dorson and Torch, 1981; Lapierre *et al.*, 1986). Several epizootics of the disease have been reported in Europe, North America and Japan (Pilcher and Fryer, 1980; Christie *et al.*, 1988).

The etiological agent, infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), belongs to the family *Birnaviridae* (Francki *et al.*, 1991). Its genome consists of a bisegmented double-stranded RNA (Dobos and Roberts, 1983). Segment A, which is approximately 3100 bp in length, encodes a single polyprotein having a M_r of 101 K. It is cleaved to produce, in order from the amino terminal end: VP2, the major structural and antigenic protein of the virion, NS, a non-structural protein with which a protease activity has been associated, and VP3, an internal component of the capsid (Duncan *et al.*, 1987). Other proteins, corresponding to precursor or degradation products, have also been assigned to this segment (Dobos, 1977; Dobos and Rowe, 1977; MacDonald and Dobos, 1981). As for segment B, which is approximately 2900 bp long, it encodes the RNA-polymerase (VP1) of the virus. This protein is found in purified virions as free VP1 or in a genome-linked form (Persson and MacDonald, 1982; Calvert *et al.*, 1991).

Classifications of IPNV strains isolated from different aquatic organisms are not yet well established. The first European isolates, Ab and SP, were shown to be antigenically different from the original reference strain, ATCC LWVRT 60-1 (VR-299) (Jørgensen and Kehlet, 1971; Wolf and Quimby, 1971). Until 1983, only these three major serotypes were recognized (MacDonald and Gower, 1981; Okamoto *et al.*, 1983).

However, Hill and Way (1983, 1988), on the basis of cross neutralization assays, have identified six additional serotypes and two serogroups. All nine serotypes would belong to the same widely predominant serogroup I (or A). A tenth serotype, represented by the N1 strain, was proposed by Christie *et al.* (1988). Experiments with monoclonal antibodies (MAbs) confirmed, in part, this classification (Caswell-Reno *et al.*, 1989; Christie *et al.*, 1990). All IPNV serotypes of serogroup A, tentatively designated A1 to A10 (Christie *et al.*, 1990), showed some degree of cross reaction.

Despite of the data with antisera or MAbs, there is still no evidence for the establishment of such a classification at the genomic level. The few IPNV sequences that were determined do not allow classification of the strains. Genome segment A was sequenced for the Jasper (Duncan and Dobos, 1986) and the N1 strain (serotype A10) (Håavarstein *et al.*, 1990a). An identity of 79,5% between the nucleotide sequences of the two strains was found. Segment B from two strains, Jasper and SP (serotype A2) was also sequenced (Duncan *et al.*, 1991). An overall homology of 80,7% at the nucleotide level was found. Still, there are not enough strains sequenced to establish a classification. However, in the case of infectious bursal disease virus (IBDV), another member of the family *Birnaviridae*, it was possible to make a correlation between genomic variations and the two known serotypes. In fact, when comparing the nucleotide sequences, an homology of 83,1 to 83,8% was found between IBDV strain OH (serotype 2) and five serotype 1 strains, while between strains of the same serotype, the homology was of 92,3 to 99,7% (Bayliss *et al.*, 1990; Kibenge *et al.*, 1990, 1991). Moreover, if the most distant strain of IBDV serotype 1 is eliminated, the homology between the four others raises to 97,4 to 99,7%.

In this paper, restriction profiles obtained from a cDNA fragment were used to classify 37 different IPNV strains. This proposed classification, based on genomic variations, is compared with the ten serotypes.

METHODS

Cells and viruses. IPNV strains used in this work are listed in Table 1. Strains from provinces of Québec and Newfoundland (Canada) were isolated in our laboratory while the others were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), except for the N1 strain which was kindly provided by Dr. K. E. Christie (University of Bergen, Norway). All these viruses were grown on Chinook salmon embryo (CHSE-214) or Rainbow trout gonad (RTG-2) cells at 20°C. The culture medium used for the cell growth was composed of equal parts of MEM (minimal essential medium in Earl's solution) and 199 medium (in Hanks solution), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50 mg/ml gentamycine and 10 U/ml nystatin (Gibco-BRL). Once the cells were infected, only 1% FBS was used.

RNA extraction. Viral RNAs were extracted from infected cells after complete cytopathic effect. To remove gross debris, cell culture supernatant was centrifuged at 10 000 g for 45 min. Viruses were then pelleted by ultracentrifugation (100 000 g, 2 h) and resuspended in TE buffer (10 mM-Tris, 1 mM-EDTA) pH 8.0. They were next digested with 2 mg/ml proteinase K and 1% (w/v) SDS for 2 h at 37°C. Nucleic acids were finally extracted with phenol and chloroform before precipitation with one volume of 5 M ammonium acetate and 2,5 volumes of 100% ethanol at -20°C. Pellets were resuspended in distilled water.

Amplification of the 359 bp cDNA fragments. Oligonucleotides were synthesized according to the published sequence of the Jasper strain (Duncan and Dobos, 1986). The first oligonucleotide, AGAGATCACTGACTTCACAAGTGAC, corresponds to position 1403 to 1427 on the Jasper sequence, while the second one, CTCAGTAGAAAGGACACCACGTGT, corresponds to position 1746 to 1761. They were both used as primers for the first strand synthesis of cDNA with the Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) reverse

transcriptase (Pharmacia). Heat denatured (100°C, 5 min) viral RNAs, extracted from cell cultures, were used as templates for the enzyme, according to the procedure described by Sambrook *et al.* (1989). After a 45 min incubation at 37°C, RNA-DNA hybrids were denatured at 100°C for 5 min, and the cDNA fragments were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using *Taq* DNA polymerase (Bio/Can Scientific) and the same oligonucleotides. The following parameters were used: denaturation 1 min at 95°C, annealing 2 min at 50°C and elongation 3 min at 72°C (35 cycles). Nucleic acids from uninfected cell cultures were used as negative controls.

Digestion with restriction endonucleases. Amplified fragments obtained with the 37 IPNV strains were first precipitated with ethanol at -20°C and resuspended in 10 µl of water. They were then sequentially digested with five restriction endonucleases: *Alu*I, *Ava*II, *Hae*III, *Hpa*II and *Nci*I (Boehringer Mannheim). Digestions occurred at 37°C, for 2 h, in buffers supplied by the manufacturer. Results were visualized by running the digested fragments at 180 V on a 4% agarose gel (Biogel, BIO 101 Inc.) and staining with ethidium bromide.

Classification of strains. In order to establish relationships between IPNV strains, a hierarchical cluster analysis of all restriction profiles obtained with the five endonucleases was carried out by computer with the SPSS (statistical package for social sciences) program.

RESULTS

A cDNA fragment was amplified with the 37 IPNV strains tested. In all cases, fragments obtained were 359 bp long as expected, thus showing a certain homology between these viruses. However restriction profiles revealed some variations.

ATCC serotype A1 strains digestion with *NciI* led to the apparition of the expected size subfragments of the PCR products (Fig. 2a, lanes 22 to 26), as could be determined from the published Jasper sequence (Duncan and Dobos, 1986). Moreover, all but eight strains isolated in Québec and Newfoundland (Eastern Canada) were identical to these ATCC strains (Fig. 2a, lanes 1 to 21). As for the remaining ones from Eastern Canada, five of them, ART-H82, LAB-P89, LEB-E87, STT-P90 and TN3-A89, showed no subfragments. The three other strains, MTB-A87, STM-A89 and TN9-A89, shared a unique pattern with the ATCC Jasper strain (Fig. 2a, lane 36) which, surprisingly, was not digested as expected. Instead of the 178, 105 and 76 bp subfragments determined by analysis of the published sequence, only one band, probably containing two subfragments of approximately 180 bp, was observed on the gel. No cutting of the PCR products occurred for strains of serotypes A2 to A8, and A10 (Fig. 2a, lanes 27 to 35 and 37).

Occasionally, extra lighter bands appeared on the gels, presumably caused either by non-specific hybridization of the primers or by nucleotide mismatches introduced by the *Taq* polymerase during PCR.

Digestion with *AvaII* (Fig. 2b) and *HpaII* (Fig. 2c) gave five distinct profiles each, but homology between IPNV strains was not exactly the same in both cases. For example, except for TN3-A89 and TN9-A89, all Québec and Newfoundland strains appeared identical when *HpaII* was used (Fig. 2c, lanes 1 to 21), while the distribution of the profiles observed with *AvaII* (Fig. 2b, lanes 1 to 21) was similar to that described for *NciI*. Nevertheless, most of ATCC serotype A1 and Eastern Canada strains gave the expected subfragments, as for the Jasper strain: 113, 99, 92 and 55 bp for *AvaII*, 177, 79, 76 and 27 for *HpaII*. Only the West Buxton strain was clearly distinct from other serotype A1 strains in both cases (Fig. 2b and 2c, lane 24).

Compared to the first three enzymes, more restriction patterns were obtained with *AluI* and *HaeIII* (Fig. 2d and 2e respectively). Thus, these enzymes showed more

heterogeneity between the ten serotypes. However many differences also appeared between ATCC strains of serotype A1 and between strains from Eastern Canada. Still, West Buxton (Fig. 2d and 2e, lane 24) had a unique pattern among all serotype A1 strains. As for the Jasper strain (Fig. 2d and 2e, lane 36), the expected subfragments of 134, 127, 55 and 43 bp for *AluI* and 127, 120, 83 and 29 bp for *HaeIII* were not observed. However, some serotype A1 strains (LWVRT 60-1, Powder Mill, STP-A88, TAD-A87 and TN1-P89) always gave the expected subfragments for the Jasper strain. In the same way, the expected subfragments for the N1 strain, as deduced from the published sequence (Håvarstein *et al.*, 1990a), were obtained with the five restriction enzymes, not only with N1 (Fig. 2a to 2e, lane 37), but also with serotype A2 strains: d'Honnincthun, Bonnamy and SP (Fig. 2a to 2e, lanes 27 to 29).

Some strains consistently showed identical restriction profiles while others appeared always different, as for serotype A2 strains and LWVRT 60-1. To determine relationships (*i.e.* the percentage of association) between IPNV strains tested, a cluster analysis was carried out. For each of the five enzymes, sets corresponding to the different restriction patterns were determined. The more often a specific strain is in the same set (*i.e.* has the same restriction profile) as another particular one, the more they are related. Thus, up to 15 clusters could be determined by combining results from the five endonucleases. The dendrogram in Figure 3 shows the associations between IPNV strains, as a function of the number of clusters. Strains belonging to the same cluster, or group, are more closely related if the number of clusters is high, but differences between two groups become less significant. On the other hand, when there are few clusters, strains could be less related within the same group, but differences between clusters become more significant.

DISCUSSION

Restriction profiles showed genomic variations between IPNV strains tested. Although very small differences can be detected with a single enzyme, the use of five different endonucleases makes a cluster analysis possible, thus giving a better idea of the relationship between strains. Up to 15 clusters could be formed, but because most of the strains that were separated over ten clusters could be distinguished from each other only by one enzyme out of five, ten clusters appears to be more significant and representative of the homology between IPNV strains tested. A classification with ten different subgroups and three major groups, tentatively designated as "genogroups" I to III, is then proposed (Fig. 3).

In the case of IBDV, there is a good correlation between sequence similarity and the two known serotypes (Kibenge *et al.*, 1991). However, the classification proposed in this paper does not correspond to the ten serotypes of IPNV. Nonetheless, it must be considered that the cDNA fragments used are unlikely to encode an important epitope of the virus. In fact, the amplified region covers the C-terminal part of the VP2 and the N-terminal part of NS protein while all MAbs developed against IPNV are either VP2 or VP3 specific (Caswell-Reno *et al.*, 1986; Nagy and Dobos, 1987; Lecomte *et al.*, 1992). Similar data were also obtained with IBDV (Azad *et al.*, 1987; Becht *et al.*, 1988; Fahey *et al.*, 1989; Jagadish and Azad, 1991). Because the precise location of the junction between the two proteins on genome segment A has not been determined yet, it is not possible to calculate the exact proportion of each protein included in the cDNA fragment. Nevertheless, this region is suitable for the analysis of genomic variations between IPNV strains. Except for the central region of VP2, the segment encoding the NS protein is the most variable section of genome segment A, when comparing nucleic acid sequences of the Jasper and the N1 strains (Håvarstein *et al.*, 1990a). Moreover, within the VP4 polypeptide of IBDV, which corresponds to the NS protein of IPNV, the N-terminal part is the most variable between

the two known serotypes, with 56% of the amino acid mismatches (Kibenge *et al.*, 1991). However, comparison between nucleotide sequences of IBDV strains of the same serotype showed that the VP4 region is more conserved than the rest of segment A (Bayliss *et al.*, 1990). Consequently, this region is appropriate for studying genomic variations between serotypes, although it may lead to a different classification than that which would be obtained by serological methods. By working on the hypervariable central region of VP2, which is probably responsible for serotype specificity in IPNV and IBDV, it could be possible to obtain a better correlation between genetic and serological classifications. However, the great heterogeneity of this region could have caused difficulties for primers hybridization, thus resulting in less efficient and less specific PCR amplification. Moreover, problems could arise in the establishment of relationships between strains, since restriction profiles could be different for each strain.

Despite the lack of correlation between proposed subgroups and the ten serotypes, it is interesting to note from Figure 3 that there is very little homology between the type strains of serotype A1 (LWVRT 60-1), serotype A2 (SP) and serotype A3 (Ab). As a result of this observation, IPNV strains can be divided in three genogroups. This is consistent with the fact that SP, Ab and LWVRT 60-1 are usually regarded as type strains of three corresponding major serotypes (Ahne, 1981; Dominguez *et al.*, 1991). The seven new serotypes do not clearly dissociate from A1, A2 and A3, except maybe for the Canada-2 strain (serotype A7). Because serological analysis of viruses are influenced by various factors such as the method of antisera production and standardization of the procedure, more tests with MAbs raised against different serotypes would be required to confirm the existence of ten truly different serotypes. In fact, one of the major problems in conventional virus neutralization tests is that isolates of IPNV differ in stability and the amount of non-infectious virus produced during replication (Wolf and Quimby, 1971; McMichael *et al.*, 1978; Nicholson and Pochebit, 1981). Consequently, it is difficult to standardize the antigen dose since the infectivity alone does not insure that virus

preparations will contain equivalent quantities of antigen. Therefore, results of the neutralization test could vary regardless of recognition of the antigen by the antibody. So, a classification in three major groups appears more appropriate to conciliate both genomic variation studies and antibodies reactions.

Genogroup I is largely predominant in North America while genogroups II and III contain all, but not only, European strains. It would be interesting to test Asian strains to see if they could fit in one of the three genogroups. Many of these strains are currently related to serotypes A1 and A3 (Caswell-Reno *et al.*, 1989; Hsu *et al.*, 1989) though few of them appeared to be related to A2 or other serotypes (Lipipun *et al.*, 1989).

Most of the strains from Eastern Canada (Québec and Newfoundland) were identical or closely related to one of the ATCC serotype A1 strains. Although variations inside genogroup I were greater than inside the other genogroups, this situation may result only from the fact that this genogroup is largely over-represented since 26 of the 37 strains tested were classified in this group. However, it has already been reported that significant antigenic differences exist among individual members of the serotype A1 (Nicholson and Pochebit, 1981; Caswell-Reno *et al.*, 1986) which account for almost all genogroup I strains.

The situation with regard to three of the strains is rather ambiguous. First, it was surprising that the expected subfragments for the Jasper strain were not observed. In contrast, the bands predicted for this ATCC strain (VR-1325) were obtained with five other strains: LWVRT 60-1, Powder Mill, STP-A88, TAD-A87 and TN1-P89. To verify these findings, experiments were performed twice and results were compared with those obtained with another Jasper strain (kindly provided by Dr. Peter Dobos, University of Guelph, Canada). Subfragments obtained with the latter strain were of the same size as those predicted from the published sequence (results not shown). Thus, it seems that the ATCC Jasper strain does not correspond to the strain sequenced by Duncan and Dobos

(1986). According to our results however, ATCC Jasper remains strongly associated with genogroup I. This situation did not occur with the N1 strain which reacted as expected in all cases.

Second, restriction fragment profiles obtained with the West Buxton strain are clearly different from those of other viruses of the same serotype. In fact, it is the only serotype A1 strain not classified in genogroup I. Whether or not there is a high degree of similarity between the rest of genome segment A of West Buxton and of other serotype A1 strains, it should not be considered as the reference strain for this serotype, as has been suggested (Hill and Way, 1983; Caswell-Reno *et al.*, 1986, 1989; Lipipun *et al.*, 1989). LWVRT 60-1 seems to be more appropriate since it exhibits greater similarity to the other strains of the same serotype.

The third ambiguous case is that of the Canada-2 strain. It is classified in subgroup IIb. Although this subgroup is located within genogroup II, it has little homology with strains of subgroup IIc. Together with West Buxton (subgroup IIa), Canada-2 could form a fourth genogroup, but this has to be confirmed by a more detailed analysis of the nucleotide sequences.

Determination of genomic variations is simpler and more reliable than the use of neutralization tests for the classification of viruses, since it is not influenced by uncontrolled experimental factors. The method used in this work to compare and classify IPNV strains on the basis of their restriction fragment profiles provides a simpler and faster alternative to direct sequence analysis at the amino acid or nucleic acid level. Until more strains of IPNV are sequenced, it remains the most precise method for the classification of IPN viruses on the basis of the genomic variations. Nevertheless, the amplification of larger cDNA fragments would increase the flexibility in choosing restriction enzymes. Moreover, they could be more representative of genomic variations between entire viral genomes and could allow a better correlation with serological

classifications particularly if the investigated region encompasses the hypervariable portion of the VP2 protein.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marie Désy for the statistical analysis. This work was supported by CORPAQ (Conseil des Recherches en Pêche et Agro-Alimentaire du Québec), grant no 2800.

Table 1

List of IPNV strains used in article I

	Strain*	Origin	Serotype
1	ART-H82	Québec (Canada)	A1
2	COO-E89	Québec (Canada)	A1
3	EBR-E81	Québec (Canada)	A1
4	KNO-P81	Québec (Canada)	A1
5	LAB-P89	Québec (Canada)	A1
6	LAR-A89	Québec (Canada)	A1
7	LCW-P89	Québec (Canada)	A1
8	LEB-E87	Québec (Canada)	A1
9	LSF-H82	Québec (Canada)	A1
10	MTB-A87	Québec (Canada)	A1
11	PHO-A90	Québec (Canada)	A1
12	SFK-A86	Québec (Canada)	A1
13	STL-E86	Québec (Canada)	A1
14	STM-A89	Québec (Canada)	A1
15	STO-E88	Québec (Canada)	A1
16	STP-A88	Québec (Canada)	A1
17	STT-P90	Québec (Canada)	A1
18	TAD-A88	Québec (Canada)	A1
19	TN1-P89	Newfoundland (Canada)	A1
20	TN3-A89	Newfoundland (Canada)	A1
21	TN9-A89	Newfoundland (Canada)	A1
22	LWVRT 60-1 (VR-299)	West Virginia (USA)	A1
23	Reno (VR-869)	Nevada (USA)	A1
24	West Buxton (VR-877)	Maine (USA)	A1
25	Powder Mill (VR-883)	New Hampshire (USA)	A1
26	Buhl (VR-890)	Idaho (USA)	A1
27	d'Honnincthun (VR-876)	France	A2
28	Bonnamy (VR-881)	France	A2
29	SP (VR-1318)	Denmark	A2
30	Ab (VR-1319)	Denmark	A3
31	Hecht (VR-1320)	Germany	A4
32	Tellina-2 (VR-1321)	England	A5
33	Canada-1 (VR-1322)	Maritimes (Canada)	A6
34	Canada-2 (VR-1323)	Maritimes (Canada)	A7
35	Canada-3 (VR-1324)	N.O.T. (Canada)	A8
36	Jasper (VR-1325)	Alberta (Canada)	A9
37	N1	Norway	A10

*Numbers in parentheses correspond to American Type Culture Collection catalog numbers

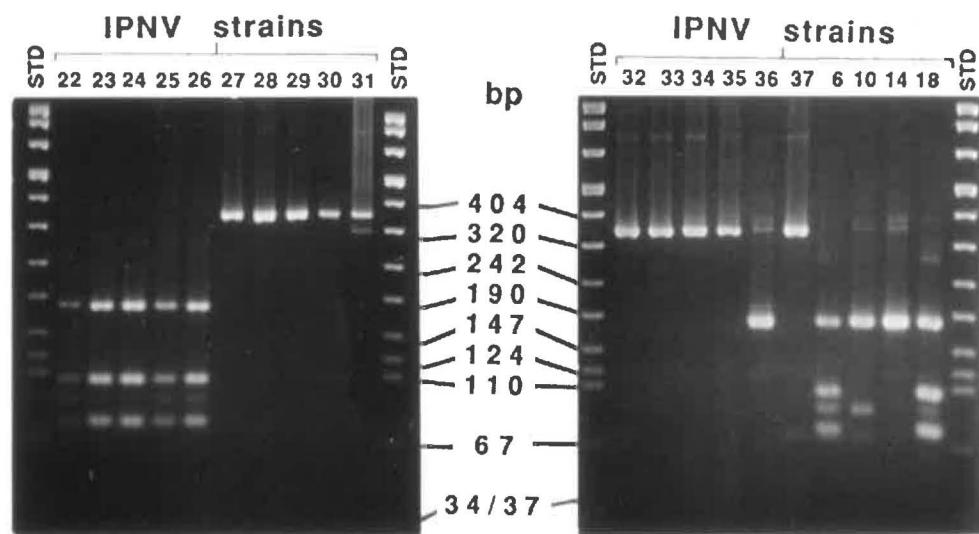
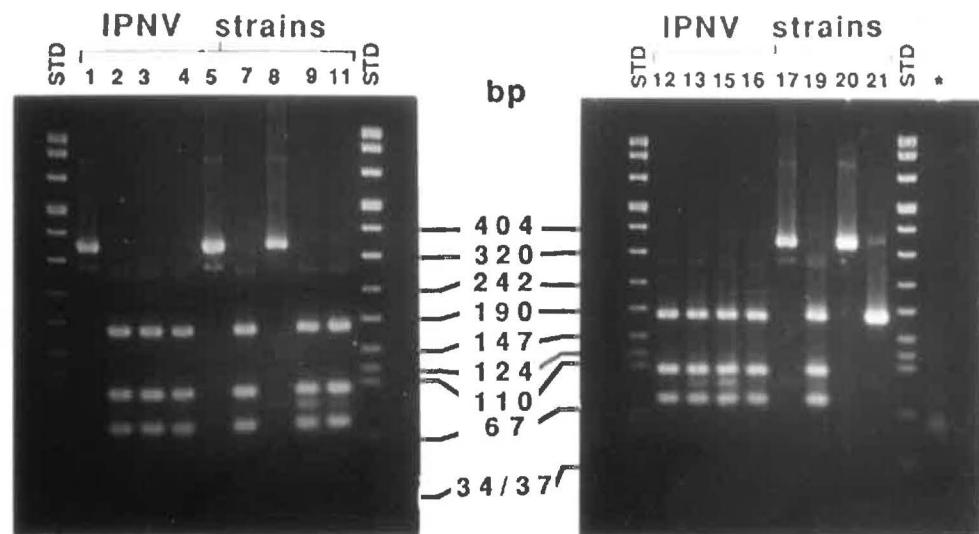
FIGURE 2: Restriction fragment profiles obtained after digestion of a 359 bp cDNA fragment amplified from 37 IPNV strains.³

- a) digestion with *Nci*I (page 50)
- b) digestion with *Ava*II (page 51)
- c) digestion with *Hpa*II (page 52)
- d) digestion with *Alu*I (page 53)
- e) digestion with *Hae*III (page 54)

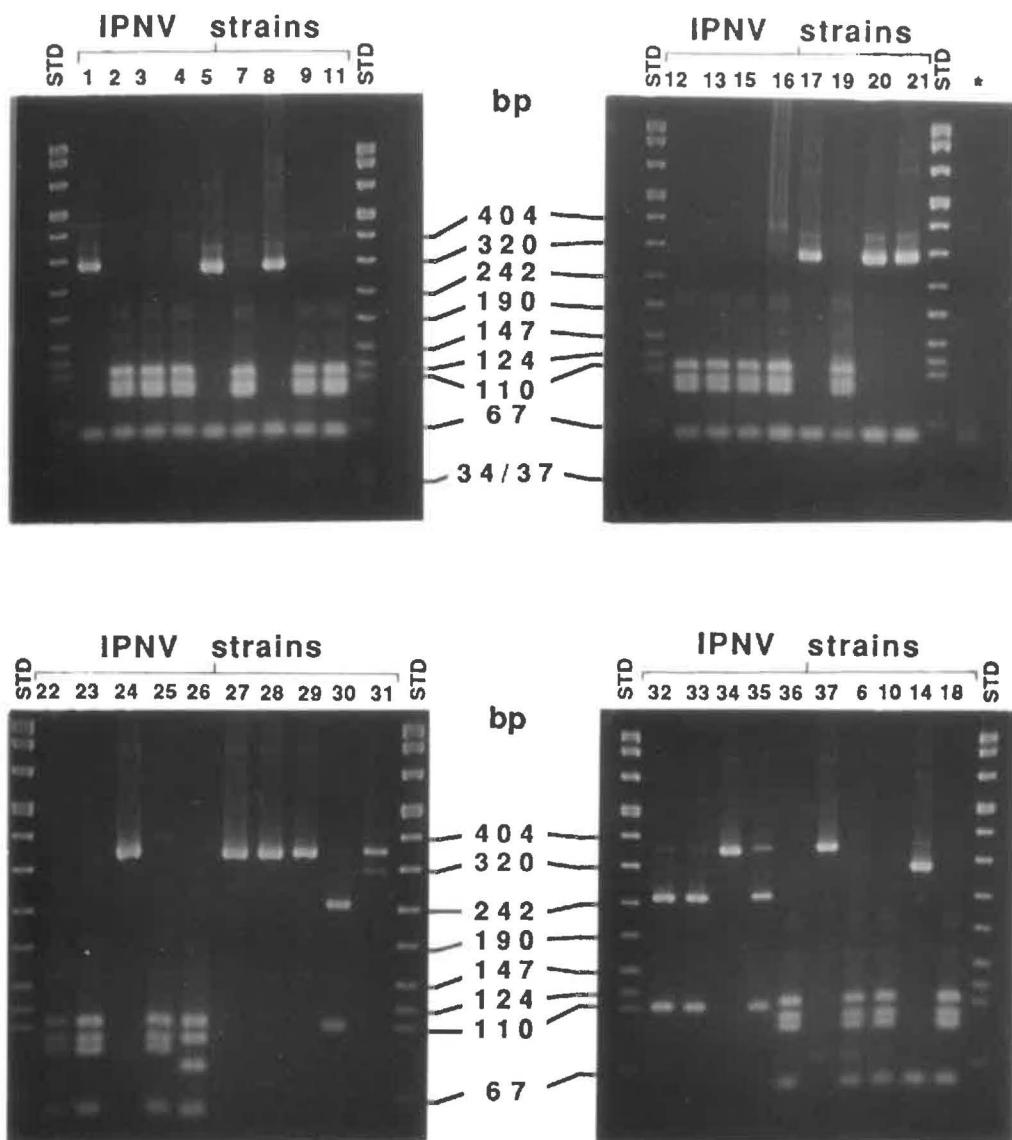
The numbering of the strains correspond to that in Table 1. The size (bp) of standards (STD) is indicated. *, Negative control.

³ Cette légende a été légèrement modifiée afin de tenir compte de la présentation différente de la figure qui s'étale sur cinq pages dans cette thèse, alors qu'elle n'en occupait que deux dans de l'article publié.

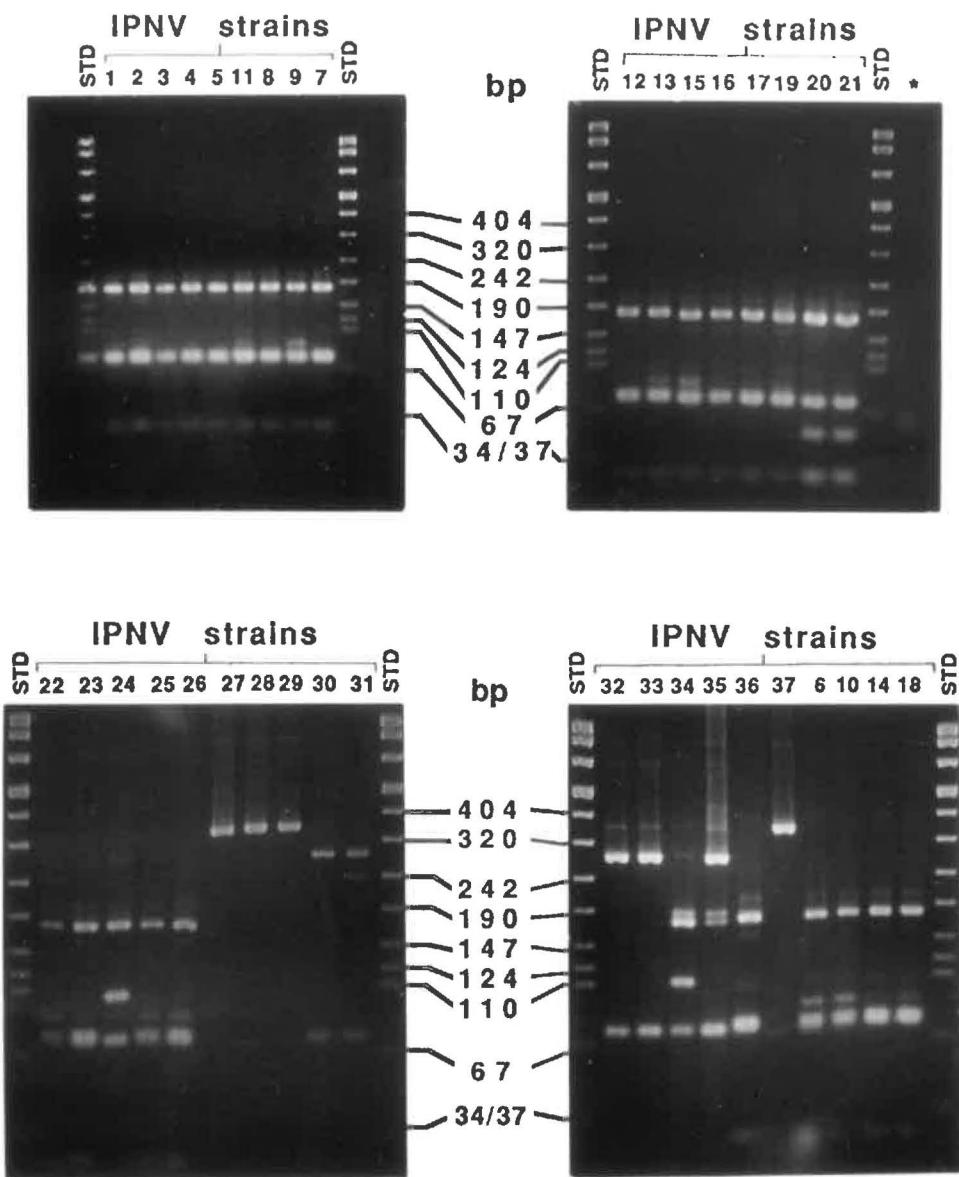
a)



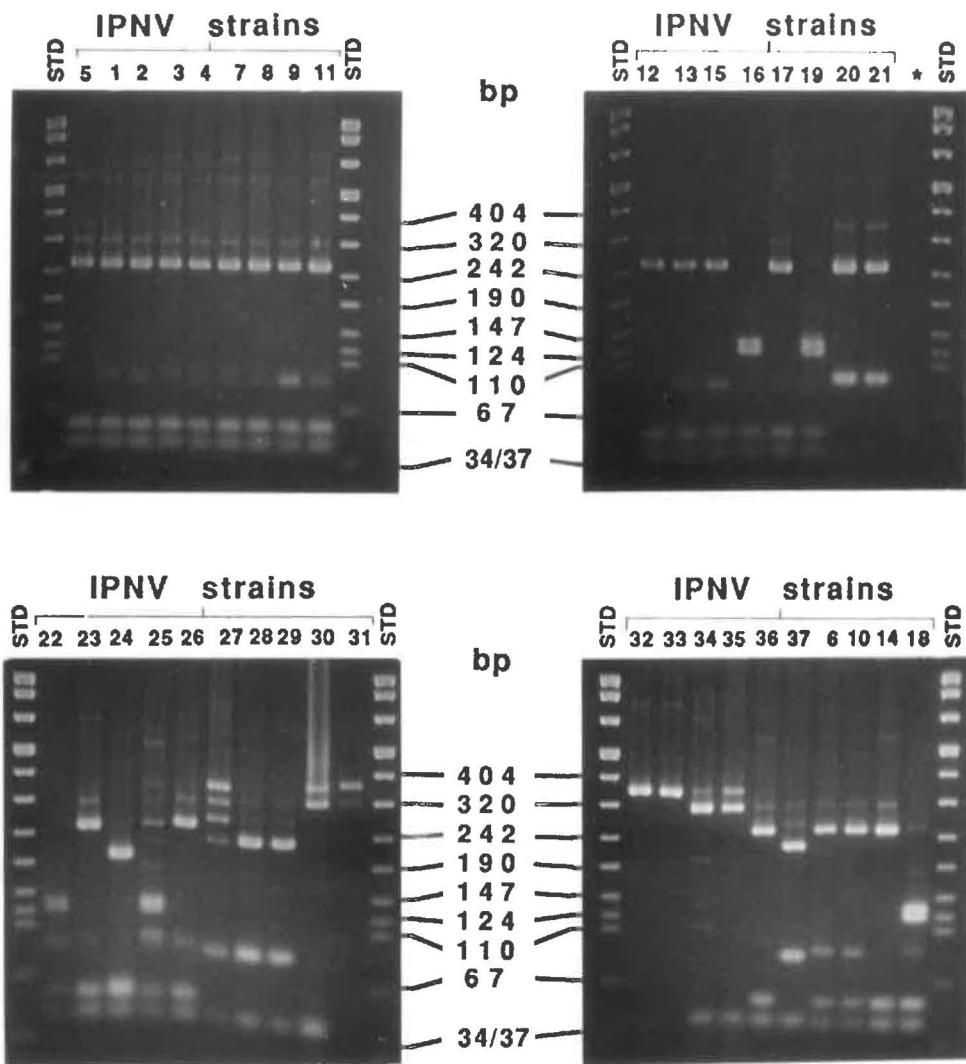
b)



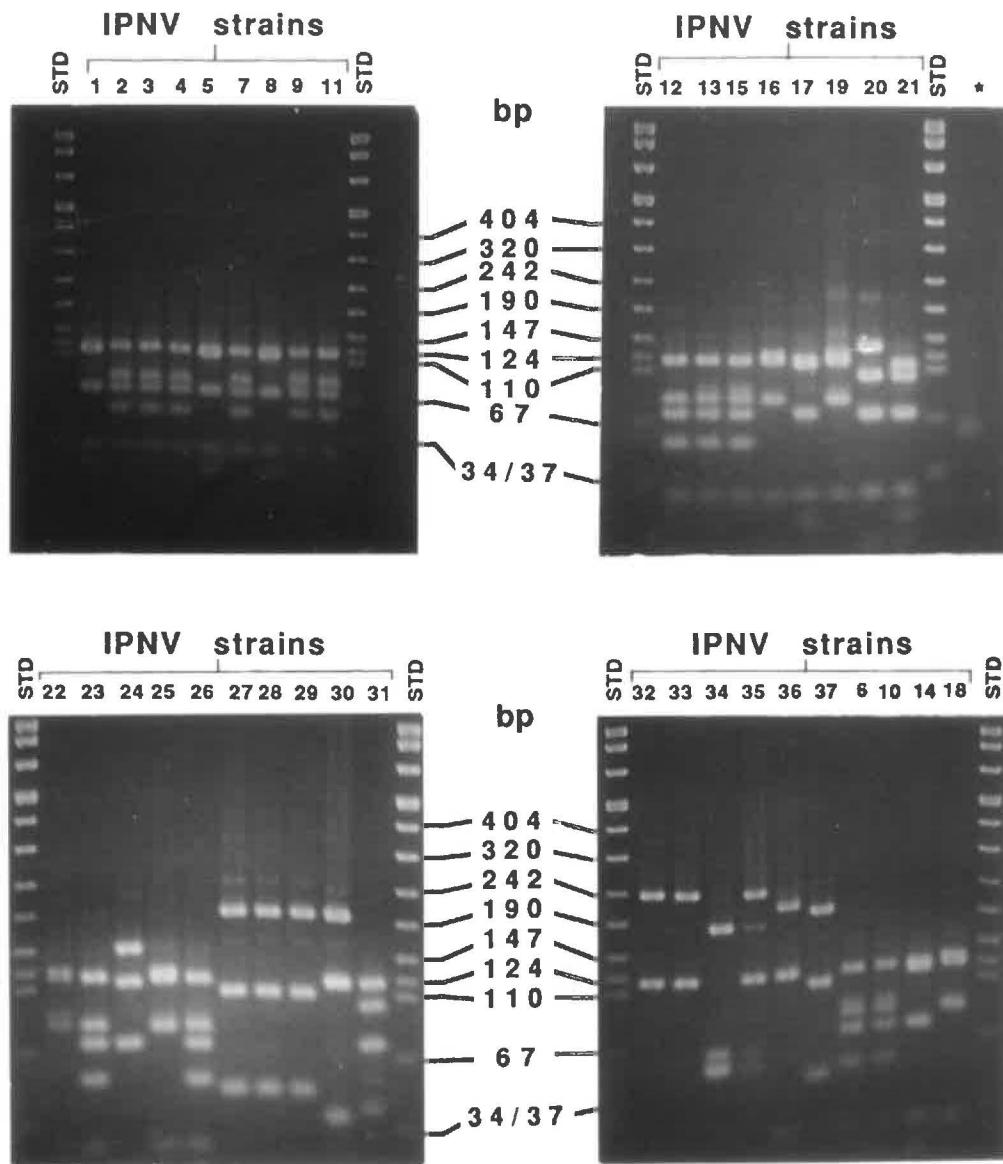
c)



d)



e)



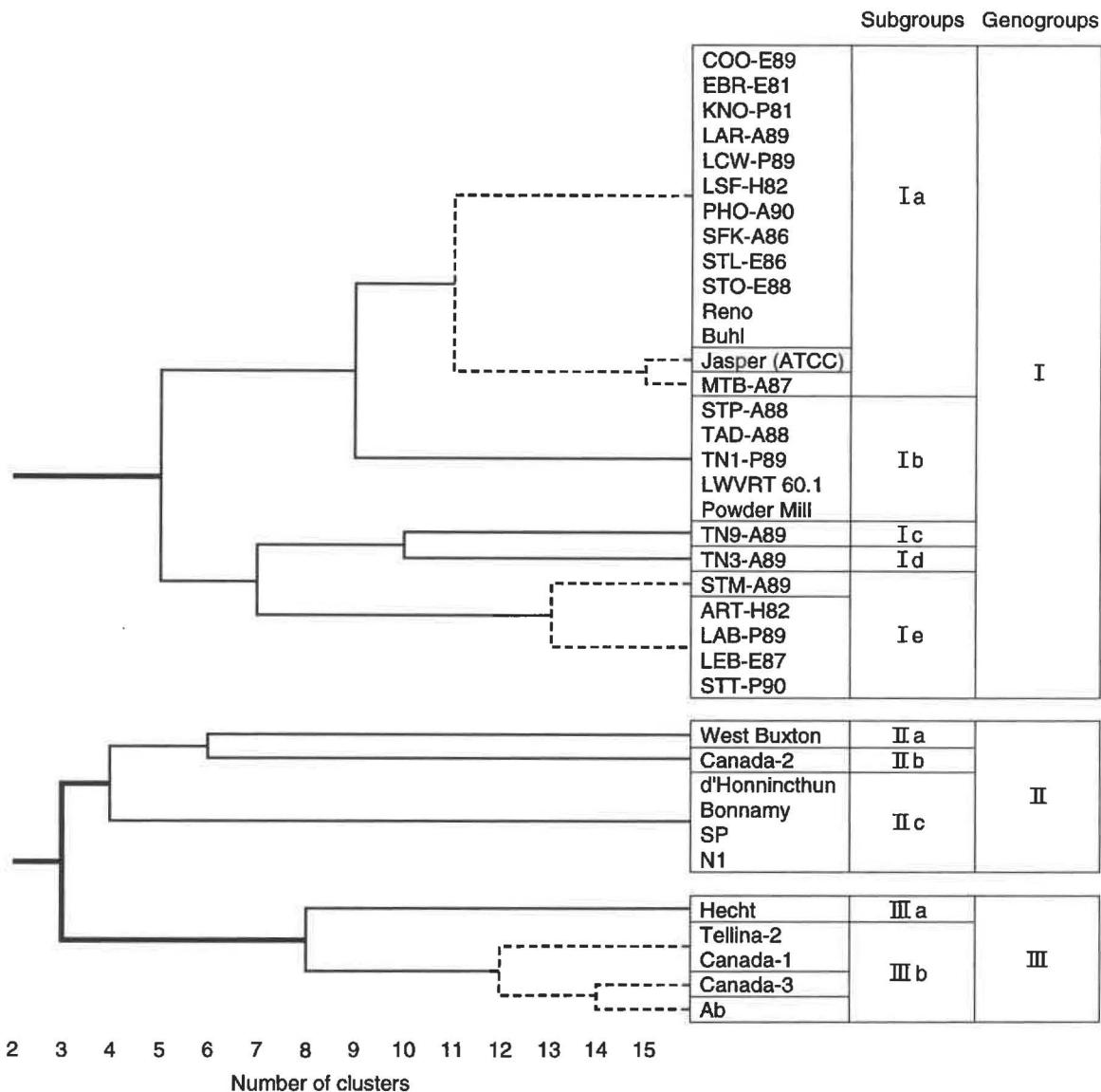


FIGURE 3: Dendrogram representing the relationships between IPNV strains as determined by cluster analysis of the restriction profiles.

Genogroups and subgroups are indicated at the right. Thick lines, divisions used for genogrouping; thin lines, divisions used for subgrouping; dotted lines, divisions appearing after ten clusters.

Étant donné que 18 des 37 souches utilisées dans l'article I proviennent du Québec, une analyse plus détaillée des variations génomiques a été effectuée au niveau provincial, mais elle n'a pas été incluse dans la publication à cause de son intérêt plus local. Cette étude a démontré que la répartition géographique des sous-groupes génomiques suit une distribution non aléatoire (Fig. 4). Par exemple, le sous-groupe principal, c'est-à-dire celui qui contient le plus d'isolats, se retrouve exclusivement sur la rive sud du St-Laurent, depuis la Gaspésie jusqu'à la frontière avec de l'état du Vermont, à l'exception d'un cas dans la région d'Ottawa. Un autre sous-groupe est plutôt localisé au nord du St-Laurent et dans l'ouest de la province, tandis que les autres variants sont exclusifs au centre du Québec.

L'analyse des profils de restriction, telle que réalisée dans l'article I, permet la comparaison rapide d'un grand nombre d'échantillons mais pas la détermination exacte du pourcentage de similarité entre deux génomes. Afin d'évaluer plus précisément le degré d'homologie entre les souches du VNPI, 17 d'entre elles ont été sélectionnées afin d'être séquencées au niveau du fragment d'ADNc amplifié précédemment. Au moins une souche de chacun des dix sous-groupes génomiques et de chacun des sérotypes du sérogroupe A a été utilisée. La classification obtenue en calculant le pourcentage d'homologie est similaire à celle déterminée avec les profils de restriction, c'est-à-dire une répartition des virus en trois groupes majeurs. Les dix subdivisions n'ont toutefois pas été retenues (voir l'article II, *Comparison of amino acid sequences deduced from a cDNA fragment obtained from infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different serotypes*). La détermination des séquences en acides aminés a également permis de rechercher un site de clivage potentiel entre les protéines NS et pVP2, qui serait conservé parmi toutes les souches étudiées de VNPI et de l'IBDV. Toutefois, tel que discuté dans l'article II, aucun motif évident n'est apparu conservé chez tous les birnavirus.

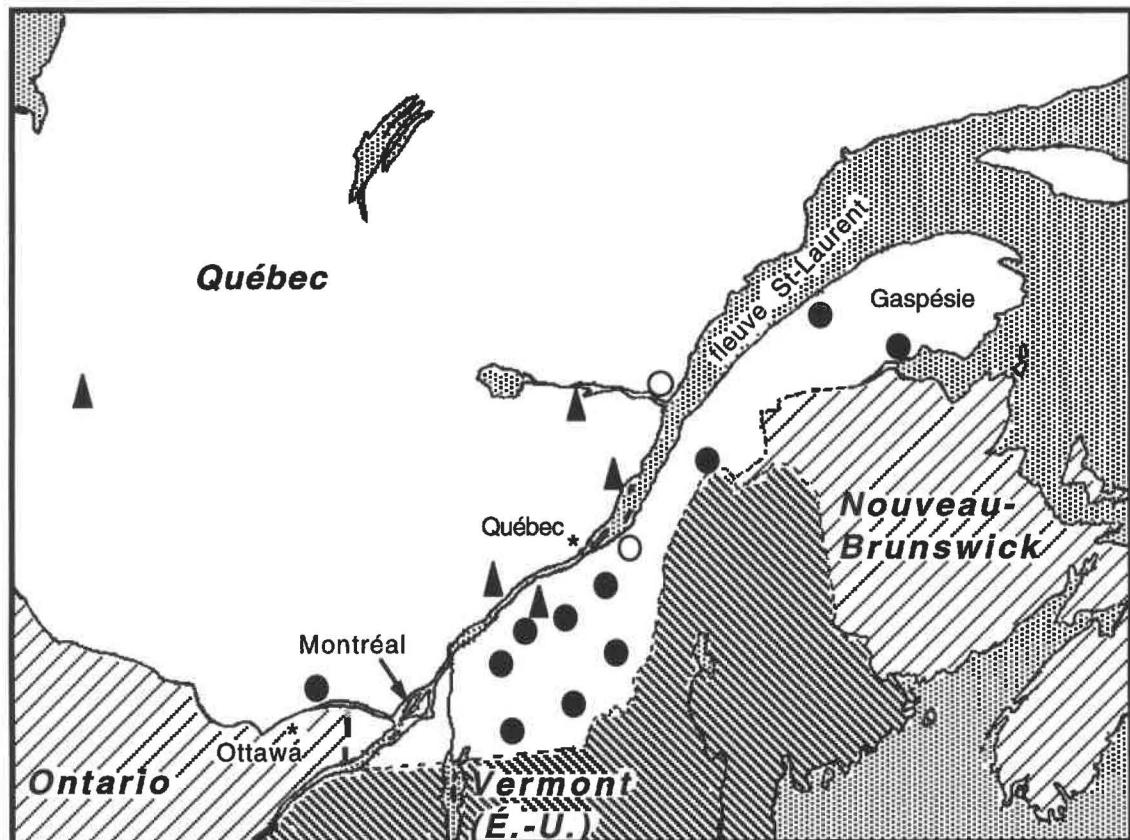


FIGURE 4: Localisation géographique des isolats québécois du VNPI. (Figure non publiée).

Les différents sous-groupes génomiques sont identifiés par des symboles distincts: ●, sous-groupe Ia; ○, sous-groupe Ib; ▲, sous-groupe Ie.

À noter que les souches du sérogroupue B (122-88 et DK3315) n'ont pas été utilisées dans cet article parce qu'elles n'étaient pas disponibles au moment où le travail a été effectué. Des essais préliminaires réalisés suite à la publication des travaux n'ont pas permis d'amplifier le fragment de 310 pb en utilisant la même paire d'amorces. En fait, plusieurs paires d'oligonucléotides, synthétisés selon la séquence de diverses souches du sérogroupue A, ont été testées comme amorces pour l'amplification par PCR d'une portion du génome de 122-88 et DK3315, mais aucune n'a permis d'obtenir un fragment d'ADNc. Il semble donc que la différence génomique entre les souches des deux sérogroupes soit assez grande, mais il n'a pas été possible de la quantifier en faisant appel à la méthode décrite dans l'article II.

ARTICLE II

Comparison of amino acid sequences deduced from a cDNA fragment obtained from infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different serotypes

Joël Heppell, Laurent Berthiaume, François Corbin, Esther Tarrab, Jacqueline Lecomte et Maximilien Arella

Institut Armand-Frappier, Centre de recherche en virologie, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

FOOTNOTE: The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank nucleotide sequence database and have been assigned the accession numbers L13664 and L13978 to L13993.

Article publié sous forme de *short communication* dans: *Virology* (1993), **195**, 840-844.

ABSTRACT

Infectious pancreatic necrosis is an important viral disease of salmonid fish reared in hatchery. Its aetiological agent, IPNV, showed a high degree of antigenic heterogeneity. Up to ten serotypes and two serogroups were proposed. Yet, very little is known about genomic variations among viruses of different origin. In order to investigate these variations, a 310 bp cDNA fragment was prepared from 17 IPNV strains by reverse transcription of the viral genome and amplification by the polymerase chain reaction. These fragments were then cloned and sequenced. Comparison of the 17 sequences obtained with three previously published ones, at the amino acid level, showed that serologically related viruses are highly homologous (over 96% homology) but some strains which were reported to belong to different serotypes also appeared closely related. Thus, only three major groups, clearly distinct from each other, could be formed. Apart from this, a search for the exact cleavage site of the unprocessed polyprotein of IPNV was done since the amplified fragment used for sequencing was localized at the junction between two polypeptides of the virus, pVP2 and NS. No obvious sequence or dipeptide appeared conserved in all birnaviruses.

Among viral diseases of trout and salmon, infectious pancreatic necrosis is one of the most important (Meyer, 1991). The causative agent, infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), belongs to the *Birnaviridae* family (Brown, 1986), whose members contain two segments of double-stranded RNA. Genome segment A, approximately 3100 bp, encodes three polypeptides in the order 5'-pVP2-NS-VP3-3', which are cleaved from a polyprotein precursor (Huang *et al.*, 1986; Nagy *et al.*, 1987). The protease activity responsible for this cleavage has been associated with the non-structural viral protein NS (Duncan *et al.*, 1987; Manning and Leong, 1990; Manning *et al.*, 1990). Though the fine structure mapping of coding regions was determined, the exact cleavage sites between pVP2, NS and VP3 remain unknown (Duncan *et al.*, 1987; Manning *et al.*, 1990). Genome segment B (2900 bp) encodes VP1 only, a protein of approximately 100 kDa that is the presumptive virion-associated RNA-dependent RNA polymerase (Cohen, 1975; Mertens and Dobos, 1982; Duncan *et al.*, 1991).

IPNV shows a high degree of antigenic heterogeneity. Though only three major serotypes were recognized until 1983 (Macdonald and Gower, 1981; Okamoto *et al.*, 1983), some studies have identified up to seven additional ones and two serogroups (Hill and Way, 1983, 1988; Christie *et al.*, 1988, 1990; Caswell-Reno *et al.*, 1989). It was recently demonstrated, however, that genomic variations between IPNV strains do not correlate exactly with their serotyping. In fact, according to restriction fragment profiles, 37 strains tested were divided in three major genogroups and ten subgroups (Heppell *et al.*, 1992). The few IPNV sequences that have been determined up to now cannot confirm these results. In fact, genome segment A was totally sequenced for only two strains, Jasper (Duncan and Dobos, 1986) and N1 (Håvarstein *et al.*, 1990a) while segment B was sequenced for Jasper and SP (Duncan *et al.*, 1991). A small portion of both segment was also determined for the E1S strain (Wu *et al.*, 1992).

In order to further investigate genomic variations, we sequenced 17 IPNV strains over a cDNA fragment located at the junction between pVP2 and NS coding regions, on genome segment A. This fragment was selected because it is suitable for PCR amplification of a large number of viral strains using the same pair of primers and because it is representative of the differences between entire genome segments (Heppell *et al.*, 1992). It might also be helpful in the localization of the exact cleavage site between pVP2 and NS on the polyprotein.

IPNV strains used in this work are described in Table 2. At least one strain for each serotype and for each subgroup determined by Heppell *et al.* (1992) was selected for this study. Strains from the provinces of Québec and Newfoundland (Canada) were isolated in our laboratory; the others were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). The Jasper strain sequenced in our laboratory was identified as JA (ATCC) in order to distinguish it from the other strain with an identical name sequenced by Duncan and Dobos (1986), to which we referred as JA (Dobos). It has already been pointed out that these two strains are different (Heppell *et al.*, 1992; Berthiaume *et al.*, 1993).

All viruses were grown in CHSE-214 or RTG-2 cells and genomic viral RNA was isolated from purified virions as previously described (Heppell *et al.*, 1992). Three-hundred-and-ten-basepair cDNA fragments (primers not included) corresponding to the region of genome segment A of the virus localized at the junction between pVP2 and NS proteins were obtained by reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR) amplification of the viral RNA as described elsewhere (Heppell *et al.*, 1992). The amplification products were purified by electrophoresis on 0.8% (wt/vol) agarose gel in TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) and eluted from the gel with the Geneclean kit (Bio 101).

Amplified fragments were then cloned directly into the pCR-1000 plasmid of the TA cloning system (Invitrogen Corporation) according to the instructions of the

manufacturer. The sequence of the inserts was determined by the dideoxy chain termination procedure (Sanger *et al.*, 1977) using 5% (wt/vol) polyacrylamide, 7 M urea gels. Both strands were sequenced for each recombinant plasmid. In order to identify possible mismatches introduced by the *Taq* polymerase or the reverse transcriptase, three RT-PCR products, obtained from independent reactions, were cloned and sequenced for each viral strain. cDNA and amino acid sequences were analyzed with the Geneworks (release 2.2.1) program (IntelliGenetics Inc.). For the translation into amino acids, the reading frame of the polyprotein encode by genome segment A was used.

Figure 5 shows the 17 nucleotide sequences obtained, while amino acid sequences deduced from the cDNAs and their corresponding portion on previously published IPNV sequences are shown in Figure 6⁴. A similar segment was located on the polyprotein of infectious bursal disease virus (IBDV), another birnavirus, after alignment of the entire polyprotein sequence of the JA (Dobos) and N1 strains of IPNV to the IBDV strains presented (Fig. 6).

Comparison of IPNV strains revealed that the first half of the sequence is highly conserved. In fact, among residues 1 to 55, 42 (76.4%) appeared in all strains, while among residues 56 to 103, only 27 (56.3%) were identical for the 20 strains. When compared to IBDV, 22 residues (21.4%) were conserved in all sequences of both viruses. Most of these amino acids (18/22) were located in the first half of the studied fragment. Consequently, this region, which corresponds to the C-terminus of pVP2, is more conserved than the rest of the sequence. This is consistent with the findings of Håvarstein *et al.* (1990a) who determined that the N and C termini of pVP2 consist of two strongly conserved segments. They also calculated that the least conserved polypeptide, when

⁴ Cette phrase a été modifiée par rapport à l'article original afin d'y inclure une référence à la Figure 5, qui a été ajoutée pour les besoins de la thèse.

comparing gene products of IPNV and IBDV is NS. Thus, our results confirm these assessments.

The percentage of homology between each IPNV strain was calculated (Table 3). All North American strains, except for C1, C2 and C3, were 93.2% or more homologous at the amino acid level. On the contrary, the He strain appeared different from all the others, since it had not more than 80.6% homology with them. Other European strains (Fr.21, SP, N1, Ab and TE2), the Asian strain (E1S) and two North American strains (C1 and C3) all were 90.3% homologous or more and thus belong to a different group than the majority of North American strains with which they shared not more than 81.6% homology. As for C2, it had more homology with the C1 and C3 group (84.5 to 89.3%) than with other North American strains (78.6 to 80.6%) but it was not highly related to any other.

A classification of IPNV strains was established by computer on the basis of amino acid sequence homology using the unweighted pair group method with arithmetic mean (Fig. 7). The length of the horizontal lines connecting one strain to another, in the dendrogram, is proportional to the estimated genetic distance between sequences. Three major groups, which were termed genogroups (Heppell *et al.*, 1992), could be formed. However, compared to genogroup I, more variations occurred within genogroup II. In fact, apart from C2, which appeared to be distant from the other strains of its genogroup as mentioned earlier, distinct subgroups could be created. For example, Ab and E1S were very similar (97.1% homology), so were N1, SP and Fr.21 (98.1% homology) and C1 and C3 (100% homology). Even if subdivisions were created within genogroup II, the genetic classification would not corroborate exactly the serological data. All strains related to the same serotype were highly homologous at the genomic level but some strains which have been reported to be serologically different were almost identical when comparing their sequences. This is the case of N1 (serotype A10) with Fr.21 and SP (serotype A2) and of C1 (serotype A6) with C3 (serotype A8).

Only one strain, He, belongs to genogroup III. Since this strain appeared distinct from all the others, it would be interesting to sequence some viruses of the serogroup B of IPNV in order to calculate their percentage of homology with members of the serogroup A used in this work and to determine whether they are related to He or if they form a fourth genogroup. It is also possible that a higher division than the genogroup would be required.

As a comparison to IPNV, the evolutionary relationships among some IBDV sequenced strains were also calculated. All sequences appeared identical at the amino acid level, over the studied portion, except for the OH strain which had 93.4% homology with the others (002-73, Cu-1, PBG 98, STC and 52/70). It is interesting to note that OH is classified in serotype 2 of IBDV while the other strains belong to serotype 1, which is the only other serotype of IBDV. Similarly to IPNV, these percentages were obtained with a small portion of the polyprotein, but they are similar to those calculated with the whole segments (Kibenge *et al.*, 1991). This indicates that differences observed in this region of genome segment A are representative of variations encountered between entire genome segments and thus, the method used in this paper is appropriate for the comparison of large numbers of strains. Moreover, it leads to a more precise classification than the previous one based on restriction fragment profiles (Heppell *et al.*, 1992). In the case of IPNV however, more sequence would be necessary to ascertain the classification proposed in this paper. Nevertheless, the two complete IPNV sequences available, N1 (Håvarstein *et al.*, 1990a) and JA (Dobos) (Duncan and Dobos, 1986) are 84.0% homologous at the amino acid level. This percentage is close to that calculated for our studied portion (80.6%), but still we preferred not to create subgroups inside genogroups until larger sections of the A segment are sequenced.

If the correlation between serological and genomic classification is as good for IPNV as it is for IBDV, some of the actual ten serotypes of IPNV would be more like subtypes, as for IBDV which has only two major serotypes and six subtypes within serotype 1

(Jackwood and Saif, 1987). More serological tests are required to ascertain the existence of important differences between serotypes A1 to A10. Already, it appears that, for example, the N1 strain (serotype A10) and the Fr.21 strain (serotype A2) are closely related, as for TE2 (serotype A5) and Ab (serotype A3) when tested in an ELISA with three panels of monoclonal antibodies (MAbs) (Tarrab *et al.*, 1993). Consequently, detailed serological studies of IPNV might lead to a classification of strains more similar to that presented in this paper, even if the amplified fragment probably does not cover the main epitopes of the virus. In fact, all MAbs developed against IPNV are either VP2- or VP3-specific (Caswell-Reno *et al.*, 1986; Lecomte *et al.*, 1992).

Because the amplified fragment used in this study is located at the junction between pVP2 and NS, it encompasses the cleavage site between these two polypeptides. Duncan *et al.* (1987) suggested that a tyrosine-leucine (Y-L) dipeptide could be the cleavage site recognized by the viral protease. Unfortunately, as can be seen on Figure 6, the Y-L motif is conserved only among strains of genogroup I. Moreover, in the case of the N1 strain, the dipeptide is also found approximately in the middle of VP3. It is possible that the Y-L motif alone is not sufficient or essential for the cleavage site to be functional. However, amino acids in its vicinity could be important for the processing of the polyprotein. For example, in the case of IPNV, a basic residue (Arg or Lys) always precedes or follows the Y-L dipeptides (or what stands for it), except for the one located in the middle of VP3. Furthermore, Manning *et al.* (1990), who used the SP strain (genogroup II) for their deletions studies, placed the C-terminal end of pVP2 between the *Kpn*I and the *Xho*I sites, which correspond to amino acids 54 to 69 of Figure 6. The Y-L motif of genogroup I strains is located in this region. For IBDV, Hudson *et al.* (1986) suggested that dibasic residues (Arg-Arg or Lys-Arg) or the sequence Ala-X-Ala-Ala-Ser (Fig. 6) could be potential cleavage sites. Though conserved dibasic residues are found in IPNV and IBDV, they are located far upstream of the region identified as the junction between pVP2 and NS (Fig. 6). As for the Ala-X-Ala-Ala-Ser sequence, it is not observed on IPNV, but a Ala-

Ala-Gly-Gly-Arg-Tyr sequence is repeated on both side of the Y-L motif and appear to be pretty well conserved among all IPNV strains.

There are no obvious putative cleavage sites that are conserved in the polyprotein of birnaviruses. It is possible however that these viruses use distinct proteases with different specificities since there is very little homology between NS of IPNV and VP4 of IBDV (Håvarstein *et al.*, 1990a; Azad *et al.*, 1987). It is also possible that different mechanisms occur on the two sides of the NS protein or that the processing of the polyprotein requires the presence of host proteases. Thus, direct evidence is needed to localize the exact cleavage sites of the polyprotein.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joanne Roger for her help with the sequencing of PCR products and James Rudnick for corrections of the manuscript. This work was supported by CORPAQ (Conseil des Recherches en Pêches et Agro-Alimentaire du Québec), grant no. 2800.

Table 2
List of IPNV strains used in article II

Strain*		Abbreviation	Origin	Serotype
ART-H82		ART	Canada (Québec)	A1
LAR-A89		LAR	Canada (Québec)	A1
TN1-P89		TN1	Canada (Newfoundland)	A1
TN3-A89		TN3	Canada (Newfoundland)	A1
TN9-A89		TN9	Canada (Newfoundland)	A1
LWVRT 60-1	(VR-299)	LW	USA	A1
West Buxton	(VR-877)	WB	USA	A1
Powder Mill	(VR-883)	PM	USA	A1
d'Honnincthun	(VR-876)	Fr.21	France	A2
SP	(VR-1318)	SP	Denmark	A2
Ab	(VR-1319)	Ab	Denmark	A3
Hecht	(VR-1320)	He	Germany	A4
Tellina-2	(VR-1321)	TE2	England	A5
Canada 1	(VR-1322)	C1	Canada	A6
Canada 2	(VR-1323)	C2	Canada	A7
Canada 3	(VR-1324)	C3	Canada	A8
Jasper	(VR-1325)	JA (ATCC)	Canada	A9
Jasper (Dobos) [†]		JA (Dobos)	Canada	A1
N1 [†]		N1	Norway	A10
E1S [†]		E1S	Taiwan	A3

*Numbers in parentheses correspond to American Type Culture Collection catalog numbers.

[†]Published sequences used for comparison. They were obtained from Duncan and Dobos (1986), Håvarstein *et al.* (1990a) and Wu *et al.* (1992), respectively.

Table 3

Percentages of homology between amino acid sequences deduced from the 310 bp cDNA fragments obtained from 17 IPNV strains and their corresponding portion on three published sequences

IPNV strains*	ART	LAR	TN1	TN3	TN9	LW	WB	PM	Fr.21	SP	Ab	He	TE2	C1	C2	C3	JA (ATCC)	JA (Dobos) ¹	N1 ²
LAR	96.1	---																	
TN1	96.1	100.0	---																
TN3	97.1	99.0	99.0	---															
TN9	97.1	99.0	99.0	100.0	---														
LW	96.1	100.0	100.0	99.0	99.0	---													
WB	99.0	97.1	97.1	96.1	96.1	97.1	---												
PM	96.1	100.0	100.0	99.0	99.0	100.0	97.1	---											
Fr.21	80.6	81.6	81.6	81.6	81.6	81.6	80.6	81.6	---										
SP	79.6	80.6	80.6	80.6	80.6	80.6	79.6	80.6	98.1	---									
Ab	80.6	81.6	81.6	81.6	81.6	81.6	80.6	81.6	93.2	92.2	---								
He	77.7	75.7	75.7	75.7	75.7	75.7	77.7	75.7	80.6	78.6	75.7	---							
TE2	77.7	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	77.7	78.6	92.2	91.3	95.1	77.7	---						
C1	77.7	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	77.7	78.6	93.2	92.2	95.1	77.7	98.1	---					
C2	80.6	80.6	80.6	80.6	80.6	80.6	80.6	80.6	88.3	89.3	87.4	78.6	84.5	84.5	---				
C3	77.7	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	77.7	78.6	93.2	92.2	95.1	77.7	98.1	100.0	84.5	---			
JA(ATCC)	94.2	94.2	94.2	95.1	95.1	94.2	93.2	94.2	79.6	78.6	79.6	74.8	76.7	76.7	78.6	76.7	---		
JA(Dobos)¹	98.1	100.0	100.0	99.0	99.0	100.0	97.1	100.0	81.6	80.6	81.6	75.7	78.6	78.6	80.6	78.6	94.2	---	
N1²	79.6	80.6	80.6	80.6	80.6	80.6	79.6	80.6	99.0	99.0	92.2	79.6	91.3	92.2	89.3	92.2	78.6	80.6	---
E1S³	78.6	79.6	79.6	79.6	79.6	79.6	78.6	79.6	92.2	90.3	97.1	76.7	92.2	92.2	85.4	92.2	77.7	79.6	91.3

*Previously published sequences are indicated with a number in superscript and were obtained from: ¹Duncan and Dobos, 1986; ²Håvarstein *et al.*, 1990a; ³Wu *et al.*, 1992.

FIGURE 5: Séquences nucléotidiques obtenues de 17 fragments d'ADNc de 310 pb amplifiés par PCR. (Figure non publiée).

Les résidus identiques à la souche JA(Dobos) sont indiqués par des points. La région correspondante, sur les séquences publiées, est également illustrée:

¹souche JA(Dobos), Duncan et Dobos, 1986; ²souche N1, Håvarstein *et al.*, 1990a; ³souche E1S, Wu *et al.*, 1992.

JA(Dobos)¹	CTACCAACCTCAAAGGCATGGGATGGAGGGACCTGGTCAGAGGCATCAGAAAAGTGGCCGCCCGTGCTGTCAACGCT	80
N1²	..G..C..G.....C....A...A.A.....A..TC.G....C..A..T..T..A.....C.....	80
E1S³	..G..C..G...G.....T.....A.A...A..G...C.G....C.....A..A.....	80
ARTC.....G.....A.....G.A..A..A..A.....C..	80
LARA.....	80
TN1	80
TN3T..C.....G.....A.....G.....A..A.....G.....	80
TN9	..G.....C..A..G.....G.....A.....G.....A..A..A.....G.....	80
LW	80
WB	..G.....A.....A.....G.....A.....A..A..A.....	80
PM	80
Fr.21	..G..C..G.....C....A...A.A.....A..TC.G....C..A..T..A.....	80
SP	..G..C..G.....C....A...A.A.....A..TC.G....C..A..T..T..A.....	80
Ab	..G..C..G.....C.....A.A.....G..C.G....C.....A..A.....	80
He	..C..C....C....C....C.....A.T..A.GCAA..C.G.G.A.C.....T..T..A.....AA.....	80
TE2	..G..C..G.....C....A...A.A.....C.G..G..C..T.....T..A.....C.....	80
C1	..G..G..G.....C.....A.A.....C.G.....C.....T.....C.....	80
C2	..G..C..G....A.....C....A...A.A.....G..C.G..G..C..A..A.....C..C.....	80
C3	..G..G..G.....C.....A.A.....C.G.....C.....T.....C.....	80
JA(ATCC)A.....AC.....A..G..A.....G.....	80

JA(Dobos)¹	CTTCCCAATGGCGGCTCCCTTATAGGAGCTGCCGACCAATTCAATTGGGACCTCACCAAGACCAACTCAGCCGGGGAC	160
N1²	G..T.....A..A..A..C.....ATG..A.....A..T.....G..A..C..A..A	160
E1S³	G..T..G.....A..A..A..C..T..ATG..A.....C..C..A..T.....C.....G..A..C..A	160
ARTC..C..A..G.....C..G.....G..C..C.....A.....T..A..A	160
LARC.....G.....	160
TN1	160
TN3A..C..A..C..C..C..G.....G..C..T.....A..G..	160
TN9C..C..A..C..C..C..G.....G..C..C.....G..	160
LW	160
WBC..C..A.....T..G.....G..C..T.....G..	160
PMC.....	160
Fr.21	G..T.....A..A..A..C.....ATG..A.....A..T.....G..A..C..A	160
SP	G..T.....A..A..A..C.....A.G..A.....A..T.....G..A..C..A	160
Ab	G..T..G.....A..A..A..C..T..TG..A.....C..C..A..T.....C.....G..A..C..A	160
He	G.....C....C..C..T..C..T..ATG.....G.....A..C.....A..A.....G..T..A..C..A	160
TE2	G..T..G.....A..C..A..G.....TG..A.....C..C..A..T.....C..A..G..A..T..A	160
C1	G.....G....A..G..A..G..C..T..TG..A.....C..C..T.....T..A..G..A..T..A	160
C2	G.....G....A..A..A..C.....GATA.....C..T.....A..A..TG..A..A..C..	160
C3	G.....G....A..G..A..G..C..T..TG..A.....C..C..T.....T..A..G..A..T..A	160
JA(ATCC)A..C..G..C.....C..A.G.....C.....T..	160

FIGURE 5 (suite)

JA(Dobos)¹	GCTACCTGTCACACGCAGCCGGAGGCCGCTACCATGATGTACGGACTCATGGCCAGCGGGTCCGAGGCAGGAAGCTAT	240
N1²	.G....AC..CATG..C..A.....G...C..A.A..C..GC.C..G..C.....A.....AGGGCCC.AC....AA.TC	240
E1S³	.G....GC..CATG..C..A.....A.A..C..A.....C.....CGGACCC.AC..G.AG.TC	240
ARTG.....A.....C.....A.....C	240
LARC.....	240
TN1	240
TN3C.....C.....C	240
TN9C.....C.....C	240
LW	240
WBT.....T.....G.....A.....T..T..C.....A.....C	240
PM	240
Fr.21	.G....AC..CATG..C..A.....G.....A.A..C..GC.C..G..A.....A.....AGGGCCC.AC....AA.TC	240
SP	.G....AC..CATG..C..A.....G...C..A.A..C..GC.C..G..C.....A.....AGGGCCC.AC....AA.TC	240
Ab	.G....GC..CATG..C..A.....A.G.....A.....C.....CGGACCC.AC..G.AG.TC	240
He	.A...AAC.....T..C..T.....G..G.....A.G..C..TC.....GA.....A.....A...A.CA.T..CC...TC	240
TE2	.G....GC..ATG.....A..G..A.....A.G..C..C.A..A..C.....CGGACCC.AC..G.AA.TC	240
C1	.G....GA..GATG.....A..G..A.....A.G.....C....G..C.....CGGACCC.AC..G.AA.TC	240
C2	.G...AAC..CATG..G..T..C..A.A.C..AGA..C..G.....G.....CAAAC..AC..G..A.TC	240
C3	.G....GA..GATG.....A..G..A.....A.G.....C....G..C.....CGGACCC.AC..G.AA.TC	240
JA(ATCC)C.....A.....A.....C	240
JA(Dobos)¹	TCAAAGCACCTCAAGACCCGGCTTGAGTCCAATAACTATGAGGAAGTGGAGCTTCAAAGCCAACAAAGG	310
N1²	..CCGAGC.....A.A....G.....GCC.....C.....C.....CCC..CT....A.	310
E1S³	..CC..GCT..A.....A.A....G.....TGCC.....C.....C.....TCCC..TT....A.	310
ARTA.....T..A.G.....C..T.....C..A.....	310
LARC.....	310
TN1	310
TN3	.G..A.....G.....C.....A..A.....C.....	310
TN9A.....A.G.....C.....A..A.....C.....	310
LW	310
WBT.....C.....C.....A.	310
PM	310
Fr.21	..CCGAGC.....A.A....G.....GCC.....C.....C.....CCC..CT....A.	310
SP	..CCGAGC.....A.A....G.....GCG.....C.....C.....CCC..CT....A.	310
Ab	..CC..GCT..A.....A.A.A..G.....TGCC.....C.....C.....TCCC..TT....A.	310
HeT.AG.....AA..C..A.....A.CA.....A.....CGC..CGA.CGT.	310
TE2	..CC..GCT..G.....A.AAA..G.....T.CC.....C..A.....CGCC..CT.G..A.	310
C1	..CCT.GCT..A.....A.AAA..G.....A.CC.....C.....G..C.....TCCC..CT.G..A.	310
C2	..CC..ATCT.....A..C..A.....GGCC.....A.....TCCA..CCAG..A.	310
C3	..CCT.GCT..A.....A.AAA..G.....A.CC.....C.....G..C.....TCCC..CT.G..A.	310
JA(ATCC)C..T..T....G.....C.....A.....	310

FIGURE 6: Amino acid sequences deduced from the 17 amplified fragments and their corresponding portion on the published sequences of IPNV and IBDV.

Homology to the JA (Dobos) strain is indicated by dots while dashes stand for missing amino acids on IPNV compared to IBDV sequences. Dibasic residues and the Y-L motif are doubly underlined on the JA (Dobos) and the 002-73 sequences while the cleavage region identified for the SP strain of IPNV and the A-X-A-A-S motives of IBDV are indicated by single underline. Previously published sequences were obtained from: ¹Duncan and Dobos, 1986; ²Hávarstein *et al.*, 1990a; ³Wu *et al.*, 1992; ⁴Hudson *et al.*, 1986; ⁵Kibenge *et al.*, 1991. Sequence of the Cu-1 (Spies *et al.*, 1989), STC (Kibenge *et al.*, 1990), PBG 98 and 52/70 (Bayliss *et al.*, 1990) strains of IBDV are identical to that of the 002-73 strain, over the presented portion.

IPNV STRAINS

JA(Dobos)¹	LPTSKAWGWRDLVRGIRKVAAPVLSTLFPMAPLIGAADQFIGDLTKTNSAGGRY	<u>55</u>
N1²I.....M.....A.....	55
E1S³	...R....I.K.....M..L...N.A.....	55
ART	55
LAR	55
TN1	55
TN3	55
TN9	55
LW	55
WB	55
PM	55
Fr.21I.....M.....A.....	55
SPI.....T.....A.....	55
AbI.....V..L...N.A.....	55
HeI.KQ..RI.....M.....M.....AS....	55
TE2I.....V..L...N.A.....	55
C1I.....V..L...N.A.....	55
C2I.....I.....A.....	55
C3I.....V..L...N.A.....	55
JA(ATCC)T.....G.....	55

IBDV STRAINS

002-73⁴	.KIAG.F.FK.II.A.. <u>RI</u> .V..V.....P....AH.IGEGVDY. <u>LGDEAOAASG</u>	55
OH⁵	.KIAG.F.FK.II.A...I.V..V.....P....AH.NREGVDY. <u>LGDEAOAASG</u>	55

IPNV STRAINS

JA(Dobos)¹	LSHAAGGRYHDVMD-SWASGSEAGS-YSKHLKT-RLESNNYEEVELPKPTK	<u>103</u>
N1²	H.M....HK..LE-.....GPD.K-F.RA..N-....A.....P.S.	103
E1S³	R.M....K.....GPD.K-F.QA..N-....A.....P.S.	103
ARTR....-T.....T....-.....S-	103
LAR-.....-.....-.....	103
TN1-.....-.....-.....	103
TN3-.....-.....-.....S-	103
TN9-.....-.....-.....S-	103
LW-.....-.....-.....	103
WBR....-T.....T....-.....	103
PM-.....-.....-.....	103
Fr.21	H.M....K..LE-.....GPD.K-F.RA..N-....A.....P.S.	103
SP	H.M....HK..LE-.....GPD.K-F.RA..N-....A.....P.S.	103
Ab	R.M....K.....GPD.K-F.QA..N-....A.....P.S.	103
He	N.....K..LE-T.....NT.R-F.MS..K-....T.....R.ER	103
TE2	R.M....K..LE-.....GPD.K-F.QA..N-K..T.....A.S.	103
C1	R.M....K..LE-.....GPD.K-F.LA..N-K..T.....P.S.	103
C2	N.M....HHR..E.....KQD.R-F.QS..N-....A.....P.Q.	103
C3	R.M....K..LE-.....GPD.K-F.LA..N-K..T.....P.S.	103
JA(ATCC)-.....T.T.-..N...S-.....	103

IBDV STRAINS

002-73⁴	<u>TAR..S.KARAASGRIRQLTLA.DKG.EVVANLFQVPQ.PVVDGI.AS.GV</u>	<u>106</u>
OH⁵	<u>TARG.S.KARAASGRIRQLTLA.DKG.EVVANMFQVPQ.PIVDGI.AS.GI</u>	<u>106</u>

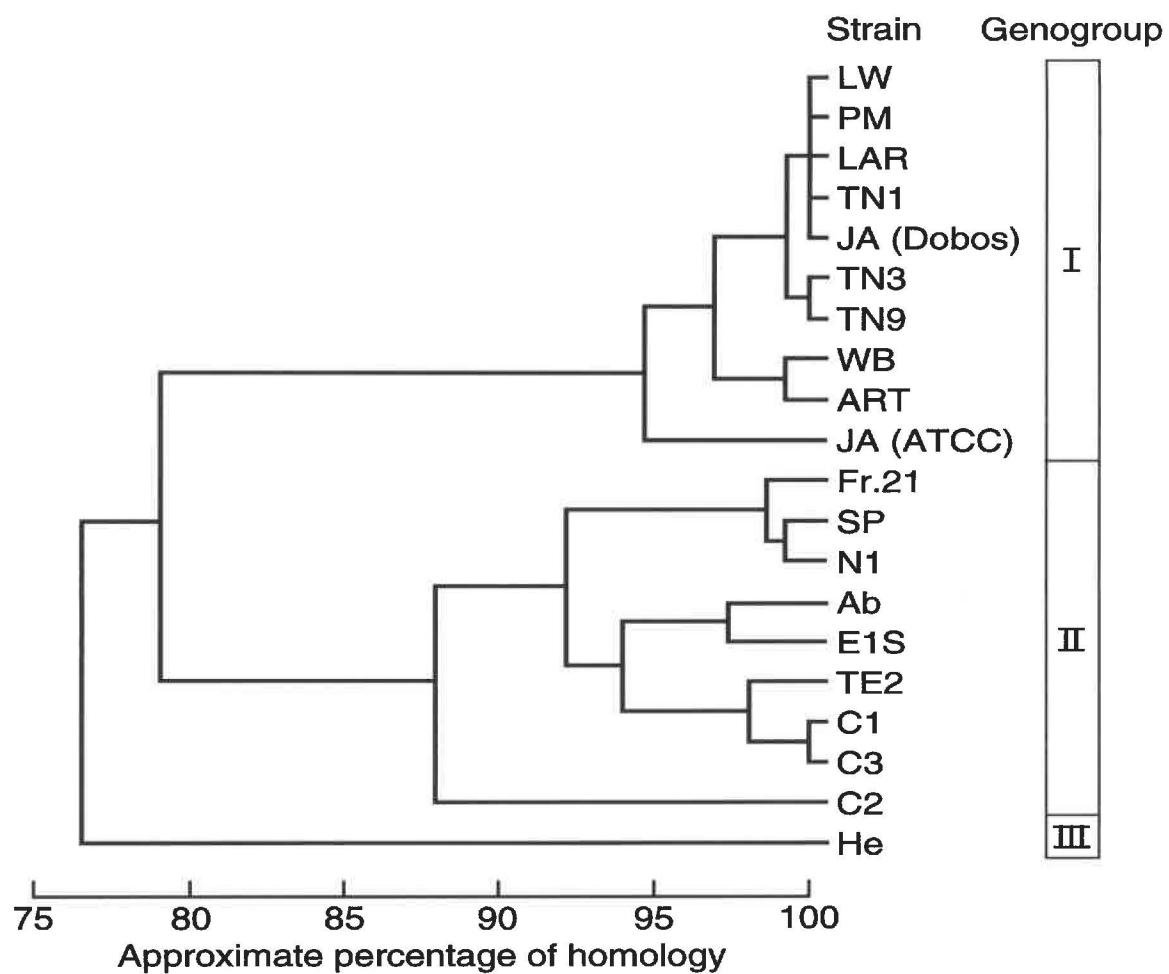


FIGURE 7: Dendrogram representing the relationships between IPNV strains as determined by amino acid sequence homology.

Proposed genogroups are indicated at the far right of the figure.

CHAPITRE 3

**Localisation des domaines variables et des
principaux déterminants antigéniques de la protéine
VP2**

La fabrication d'un vaccin sous-unitaire nécessite la caractérisation préalable des principaux épitopes du virus. Dans le cas du VNPI, la protéine VP2 apparaît comme une bonne candidate pour un tel vaccin, notamment parce qu'elle est le principal constituant externe du virus et la cible des anticorps neutralisants. Les épitopes de cette protéine ont été étudiés à l'aide de techniques sérologiques, mais leur localisation précise sur la séquence primaire de la VP2 n'avait jamais été déterminée jusqu'à tout récemment.

Les objectifs spécifiques visés dans le présent chapitre étaient de délimiter les domaines les plus variables de la VP2 et de vérifier s'il existe une corrélation entre ces régions et la localisation des principaux épitopes du VNPI. De cette façon, il est possible de déterminer quels sont les acides aminés le plus souvent impliqués dans les variations antigéniques. Pour y parvenir, cinq souches virales ont été séquencées au niveau de la région du génome codant pour la pVP2. Les virus utilisés [LWVRT 60-1 (VR-299), d'Honnincthun (Fr.21), Ab, Canada 2 (C2) et Hecht (He)] ont été sélectionnés parce qu'ils sont représentatifs des variations génomiques observées précédemment. C'est ainsi qu'une souche de chaque génogroupe a été utilisée, sauf pour le génogroupe II qui compte trois représentants étant donné sa plus grande hétérogénéité. Un des virus, VR-299, a également été utilisé pour localiser les principaux épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux dirigés contre ce dernier. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (voir l'article III, *Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus*). La section qui suit est constituée de l'article publié ainsi que de trois figures supplémentaires qui n'ont pas été incluses dans la publication, faute d'espace. Comme dans le chapitre précédent, les figures ajoutées sont clairement identifiées par la mention "non publiée" dans leur légende. Elles présentent, respectivement, les séquences nucléotidiques obtenues et auxquelles l'article réfère, ainsi que les profils d'hydrophilicité et de probabilité de surface des mutants de la souche VR-299 utilisés dans la publication. Pour plus de clarté et pour faciliter la lecture de ce chapitre, les résultats illustrés par ces figures supplémentaires sont discutés à

l'intérieur de l'article III, qui a été légèrement modifié à cette fin. Par exemple, les mentions *not shown* apparaissant à l'origine dans le texte ont été remplacées par des références aux figures supplémentaires. Les phrases touchées par ces changements sont identifiées par des notes de bas de page.

ARTICLE III

Strain variability and localization of important epitopes on the major structural protein (VP2) of infectious pancreatic necrosis virus

Joël Heppell, Esther Tarrab, Jacqueline Lecomte, Laurent Berthiaume et Maximilien Arella

Institut Armand-Frappier, Centre de recherche en virologie, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

FOOTNOTE: The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank nucleotide sequence database and have been assigned the accession numbers L40580 to L40584.

Cet article sera publié prochainement dans: *Virology* (1995), **214**, (sous presse).

ABSTRACT

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), a birnavirus, is an important pathogen in fish farms. Analyses of viral proteins showed that VP2 is the major structural and immunogenic polypeptide of the virus. All neutralizing monoclonal antibodies (mAbs) against IPNV are specific to VP2 and bind to continuous or discontinuous epitopes. In order to determine which parts of the protein are involved in antigenic variations, five IPNV strains were sequenced over the VP2 coding region. Comparison of the sequences obtained with three previously published ones revealed a central variable domain (positions 183 to 335) which encompasses two hydrophilic hypervariable segments. Viral mutants which escaped neutralization were then selected with anti-VP2 mAbs directed against discontinuous epitopes. Sequencing of three mutants revealed a single amino acid mismatch in each of them. All of these substitutions occurred in the hypervariable segments, suggesting that these regions are involved in the formation of a discontinuous epitope. Finally, expression of different truncated VP2s in *E. coli* allowed localization of the binding site for neutralizing mAbs which recognize continuous epitopes. One of these mAbs bound to the region adjacent to the C-terminus of the variable domain of VP2, while two others reacted with the central and C-terminal parts of the variable domain. No antibody reacted with the N-terminus of VP2. These results suggest that the variable domain of VP2 and the 20 adjacent amino acids of the conserved C-terminal part are the most important in inducing an immune response for the protection of animals.

INTRODUCTION

Infectious pancreatic necrosis is one of the major viral diseases of juvenile trout and salmon (Pilcher and Fryer, 1980; Wolf, 1988; Meyer, 1991). The causal agent of this contagious, high-mortality disease, is infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), which belongs to the *Birnaviridae* family (Francki *et al.*, 1991). The major structural and immunogenic proteins of the virus, VP2 and VP3, are produced by cleavage of the amino- and carboxy-terminal parts, respectively, of a precursor polyprotein encoded on genome segment A (Huang *et al.*, 1986; Duncan *et al.*, 1987; Nagy *et al.*, 1987), which is the largest of the two dsRNA segments of IPNV (Dobos and Roberts, 1983). VP2 (54 kDa) is associated with the outer capsid and is the late maturation cleavage product of preVP2 (62 kDa). Both forms of the polypeptide are usually found in purified virus preparations and together, they represent 64% of all virions proteins (Dobos *et al.*, 1991). All the epitopes (continuous and discontinuous) recognized by neutralizing monoclonal antibodies (mAbs) are located on VP2 (Caswell-Reno *et al.*, 1986; Nagy and Dobos, 1987; Christie *et al.*, 1990; Tarrab *et al.*, 1993, 1995). VP3 (29 to 31 kDa) is thought to be an internal protein of the virus (Dobos *et al.*, 1977), and contains some important continuous non-neutralizing epitopes (Caswell-Reno *et al.*, 1986; Christie *et al.*, 1990; Tarrab *et al.*, 1993).

Most of the information available on the antigenic domains of birnavirus proteins comes from studies on infectious bursal disease virus (IBDV). These works showed that a central variable region of IBDV VP2 contains the conformational epitopes recognized by neutralizing mAbs (for review, see Müller *et al.*, 1992). It is suspected that IPNV has the same antigenic structure. Comparison of the N1 and Jasper strains of IPNV revealed that, as for IBDV, the N- and C-terminal parts of IPNV VP2 are more conserved than the central region of the protein (Håvarstein *et al.*, 1990a). Moreover, Tarrab *et al.* (1995) showed

evidences for a major, conformational-dependent and immunodominant domain of VP2, where continuous epitopes could represent portions of a larger discontinuous epitope. The exact size of this region has not yet been determined, though it was shown to be located in the central third of the protein (Frost *et al.*, 1995; Liao and Dobos, 1995).

The two birnaviruses share many similar features, but IPNV strains show more genomic variations than those of IBDV (Kibenge *et al.*, 1991; Heppell *et al.*, 1993). The proposed serological classification of IPNV also appeared more complex with two serogroups, A and B, and up to ten serotypes inside serogroup A (Hill and Way, 1983, 1988; Christie *et al.*, 1988, 1990; Caswell-Reno *et al.*, 1989). In comparison, IBDV has only two serotypes (for review, see Kibenge *et al.*, 1988). The higher degree of antigenic and genomic diversity among IPNV strains may indicate that the molecular basis for antigenic variations is different for the two viruses, but more sequence data are needed to assess this. There are only three strains of IPNV which were completely sequenced over the VP2 coding region: Jasper (Duncan and Dobos, 1986), N1 (Håvarstein *et al.*, 1990a) and DRT (Chung *et al.*, 1993a). Two of these strains, Jasper and DRT, are very similar.

In order to determine exactly where variability occurred in the VP2 coding region of IPNV, we have sequenced five strains which were reported to be different at the genomic level (Heppell *et al.*, 1992, 1993). Then, to determine the significance of the genomic variations in relation to the antigenic determinants, epitopes recognized by a panel of mAbs specific to VP2 were localized using viral mutants which escape neutralization, and expression of truncated proteins. Conditions necessary for the elaboration of a subunit vaccine against IPNV are also discussed.

METHODS

Virus production and RNA extraction. Viral strains used in this work [LWVRT 60-1 (VR-299), d'Honnincthun (Fr.21), Ab, Hecht (He) and Canada 2 (C2)] were obtained from the American Type Culture Collection, and are related to serotypes A1, A2, A3, A4 and A7, respectively. All viruses were propagated on CHSE-214 cells and concentrated by ultracentrifugation of the clarified supernatant, as previously described (Heppell *et al.*, 1992). Viral dsRNA was then extracted with phenol and chloroform, followed by digestion with proteinase K (Heppell *et al.*, 1992).

Cloning and sequencing. The preVP2 coding region on genome segment A was reverse transcribed and amplified by PCR following the protocol described elsewhere (Heppell *et al.*, 1992). Oligonucleotides IPN-0 (5'-**CTTCTAGA**CATATGAGCACATCCAAGGCAACCGCA-3') and IPN-7 (5'-GGTCTAGATTAGTGCACCACAGGAAAGATGACTC-3'), which contain an added *Xba*I restriction site (underlined characters) and the complement of a stop codon (**bold** characters in IPN-7), were synthesized according to the published sequence of the Jasper strain (Duncan and Dobos, 1986). The position of the start codon of the polyprotein is indicated by **bold** characters in IPN-0. These primers allowed the amplification of a 1594 bp cDNA fragment (nucleotides 144 to 1737) for all strains except Hecht. For this strain, the oligonucleotide LAC-5 (5'-GAGACGTCACAGGACCT-3') was used instead of IPN-0 in order to amplify a portion of preVP2 (nucleotides 386 to 1737).

The amplified fragments were purified with the Geneclean kit (Bio 101) and cloned directly into the pCR II vector (Invitrogen). Inserts were then sequenced using an A.L.F. DNA sequencer (Pharmacia) or traditional dideoxynucleotide chain-termination procedure (Sanger *et al.*, 1977). For each virus strain, three fragments, obtained from independent RT-PCR reactions, were cloned and sequenced in both directions. In cases where a nucleotide mismatch was detected in one of the three fragments, only the two identical ones

were considered to determine the consensus sequence at this particular position. The sequence of the missing portion of the preVP2 of Hecht (nucleotides 144 to 385) and the region upstream of nucleotide 144, for all strains (5' end to nucleotide 143), was determined previously (Heppell *et al.*, 1995). Sequences were analyzed with MacVector release 4.5.0 (Eastman Kodak) and GeneWorks release 2.4 (Intelligenetics Inc.) programs.

Expression and detection of truncated VP2. For the expression of VP2 as a fusion protein, one of the three fragments obtained previously for the VR-299 strain was transferred from the pCR II vector to the pTOPE-1b(+) expression vector (Novagen), downstream of, and in frame with the T7 gene 10 included in the plasmid. The preVP2 coding sequence was then truncated at different restriction sites, as indicated in Figure 8, and the shortened plasmids were closed with T4 DNA ligase. For the expression of full length (*i.e.* entire preVP2) and truncated VP2, pTOPE-1b(+) recombinant vectors were inserted into *E. coli* Novablue(DE3) cells (Novagen). Bacterial cultures were grown at 37°C until the O.D.600 reached 0.5, then they were induced with 0.4 mM IPTG for 2 h at 37°C. Volumes of 1 ml of the cell cultures were centrifuged for 5 min and the pellets were resuspended in 200 µl of SDS-PAGE sample buffer. For each clone, 20 µl of these bacterial lysates was loaded on a 10% polyacrylamide gel. A concentrated virus suspension (strain VR-299), prepared as described above, was used as positive control. In this case, 5 µl of the virus preparation was mixed with 15 µl of SDS-PAGE sample buffer before loading on the gel.

After electrophoresis, proteins were stained with Coomassie blue or transferred onto PVDF membrane (Bio-Rad). In the latter case, they were probed with a rabbit anti-VR-299 serum or with anti-VP2 mAbs. Monoclonal antibodies used in this work (LW4, LW6, LW7, LW9 and LW10) were raised against the VR-299 strain and have been characterized in our laboratory (Tarrab *et al.*, 1993). They all neutralize virus

infectivity and bind to continuous (LW4, LW6 and LW7) or discontinuous (LW9 and LW10) epitopes. Detection was carried out with a HRP-conjugated anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG and a chemiluminescence Western blotting kit (Boehringer Mannheim).

Selection of escape mutants. Monoclonal antibodies LW9 and LW10 were used to select escape mutants in order to locate amino acid residues that are potentially involved in the formation of discontinuous epitopes on VP2. The VR-299 strain was pre-incubated with one of the two mAbs for 1 h and then inoculated onto CHSE-214 cells in the presence, in the overlay agarose, of the same mAb used for selection (Øppling *et al.*, 1991a). Individual plaques were taken and grown following the same procedure at least five times. Genomic dsRNA was finally extracted, cloned and sequenced as described previously.

RESULTS

Comparison of the sequences obtained. Nucleotide sequences were determined for the five IPNV strains used, from the 5' end of genome segment A to the 3' end of the preVP2 coding region (Fig. 9). The deduced amino acid sequences corresponding to the preVP2 ORF are shown in Figure 10, alongside previously published sequences⁵. Analysis of these data revealed that strains Fr.21 and C2 have an open reading frame (ORF) containing 17 additional residues at their N-terminal part. This is due to a frame shift mutation in a highly variable region of the nucleotide sequence located upstream of the methionine at position 1, which has already been identified (Heppell *et al.*, 1995). The NH₂ extremity

⁵ Les deux premières phrases de ce paragraphe ont été modifiées par rapport au texte de l'article publié, afin d'y inclure une référence à la Figure 9. Seuls les numéros d'accession de GenBank apparaissaient à l'origine dans la publication et non les séquences nucléotidiques complètes.

of the Hecht strain ORF also differed from the others in that it begins with two consecutive methionines and it contains an additional residue at position 5. Except for these differences, other variations between strains were simple amino acid mismatches.

The central region of VP2 (positions 183 to 335) showed more variation than its extremities. In fact, 59.5% of the amino acids are conserved among all strains in this region, compared to 87.4 and 84.1% for the N- and C-terminal parts respectively (positions 1 to 182 and 336 to 492). Residues 493 to the end were not considered in the comparison because they probably belong to the NS protein, which lies between VP2 and VP3 in the polyprotein (Duncan *et al.*, 1987). Within the variable portion of VP2, many mismatches appeared clustered in two hypervariable regions: residues 243 to 261 and 275 to 288. Interestingly, these two regions correspond to small hydrophilic peaks separated by an hydrophobic portion. These features, however, are not perfectly conserved on all viruses, particularly on strains C2 and He which have a different hydrophilicity pattern in the hypervariable region nearest the N-terminus of the protein. Despite this, the overall hydrophilicity profile of VP2, calculated by the method of Kyte and Doolittle (1982), showed great similarity between strains (Fig. 11).

Percentages of homology between amino acid sequences were calculated (Table 4). Strains VR-299 and Jasper appeared identical at the amino acid and the nucleotide level, while DRT was very similar to them, with 99.2% homology (at the amino acid level). This group of strains showed little variation compared to the second group which includes Fr.21 and N1 (98.6% homology), as well as C2 and Ab, although these last two strains are not so closely related. The Hecht strain would belong to a third group since it showed less than 88.5% similarity with any other virus.

Expression of truncated proteins. Full length and truncated VP2s of the VR-299 strain were produced in a prokaryotic expression vector as fusion proteins, in order to locate the binding site of mAbs in relation to the variable domain of the protein. For each

bacterial clone, a polypeptide having the expected molecular mass (the VP2 portion plus its 29 kDa fusion partner) was observed on SDS-PAGE (Fig. 12A). Monoclonal antibodies LW4, LW6 and LW7, as well as the rabbit anti-VR-299 serum, reacted strongly against the full length VP2 in bacteria and in the concentrated virus preparation used as positive control (Figs. 12C to 12F). A few smaller polypeptides were also detected in bacterial lysates. These were probably partially degraded fusion proteins or they were produced by an early termination of translation. Similar results were obtained by Lawrence *et al.* (1989) with a different prokaryotic expression vector. In the case of the anti-VR-299 serum, however, one of the lower bands in the concentrated virus preparation corresponded to VP3 (Fig. 12F). In addition to the whole VP2, antibodies also reacted with clone EM351, which lacks most of the conserved region of VP2 located downstream of the variable domain. Only mAb LW7 showed a significant decrease in the intensity of the signal obtained with this clone, when compared to EMVP2.

Clone EM331, which contains the entire variable domain and the N-terminal conserved region of VP2, was the most discriminant. The antiserum and mAbs LW6 and LW7 showed a weak reaction with this clone (compared to the reaction obtained with EMVP2) while mAb LW4 completely failed to recognize it. This suggests that the binding site of LW4 was located between amino acids 331 and 351.

No antibody reacted with the EM271 deletion clone but, surprisingly, a very weak signal was consistently obtained with the shorter clone EM245, using the same antiserum. However, it has to be highlighted that the band appearing at the expected size for the fusion protein in EM245 was less intense than some of the non-specific bands observed in Figure 12F. Hence, the reaction between the antiserum and the fusion protein in clone EM245 was weak, although it seemed to be specific since it never appeared with the other clones.

When the entire variable domain was deleted (clones EM184 and EM75) no reaction was observed. This suggests that the N-terminal part of VP2 does not contain an

important epitope. These results were confirmed by clone EMvar, which contains only the variable domain of the protein. The signal obtained with this clone (Fig. 12B) was identical, for all antibodies, to the one observed with clone EM331. Thus, the N-terminal region had no influence on the reaction.

The LW9 mAb, which binds to a discontinuous epitope, was also tested in Western blot, but results were negative. Monoclonal antibodies LW9 and LW10 also failed to react in an immunodot assay using bacterial lysates obtained in non-denaturating conditions (not shown).

Detection of mismatches in escape mutants. To locate the binding sites for mAbs LW9 and LW10, three escape mutants of the VR-299 strain were cloned and sequenced over the preVP2 coding region. A single nucleotide mismatch was found in each sequence (Table 5). All the substitutions occurred in the first or second position of the codon and modified the amino acid sequence. Interestingly, all the mutations were found in the two hypervariable regions previously identified. Substitutions of an arginine residue with tryptophan [in MLW9 (A)] or with threonine [in MLW9 (P2)] were associated with a lower local hydrophilicity of the protein, compared to the profile observed in the corresponding region of the wild virus (Fig. 13)⁶. Arginine is a positively charged amino acid while tryptophan is hydrophobic and threonine is polar but uncharged. The mutation observed in MLW10 (P4) is more conservative (glutamic acid to lysine) and had no significant influence on the hydrophilicity profile (Fig. 13)⁶.

Two other escape mutants, obtained with mAbs LW9 and LW10, were cloned and sequenced. They were not included in Table 5 because they had the same nucleotide mismatch than that observed in MLW9 (P2) or in MLW10 (P4).

⁶ Les références à la Figure 13 apparaissent dans la thèse seulement puisque cette dernière n'a pas été incluse dans l'article originel, faute d'espace.

DISCUSSION

Comparison of aligned sequences of the preVP2 coding region revealed that IPNV strains can be classified in three distinct groups, as previously suggested (Heppell *et al.*, 1993), though percentages of homology are not representative of the variations between entire A segments of the viral genome, because VP2 is more conserved than the rest of the polyprotein. Nevertheless, we identified two short hypervariable segments within the central region of the protein. The position and the size of the central variable domain are similar to those determined by Håvarstein *et al.* (1990a), but the hypervariable segments are different since they found only one highly variable region (positions 234 to 264). These discrepancies are probably due to the fact that they compared only two strains, Jasper and N1.

Amino acid substitutions in the escape mutants occurred in the two hypervariable segments. Thus, these regions are probably involved in the formation of the conformational epitope recognized by neutralizing mAbs LW9 and LW10. The location of the substitutions observed in mutants MLW9 (A and P2) correlate with the discontinuous nature of the binding site for mAb LW9, since they are probably too far apart (31 residues) to form a single continuous epitope. It is possible, however, that the antibodies bind to only one of the two hypervariable segments and that the other one plays a role in stabilizing the conformation of the epitope, as it was suggested for IBDV (Heine *et al.*, 1991). Mutations observed in MLW9 (A and P2) are not conservative and have a significant local influence on the calculated hydrophilicity profile. Thus, they could slightly modify the folding of the protein, as suggested by the variation in the calculated surface probability of mutants VP2s (Fig. 14)⁷.

⁷ Cette figure a été ajoutée dans la thèse; elle ne figurait pas dans l'article publié.

Comparison of the different IPNV strains revealed significant differences in the hydrophilicity profile of the hypervariable region nearest the N-terminus (Fig. 11). Consequently, as suggested for the VR-299 escape mutants, both the primary sequence and the conformation of VP2 could contribute to the antigenic variations of IPNV. However, there is no direct evidence that the hypervariable regions of all IPNV strains contain an important neutralizing epitope.

Disulfide bonds are probably not important for the proper folding of the variable domain of VP2. In fact, only two conserved cysteines were found on all IPNV strains: one at position 55 and the other at position 195 (in the N-terminal part of the variable domain). Nevertheless, these residues could be involved in the formation of protein dimers and trimers since VP2 tends to polymerize in the absence of reducing agents (Dobos and Rowe, 1977). No other cysteines were found in the sequences, except for the one at position -2 on strains Fr.21 and C2.

Despite the fact that IPNV strains show more genomic and antigenic variations than IBDV, it appears that the antigenic structure is similar for both viruses. In fact, Azad *et al.* (1987) showed that the central region of IBDV VP2 (amino acids 206 to 350) contains a conformational epitope recognized by a neutralizing mAb. This region was found to be hydrophobic with a small hydrophilic region located close to each terminus, which could correspond to the hypervariable regions we identified on IPNV. Most of the amino acid substitutions in IBDV also occur in the central portion of VP2 and especially in the two hydrophilic regions (Vakharia *et al.*, 1994b). Thus, these features could be shared by all birnaviruses, but their exact location and size are not identical.

In addition to the major conformational antigenic determinant, other important epitopes of IPNV are located on VP2. Tarrab *et al.* (1995) showed by additivity and competition assays, that mAbs LW4, LW6 and LW7 (which recognize continuous epitopes) bind to proximal or identical sites. However, the relative position of these epitopes was

uncertain. Results obtained with the truncated VP2s showed that LW4 binds to the region located between amino acids 331 and 351, which lies immediately downstream of the variable domain. The binding site for mAbs LW6 and LW7 could not be determined so precisely. Though they both reacted with the same bacterial clones, the intensity of the signal obtained with the truncated proteins was different for the two mAbs, while it was similar with the positive controls. Thus, LW6 and LW7 could bind to proximal but not identical epitopes, located between residues 271 and 331, in the variable domain. According to Tarrab *et al.* (1995), the binding site for LW6 would be closer to the LW4 epitope than to that of LW7.

To precisely determine the binding site for mAbs LW6 and LW7, escape mutants were isolated and sequenced as described previously for LW9 and LW10 mutants. However, because the neutralization titers of LW6 and LW7 were much lower than those of LW9 and LW10 (unpublished results)⁸, true stable mutants were difficult to obtain. Despite repeated attempts, no mismatches were detected in the VP2 coding region of the LW6 and LW7 escape mutants selected.

The reason why the antiserum seemed to react with the shorter clone EM245 and not with EM271 is unknown. It is possible that the truncated protein expressed in clone EM271 partially renatured itself during the transfer to the membrane in such a way that the epitopes were no longer accessible to the antibodies. Secondary folding into a more stable configuration has already been reported for proteins blotted from SDS gels (Nyholm and Ramlau, 1988). In clone EM271, one of the hypervariable segments is totally eliminated. Removal of this hydrophilic region leaves a hydrophobic terminus on the fusion protein, which could likely fold inside the protein or bind to the membrane. This

⁸ Ces résultats ont été obtenus par Mme Esther Tarrab, dans le cadre de ses travaux de doctorat portant sur la caractérisation antigénique du VNPI. Pour cette raison, ils n'ont pas été inclus dans cette thèse.

could also explain why clone EM245, which does not contain this hydrophobic region, seemed to react with the antiserum. Nevertheless, the weak signal obtained with EM245 would suggest that minor continuous epitopes were located in the N-terminal part of the variable domain. However, the upstream conserved region did not seem to play an important role in the immunological response to the virus, although it has been suggested that, for the N1 strain, some of the amino acids located between positions 153 and 203 could be involved in the formation of a conformational epitope (Frost *et al.*, 1995).

If refolding of the fusion protein in clone EM271 hindered the binding of the antibodies to the epitopes close to its C-terminus, then it is likely that the negative results obtained for mAbs LW6 and LW7 with this bacterial clone resulted from the same situation. In such a case, it is impossible to determine if the binding site for these two mAbs lies between residues 271 and 331, as mentioned before, or between residues 245 and 271. Refolding of IPNV VP2 after blotting onto a membrane has been suggested previously (Frost *et al.*, 1995; Liao and Dobos, 1995), except that in these particular cases it was thought to restore a discontinuous epitope.

There is no direct evidence that anti-IPNV antibodies with an *in vitro* neutralizing activity are involved in the protection of fish. However, experiments conducted with another trout virus, the Egtved virus, showed that *in vitro* neutralizing, as well as non-neutralizing mAbs, have an *in vivo* protective ability (Lorenzen *et al.*, 1990). Passively transferred antisera from trout or mammals into fish also provided protection against different trout pathogens (Harrell *et al.*, 1975; LaPatra *et al.*, 1994). Accordingly, an antigen which contains important epitopes of the virus is likely to induce a protective immune response in fish.

Results reported herein suggest that a recombinant subunit vaccine against IPNV should include at least the variable domain of VP2 and the 20 adjacent amino acids of the conserved C-terminal part (residues 183 to 351). The efficiency of immunization of

trout with such vaccines has not been tested thoroughly, but some experiments showed that vaccination with the entire polyprotein (VP2, NS and VP3) induced a good protection in rainbow trout fry (Manning and Leong, 1990), while VP2 alone (or its amino terminus) is less effective (Bootland *et al.*, 1993). In both cases however, proteins were expressed in bacteria. It is possible that VP2 does not fold properly in prokaryotic cells. Thus, fish immunized with such proteins could not raise antibodies to the important conformational epitope of the variable domain. In this article, it has not been possible to detect VP2 produced in *E. coli* with mAbs LW9 and LW10, even when bacteria were lysed in non-denaturating conditions.

In addition to the proper folding of the protein, glycosylation could also play an important role in antigenicity (Caust *et al.*, 1987). It has already been shown that IPNV VP2 contains carbohydrate residues that are probably N-linked (Estay *et al.*, 1990). Comparison of sequences revealed that few potential N-glycosylation sites are found on the protein, three of which are conserved among all strains: two in the N-terminal conserved region (positions 73 and 118) and one in the variable domain (position 234). Consequently, VP2 expressed in eukaryotic cells could be more effective at inducing a good protective immune response when injected into fish, as it is the case for IBDV in chickens (Jagadish *et al.*, 1990; Azad *et al.*, 1991).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joanne Roger and Lise Forget for their technical assistance with the sequencing of the clones.

Table 4

Percentages of homology between deduced amino acid sequences of the preVP2 coding region of 8 different IPNV strains

	VR-299	Jasper	DRT	Fr.21	N1	Ab	C2
Jasper*	100.0 [†]						
DRT	99.2	99.2					
Fr.21	89.0	89.0	89.6				
N1	88.8	88.8	89.0	98.6			
Ab	88.6	88.6	88.4	92.1	91.5		
C2	88.8	88.8	89.4	91.5	91.3	88.8	
He	83.7	83.7	83.9	88.4	88.2	84.6	85.8

*Sequence of the Jasper, DRT and N1 strains were obtained from Duncan and Dobos (1986), Chung *et al.* (1993a) and Håvarstein *et al.* (1990a), respectively.

[†]Percentages were calculated with residues corresponding to positions 1 to 492 on the VR-299 sequence.

Table 5

**Localization of mismatches in the sequence of escape mutants of the
VR-299 strain**

Mutants*	Nucleotide mismatches		Amino acid mismatches	
	Substitution	Position	Substitution	Position
MLW9 (A)	C→T	882	R→W	255
MLW9 (P2)	G→C	976	R→T	286
MLW10 (P4)	G→A	864	E→K	249

*Mutants MLW9 and MLW10 were selected with mAbs LW9 and LW10, respectively.

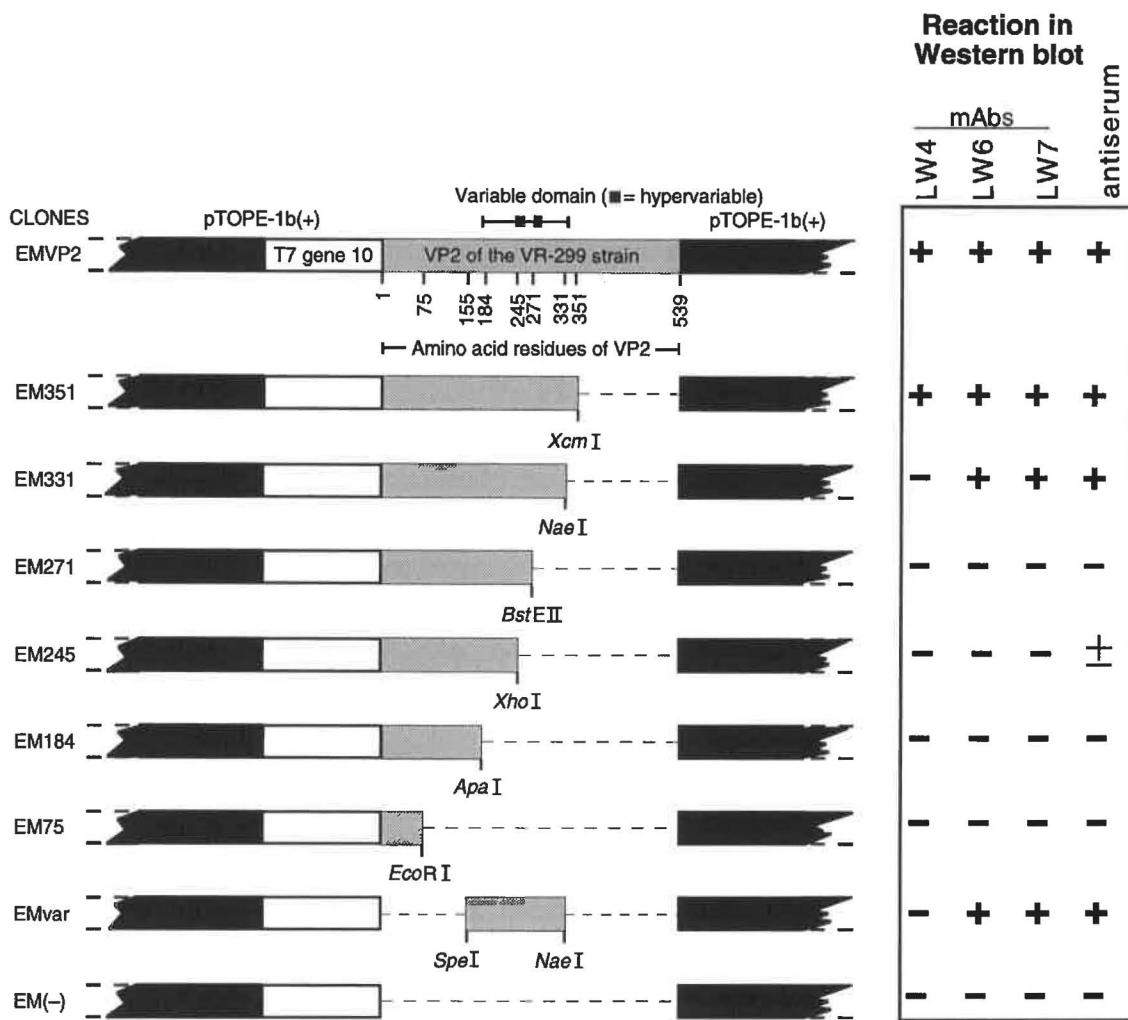


FIGURE 8: Construction of the deletion clones used for expression of truncated VP2s.⁹

Restriction sites used for the cleavage are indicated. Amino acid residues are numbered from the first methionine of the polyprotein (position 1). Clone EMVP2 contain the entire preVP2 coding sequence while clone EM(-) is the pTOPE-1b(+) expression vector without insert, used as negative control. The reaction obtained with each clone in Western blot is indicated on the right: +, positive reaction; -, negative reaction; ±, weak positive reaction.

⁹ Cette figure et sa légende ont été modifiées par rapport à la version publiée. Le tableau de droite (*Reaction in Western blot*) n'apparaît pas dans l'article original.

FIGURE 9: Séquence nucléotidique des ADNc correspondants à la pVP2 et à la portion 5' non codante, obtenue de cinq souches de VNPI. (Figure non publiée).

Les résidus identiques à la souche JA(Dobos) sont indiqués par des points tandis que les traits représentent des délétions ou insertions. L'ATG de la polyprotéine apparaît en caractères gras plus grands et soulignés, alors que les codons d'initiation et d'arrêt de la VP5 sont en caractères gras plus grands mais non soulignés. La région correspondante, sur trois séquences publiées, est illustrée: ¹souche JA(Dobos), Duncan et Dobos, 1986; ²souche N1, Hávarstein *et al.*, 1990a; ³souche DRT, Chung *et al.*, 1993a.

	-11 position 1		
	↓	↓	
JA(Dobos)¹	-----GGAAAGAGAGTTCAACGTTAGTGGTAACCCACGAGCGGAGAGCTTACGGAGGAGCTCCTCGTCG	ATG GGCAAAGCCCTTCTAAC	89
VR-299	-----	89
DRT³	-----	T.....A.....	89
Fr.21	-----	89
N1²	GTGTGTTGACA	89
Ab	-----	G.....	89
C2	-----	89
He	-----T.....	89
JA(Dobos)¹	AACCAACCAACATTCTTATCTACAT-GAATC	ATG --AGCACATCCAAGGCAACCGCAACCTACTTGAGATCCATTATGCTTCCCGAGAAATGGGCCAGCA	185
VR-299	...A.C.A.CA.....	185
DRT³	...A.C.A.CA.....G.....C.....	185
Fr.21	...A...A...A...ATAT.CA...C.AG....A...AA.....T.....A.....A...C...A.....	184	
N1²	...A...A...A...ATAT.CA...AC.AG....A...AA.....T.....A.....A...C...A.....	185	
Ab	...A...A--A...A.CA...C.AG....AA...A.....AG.....A...C...A..TT.C	182	
C2	...A.C.T.CA...A.CATAT...A...C.AG....A...AA.....T.T...A.....C.....	184	
He	...A.....T...AAT.CC.AC.A.AC.C.C...ATG.C...ACAA...AAC.....T...T...C...A...T...C...A...ATC.....G	189	
JA(Dobos)¹	AGCATTCCGGACGACATAACAGAGAGGCATATACTAAAACAAGAGACCTCGTCATACAACCTAGAGGTATCCGAATCAGGAAGTGGCTCTTGTCTGCT	285	
VR-299	285
DRT³	C.....C.....	285
Fr.21	...C.....G...A...C..CT.....	C.....CA.....T..T.	284
N1²	...C.....G...A...C..C.....	C.....CA.....T..T.	285
AbG...A..C..CT.....T...C.....C..G..C.....TG.....T..T.	282	
C2C.....G...A...C..CT.....C..A..C..C.....A.....	284	
HeT...T..TG.G.....C.T..C..C..G.....A...A..C.....TC...A..T..A..G.....C..C..CA.A..G..G.....	289	
JA(Dobos)¹	TCCCCGGAGCTCCTGGATCCAGGGTGGTCCCCACTACAGGTGGAATCTGAACCAAGACGGCACTAGAATTGGACCAGTGGCTAGAGACGTCACAGGACCT	385	
VR-299	385
DRT³	...T.....C.....	385
Fr.21	...T..G..A..A..C..AC..A.....A.....A.....GC.....GG..G..G.....G.....G.....	384	
N1²	...T..G..A..A..C..AC..A.....A.....A.....GC.....GG..G..G.....G.....G.....	385	
Ab	...T.....A..A....A.....A.....T.....A.....G.....A.....G.....G.....	382	
C2	...G..C..A..A..C..GC..T..T.....T.....A.....GC.....G.....G.....G.....	384	
He	.T..A..G..A..A..C..GC..CA..A.....A.....GCC..T.....CCAG..CC..G.....A.....C..A.....	389	
JA(Dobos)¹	AAAGAAGGCATTCAACTACGGGAGACTGATCTCACGGAAATACGACATCCAGAGCTCAACCCCTCCGCTGGCTGTATGCACTCAATGGACCCTGAAC	485	
VR-299	485
DRT³T.....	485
Fr.21	G...A..C.....G.....A.....T..A.....C..A..A..G..C.....C..T..G..C.....G..C.....	484	
N1²	G...A..C.....G.....A.....A.....C..A..A..G..C.....C..T..G..C.....G..C.....	485	
Ab	G...A..T.....G.....A..CA.....G..T..A.....C..G..G..G.....G..C.....C..G.....A..C.....	482	
C2	G.....C.....T.....G..T.....A.....T.....C..T..A..A..C..C..C.....G.....A..T	484	
He	C...G...G.....T.....C..T..C.....GA.....T.....A.....A.....A.....G..C.....AA..A..T	489	

FIGURE 9 (suite)

JA(Dobos)¹	GCTGCCACCTTCGAAGGAAGTCTGTC	TGA AGTAGAGAGCCTAACCTACAACAGCTTGATGTCCCTAACAAACAAACCCACAGGACAAGGTCAACAATCAAC	585
VR-299	585
DRT³	585
Fr.21C.....G..G.....G.....C.....C..G.....C.....A.....C..G.	584
N1²C.....G..G.....G.....C.....C.....G.....C.....A.....C..G.	585
Ab	.C.....C.....G..T.....GT.....C.....T..G.....G.....C.....A.....C..G.	582
C2	.C.....A.....C.....A.....G.....G..A.....T..C.....A..C.....G.....C.....	584
He	.C.....A.....C..C..... AGTCC.A.....T.....TC.A.....G.....G.....A.....C.....	589
JA(Dobos)¹	TAGTGACCAAAGGAATTACCGTCCTGAATCTACCAACTGGTTTGACAAGCCATACGTCCGCCTAGAGGACGACACCACAGGGCCCCAGTCCATGAA	685	
VR-299	685
DRT³C.....G.....	685
Fr.21	.G.....G.C.....A.....C.....C.....T.T.....A.....	684
N1²	.G.....G.C.A.....A.....C.....A.....C.....T.T.....A.....	685
Ab	.C.....G.C.G.....C..G.....A.....C.....A.....C.....T.T.....A.....	682
C2	.G.....A.....G.C.....C..G.....A.....C.....C.....T.T.....T..G.....	684
He	.C.A.A.....A.....GG.G.A.....A.....C.AC.....A.....A.....A.T.....A.A.....T.T.....G.....	689
JA(Dobos)¹	CGGAGCAAGGATGAGGTGCACAGCTGCCATCGCACCAAGGAGGTATGAAATCGACCTCCCATCCGAACGACTGCCGACCGTGGCCGCGACTGGGACCCCA	785	
VR-299	785
DRT³	785
Fr.21	...G..C.A.....A.C.....G.C.....C..G.....C.....C..A..CC.....TC.T.....A..A.....TC	784
N1²	...G..C.A.....A..T.....G.C.....C..G.....C.....C..A..CC.....TC.T.....A..A.....TC	785
Ab	...G..C.A.....A.C.....G.G.....C..G.....C.....A.....A.....CC.T.....A.....TC	782
C2	...G..G.A.....A..T.....C.....G.....A..G.....C..CC.....CACAA.....A..A.....TC	784
He	T..GT..C.....A.....G..TT.....C.A.....G..CAA.....GCC..T..TC.A..TC.A.....A..A..TAT	789
JA(Dobos)¹	ACAACAATTTATGAGGGGAATGCTGACATCGTGAACCTCCACAGCAGTCACCGGGGACATAACATTCCAGCTCGAGGCCGAACCGCTAACATGAGACACGGT	885	
VR-299	885
DRT³C.....A.....G.....	885
Fr.21	.C..TC.C..C.....A..C..C.....C.....A.....G..G..A.....AC..AGT..G..CA..AAC.....CA..C.....CAA..	884
N1²	.C..TC.C..C.....A..C..C.....C.....A.....G..G..A.....AC..AGT..G..CA..AAC.....CG..C.....CAA..	885
Ab	.C..G..C..C.....C.....C.....G..GA.....T..A.....T..GC..AGC..C..CAA..A..C..AC..GCA..C..TCAA..	882
C2	.C..C..G..C.....A.....C.....A.....A.....G..G..A.....C..GC..AGT..T..CAA..CC..CAGCA..A..CAC..	884
He	G.....C.A..C..A..C.....A.....A..T.....CA.....TT..G..T.....C.AC..A..T..GC..CAG..CC..A..CA..A..CAA..	889
JA(Dobos)¹	TCGACTTCATTCTACAGTTCTGGGCTGGACAACGACGTCCCCGTGGTTACCGTGACAAGCTCCACGCTAGTCACAGCGACAACTAACAGGGGGCGTC	985	
VR-299	985
DRT³T.....C.....	985
Fr.21CAG..GG.C.....A..C..T.....T.....A.....C..A..GTC.....GT..G..C..AAC.....C..A..A..TC..	984
N1²CAG..GG.C.....A..C..T.....A..T..C..A..GTC.....GT..G..C..AAT.....A..A..TC..	985
AbCAG..GG.C.....C..T..C.....G..T..C..G.....C.....GT..G..A.AC..A.....A..C.....	982
C2	.T..A..CAG..GG.C.....T..A..A.....A..A..C..C.....C..TC..A..AG..G..C..GAAA..A..C..CTA..A..TC..	984
He	.T.....AG..TG.....C.....T.....T..T..AA..A..T..C..A..CGTG.....AGT..C..CA..T..A..CA.....C..A..GATC..	989

FIGURE 9 (suite 2)

JA(Dobos) ¹	AGCCAAGTTCACCCAGTCATCCAAACAGAAATGATTACCAAACCAATCACACGGGTCAAGCTGGCTACCAGCTAACCGCAGACCGCAATTGCAAAC	1085
VR-299	1085
DRT ³T.....	1085
Fr.21A.G.....T..C.....G..C..G.AC..C.....G..G.....CA.....T.A..A..A.....A.....C.GC..T	1084
N1 ²A.G.....C.....G..C..G.AC..C..A..G..G.....CA.....T.A..A..A.....A.....C.GC..	1085
AbA.G..GAT..C..A..C..C..G.AC..C..G..G..G.....A.A.....T.....A.AG.....A..G..A..C..	1082
C2	G.....A.G.....AG.....A..G..G.GC..A..A..G.....CA.A.....G.....T.....A.A.....A.....A.A..C.G..	1084
He	...G..AA.G..A.....G..A.....T.....AC..C..A.....GG.G..GA.....AT.....A.AA.....T.....A..T.AG..C.G..	1089
JA(Dobos) ¹	GCAGCAACGCTCGGAGCCAAGGGGCCGGCATCAGTCTCATTCTCATCCGGAACGGCAATGTGCCGGGGTCCTAACGACCCATAACCCTAGTGGCGTAGC	1185
VR-299	1185
DRT ³	1185
Fr.21	.TC..C..C..G..CA.A.T..T..A..T..C.....C..T.....G.....A.....C..C..C..G..C.....A..C..A..G..C..T.	1184
N1 ²	.TC..C..C..G..CA.A.T..T..A..T..A.C.....C.....A.....A..C..C..C..G..C.....A..C..A..G..C..T.	1185
Ab	C....C..C..G..GA.ACTA..T..A.GG..C.....C..T..T..A..A.....C..C..T..G.....C..A..G..C..T.	1182
C2T..A..G..G..CTT.....C..A.T.....C.....A.....T..A..C..A..T..A..G..G.C.G..A..C..A..G..C..T.	1184
He	A.C..C..C..T..G.TGCTT..A..A..C.....GG.C.....G..A..C.....C..T..T..C..G..C.....C..C.....T.	1189
JA(Dobos) ¹	AGAAGATGACCCCCCAGTCATCCTGACCGTGGCTGGCTATCCAACATGAGCTGATCCAAACCCAGACCTACTGAAGAACATGGTCACCAAGTATGG	1285
VR-299	1285
DRT ³	1285
Fr.21A..G.T..C.....A.....A..G.....C.....A..C..C.....G..ACGC.....T.	1284
N1 ²A..G.T..C.....A.....A..G.....C..TC.TA.....A..C..C.....G..ACGC.....T.	1285
AbA.....A.....C.....A..T..A.....A..G.....C.....A..CT.....G..ACGC.....T.	1282
C2A.....A.....A.....A..G..T.....C..A.....C.....C.....A.....C..C.....A.....C..	1284
HeA.....G..A.....G.T.....A..C..C..A..G..A.....A..A.....T.....C..G.....A..C..C..C..	1289
JA(Dobos) ¹	AAAGTATGACCTGAGGGCTCAACTATGCCAAGATGATCCTGTCCCACAGAGAGGAGCTGGACATTAGAACCGTCTGGAGGACTGAGGAATACAAAGAA	1385
VR-299	1385
DRT ³	1385
Fr.21	C....C..C..A..T.....G..A.....C..G..A..G.....A..G.....G..G	1384
N1 ²	C....C..C..A..T.....G..A.....C..G..A..G.....A..G.....G..G	1385
Ab	C....C..A..G.....G.....A..G..A.....A..G..A.....G..G..G	1382
C2	C..A.....G..A..T..G.....A..A.....A..G..A.....A..G..A.....C..G..G	1384
He	G.....C..A..T..A.....T..T..G..T.....C.....C.....G.....C.....C..G..G	1389
JA(Dobos) ¹	AGGACAAGAGCATTCAAAGAGATCACTGACTTCACAAGTGACCTACCAACCTCAAAGGCATGGGATGGAGGGACCTGGTCAGAGGCATCAGAAAAGTGG	1485
VR-299	1485
DRT ³	1485
Fr.21C..TC.....C..A.....G.....T..T.....G..C..G.....C.....A..A..A.....A..TC..G.....C.	1484
N1 ²C..TC.....C..A.....G.....T..C.....G..C..G.....C.....A..A..A.....A..TC..G.....C.	1485
Ab	C.....TC.....C.....C.....T..C.....G..C..G.....C.....A..A.....G..C..G.....C.	1482
C2G..G..TG.....C.....C.....T..G..C.....G..C..G..A.....C.....A..A..A.....G..C..G..G..C.	1484
HeC..G..TG.....C.....A.....TT..C.....C..C.....C.....C.....A..T..A..AGCAA..C..G..G..A..C.	1489

FIGURE 9 (suite 3)

JA(Dobos)¹	CCGCCCCGTGCTGTCAACGCTCTTCCAATGGCGGCTCCCTTAGGAGCTGCCGACCAATTCAATTGGGACCTCACCAAGACCAACTCAGCCGGGG	1585
VR-299	1585
DRT³A.....C.....G.....	1585
Fr.21	.A..T.....A.....G..T.....A..A..A..C.....ATG..A.....A..T.....G..A..C..	1584
N1²	.A..T..T..A.....C.....G..T.....A..A..A..C.....ATG..A.....A..T.....G..A..C..	1585
AbA..A.....G..T..G.....A..A..A..C..T..TG..A.....C..C..A..T.....C..G..A..C..	1582
C2	.A..A.....C..C.....G..G.....A..A..A..C.....GATA.....C..T.....A..A..TG..A..A..	1584
HeT..T.....A.....AA.G.....C.....C..C..T..C..T..ATG.....G.....A..C.....A..A.....G..T.A..C..	1589
 JA(Dobos)¹	 ACGGCTACCTGTCACACGGAGCCGGAGGGCGTACCATGATGTCATGGACTCATGGGCCAGCGGGTCCGAGGCAGGAAGCTATTCAAAGCACCTCAAGACC	 1685
VR-299	1685
DRT³C.....C.....	1685
Fr.21	.A.G.....AC..CATG..C..A.....G.....A..A..C..GC..C..G..C.....A.....AGGGCCC.AC.....AA..TC..CCGAGC.....A.	1684
N1²	.A.G.....AC..CATG..C..A.....G..C..A..A..C..GC..C..G..C.....A.....AGGGCCC.AC.....AA..TC..CCGAGC.....A.	1685
Ab	.A.G.....GC..CATG..C..A.....A..T..A.G.....A.....C.....CGGACCC.AC..G..AG..TC..CC..GCT..A..A..	1682
C2	C..G..AAC..CATG..G..T..C..A..A..C..AGA..C..G.....G.....CAAAC..AC..G..A..TC..CC..ATCT.....A..	1684
He	.A..A..AAC.....T..C..T.....G..G..A..G..C..TC..GA.....A.....A..A..A..CA..T..CC..TC..T..AG.....AA	1689
 JA(Dobos)¹	 CGGCTTGAGTCCAATAACTATGAGGAAGTGGAGCTTCCAAGCCAACAAAGG	 1737
VR-299	1737
DRT³	1737
Fr.21	A...G.....GCC.....C.....C.....CCC..CT...A.	1736
N1²	A...G.....GCC.....C.....C.....CCC..CT...A.	1737
Ab	A..A..G.....TGCC.....C.....C.....TCCC..TT...A.	1734
C2	..C..A.....GGCC.....A.....TCCA..CCAG..A.	1736
He	..C..A.....A.CA.....A.....CGC..CGA.CGT.	1741

FIGURE 10: Dduced amino acid sequences obtained from the five viral strains used in article III and their corresponding portion on the published sequences of IPNV.

Homology to the VR-299 strain is indicated by dots, and dashes stand for missing residues. The central variable domain of VP2 is underlined while the two hypervariable segments are doubly underlined. Amino acid residues shown in lower case letters probably belong to the NS protein. Sequences of the N1 and DRT strains were obtained from Håvarstein *et al.* (1990a) and Chung *et al.* (1993a), respectively. The sequence of the Jasper strain (Duncan and Dobos, 1986) is not presented because it is identical to VR-299.

	-17	position	1		
	↓		↓		
VR-299		MSTS-KATATYLRSIMLPENGPASIPDDITERHILKQETSSYNLEVSESGSLLVCFPGAPGS			62
DRT					62
Fr.21	MAKALSNKQTNNLYQCK.N.N-	K.....T.....		I.....	62
N1N.N-.....	K.....T.....		I.....	62
AbN-.....	K.....T.S.....	D...V.....		62
C2	MAKALSNKOPTIPIYKCK.N.N-	K.....T.....	D.....		62
HeM.NN.N-.....	K.....S.....V.....	I.....		63
VR-299	RVGAGHYRWNLNQTALEFDQWLETSDQLKKAFNYGRLISRKYDIQSSTLPAGLYALNGTLNAATFEGSLSEVESLTYNSLM				142
DRT					142
Fr.21	I.....A..G.				142
N1	I.....A..G.				142
AbV..E.	V.....	I.....S.....		142
C2K..A.				142
He	I.....A..Q.Q.	R.....	I.....SN.S.....		143
VR-299	SLTTNPQDKVNQNQLVTKGITVLNLPFGFDKPYVRLEDETPQGPOSMNGARMRCTAAIAPRRYEIDLPSERLPTVAATGTP				222
DRT					222
Fr.21V.....	L.....K.....T.....	Q..P.P...L		222
N1V.....	L.....K.....	Q..P.P...L		222
AbV.....	L.....K.....T.G.....	Q..P...L		222
C2		LL.....K.....	PAQ...L		222
HeI..V.....N.....	K.L.....ST.....S.....	N.A..P.P...Y		223
VR-299	TIIYEGNADIVNSTAVTGDTFQLEAEPVNETRFDFTLQFLGLDNDPVVTVTSSTLVADNYRGASAKFTOSIPTEMIT				302
DRT					302
Fr.21T.....A.....	V..H.....			302
N1T.....N.S.AEQ.A..K..Q.D.M.....	V..V.A.N..H..V..M.H.....N..			302
AbT.....N.S.AEQ.A..K..Q.D.M.....	V..V.A.N.....V..M.....N..			302
C2T.....S.S.ANN.TADIK..Q.D.....	V..N.....M.M.....N..			302
HeM.....T.....S.S.ATA.AA..T.E.Q.D.....N.....I.TA.A.KE.HL.V..M..A..S..				302
	A.L.....T.S..N.N.QQA.A..K..K.E.....E.....V..V.A.EA..I..M.....N..				303
VR-299	KPITRVKLAYOLNOOTAJANAATLGAKGPASVSFSSGNGNVPGLRPITLVAYEKMTPOSILTIVAGVSNYELIPNPDLKK				382
DRT					382
Fr.21S.KI.....G.V.....TM.....	L.....E..			382
N1S.KI.....G.V.....TM..TT.....	L.....SY..E..			382
AbS.KV.....P....TL..G.....		E..		382
C2R.S.K.....E.G.....L..T..				382
HeV.....S.KI.....E.G.T.....VL.....A.....V.....		R		383
VR-299	NMVTKYGYDPEGLNYAKMILSHREELDIRTVWRTEEYKERTRAFKEITDFTSDLPTS KAWGWRDLVRGIRKVAAPVLST				462
DRT					462
Fr.21R.....	V.N.....S.....I.....			462
N1R.....	V.N.....S.....I.....			462
AbR.....	K.....V.N.....S.....I.....			462
C2R.....	D.....V.N.....S.....I.....			462
HeH.....	D.....D.....V.N.....S.....I.KQ..RI.....			463
VR-299	LFPMAAPLIGAADQFIGDLTTKTN SAGGRYLshaaggryhdmdswasgseagsyskh lktrlesnnyeevelpkptk				539
DRT					539
Fr.21M.....A.....H.m.....k..le.....gpd.kf.ra..n....a.....p.s.				539
N1M.....A.....H.m.....hk..le.....gpd.kf.ra..n....a.....p.s.				539
AbV..L.....N..A.....R.m.....k.....gpd.kf.qa..n....a.....p.s.				539
C2I.....A.....N.m.....hhr..e.....kqd.rf.qs..n....a.....p.q.				539
HeM.....AS.....N.....k..let.....nt.rf.ms..k....t.....r.er				540

FIGURE 11: Hydrophilicity profiles calculated for the five IPNV strains sequenced in article III.

Signs of the values (on the left) were inverted so that hydrophilicity was plotted instead of hydrophobicity as originally used by Kyte and Doolittle (1982). The approximate location of the substitutions observed with the VR-299 escape mutants (small arrows) and of the variable domain of VP2 are indicated.

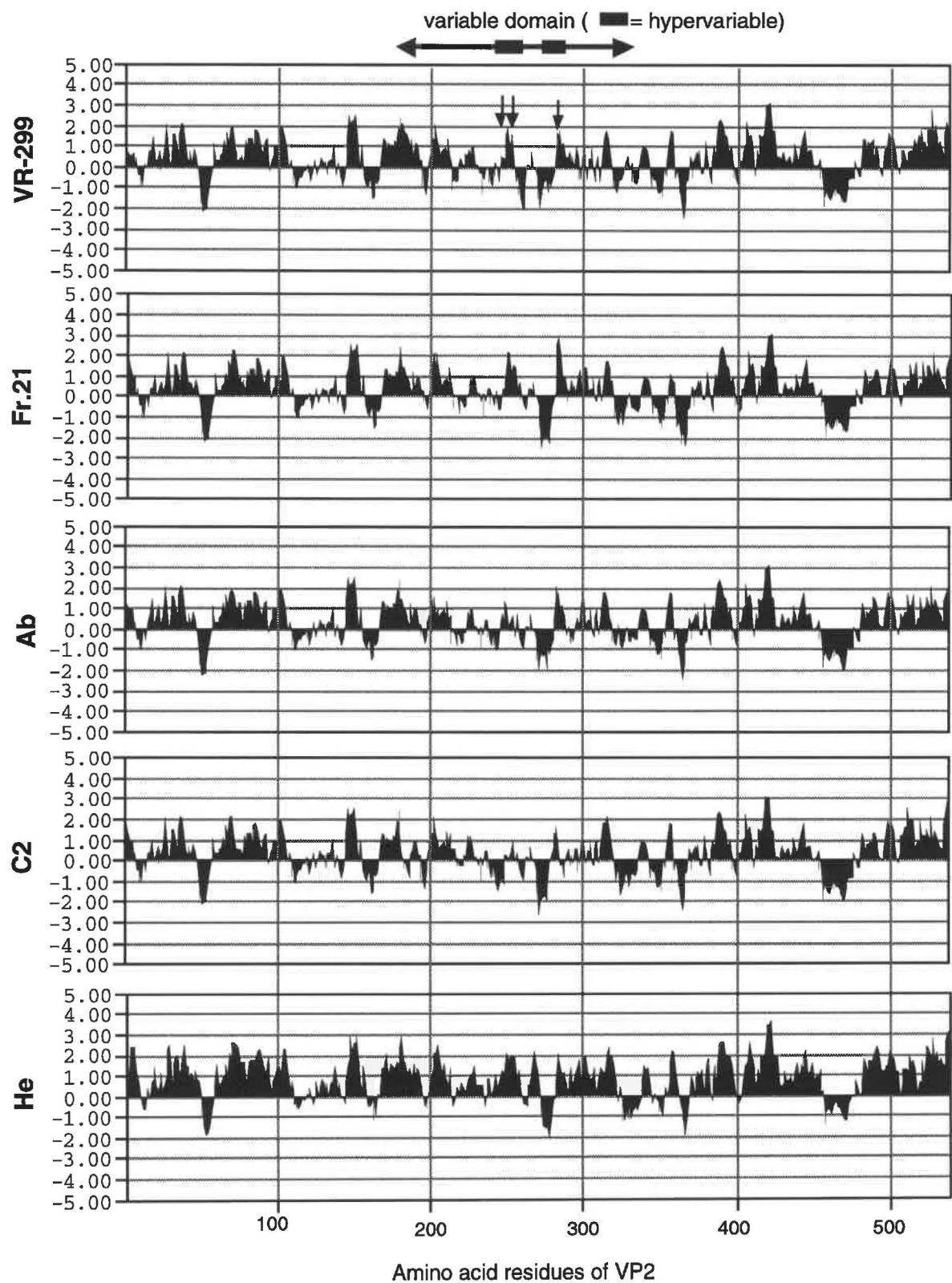


FIGURE 12: Expression of truncated VP2s in bacteria and detection of specific proteins by Western blot.

(A) Induced bacterial cell lysates run on a 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Arrow heads show the position of the fusion proteins. The molecular size markers (M) are indicated on the right.

(B) Western blot of clone EMvar, which contains only the variable domain of VP2, probed with the anti-VR-299 serum and mAbs LW4, LW6 and LW7.

(C to F) Western blots of truncated VP2s expressed in bacteria. The antibody used for the detection is indicated below the figures. A concentrated virus preparation (VR-299) was used as positive control. In (F), the position of native VP2/preVP2 and VP3 is indicated on the right, while arrow heads show the position of specific bands corresponding to full length and truncated VP2s in bacterial clones.

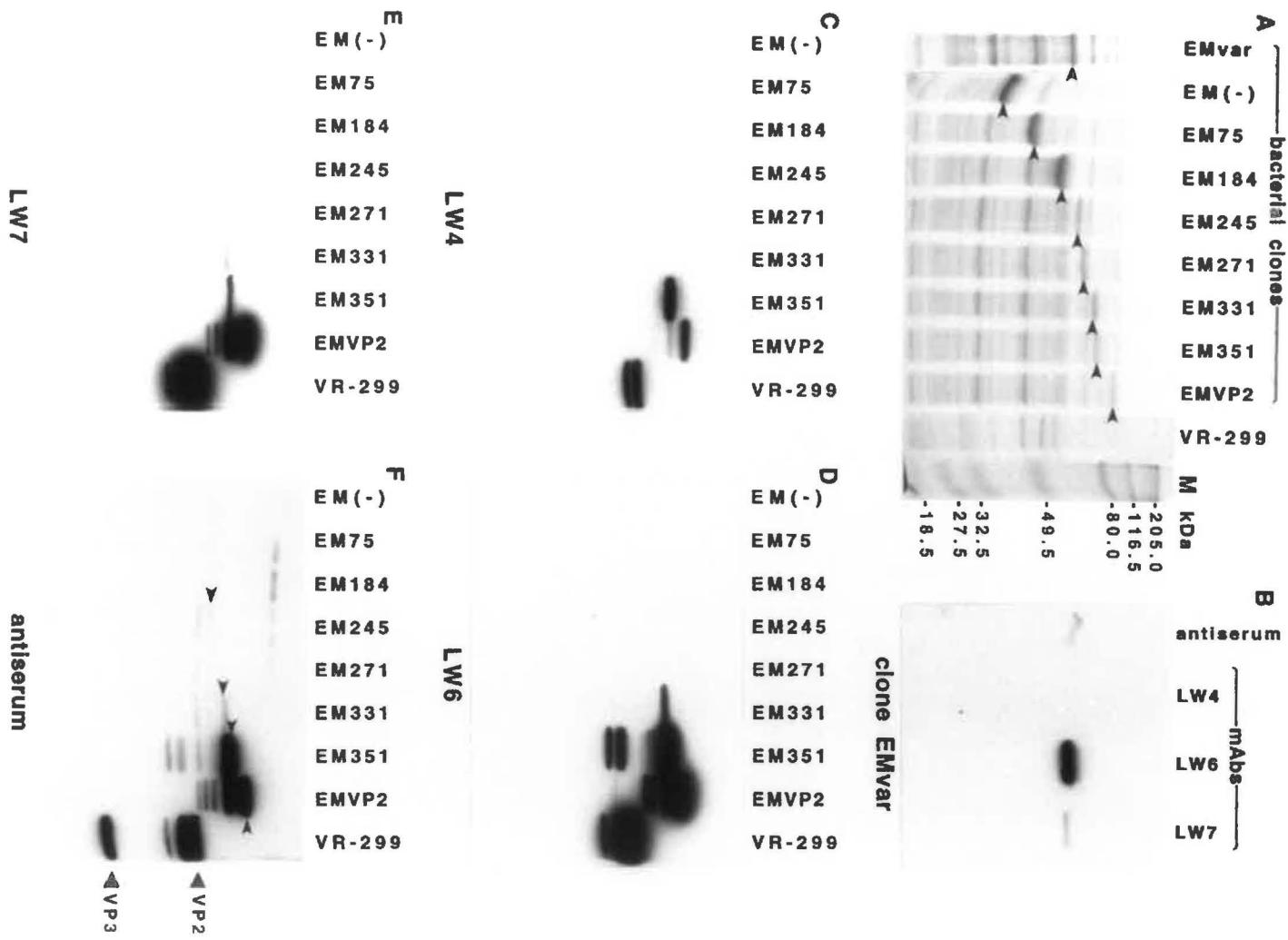


FIGURE 13: Profils d'hydrophilicité calculés pour les mutants d'échappement de la souche VR-299. (Figure non publiée).

Seul le domaine variable de la protéine est représenté sur cette figure. Les valeurs indiquées en ordonnée représentent l'hydrophilicité relative des acides aminés selon l'échelle de Kyte et Doolittle (1982). Le signe des valeurs a toutefois été inversé par rapport à la méthode de calcul originale de façon à obtenir les pics d'hydrophilicité vers le haut. Les flèches indiquent la position des substitutions observées chez les mutants. La souche VR-299 sauvage est représentée par le profil hachuré (courbe du haut), tandis que le profil des mutants est noir et superposé au premier (trois courbes du bas).

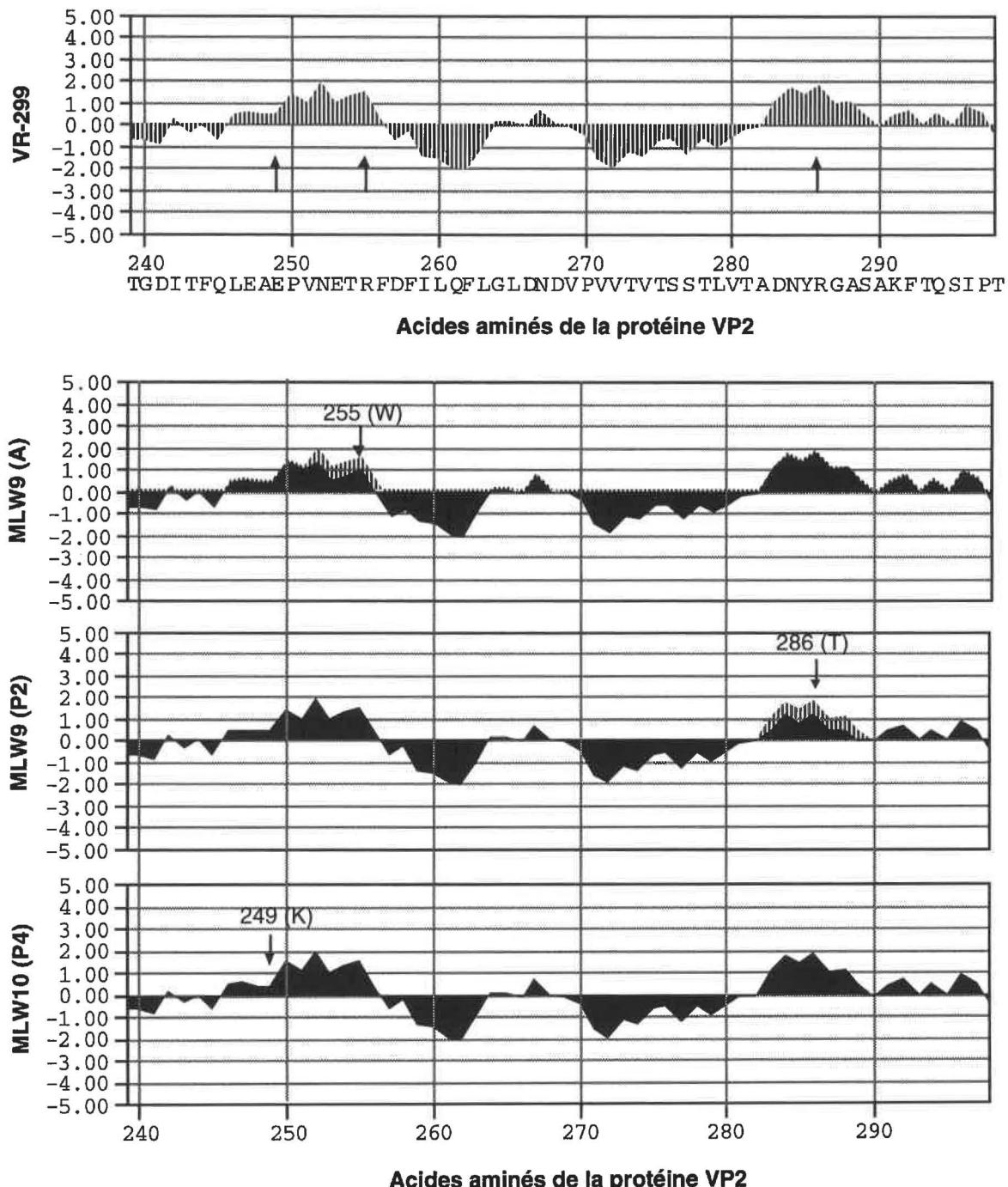
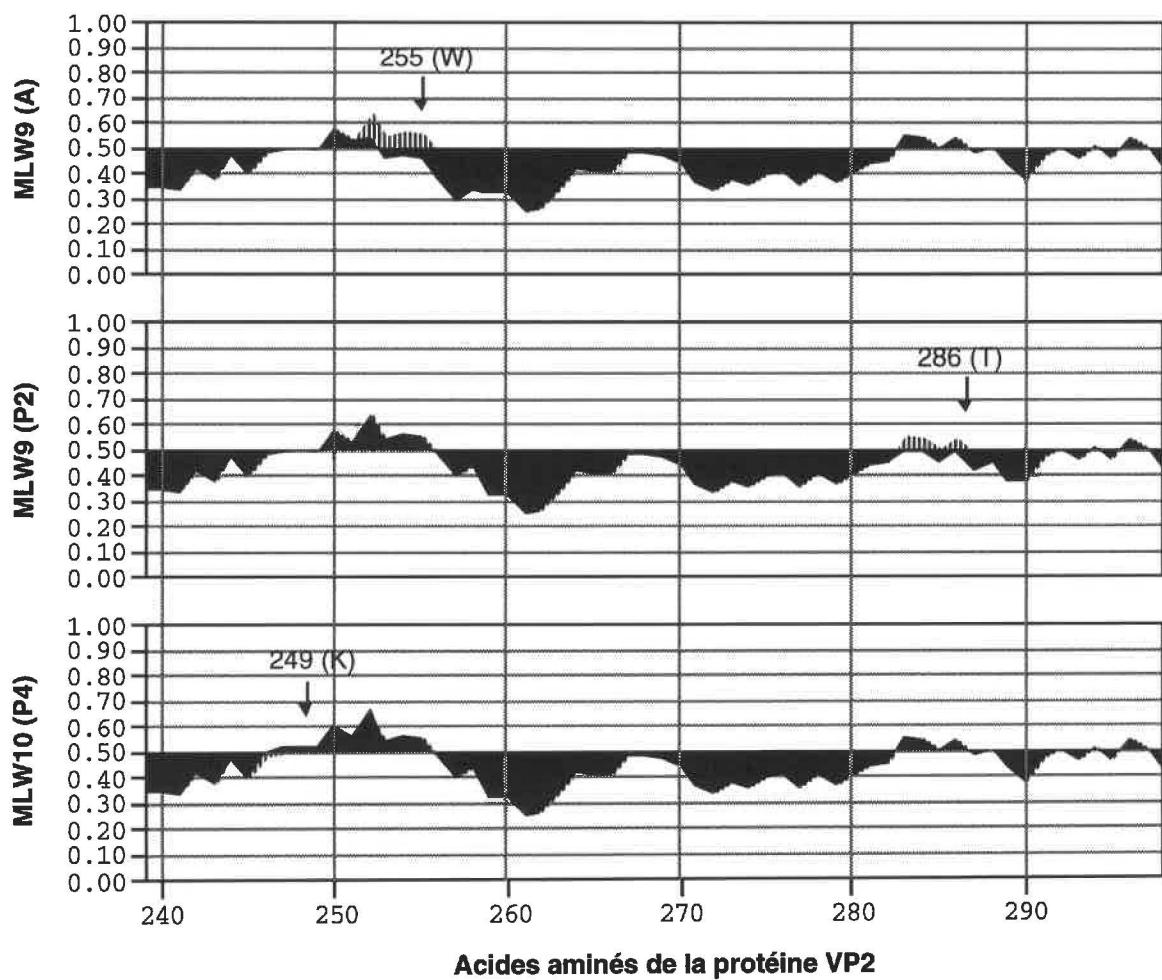
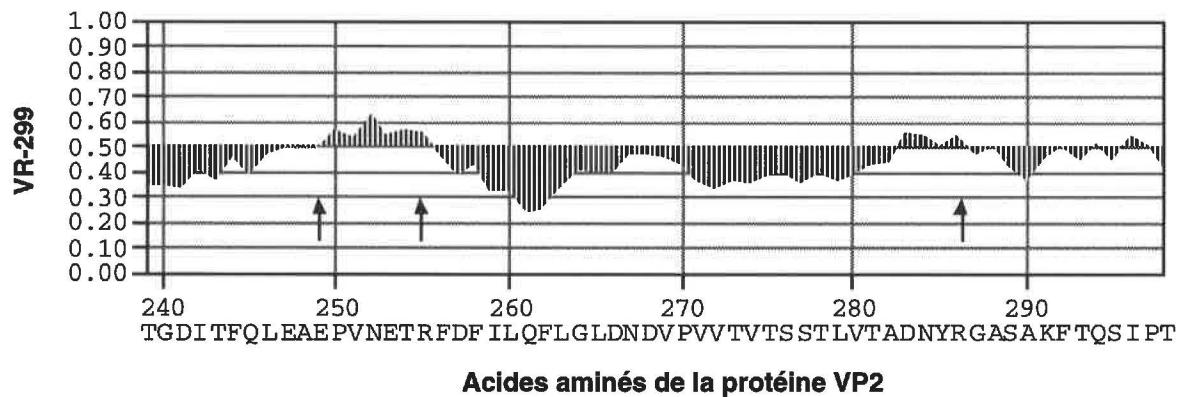


FIGURE 14: Graphiques montrant la probabilité de surface de la VP2 des mutants d'échappement de la souche VR-299. (Figure non publiée).

Les courbes ont été calculées à l'aide du logiciel MacVector (version 4.5, Eastman Kodak Company). Les chiffres apparaissant en ordonnée représentent des valeurs relatives sur une échelle graduée de 0.00 (lorsque la probabilité que l'acide aminé soit exposé à la surface de la protéine est nulle) à 1.00 (pour un acide aminé certainement exposé à la surface). Seul le domaine variable de la VP2 est représenté. Les flèches indiquent la position des substitutions observées chez les mutants. La souche VR-299 sauvage est représentée par le profil hachuré (courbe du haut), tandis que le profil des mutants est noir et superposé au premier (trois courbes du bas).



CHAPITRE 4

**Caractérisation du cadre de lecture de la protéine
VP5 et de la région non codante à l'extrémité 5' du
segment génomique A**

Pour une même espèce de poisson, la virulence du VNPI varie d'une souche à l'autre. Bien que le virus ne soit pas le seul facteur déterminant dans la maladie, il existe certainement des différences au niveau du génome viral pouvant expliquer les variations phénotypiques. Le caractère de virulence a d'ailleurs été relié au segment génomique A (Sano *et al.*, 1992), mais rien n'est connu sur ce qui différencie une souche virulente d'une autre qui ne l'est pas, au niveau de la séquence nucléotidique.

Dans le but de localiser des régions du génome viral qui pourraient être impliquées dans les variations phénotypiques entre les souches, nous avons dirigé nos efforts sur la portion 5' terminale du brin positif du segment A. Outre la partie non codante, le cadre de lecture de la VP5 apparaissait comme un candidat intéressant. Avant la détermination des premières séquences de birnavirus, la présence d'une protéine d'environ 17 kDa (VP5) n'avait jamais été rapportée, ni même soupçonnée. Ce n'est qu'à partir du moment où un deuxième cadre ouvert de lecture a été retrouvé sur le segment A, au même endroit chez le VNPI et l'IBDV, qu'on a commencé à rechercher cette protéine dans les cellules infectées et dans les virions purifiés. Chez l'IBDV, le cadre de lecture a été retrouvé dans toutes les séquences actuellement disponibles mais ce n'est que très récemment que la présence de la VP5 a été démontrée dans les cellules infectées (Mundt *et al.*, 1995). Une protéine de 16 kDa avait toutefois été observée précédemment, suite à la traduction *in vitro* du segment d'ARN génomique A (Azad *et al.*, 1985). Dans le cas du VNPI, seulement trois souches virales ont été séquencées au niveau du cadre de lecture de la VP5, mais la présence de la protéine correspondante a aussi été démontrée dernièrement (Magyar et Dobos, 1994b). Étant donné que les variations génomiques chez le VNPI sont plus grandes que chez l'IBDV, il était intéressant de vérifier si le cadre de lecture de la VP5 se retrouvait dans toutes les souches virales. Pour ce faire, nous avons cloné et séquencé l'extrémité 5' du segment A de cinq virus, en l'occurrence les mêmes que ceux utilisés dans le chapitre 3 [LWVRT 60-1 (VR-299), d'Honnincthun, Ab, Canada 2 et Hecht]. Les séquences obtenues ont déjà été

reproduites dans la Figure 9 du chapitre précédent, combinées aux séquences du cadre de lecture de la pVP2.

En analysant la portion non codante de l'extrémité 5', les cinq souches du VNPI sont apparues presque identiques. Il est donc peu probable que cette région soit responsable des variations phénotypiques. Par contre, des divergences importantes ont été détectées au niveau du cadre de lecture de la VP5. Ces résultats sont rapportés dans l'article IV qui suit (*Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus*). Cette publication répond principalement à la question de l'universalité du cadre de lecture chez les birnavirus, mais elle soulève aussi des interrogations sur le rôle biologique de la VP5.

ARTICLE IV

Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus

Joël Heppell, Esther Tarrab, Laurent Berthiaume, Jacqueline Lecomte et Maximilien Arella

Institut Armand-Frappier, Centre de recherche en virologie, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

FOOTNOTE: The nucleotide sequences reported in this paper have been submitted to the GenBank database and assigned the accession numbers L40580 to L140584.

Article publié sous forme de *short communication* dans: *Journal of General Virology* (1995), **76**, 2091-2096.

ABSTRACT

The genome of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is composed of two segments of double-stranded RNA. The larger segment contains a small ORF partly overlapping the 5' end of the polyprotein reading frame. Yet, very little is known about this possible new gene, which presumably codes for a 17 kDa polypeptide (VP5). The region of the viral genome which encompasses the small ORF was reverse transcribed and amplified by PCR before cloning and sequencing. Analysis of the sequences obtained from five different viral strains revealed that the small ORF is not found on one of them, and that it is truncated on two others. Moreover, the deduced amino acid sequences did not appear to be well conserved among these. Despite the large variations between IPNV strains at the genomic level, all VP5 are arginine-rich basic polypeptides. To verify whether or not the small ORF is translated into proteins in fish cells, the 17 kDa polypeptide of the VR-299 strain was expressed as a fusion protein in a prokaryotic expression vector and used to produce a specific antiserum. This antiserum reacted with concentrated virus in an immunodot assay, indicating that VP5 is synthesized in infected cells, but probably only in small quantities. When tested with twelve other IPNV strains, results were not as conclusive as those obtained with the homologous strain VR-299. Nevertheless, three of the twelve viruses gave a clearly negative signal in immunodot, suggesting that possibly more than one viral strain lack the small ORF.

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) belongs to the family *Birnaviridae* (Francki *et al.*, 1991) and has been isolated from fresh-water and marine fish, molluscs and crustaceans. Its genetic information is contained within two segments of double-stranded RNA (Dobos *et al.*, 1979). The smaller, segment B, is approximately 2700 bp long and contains a single large open reading frame (ORF) encoding VP1 (Duncan *et al.*, 1991), which is the putative RNA-dependent RNA polymerase (Cohen, 1975; MacDonald and Dobos, 1981; Dobos *et al.*, 1991). Segment A (approximately 3100 bp) contains two partly overlapping ORFs (Duncan *et al.*, 1987; Håvarstein *et al.*, 1990a). The larger one (2916 bases) encodes a polyprotein which is cleaved into three polypeptides in the order 5' VP2-NS-VP3 3' (Huang *et al.*, 1986; Duncan *et al.*, 1987; Nagy *et al.*, 1987). The protease activity responsible for this cleavage has been associated with the viral protein NS (Duncan *et al.*, 1987; Manning and Leong, 1990; Manning *et al.*, 1990; Magyar and Dobos, 1994a). VP2 and VP3 are the major immunogenic and structural polypeptides of the virus, and are associated with the capsid.

The small ORF (444 bases) on genome segment A starts 52 nucleotides upstream of the other ORF, but in a different frame. It could code for a 17 kDa arginine-rich protein, tentatively designated VP5 (Duncan *et al.*, 1987; Håvarstein *et al.*, 1990a), but its function is still unknown.

Until now, only three strains of IPNV have been totally sequenced over segment A: Jasper (Duncan and Dobos, 1986), N1 (Håvarstein *et al.*, 1990a) and DRT (Chung *et al.*, 1993a). In each of these sequences, the location and the length of the small ORF are identical. A few other experiments lend support to the presence of VP5. For example, a weak band at approximately 17 kDa was observed with ^{35}S -methionine-labelled purified IPNV particles after SDS-PAGE (Håvarstein *et al.*, 1990a), and, recently, a polypeptide of similar molecular mass was immune precipitated from IPNV-infected cell lysates (Magyar and Dobos, 1994b).

We have compared sequences of the small ORF from various strains of IPNV which have already been assigned to different genogroups (Heppell *et al.*, 1993). A specific antiserum against VP5 was also prepared in order to detect the protein in concentrated virus preparations.

IPNV strains used in this work were obtained from the ATCC [LWVRT 60-1 (VR-299), Ab, d'Honnincthun, Hecht, Canada 1, Canada 2, Canada 3, Tellina-2 and Jasper(ATCC)], except for N1 (Dr. K.E. Christie, University of Bergen, Norway), Jasper (Dr. P. Dobos, University of Guelf, Canada), DK3315 (Dr. N.J. Olesen, National Veterinary Laboratory, Denmark) and 122-88 (Dr. W. Ahne, University of Munich, Germany). Note that the Jasper strain sequenced by Duncan and Dobos (1986) is different from the Jasper strain obtained from the ATCC (Berthiaume *et al.*, 1992). Herein, we refer to the latter as Jasper (ATCC). All viruses were grown on Chinook salmon embryo CHSE-214 cells (except for DK3315 and 122-88 which required fat head minnow (FHM) cells), as described elsewhere (Heppell *et al.*, 1992). Five strains (Ab, VR-299, d'Honnincthun, Canada 2 and Hecht) were selected for cloning and sequencing. The virus RNAs were extracted with phenol and chloroform as previously described (Heppell *et al.*, 1992), then segments A and B of IPNV were purified with the RNaid Kit (Bio 101).

Purified dsRNAs were polyadenylated at their 3' end. Approximately 500 ng of dsRNA was added to a solution containing 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM MnCl₂, 0.2 M NaCl, 0.1 mg/ml BSA, 0.1 mM ATP and 7 units of poly(A) polymerase. After incubation at 37°C for 30 min, and extractions with phenol and chloroform, the nucleic acids were precipitated and resuspended in 12 µl of DEPC treated water. For each RT-PCR reaction, 3 µl of the poly(A)-dsRNA were used.

First-strand cDNA synthesis and the subsequent amplification of the 5' end of genome segment A by PCR were performed according to the protocol described previously (Heppell *et al.*, 1992), with some modifications. Firstly, 50 pmol of the oligonucleotide

Rtag [5'-GGGTCTAGAGCTCGAG(T)₁₇-3'] was used as a primer for the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Secondly, two different oligonucleotides (100 pmol each) were employed for PCR amplification: ADap, which is identical to Rtag but without the poly(dT) tail, and a second one which is complementary to the region downstream of the 3' end of the small ORF (5'-TCGTCCTCTAGGCGGACGTATGG-3' for VR-299, Ab and Canada 2, 5'-GTCAGGCTCTCCACCTCAGAC-3' for d'Honnincthun and 5'-GGGCTTCGTTGGGCA GGTC-3' for Hecht). The following parameters were used for PCR: 1 min denaturation at 95°C, 2 min annealing at 46°C and 2 min elongation at 72°C (35 cycles). The amplified fragments were cloned into the pCR II vector (Invitrogen).

The inserts were sequenced with an A.L.F. DNA sequencer (Pharmacia). For each viral strain, three different clones obtained from three independent RT-PCR reactions were sequenced in both directions. In cases where significant differences between our sequences and previously published ones appeared, results were confirmed by traditional dideoxynucleotide chain termination procedure (Sanger *et al.*, 1977). Sequences described in this paper were analyzed with the GeneWorks program, release 2.3.1 (IntelliGenetics Inc.).

One of the three clones obtained with the VR-299 strain was used for the amplification of the small ORF with primers p17F (5'-GGAGGAGATCTCCGTCATGGCG-3') and p17R (5'-CGCAAGCTTCAGACAGACTTCCTTCG-3'). The start codon and the complement of the stop codon of VP5 appear in bold characters (the added restriction sites are underlined: *Bgl*II for p17F and *Hind*III for p17R). PCR amplification was performed with the following parameters: 1 min at 95°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C for five cycles, then 30 more cycles with 1 min at 95°C, 1.5 min at 65°C and 1.5 min at 72°C. The PCR product was inserted into the prokaryotic expression vector pMAL-c2 (New England Biolabs), then TB1 cells were transformed with this recombinant plasmid (p17pMAL). The insert was sequenced to ensure that no mismatches were introduced during the second

PCR, and that the IPNV ORF was in the right reading frame for its expression. To verify the production of the fusion protein [maltose binding protein (MBP)/p17], samples of bacterial cultures were taken before and after induction with IPTG, and analysed with a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

The cDNA sequence of the small ORF and of the 5' non-coding region was determined for IPNV strains VR-299, Ab, d'Honnincthun, Hecht and Canada 2. Three previously published sequences, from strains Jasper (Duncan and Dobos, 1986), N1 (Håvarstein *et al.*, 1990a) and DRT (Chung *et al.*, 1993a), were also included in this study for the purpose of comparison (Fig. 9)¹⁰. Except for additional nucleotides at the 5' end of the N1 strain and single mismatches for strains N1 (position 1), Ab (position 35), DRT (positions 50 and 64) and Hecht (position 76), the first 91 bases are identical on all sequences. However, the downstream region located between bases 91 and 120 on the Jasper strain appeared to be highly variable, since only five bases were conserved among all strains (Fig. 9)¹⁰.

Analysis of these sequences showed that the small ORF is not identical on all strains. Though its start codon was found on all eight viruses at the same position, insertion (in the case of Hecht) or deletion (in the case of d'Honnincthun and Canada 2) of one residue in the highly variable region was responsible for frame shifts in the small ORF. For this reason, the ATG of the small ORF moved into the same reading frame as the one of the polyprotein in the case of d'Honnincthun and Canada 2. Still, these two strains have a truncated small ORF, beginning at position 112. However, no alternative ORF appeared to be present in the case of Hecht. Additional deletions (strain Ab) and insertions (strain Hecht) were

¹⁰ Les références à la Figure 9 ont été ajoutées puisque dans la publication, seuls les numéros d'accession de GenBank étaient fournis. La figure a été insérée dans le chapitre 3, étant donné qu'elle concerne aussi cette section.

observed in the highly variable region, or in its vicinity, but they did not modify the reading frames.

Comparison of the deduced amino acid sequences showed that there are more conserved residues in the N-terminal part of VP5 (43 out of 74) than there were in the second half of the protein (29 out of 74) (Fig. 15). However, no particular conserved motif or domain was found on either portion of the sequence, except for two potential phosphorylation sites which were found on all strains (tyrosine kinase and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation sites at positions 25 and 144, respectively). Nevertheless, all VP5 had a similar hydrophobicity profile, as calculated by the method of Kyte and Doolittle (1982). In addition, they all had an estimated pI between 9.9 and 11.0, and they were all arginine-rich (11.4 to 12.8% of residues are arginines).

Percentages similarities between the nucleotide and the deduced amino acid sequences of the small ORF were calculated (Table 6). The Hecht strain appeared to be the most distant when compared to the others. However, there was no correlation between the percentage similarity and the presence of an intact ORF. For example, d'Honninchnun and N1 were very similar but only the former had a truncated ORF.

The 17 kDa polypeptide of VR-299 was expressed as a fusion protein in *E. coli*. (Fig. 16A). After purification with an amylose resin column (New England Biolabs) (lane 7), MBP/p17 was injected into a rabbit. The antiserum obtained was extensively adsorbed with MBP (without the p17 portion), and tested by ELISA (data not shown) and Western immunoblot. For Western blotting, 12% SDS-PAGE was used and proteins were transferred to PVDF membrane (Bio-Rad). Detection was carried out with a chemiluminescence Western blotting kit (Boehringer Mannheim) (Fig. 16B). Cleavage of the fusion protein with the Xa cleavage factor was performed in column elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl) at 20°C for 1.25 h (Fig. 16A, lane 8). Digestion of MBP/p17 was only partial because of the rapid degradation of VP5 once

separated from the MBP portion. For this reason, the whole fusion protein was injected into the rabbit. Figure 16B shows that the antiserum recognized the fusion protein (lanes 6 and 7). After cleavage of MBP/p17, a weak band also appeared at approximately 17.5 kDa (lane 8). A better yield in the cleavage of the fusion protein would certainly improve these results. Despite the greater abundance of MBP compared to MBP/p17, as can be seen in Figure 16A, a stronger signal was obtained in chemiluminescence with the fusion protein, indicating that substantial amounts of anti-p17 antibodies were present.

The same rabbit antiserum was used in an immunodot assay for the detection of VP5 in virus preparations. Concentrated viruses (1 to 2 µg of total protein per µl), prepared as previously described (Tarrab *et al.*, 1993), and uninfected cell lysates (similarly processed) were spotted directly onto PVDF membrane, along with purified MBP/p17. They were successively reacted with the rabbit anti-MBP/p17 serum and a peroxidase-labelled anti-rabbit IgG. A normal rabbit serum and a rabbit anti-VR-299 serum were employed as controls. Reactions were detected by chemiluminescence. As little as 8 pg of MBP/p17 could be detected with this test (Fig. 17A, column 1). The reaction with concentrated VR-299 (Fig. 17A, column 2) was also clearly positive when compared to background levels (Fig. 17A, column 3 and Fig. 17B). However, it was not possible to obtain an unambiguous positive reaction with some of the other viruses tested (Fig. 17A, columns 4 and 5), though Canada 2 and Jasper appeared positive while Hecht, Tellina-2 and Canada 1 were definitely negative. A rabbit anti-VR-299 serum, which cross-reacts with the other IPNV strains, showed that equivalent amounts of viral proteins were deposited onto the membrane for each virus (data not shown).

Overlapping reading frames in dsRNA genomes are not unique to birnaviruses. For example, human reovirus s1 mRNA, which codes for the viral hemagglutinin, also directs the synthesis of a 14 kDa polypeptide encoded in a different reading frame which overlaps the first (Ernst and Shatkin, 1985). Since the small ORF on genome segment A appeared to

be well conserved among birnaviruses, it was surprising to find that at least one strain of IPNV does not contain such an ORF. The Hecht virus possesses neither the alternative ATG for the small ORF found on Canada 2 and d'Honnincthun strains, nor the stop codon (position 512 on Jasper) present in all other sequences. This is consistent with the negative result obtained by immunodot with this strain.

Canada 2 and d'Honnincthun are also special cases. Though the usual ATG of the 17 kDa protein is found in frame with the polyprotein on these strains, an alternative start codon could be used to produce a truncated form of VP5. However, this second ATG is not in a favorable context, since it lacks both the purine in the -3 position and the guanine in +4. Still, it could be read as a start signal by ribosomes. In fact, Canada 2 seemed to react positively with the anti-MBP/p17 serum. Furthermore, the Kozak consensus sequence for the initiation of translation (Kozak, 1987), is not perfectly conserved on any ORF of IPNV. Internal translation start sites were also demonstrated *in vitro* (Huang *et al.*, 1986; Duncan *et al.*, 1987; Manning and Leong 1990; Manning *et al.*, 1990), showing that ribosomes do not have a strong preference for a particular ATG.

The results obtained in the immunodot assay suggest that VP5 is produced in VR-299 infected cells. However, because the signal obtained was weak compared to that of the anti-VR-299 antiserum (data not shown), the 17 kDa protein may still be present in low amounts and/or expressed transiently. The configuration of the fusion protein may also differ from that of the native viral protein. This could explain why it has not been possible to identify the 17 kDa protein in Western immunoblots using the anti-MBP/p17 serum, since it is a less sensitive test. Negative results were also obtained by others using this technique (Magyar and Dobos, 1994b).

The presence of VP5 in some of the other IPNV strains tested was not clear. These results, however, are influenced by various factors, such as the affinity of the antiserum toward heterologous strains and the level of expression of VP5 relative to the other viral

proteins. Nevertheless, it appeared that when it is encoded on the viral genome, VP5 could be produced in infected cells. According to Håvarstein *et al.* (1990a), this protein would be present on purified particles of the Ab, SP, Jasper and N1 strains. This is consistent with our results since the small ORF is found on these viruses, and none of them appeared negative in the immunodot assay (except for SP which we did not test).

Apparently, there is no natural selection for a conserved primary structure of this small protein. The exact amino acid sequence is probably not critical for the fulfillment of whatever biological function it has. Despite the genomic variations, however, all VP5 are rich in arginine and basic. Such positively charged proteins are often found to be associated with nucleic acids, and are common among negative-strand RNA viruses (Spiropoulou and Nichol, 1993). Thus, VP5 of IPNV is not a unique case.

Unlike IPNV, all strains so far sequenced of another birnavirus, infectious bursal disease virus (IBDV), contain the small ORF, though not all of them code for a basic VP5 (Kibenge *et al.*, 1990). The fact that IPNV shows more variations than IBDV may result from an adaptation to a large variety of hosts. IPNV has been isolated from at least 20 different families of fish, as well as molluscs and crustaceans (Wolf, 1988). Multiple strains of the virus differ in virulence and serologic response.

From the results presented in this paper, it is clear that the small ORF on genome segment A is not present in all IPNV strains. In cases where VP5 is encoded on the viral genome, the protein is probably synthesized in infected fish cells, as it is the case for VR-299. This, as well as the possible role of the protein or of the ORF itself, in viral replication, are under study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joanne Roger and Lise Forget for their technical assistance with the sequencing of the clones. We also thank Daniel Belkosky for correction of the manuscript.

TABLE 6

**Percentage similarity between nucleotide and deduced amino acid sequences
of the small ORF on genome segment A of eight IPNV strains**

IPNV strains*	Ab	Canada 2	d'Honni.	Hecht	VR-299	Jasper	DRT
Canada 2	86 [†] (69) [‡]	---					
d'Honni.	91 (78)	90 (78)	---				
Hecht	74 (-)§	78 (-)	77 (-)	---			
VR-299	85 (62)	86 (65)	85 (65)	75 (-)	---		
Jasper	85 (62)	85 (65)	85 (65)	75 (-)	99 (98)	---	
DRT	85 (61)	85 (63)	85 (63)	76 (-)	98 (95)	98 (93)	---
N 1	89 (74)	89 (75)	99 (97)	77 (-)	85 (64)	85 (65)	85 (64)

*Sequences of the Jasper, N1 DRT strains were obtained from Duncan and Dobos (1986), Håvarstein *et al.* (1990a) and Chung *et al.* (1993a), respectively.

†Percentage similarity between nucleotide sequences as calculated with bases corresponding to positions 68 to 514 on the Jasper strain.

‡Percentage similarity between amino acid sequences. For strains with a truncated ORF (Canada 2 and d'Honnincthun), only the corresponding portion on the full-length ORF of the other strains was used for calculations.

§Percentage similarity at the amino acid level were not calculated for the Hecht strain as there was no corresponding ORF in the nucleotide sequence.

FIGURE 15: Comparison of amino acid sequences of the putative 17 kDa protein (or its truncated form) of IPNV, as deduced from cDNA sequences.

Homology to the Jasper strain is shown by dots, while dashes indicate missing amino acids. Sequences of the Jasper, N1 and DRT strains were obtained from Duncan and Dobos (1986), Håvarstein *et al.* (1990a) and Chung *et al.* (1993a), respectively.

position 1
↓

Jasper	MAKALSNKPTNILIYMNHEHIQGNRNLLEIHYASREWASKHSGRHNRREAYTKTRDLVIQLRGIRIRKWASCLLP	74
VR-299QPT.....	74
DRTQPT..C.....P.....P..L.....	74
AbQ.-Q..S.QD..K.S.....V.....D.TFQ.....G.THL....F.L....LGL...C...F.	73
N1Q..N.YSIQD..K.....D.T...P....G.THP.....P..L....H...F.	74
d'Honnincthun	-----QD..K.....D.T...P....G.THL.....L....H..F.	59
Canada 2	-----QD..K.....F.....D....P....G.THL.....L.L..A.S...	59

Jasper	RSSWIQGRCPLOVESEPDGTRIRPVARDVTGPKEGIQLRETDLTEIRHPELNPSRWSVCTQWDPERCHLRRKSV	148
VR-299	148
DRT	W.....R.....L.....	148
Ab	W.TR.K...S..M.C.....V....G....E.SF....A.IQ...RSK.HAAG.AL.PE..HQ.R...Q..	147
N1	WGTRLTD..T..M.C....AGV....G..A..E.SL....A..K....K.HTTGR.L.SER.AQ.....Q..	148
d'Honnincthun	WGTRLTD..T..M.C....AGV....G..A..E.SL....A..K....SK.HTTGR.L.SER.AQ.....Q..	133
Canada 2	GRTRLACW.S....C....A.....G..A..E..L..W.AY.K....S..HLTSRPL..E...KCR.I..Q.I	133

FIGURE 16: Expression in *E. coli* of the 17 kDa protein of IPNV strain VR-299 fused to the maltose binding protein (MBP) of the pMAL-c2 vector.

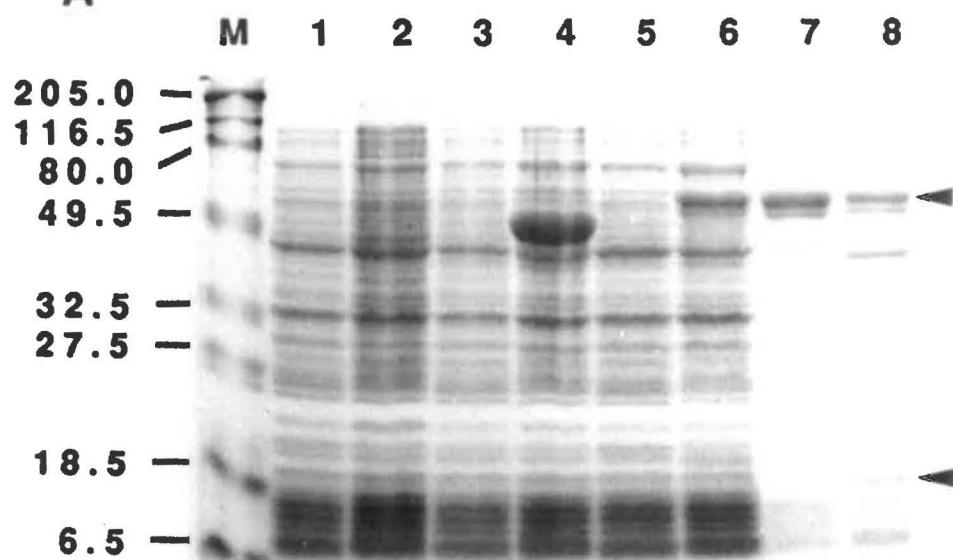
Lanes 1 and 2, TB1 cells without plasmid, before (1) and after (2) induction with IPTG; lanes 3 and 4, TB1 cells containing pMAL-c2 without insert before (3) and after (4) induction; lanes 5 and 6, TB1 cells containing the p17pMAL recombinant plasmid before (5) and after (6) induction. The purified fusion protein MBP/p17 is shown in lane 7. Lane 8 contains MBP/p17 cleaved with the Xa factor. Molecular mass markers are shown on the left.

(A) Polyacrylamide gel stained with Coomassie blue.

(B) Western immunoblot showing the specificity of the rabbit anti-MBP/p17 serum.

Arrow heads indicate the position of the fusion protein and the 17 kDa polypeptide after cleavage.

A



B

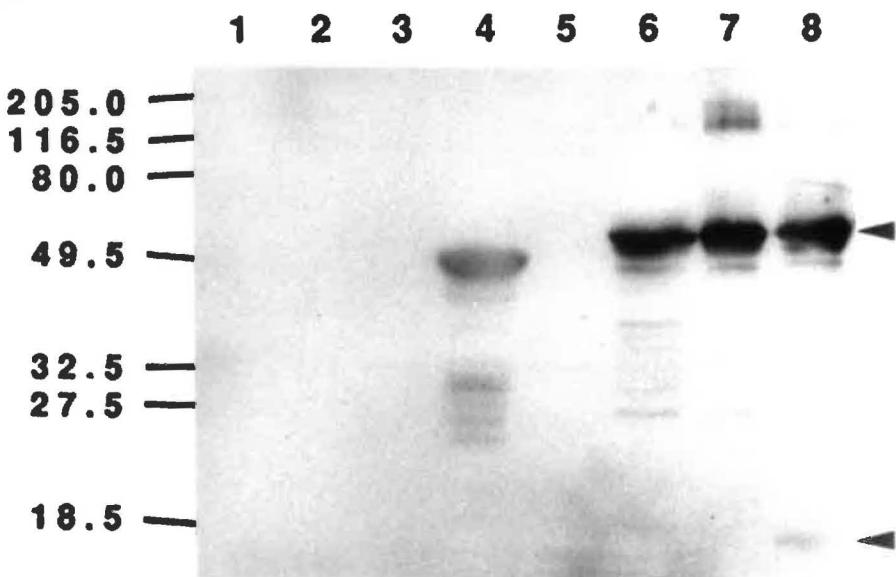
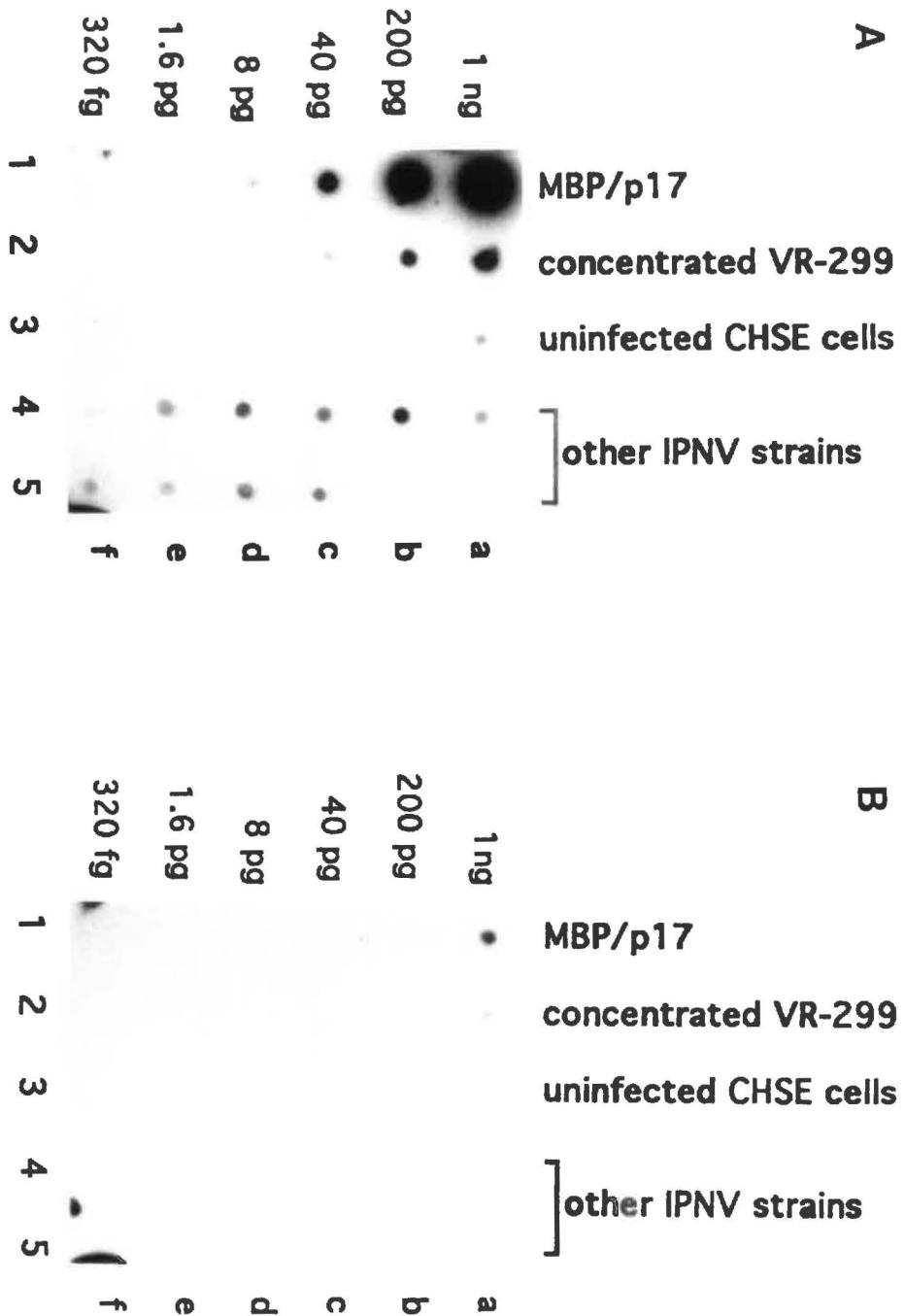


FIGURE 17: Detection of VP5 in concentrated virus preparations.

- (A) Immunodot assay obtained with the rabbit anti-MBP/p17 serum.
- (B) Negative control obtained with normal rabbit serum.

For both (A) and (B), column 1 contains fivefold dilutions of the purified MBP/p17. Amounts of the fusion protein spotted onto the membrane are indicated on the left. Columns 2 and 3 are fivefold dilutions of concentrated VR-299 (2) and uninfected cells (3). Columns 4 and 5 show concentrated viruses of different strains (not diluted). Column 4 row a, strain Ab; 4b, Canada 2; 4c, d'Honnincthun; 4d, Jasper; 4e, N1; 4f, Hecht; 5a, Tellina-2; 5b, Canada 1; 5c, Canada 3; 5d, Jasper (ATCC); 5e, DK3315; 5f, 122-88. A volume of 1 μ l was used for each spot.



DISCUSSION GÉNÉRALE

Les différents éléments de discussion étant abordés de façon détaillée dans chacun des articles, nous analysons dans cette section seulement les points majeurs et en relation avec les objectifs principaux de cette recherche. De plus, certains éléments précis ignorés dans les articles parce qu'ils ne caderaient pas avec leurs objectifs spécifiques ou simplement par mesure d'économie d'espace, sont discutés ici.

1- VARIATIONS GÉNOMIQUES ENTRE LES SOUCHES DE VNPI

1.1 - Classification en trois génogroupes

La comparaison des profils de restriction ainsi que des séquences obtenues à partir des fragments de 310 pb a permis d'établir une classification des virus disponibles dans notre laboratoire en trois génogroupes majeurs. Des différences sont toutefois apparues entre les dendrogrammes présentés aux Figures 3 et 7. Ainsi, le sous-groupe IIa de la Figure 3 est associé au génogroupe I dans la Figure 7, tandis que le sous-groupe IIIb passe dans le génogroupe II, laissant la souche Hecht seule représentante du génogroupe III de la Figure 7. Ces divergences ne reflètent pas des résultats contradictoires mais proviennent plutôt de l'emploi de techniques différentes, de la même façon que la classification génomique obtenue ne concorde pas bien avec la classification sérologique en dix sérotypes proposée par Hill et Way (1983, 1988) et Christie *et al.* (1988).

Étant donné son caractère absolu facilitant les comparaisons, la reproductibilité des résultats d'un laboratoire à l'autre et son indépendance par rapport aux paramètres expérimentaux, le regroupement des souches basé sur la comparaison des séquences est plus précis que les autres méthodes. Par conséquent, le dendrogramme présenté dans la Figure 7 est probablement le plus représentatif des relations phylogénétiques et des différences réelles qui existent entre les souches de VNPI.

En dessinant un dendrogramme semblable à celui de la Figure 7, mais en utilisant les séquences des pVP2 entières pour faire les calculs d'homologie, on obtient un regroupement identique des souches, hormis les différences de pourcentage (Fig. 18). Ceci confirme que le fragment de 310 pb utilisé dans les articles I et II est bien représentatif du segment génomique A. Toutefois, malgré le fait que la VP2 contienne la majorité des épitopes importants du virus, la classification observée dans ce dernier dendrogramme ne corrobore toujours pas l'existence des dix sérotypes. Des expériences effectuées dans notre laboratoire à l'aide d'anticorps monoclonaux et d'antisérum semblent aussi remettre en question la classification de Hill et Way, mais bien qu'il n'y ait pas de relation directe entre les génogroupes et les sérotypes, il n'y a pas non plus de contradiction majeure, à savoir que des souches appartenant au même sérotype se retrouvent toujours dans le même génogroupe.

Les études sérologiques, comme celles basées sur les profils de digestion par des endonucléases, ont le désavantage de dépendre de mutations ponctuelles qui peuvent modifier les épitopes ou les sites de restriction. Un changement au niveau d'un seul déterminant antigénique peut influencer grandement l'interprétation des résultats d'un test *in vitro*, mais n'a pas d'impact sur les autres épitopes du virus. Par conséquent, certains sérotypes pourraient n'être que des subdivisions mineures. Jusqu'à l'obtention de nouvelles données sur le VNPI, un partage des souches virales en seulement trois groupes majeurs semble plus approprié.

La classification proposée dans ce travail n'est pas définitive, notamment parce que la position des virus appartenant au sérogroupe B est encore incertaine. D'après les résultats préliminaires obtenus avec les souches 122-88 et DK3315, ces dernières semblent se distinguer nettement des membres du sérogroupe A et pourraient ainsi former un quatrième génogroupe. Cette hypothèse requiert néanmoins une confirmation par des expériences supplémentaires, notamment le séquençage de leur génome.

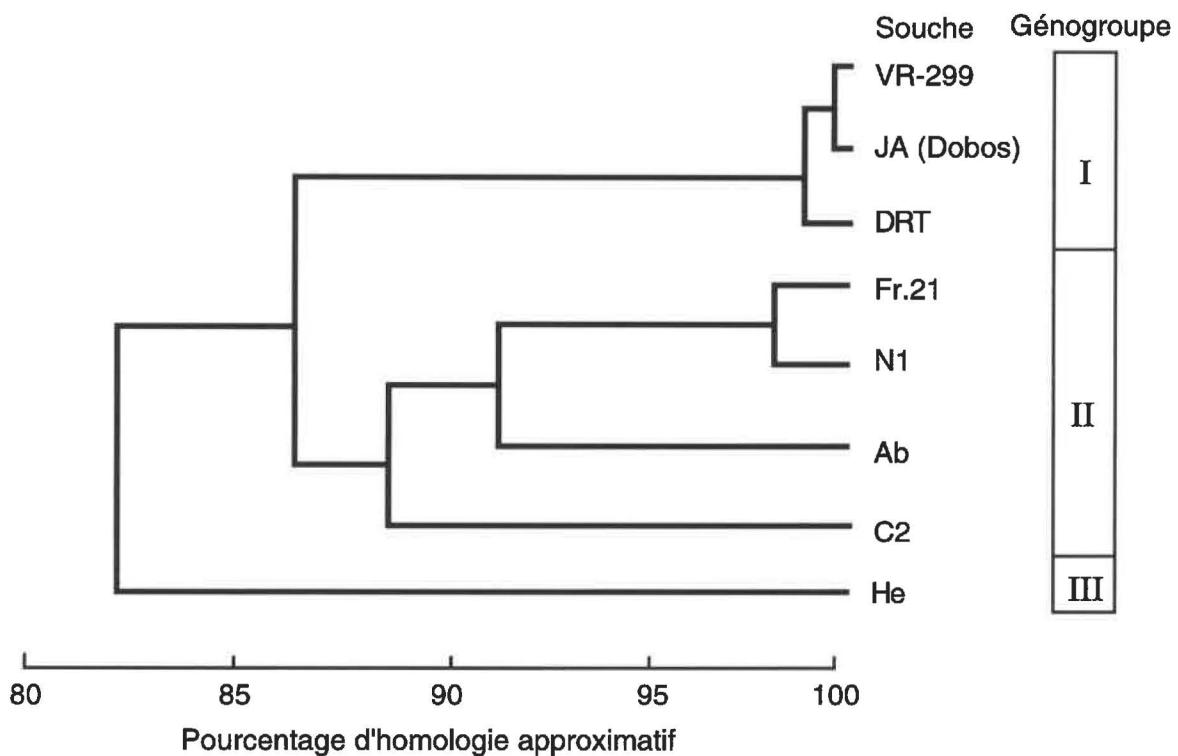


FIGURE 18: Dendrogramme représentant les relations entre des souches de VNPI, telles que déterminées par les pourcentages d'homologie au niveau de la protéine pVP2 (acides aminés 1 à 539). (Figure non publiée).

Les génogroupes indiqués à la droite du dessin correspondent à ceux de la Figure 7.

1.2 - Le cas des deux souches Jasper

L'étude des profils de restriction, dans l'article I, a permis de révéler une contradiction entre les résultats attendus suite à l'analyse de la séquence publiée de la souche Jasper (Duncan et Dobos, 1986) et les résultats expérimentaux obtenus avec la souche du même nom provenant de l'ATCC. Le séquençage ainsi que l'analyse sérologique de la souche JA (ATCC) ont par la suite confirmé la disparité entre les deux virus (Berthiaume *et al.*, 1992; Heppell *et al.*, 1993). Curieusement, la souche JA (Dobos) est apparue presque identique à la souche VR-299, même au niveau du domaine variable de la protéine VP2. La seule différence observée entre les deux souches se situe dans la région hypervariable localisée entre les codons d'initiation de la VP5 et de la polyprotéine, où un résidu cytosine supplémentaire (position 93) est présent dans la séquence de JA (Dobos), alors que VR-299 possède une adénine additionnelle à la position 101 (Fig. 9). La souche DRT, qui appartient au même génogroupe, est identique à VR-299 dans cette région. Il est possible qu'il y ait eu un mélange et que le virus séquencé par Duncan et Dobos soit en réalité la souche VR-299 (ou une autre qui lui est très apparentée) et non la souche Jasper¹¹. Il est improbable, en effet, que ces observations puissent s'expliquer simplement par des mutations, d'autant plus que dans le cas de la souche N1, aucune contradiction n'est apparue entre les résultats expérimentaux et ceux attendus d'après sa séquence publiée, ce qui témoigne de la stabilité relative du VNPI en culture cellulaire.

Le fait de relever une différence entre les souches JA (Dobos) et JA (ATCC) n'a pas beaucoup d'importance en soi, si ce n'est pour éviter d'éventuelles confusions. Par contre, du point de vue de l'évolution et de la diversité des souches, il soulève un certain intérêt. En effet, la vérification de notre hypothèse concernant l'origine de la souche JA (Dobos) démontrerait, d'une part, que la fidélité de la polymérase virale est bonne

¹¹ L'équipe du Dr Dobos a travaillé avec la souche VR-299 provenant de l'ATCC jusqu'en 1980 environ, soit peu avant ses travaux de séquençage.

comparativement à ce qu'on observe généralement chez les virus à ARN (Parvin *et al.*, 1986) et, d'autre part, qu'en absence d'une pression sélective exercée par le système immunitaire des animaux, la VP2 du VNPI ne varie pas ou très peu, même après un grand nombre de passages en culture cellulaire comme ce fut le cas dans notre laboratoire. C'est en infectant plusieurs espèces d'animaux que le virus aurait pu acquérir sa grande diversité antigénique par rapport à celle de l'IBDV, isolé dans des volailles seulement. Cette situation, si elle se vérifie, se rapprocherait de celle du virus influenza. Chez ce dernier, en effet, le taux d'accumulation des variants antigéniques en culture cellulaire est de 10^{-4} par nucléotide pour un cycle de multiplication, ce qui est élevé mais pas plus que pour les autres virus à ARN négatif (Joklik, 1988). Pourtant, les variations antigéniques sont plus grandes dans le cas de l'influenza que dans celui d'autres virus similaires. Ceci s'explique par la pression sélective exercée par le système immunitaire des animaux (Joklik, 1988). En plus des mutations introduites par l'ARN-polymérase virale, le réassortiment des segments génomiques constitue aussi une source de variation importante bien connue chez plusieurs virus dont le génome est segmenté. Chez le VNPI, le réassortiment est aussi possible, du moins *in vitro* (Sano *et al.*, 1992).

La situation de la région hypervariable en amont de la polyprotéine pourrait être différente de celle de la protéine VP2. Cette région qui est incluse dans le cadre de lecture de la VP5 n'est pas importante du point de vue immunologique. Par conséquent, plutôt que de résulter de la pression immunitaire de l'hôte, son hypervariabilité pourrait dépendre de facteurs tels que l'adaptation à un nouvel environnement cellulaire.

1.3 - Distribution géographique des isolats québécois

L'analyse détaillée des variations génomiques entre les isolats québécois du VNPI, telles que déterminées par les profils de restriction, a révélé une distribution

géographique non aléatoire des variants. Ceci implique, premièrement, qu'il serait possible de retracer l'origine d'une épidémie par simple comparaison des profils de restriction des génomes viraux et, deuxièmement, qu'il faudrait mieux contrôler les échanges de matériel biologique entre les pisciculteurs afin de ne pas introduire de souches virulentes dans des territoires qui en sont exempts.

Cependant, il ne semble pas que les échanges entre éleveurs constituent actuellement un facteur d'introduction virale important. En effet, une souche génétiquement distincte des autres et localisée géographiquement est probablement indigène à une région (Fig. 4). À l'opposé, un virus qui aurait été disséminé par les pisciculteurs aurait une répartition plus aléatoire. Conséquemment, il est possible qu'une majorité des infections par le VNPI au Québec origine d'une contamination naturelle provenant d'un réservoir sauvage du virus. Les contaminations entre piscicultures ne sont cependant pas exclues et pourraient, si elles ne le sont pas déjà, devenir le facteur de contamination le plus important, à supposer que l'industrie aquicole se développe sans réglementation sanitaire.

1.4 - Site de clivage entre les protéines NS et VP2

Outre la détermination des génogroupes, l'analyse des séquences provenant des fragments de 310 pb a démontré que le site de clivage de la polyprotéine n'était pas le dipeptide Tyr-Leu suggéré par Duncan *et al.* (1987). Tout au moins, il n'est pas essentiel ou suffisant pour être reconnu par la protéase. Par contre, l'association du résidu Tyr avec un ou deux acides aminés basiques, tel que suggéré dans l'article II, est un candidat potentiel puisqu'on retrouve ce motif entre les protéines NS et pVP2 de toutes les souches du VNPI. Le seul autre endroit où on retrouve une disposition similaire, à l'exception de la jonction NS/VP3, est dans la portion N-terminale de la pVP2, ce qui est compatible avec le

clivage post-traductionnel que subit cette protéine avant de donner naissance à la VP2 mature. En effet, il est plus probable que ce soit cette extrémité de la protéine qui est éliminée étant donné qu'aucun anticorps produit contre les virions entiers ne semble se fixer dans cette région (Fig. 12). Seules des expériences de mutagénèse dirigée pourraient apporter une preuve directe du site de clivage. Cependant, afin d'expliquer les différentes tailles de la VP2 et/ou des autres protéines virales, nous ne pouvons pas éliminer l'hypothèse d'un mécanisme de clivage faisant appel à des protéases cellulaires, ni celle de l'initiation interne de la traduction, telle que formulée par Nagy *et al.* (1987) pour le VNPI et démontrée par Pelletier et Sonenberg (1988) chez le poliovirus.

2 - CARTOGRAPHIE DES PRINCIPAUX ÉPITOPE ET DES RÉGIONS VARIABLES DE LA VP2

Les résultats présentés dans le chapitre 3 ont révélé que l'organisation structurelle de la VP2 du VNPI est similaire à celle de l'IBDV. Dans les deux cas, on retrouve un domaine variable à l'intérieur duquel se retrouvent deux régions hypervariables probablement impliquées dans la formation d'un épitope discontinu qui est reconnu par des anticorps monoclonaux neutralisants. De plus, la région N-terminale de la protéine des deux virus ne semble pas importante du point de vue immunologique.

Dans l'optique du développement éventuel d'un vaccin, l'utilisation de quelques souches de VNPI représentatives des variations majeures observées chez ce virus serait susceptible d'induire une réponse immunitaire universelle, c'est-à-dire pouvant protéger les poissons contre la plupart des variants viraux. En appliquant ce principe à un vaccin sous-unitaire, une protéine de fusion qui contiendrait la portion immuno-dominante de la VP2 (acides aminés 183 à 351) de deux ou trois souches virales sélectionnées pourrait constituer un vaccin plus efficace que le polypeptide entier obtenu d'un seul virus, en supposant un repliement correct des déterminants antigéniques. La plupart des anticorps

neutralisants anti-VP2 se fixent en effet au domaine variable de la protéine, qui comporte des épitopes discontinus importants. La production des protéines de fusion dans un système d'expression eucaryote ou par injection directe de plasmides recombinants dans les poissons s'avérerait donc plus appropriée que l'utilisation des bactéries.

3- ÉTUDE DE LA VP5 ET DE SON CADRE DE LECTURE

S'il apparaît maintenant certain que la VP5 est synthétisée dans les cellules infectées par le VNPI et l'IBDV (Magyar et Dobos, 1994b; Mundt *et al.*, 1995; Heppell *et al.*, 1995), l'absence du cadre de lecture correspondant sur le génome de la souche Hecht, de même que la possibilité d'avoir une version raccourcie chez les virus Canada 2 et d'Honnincthun, soulèvent de nombreuses interrogations sur le rôle biologique possible de cette protéine. Certaines caractéristiques de la VP5, soit son point isoélectrique et l'abondance de l'acide aminé arginine, sont conservées d'une souche de VNPI à l'autre, mais la séquence primaire de la protéine est plutôt variable. La pression sélective naturelle semble plutôt favoriser la pVP2 étant donné que dans la région où les deux cadres de lecture se chevauchent (nucléotides 119 à 515 sur la séquence de la souche VR-299), 115 acides aminés sur 134 sont conservés parmi tous les virus, incluant Hecht, dans le cas de la polyprotéine, alors qu'il n'y en a que 63 pour la VP5, en excluant Hecht. Par conséquent, si la protéine VP5 joue un rôle dans le cycle biologique du VNPI, sa séquence primaire n'est probablement pas critique pour l'accomplissement de cette fonction. Dans une protéine fixant l'ARN par exemple, seuls quelques acides aminés précis peuvent être conservés.

Il est possible que le cadre de lecture de la VP5 ait lui-même un rôle à jouer dans la régulation de la traduction. Il a déjà été démontré avec le virus SV40 que la présence d'un ORF (*Open Reading Frame*) de tête peut moduler le taux de synthèse des protéines

codées en aval (Sedman *et al.*, 1989). Si cette hypothèse se vérifie également dans le cas du VNPI, elle pourrait expliquer, tout comme la VP5 elle-même, certaines des différences observées entre les souches. La région hypervariable située en amont de l'ATG de la polyprotéine, pourrait ainsi être le résultat ou la cause de la réorganisation génomique rendue nécessaire pour l'acquisition de mécanismes alternatifs pouvant pallier à l'absence de la VP5 et/ou de son ORF. Dans le cas de la souche Hecht, la présence de deux codons ATG consécutifs au début du cadre de lecture de la polyprotéine pourrait constituer un exemple de mécanisme différent de régulation de la traduction, ce qui pourrait expliquer par le fait même les faibles titres viraux généralement obtenus en culture cellulaire avec cette souche, dans notre laboratoire.

4 - CARACTÉRISATION DE LA RÉGION NON CODANTE SITUÉE À L'EXTRÉMITÉ 5' DU SEGMENT A

L'étude de la région non codante à l'extrémité 5' du brin d'ARN positif du segment A n'a pas permis de révéler des indices qui expliqueraient certaines différences phénotypiques observées entre les souches du VNPI. Au contraire, la région située en amont de l'ATG de la VP5 (Fig. 9, nucléotides 1 à 67) est très bien conservée. Seule la souche N1 se distingue des autres puisqu'elle possède 11 bases supplémentaires à son extrémité. Ces nucléotides pourraient toutefois n'être qu'un artefact engendré par la technique de clonage par amorces aléatoires utilisée par Håvarstein *et al.* (1990a). La technique RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) que nous avons employée permet de déterminer les extrémités avec plus de certitude. Toutes les autres séquences, incluant celle de JA (Dobos), se terminent de la même façon, soit par deux guanines consécutives, ce qui est en accord avec la capacité de l'ARN-polymérase virale de former un complexe de type VP1-pG-pG (Dobos, 1993).

Aucun codon d'initiation de la traduction n'a été observé en aval du cadre de lecture de la VP5, à l'exception de celui à la position 49 de la souche DRT. Ce dernier est cependant suivi de près par un codon d'arrêt en phase, à la position 85. Pour toutes les autres souches de VNPI, le premier ATG est celui situé à la position 68. Il tient lieu de codon d'initiation pour la protéine VP5 chez les souches Jasper (Dobos), VR-299, DRT, Ab et N1. Dans le cas de Canada 2 et d'Honnincthun, ce codon pourrait servir à l'initiation de la traduction de la polyprotéine puisqu'il se trouve en phase avec le cadre de lecture de cette dernière, mais ceci devrait être vérifié expérimentalement. Pour la souche Hecht finalement, cet ATG ne peut pas servir à l'initiation de la traduction d'une protéine selon un processus normal puisqu'il est suivi de près par deux codons d'arrêt consécutifs aux positions 122 et 125 (Fig. 9).

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis dans un premier temps de mieux discerner les variations génomiques entre les nombreuses souches du VNPI. Ceci a mené à l'établissement d'une classification des virus en trois génogroupes distincts sur la base du pourcentage d'homologie au niveau d'une portion représentative de leur séquence en acides aminés. Alors que le génogroupe I ne contient que des virus d'origine nord-américaine, les membres du groupe II proviennent majoritairement d'Europe, mais également d'Amérique du Nord et d'Asie. La diversité géographique de cette deuxième subdivision se reflète sur son hétérogénéité génomique. En comparaison, le groupe I est apparu plus homogène. Le troisième génogroupe ne compte pour sa part qu'un seul représentant, isolé en Allemagne, qui se distingue à plusieurs niveaux de toutes les autres souches.

En comparant la séquence de la pVP2 de cinq souches représentatives du VNPI et en exprimant des portions de celle-ci dans des bactéries, nous avons pu, dans un deuxième temps, localiser un domaine variable de même que les principaux épitopes de la protéine. Le domaine variable situé au centre de la pVP2 comporte deux petites sections hypervariables qui sont probablement la cible des anticorps neutralisants dirigés contre des épitopes discontinus. Les anticorps qui reconnaissent des épitopes continus se fixent aussi sur le domaine variable ou très près de celui-ci, du côté C-terminal. Aucun déterminant antigénique n'a été observé dans la région conservée située du côté N-terminal de la pVP2.

Finalement, la recherche d'indices pouvant expliquer les différences phénotypiques observées entre les souches du VNPI n'a rien révélé dans la région non codante située à l'extrémité 5' du segment génomique A, celle-ci étant très bien conservée d'un virus à l'autre. Cependant, des indices émanent du cadre de lecture de la protéine VP5. En effet, au moins une souche, celle du génogroupe III, ne possède pas ce cadre de lecture alors que des variations importantes ont été observées chez deux souches du génogroupe II. Nous avons

pu déterminer que la VP5 est exprimée dans les cellules infectées par certaines souches du VNPI, mais sa fonction biologique reste encore inconnue.

La recherche fondamentale sur le VNPI et l'IBDV a beaucoup progressé, mais le cycle de réplication de ces virus est encore mal connu, notamment en ce qui concerne le mécanisme exact utilisé pour l'expression du génome. Les questions de l'initiation interne de la traduction, du clivage de la polyprotéine ainsi que du rôle de la VP5 et/ou de son cadre de lecture en sont des exemples. Il est clair que des expériences supplémentaires seront nécessaires afin d'y apporter une réponse. Toutefois, si le VNPI et l'IBDV se sont avérés assez similaires jusqu'à présent au niveau de leur organisation génomique et structurelle, il est possible que ce ne soit pas le cas pour les mécanismes de réplication et d'expression étant donné les divergences entre les enzymes virales. Par exemple, la protéase (NS) est la protéine la moins bien conservée entre les deux birnavirus, avec environ 20% d'homologie seulement (Håvarstein *et al.*, 1990a). Même entre les séquences protéiques des ARN-polymérases (VP1), il n'y a que 41% de similarité (Duncan *et al.*, 1991). Les types d'hôtes très différents qu'infectent ces virus pourraient expliquer les voies distinctes empruntées par le VNPI et l'IBDV. Les résultats obtenus avec un genre de la famille *Birnaviridae* ne sont donc pas nécessairement applicables aux autres.

Du point de vue de la recherche appliquée, les perspectives de développement semblent surtout dirigées vers l'élaboration d'un vaccin sous-unitaire. Nous avons pu cibler une région précise de la protéine VP2 qui semble cruciale dans la réponse humorale. Il reste maintenant à vérifier si cette région a la même importance lors d'une infection naturelle chez des hôtes susceptibles au virus, à savoir les poissons. Il faudra également tester diverses méthodes de préparation et de présentation des antigènes de façon à pouvoir obtenir un vaccin efficace qui soit aussi économiquement rentable à utiliser. Ce dernier obstacle semble le plus difficile à contourner dans le cas du VNPI, mais

l'expérience acquise avec ce virus pourra aussi servir de modèle pour les autres pathogènes rencontrés dans les élevages de poisson.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Dr Max Arella pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir dirigé mes travaux de doctorat malgré son horaire très chargé de directeur du Centre de recherche en virologie. Je remercie également mon codirecteur, le Dr Laurent Berthiaume, pour son encadrement, ses conseils et le support technique de son laboratoire. Je désire aussi souligner la participation du Dr Jacqueline Lecomte dans le groupe de recherche sur le VNPI et dans mon projet en particulier. Ses recommandations concernant la partie sérologique notamment ainsi que lors de la rédaction des articles ont été très appréciées.

Je suis très reconnaissant également à Madame Esther Tarrab, étudiante au doctorat dans le même laboratoire, pour sa précieuse collaboration technique ainsi que pour son soutien constant. Son travail de recherche complémentaire au mien et portant sur la caractérisation antigénique du VNPI au moyen d'anticorps monoclonaux a permis des discussions et une collaboration fructueuses.

Je désire aussi souligner l'apport de Mesdames Micheline Chénard et Lisette Duval, techniciennes de laboratoire, pour leur aide concernant principalement la production et la purification de virus pendant la première moitié de mon projet.

Je remercie ensuite Mesdames Joanne Roger et Lise Forget, responsables du service de séquençage sous la direction du Dr Peter Tijssen, sans qui il n'aurait pas été possible de déterminer toutes les séquences présentées dans cette thèse. Le travail professionnel de M. André Levac et de Mme Ginette Larose, respectivement pour les photos et certains schémas apparaissant dans cette thèse, fut également apprécié.

J'adresse enfin mes remerciements chaleureux à tous ceux et celles qui ont collaboré de près ou de loin à mon doctorat et qui ont contribué à rendre plus agréable mon séjour à l'Institut Armand-Frappier. Parmi ceux-ci, je désire mentionner tout particulièrement les membres du laboratoire de Max Arella.

En terminant, je suis reconnaissant au Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) du Québec ainsi qu'à l'Université du Québec à Trois-Rivières qui, par le biais du programme de bourse de perfectionnement pour les chargés de cours, m'ont supporté financièrement pendant mes années d'études au doctorat.

RÉFÉRENCES

- AHNE, W. 1981. Serological techniques currently used in fish virology. *Develop. Biol. Standard.* **49**: 3-27.
- AHNE, W., P.E.V. JØRGENSEN, N.J. OLESEN, T. FISCHER-SCHERL et R. HOFFMANN. 1989. Aquatic birnaviruses: virus of the serogroup II isolated from an IPN outbreak in Brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **9**: 14-16.
- AZAD, A.A., S.A. BARRETT et K.J. FAHEY. 1985. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology* **143**: 35-44.
- AZAD, A.A., K.J. FAHEY, S.A. BARRETT, K.M. ERNY et P.J. HUDSON. 1986. Expression in *Escherichia coli* of cDNA fragments encoding the gene for the host-protective antigen of infectious bursal disease virus. *Virology* **149**: 190-198.
- AZAD, A.A., M.N. JAGADISH, M.A. BROWN et P.J. HUDSON. 1987. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* **161**: 145-152.
- AZAD, A., I. MACREADIE, P. VAUGHAN, M. JAGADISH, N. MCKERN, H.-G. HEINE, P. FAILLA, C. WARD, A. CHAPMAN et K. FAHEY. 1990. Full protection against an immunodepressive viral disease by a recombinant antigen produced in yeast. In "Vaccines 90. Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS" (F. Brown, R.M. Chanock, H.S. Ginsberg et R.A. Lerner, Éd.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 59-62.
- AZAD, A.A., N.M. MCKERN, I.G. MACREADIE, P. FAILLA, H.-G. HEINE, A. CHAPMAN, C.W. WARD et K.J. FAHEY. 1991. Physicochemical and immunological characterization of recombinant host-protective antigen (VP2) of infectious bursal disease virus. *Vaccine* **9**: 715-722.
- BANERJEE, A.K. et A.J. SHATKIN. 1970. Transcription *in vitro* by reovirus-associated ribonucleic acid-dependent polymerase. *J. Virol.* **6**: 1-11.
- BAYLISS, C.D., U. SPIES, K. SHAW, R.W. PETERS, A. PAPAGEORGIOU, H. MÜLLER et M.E.G. BOURSSELL. 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* **71**: 1303-1312.

- BAYLISS, C.D., R.W. PETERS, J.K.A. COOK, R.L. REECE, K. HOWES, M.M. BINNS et M.E.G. BOURSNELL. 1991. A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus. *Arch. Virol.* **120**: 193-205.
- BECHT, H., H. MÜLLER et H.K. MÜLLER. 1988. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* **69**: 631-640.
- BERNARD, J. 1980. Drosophila X virus RNA polymerase: tentative model for *in vitro* replication of the double-stranded virion RNA. *J. Virol.* **33**: 717-723.
- BERTHIAUME, L., E. TARRAB, J. HEPPELL, M. ARELLA, P. DOBOS, R. DUNCAN et J. LECOMTE. 1992. Antigenic and genomic differences of two Jasper strains of infectious pancreatic necrosis virus. *Intervirology* **34**: 197-201.
- BIERING, E., F. NILSEN, O.M. RØDSETH et J. GLETT. 1994. Susceptibility of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* to infectious pancreatic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.* **20**: 183-190.
- BOOTLAND, L.M., P. DOBOS et R.M.W. STEVENSON. 1990. Fry age and size effects on immersion immunization of brook trout, *Salvelinus fontinalis* Mitchell, against infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* **13**: 113-125.
- BOOTLAND, L.M., N.M. ALLEN, K. EDWARDS, H.V. LORZ et L. VIRK. 1993. Efficacy of immunization of Rainbow trout fry with recombinant vaccines against IPNV. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada* **93-4**: 139-142.
- BROWN, F. 1986. The classification and nomenclature of viruses: Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984. *Intervirology* **25**: 141-143.
- BROWN, M.D., P. GREEN et M.A. SKINNER. 1994. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J. Gen. Virol.* **75**: 675-680.
- CALVERT, J.G., E. NAGY, M. SOLER et P. DOBOS. 1991. Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **72**: 2563-2567.

- CASTRIC, J., F. BAUDIN-LAURENCIN, M.F. COUSTANS et M. AUFFRET. 1987. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus, Ab serotype, from an epizootic in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* **67**: 117-126.
- CASWELL-RENO, P., P.W. RENO et B.L. NICHOLSON. 1986. Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *J. Gen. Virol.* **67**: 2193-2205.
- CASWELL-RENO, P., V. LIPIPUN, P.W. RENO et B.L. NICHOLSON. 1989. Use of a group-reactive and other monoclonal antibodies in an enzyme immunodot assay for identification and presumptive serotyping of aquatic birnaviruses. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1924-1929.
- CAUST, J., M.L. DYALL-SMITH, I. LAZDINS et I.H. HOLMES. 1987. Glycosylation, an important modifier of rotavirus antigenicity. *Arch. Virol.* **96**: 123-134.
- CHANG, N., R.D. MACDONALD et T. YAMAMOTO. 1978. Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates. *Can. J. Microbiol.* **24**: 19-27.
- CHI, S.-C., C.-F. LO, S.-N. CHEN et G.-H. KOU. 1993. Lowered affinity of structural protein VP2 to monoclonal antibodies in serial undiluted passage of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Gyobyo Kenkyu* **28**: 51-52.
- CHOU, H.-Y., C.-F. LO, M.-C. TUNG, C.-H. WANG, H. FUKUDA et T. SANO. 1993. The general characteristics of a birnavirus isolated from cultured loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in Taiwan. *Gyobyo Kenkyu* **28**: 1-7.
- CHRISTIE, K.E., L.S. HÅVARSTEIN, H.O. DJUPVIK, S. NESS et C. ENDRESEN. 1988. Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Atlantic salmon. *Arch. Virol.* **103**: 167-177.
- CHRISTIE, K.E., S. NESS et H.O. DJUPVIK. 1990. Infectious pancreatic necrosis virus in Norway: partial serotyping by monoclonal antibodies. *J. Fish Dis.* **13**: 323-327.
- CHUNG, H.-K., S.-H. LEE, H.H. LEE, Y.C. HA, D.S. LEE et Y.S. KIM. 1993a. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus DRT strain. GenBank accession number D26526.

- CHUNG, H.-K., S.-H. LEE et H.H. LEE. 1993b. Nucleotide sequence analysis of genome segment B encoding VP1 protein of infectious pancreatic necrosis virus DRT strain. GenBank accession number D26527.
- COHEN, J. 1975. Ribonucleic acid polymerase activity in purified infectious pancreatic necrosis virus of trout. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **62**: 689-695.
- COHEN, J. et R. SCHERRER. 1972. Structure de la capsid du virus de la nécrose pancréatique infectieuse (NPI) de la truite. *C. R. Acad. Sc. Paris* **274**: 1222-1225.
- COHEN, J., A. POINSARD et R. SCHERRER. 1973. Physico-chemical and morphological features of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **21**: 485-498.
- COUVE, E., J. KISS et J. KUZNAR. 1992. Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cells. *Cell Biol. Intl. Reports* **16**: 899-906.
- DIXON, P.F. et B.J. HILL. 1983. Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use. *J. Fish Dis.* **6**: 399-409.
- DOBOS, P. 1976. Size and structure of the genome of infectious pancreatic necrosis virus. *Nucl. Acids Res.* **3**: 1903-1924.
- DOBOS, P. 1977. Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **21**: 242-258.
- DOBOS, P. 1993. *In vitro* guanylylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology* **193**: 403-413.
- DOBOS, P. 1995. Protein-primed RNA synthesis *in vitro* by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* **208**: 19-25.
- DOBOS, P. et T.E. ROBERTS. 1983. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can. J. Microbiol.* **29**: 377-384.
- DOBOS, P. et D. ROWE. 1977. Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptides. *J. Virol.* **24**: 805-820.
- DOBOS, P., R. HALLETT, D.T.C. KELLS, O. SORENSEN et D. ROWE. 1977. Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **22**: 150-159.

- DOBOS , P., B.J. HILL, R. HALLETT, D.T.C. KELLS, H. BECHT et D. TENINGES. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* **32**: 593-605.
- DOBOS, P., E. NAGY et R. DUNCAN. 1991. Birnaviridae. In "Viruses of Invertebrates" (E. Kurstak, Éd.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 301-314.
- DOMINGUEZ, J., M. BABIN, C. SANCHEZ et R.P. HEDRICK. 1991. Rapid serotyping of infectious pancreatic necrosis virus by one-step enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods* **31**: 93-104.
- DORSON, M. 1988. Vaccination against infectious pancreatic necrosis. In "Fish Vaccination" (A.E. Ellis, Éd.), Academic Press, San Diego, pp. 163-171.
- DORSON, M. et C. TORCHY. 1981. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, caused by a European strain of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* **4**: 213-221.
- DUNCAN, R. et P. DOBOS. 1986. The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) dsRNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucleic Acids Res.* **14**: 5934.
- DUNCAN, R., E. NAGY, P.J. KRELL et P. DOBOS. 1987. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Virol.* **61**: 3655-3664.
- DUNCAN, R., C.L. MASON, E. NAGY, J. LEONG et P. DOBOS. 1991. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependant RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* **181**: 541-552.
- ERNST, H. et A.J. SHATKIN. 1985. Reovirus hemagglutinin mRNA codes for two polypeptides in overlapping reading frames. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 48-52.
- ESTAY, A., G. FARIAS, M. SOLER et J. KUZNAR. 1990. Further analysis on the structural proteins of infectious pancreatic necrosis virus. *Virus Res.* **15**: 85-96.

- FAHEY, K.J., I.J. O'DONNELL et T.J. BAGUST. 1985. Antibody to the 32K structural protein of infectious bursal disease virus neutralizes viral infectivity *in vitro* and confers protection on young chickens. *J. Gen. Virol.* **66**: 2693-2702.
- FAHEY, K.J., K. ERNY et J. CROOKS. 1989. A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J. Gen. Virol.* **70**: 1473-1481.
- FAHEY, K.J., P. MCWATERS, M.A. BROWN, K. ERNY, V.J. MURPHY et D.R. HEWISH. 1991a. Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease of chickens. *Avian Dis.* **35**: 365-373.
- FAHEY, K.J., A.J. CHAPMAN, I.G. MACREADIE, P.R. VAUGHAN, N.M. MCKERN, J.I. SKICKO, C.W. WARD et A.A. AZAD. 1991b. A recombinant subunit vaccine that protects progeny chickens from infectious bursal disease. *Avian Pathol.* **20**: 447-460.
- FISCHETTI, M. (1991). A feast of gene-splicing down on the fish farm. *Science* **253**: 512-513.
- FRANCKI, R.I.B., C.M. FAUQUET, D.L. KNUDSON et F. BROWN. 1991. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* Springer-Verlag, Vienna.
- FRANTS, C. et M. SAVAN. 1971. Infectious pancreatic necrosis virus-Temperature and age factors in mortality. *J. Wildlife Dis.* **7**: 249-255.
- FROST, P., L.S. HÅVARSTEIN, B. LYNGREN, S. STÅHL, C. ENDRESEN et K.E. CHRISTIE. 1995. Mapping of neutralization epitopes on infectious pancreatic necrosis viruses. *J. Gen. Virol.* **76**: 1165-1172.
- HARRELL, L.W., H.M. ETLINGER et H.O. HODGINS. 1975. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. I. Serum antibody protection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis. *Aquaculture* **6**: 211-219.
- HÅVARSTEIN, L.S., K.H. KALLAND, K.E. CHRISTIE et C. ENDRESEN. 1990a. Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus: a comparison with other Birnaviridae. *J. Gen. Virol.* **71**: 299-308.

- HÅVARSTEIN, L.S., C. ENDRESEN, B. HJELTNES, K.E. CHRISTIE et J. GLETTE. 1990b. Specific immunoglobulins in serum from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., immunized with *Vibrio salmonicida* and infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* **13**: 101-111.
- HAYMAN, J.R. et C.J. LOBB. 1993. Immunoglobulin in the eggs of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Develop. Comp. Immunol.* **17**: 241-248.
- HEDRICK, R.P. et J.L. FRYER. 1982. Persistent infections of salmonid cell lines with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV): a model for the carrier state in trout. *Fish Pathology* **16**: 163-172.
- HEINE, H.-G. et D.B. BOYLE. 1993. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. *Arch. Virol.* **131**: 277-292.
- HEINE, H.-G., M. HARITOU, P. FAILLA, K. FAHEY et A. AZAD. 1991. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. *J. Gen. Virol.* **72**: 1835-1843.
- HEINE, H.-G., A.D. HYATT et D.B. BOYLE. 1994. Modification of infectious bursal disease virus antigen VP2 for cell surface location fails to enhance immunogenicity. *Virus Res.* **32**: 313-328.
- HEPPELL, J., L. BERTHIAUME, E. TARRAB, J. LECOMTE et M. ARELLA. 1992. Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J. Gen. Virol.* **73**: 2863-2870.
- HEPPELL, J., L. BERTHIAUME, F. CORBIN, E. TARRAB, J. LECOMTE et M. ARELLA. 1993. Comparison of amino acid sequences deduced from a cDNA fragment obtained from infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains of different serotypes. *Virology* **195**: 840-844.
- HEPPELL, J., E. TARRAB, L. BERTHIAUME, J. LECOMTE et M. ARELLA. 1995. Characterization of the small open reading frame on genome segment A of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **76**, 2091-2096.

- HILL, B. et K. WAY. 1983. Serological classification of fish and shellfish birnaviruses. "Abstract of First International Conference of the European Association of Fish Pathologists." Plymouth, U. K., p.10.
- HILL, B.J. et K. WAY, 1988. Proposed standardization of the serological classification of aquatic birnaviruses. International Fish Health Conference, Vancouver, Canada. Conference handbook, p. 151.
- HSU, Y.L., B.S. CHEN et J.L. WU. 1989. Comparison of RNAs and polypeptides of infectious pancreatic necrosis virus isolates from eel and Rainbow trout. *J. Gen. Virol.* **70**: 2233-2239.
- HUANG, M.T.F., D.S. MANNING, M. WARNER, E.B. STEPHENS et J.C. LEONG. 1986. A physical map of the viral genome for infectious pancreatic necrosis virus Sp: analysis of cell-free translation products derived from viral cDNA clones. *J. Virol.* **60**: 1002-1011.
- HUDSON, P.J., N.M. MCKERN, B.E. POWER et A.A. AZAD. 1986 Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.* **14**: 5001-5012.
- JACKWOOD, D.H. et Y.M. SAIF. 1987. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* **31**: 766-770.
- JAGADISH, M.N. et A.A. AZAD. 1991. Localization of a VP3 epitope of infectious bursal disease virus. *Virology* **184**: 805-807.
- JAGADISH, M.N., P.R. VAUGHAN, R.A. IRVING, A.A. AZAD et I.G. MACREADIE. 1990. Expression and characterization of infectious bursal disease virus polyprotein in yeast. *Gene* **95**: 179-186.
- JOKLICK, W.K. 1988. "Virology", 3^e édition. Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut, 277 p.
- JØRGENSEN, P.E.V. et N.P. KEHLET. 1971. Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout: their serological and pathogenic properties. *Nordisk Veterinaermedicin* **23**: 568-575.
- KENNEDY, J.C. et R.D. MACDONALD. 1982. Persistent infection with infectious pancreatic necrosis virus mediated by defective-interfering (DI) virus particles in a cell line showing strong interference but little DI replication. *J. Gen. Virol.* **58**: 361-371.

- KIBENGE, F.S.B., A.S. DHILLON et R.G. RUSSELL. 1988. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* **69**: 1757-1775.
- KIBENGE, F.S.B., D.J. JACKWOOD et C.C. MERCADO. 1990. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* **71**: 569-577.
- KIBENGE, F.S.B., P.K. MCKENNA et J.K. DYBING. 1991. Genome cloning and analysis of the large RNA segment (segment A) of a naturally avirulent serotype 2 infectious bursal disease virus. *Virology* **184**: 437-440.
- KOONIN, E.V. 1992. Evolution of double-stranded RNA viruses: a case for polyphyletic origin from different groups of positive-stranded RNA viruses. In "Evolution of Viral Genomes" (E.V. Koonin, Éd.), *Seminars in Virology* **3**, pp. 327-339.
- KOZAK, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8125-8132.
- KYTE, J. et R.F. DOOLITTLE. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- LANA, D.P., C.E. BEISEL et R.F. SILVA. 1992. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of a naturally occurring variant virus. *Virus Genes* **6**: 247-259.
- LaPATRA, S.E., K.A. LAUDA, G.R. JONES, S.C. WALKER et W.D. SHEWMAKER. 1994. Development of passive immunotherapy for control of infectious hematopoietic necrosis. *Dis. Aquat. Org.* **20**: 1-6.
- LAPIERRE, J., D. LARRIVÉE et L. BERTHIAUME. 1986. Influence of water temperature and fish age on mortality in Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Aquaculture* **59**: 81-92.
- LAWRENCE, W.R., E. NAGY, R. DUNCAN, P. KRELL et P. DOBOS. 1989. Expression in *Escherichia coli* of the major outer capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. *Gene* **79**: 369-374.
- LECOMTE, J., M. ARELLA et L. BERTHIAUME. 1992. Comparison of polyclonal and monoclonal antibodies for serotyping infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains isolated in Quebec and Newfoundland. *J. Fish Dis.* **15**: 431-436.

- LIAO, L. et P. DOBOS. 1995. Mapping of a serotype specific epitope of the major capsid protein VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* **209**: 684-687.
- LIPIPUN, V., P. CASWELL-RENO, Y.L. HSU, J.L. WU, M.C. TUNG, P.W. RENO, W. WATTANAVIJARN et B.L. NICHOLSON. 1989. Antigenic analysis of Asian aquatic birnavirus isolates using monoclonal antibodies. *Fish Pathol.* **24**: 155-160.
- LIU, Z., B. MOAV, A.J. FARAS, K.S. GUISE, A.R. KAPUSCINSKI et P.B. HACKETT. 1990. Development of expression vectors for transgenic fish. *Bio/Technology* **8**: 1268-1272.
- LO, C.F., Y.W. HONG, S.Y. HUANG et C.H. WANG. 1988. The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Pathol.* **23**: 147-154.
- LO, C.-F., C.-H. WANG, M.-S. LIN et G.-H. KOU. 1991. Viral polypeptides and RNA of defective interfering particles of IPN virus generated by serial undiluted passaging in TO-2 cells. *Gyobyo Kenkyu* **26**: 119-125.
- LORENZEN, N., N.J. OLESEN et P.E.V. JØRGENSEN. 1990. Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *J. Gen. Virol.* **71**: 561-567.
- MACDONALD, R.D. 1978. Ringed plaque formation in infectious pancreatic necrosis virus correlates with defective interfering particles production. *J. Gen. Virol.* **41**: 623-628.
- MACDONALD, R.D. et P. DOBOS. 1981. Identification of the protein encoded by each genome segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* **114**: 414-422.
- MACDONALD, R.D. et D.A. GOWER. 1981. Genomic and phenotypic divergence among three serotypes of aquatic birnaviruses (infectious pancreatic necrosis virus). *Virology* **114**: 187-195.
- MACDONALD, R.D. et T. YAMAMOTO. 1977. The structure of infectious pancreatic necrosis virus RNA. *J. Gen. Virol.* **34**: 235-247.
- MACDONALD, R.D. et T. YAMAMOTO. 1978. Quantitative analysis of defective interfering particles in infectious pancreatic necrosis virus preparations. *Arch. Virol.* **57**: 77-89.
- MACDONALD, R.D., K.L. ROY, T. YAMAMOTO et N. CHANG. 1977. Oligonucleotide fingerprints of the RNAs from infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Virol.* **54**: 373-377.

- MACREADIE, I.G., P.R. VAUGHAN, A.J. CHAPMAN, N.M. MCKERN, M.N. JAGADISH, H.-G. HEINE, C.W. WARD, K.J. FAHEY et A.A. AZAD. 1990. Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. *Vaccine* **8**: 549-552.
- MAGYAR, G. et P. DOBOS. 1994a. Expression of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and VP1 in insect cells and the detection of the polyprotein in purified virus. *Virology* **198**: 437-445.
- MAGYAR, G. et P. DOBOS. 1994b. Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology* **204**: 580-589.
- MAHARDIKA, G.N.K. et H. BECHT. 1995. Mapping of cross-reacting and serotype-specific epitopes on the VP3 structural protein of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch. Virol.* **140**: 765-774.
- MALSBERGER, R.G. et C.P. CERINI. 1965. Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **126**: 320-327.
- MANNING, D.S. et J.C. LEONG. 1990. Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* **179**: 16-25.
- MANNING, D.S., C.L. MASON et J.C. LEONG. 1990. Cell-free translational analysis of the processing of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein. *Virology* **179**: 9-15.
- MARSHALL, H. et P. DOBOS. 1994. Identification of the infectious pancreatic necrosis virus receptor on Chinook salmon embryo cells. American Society for Virology, 13th Annual Meeting, Madison, U.S.A., p. 156. [Abstract W15-9].
- MCALLISTER, P.E. 1979. Fish viruses and viral infections. In "Comprehensive virology" (H. Fraenkel-Conrat et R.R. Wagner, Éd.), Vol. 14, Plenum, New York, pp. 401-470.
- MCALLISTER, P.E. et W.J. OWENS. 1995. Assessment of the virulence of fish and molluscan isolates of infectious pancreatic necrosis virus for salmonid fish by challenge of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *J. Fish Dis.* **18**: 97-103.
- MCALLISTER, P.E. et X. REYES. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.* **7**: 319-322.

- McMICHAEL, J., J.L. FRYER, et K.S. PILCHER. 1978. An antigenic comparison of three strains of infectious pancreatic necrosis virus of salmonid fishes. *Aquaculture* **6**: 203-210.
- MEYER, F.P. 1991. Aquaculture disease and health management. *J. Anim. Sci.* **69**: 4201-4208.
- MERTENS, P.P.C. et P. DOBOS. 1982. Messenger RNA of infectious pancreatic necrosis virus is polycistronic. *Nature* **297**: 243-246.
- MERTENS, P.P.C., P.B. JAMIESON et P. DOBOS. 1982. *In vitro* RNA synthesis by infectious pancreatic necrosis virus-associated RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **59**: 47-56.
- M'GONICLE, R.H. 1941. Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. *Trans. Am. Fish. Soc.* **70**: 297-303.
- MORTENSEN, S.H. 1993. Passage of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) through invertebrates in an aquatic food chain. *Dis. Aquat. Org.* **16**: 41-45.
- MORTENSEN, S.H., B. HJELTNES, O. RØDSETH, J. KROGSRUD et K.E. CHRISTIE. 1990. Infectious pancreatic necrosis virus serotype N1 isolated from Norwegian turbot (*Scophthalmus maximus*), halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and scallops (*Pecten maximus*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **10**: 42-43.
- MORTENSEN, S.H., E. BACHERE, G. LE GALL et E. MIALHE. 1992. Persistence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in scallops *Pecten maximus*. *Dis. Aquat. Org.* **12**: 221-227.
- MORTENSEN, S.H., Ø. EVENSEN, O.M. RØDSETH et B.K. HJELTNES. 1993. The relevance of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed Norwegian turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* **115**: 243-252.
- MÜLLER, H. et R. NITSCHKE. 1987. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* **159**: 174-177.
- MÜLLER, H., D. SCHNITZLER, F. BERNSTEIN, H. BECHT, D. CORNELISSEN et D.H. LÜTTICKEN. 1992. Infectious bursal disease of poultry: antigenic structure of the virus and control. *Vet. Microbiol.* **33**: 175-183.

- MUNDT, E. et H. MÜLLER. 1995. Complete nucleotide sequences of 5'- and 3'-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. *Virology* **209**: 10-18.
- MUNDT, E., J. BEYER et H. MÜLLER. 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* **76**: 437-443.
- MUNN, C.B. 1994. The use of recombinant DNA technology in the development of fish vaccines. *Fish Shellfish Immunol.* **4**: 459-473.
- MURPHY, F.A., C.M. FAUQUET, D.H.L. BISHOP, S.A. GHABRIAL, A.W. JARVIS, G.P. MARTELLI, M.A. MAYO et M.D. SUMMERS. 1995. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* **10**, Springer-Verlag, Wien.
- NAGY, E. et P. DOBOS. 1987. Epitope mapping of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) polypeptides using monoclonal antibodies. VII International Congress of Virology, Edmonton, Canada, p. 311. [Abstract OP25.2].
- NAGY, E., R. DUNCAN, P. KRELL et P. DOBOS. 1987. Mapping of the large RNA genome segment of infectious pancreatic necrosis virus by hybrid arrested translation. *Virology* **158**: 211-217.
- NICHOLSON, B.L. et S. POCHEBIT. 1981. Antigenic analysis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by neutralization kinetics. *Develop. Biol. Standard.* **49**: 35-41.
- NOVOA, B., A. FIGUERAS, C.F. PUENTES, A. LEDO et A.E. TORANZO. 1993a. Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain. *Dis. Aquat. Org.* **15**: 163-169.
- NOVOA, B., A.E. TORANZO, C.P. DOPAZO, J.L. BARJA et A. FIGUERAS. 1993b. Isolation of IPN virus serotype VR-299 from turbot in Europe. *Dis. Aquat. Org.* **17**: 61-65.
- NOVOA, B., C. RIVAS, A.E. TORANZO et A. FIGUERAS. 1995. Pathogenicity of birnaviruses isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*): comparison with reference serotypes of IPNV. *Aquaculture* **130**: 7-14.

- NYHOLM, L. et J. RAMLAU. 1988. Nitrocellulose membranes as a solid phase in immunoblotting. In "CRC Handbook of Immunoblotting of Proteins" (O.J. Bjerrum et N.H. H. Heegaard, Ed.), Vol. I, CRC Press, Boca Raton, pp. 101-108.
- OKAMOTO, N., T. SANO, R.P. HEDRICK et J.L. FRYER. 1983. Antigenic relationships of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus and european eel virus. *J. Fish Dis.* **6**: 19-25.
- OLESEN, N.J. et P.E.V. JØRGENSEN. 1988. Isolation of an IPN-like virus belonging to the serogroup II of the aquatic birnaviruses from dab, *Limanda limanda* L. *J. Fish Dis.* **11**: 449-451.
- ÖPPLING, V., H. MÜLLER et H. BECHT. 1991a. Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* **119**: 211-223.
- ÖPPLING, V., H. MÜLLER et H. BECHT. 1991b. The structural polypeptide VP3 of infectious bursal disease virus carries group- and serotype-specific epitopes. *J. Gen. Virol.* **72**: 2275-2278.
- ÖZEL, M. et H. GELDERBLOM. 1985. Capsid symmetry of viruses of the proposed birnavirus group. *Arch. Virol.* **84**: 149-161.
- PARVIN, J.D., A. MOSCONA, W.T. PAN, J.M. LEIDER et P. PALESE. 1986. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J. Virol.* **59**: 377-383.
- PELLETIER, J. et N. SONENBERG. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**: 320-325.
- PERSSON, R.H. et R.D. MACDONALD. 1982. Evidence that infectious pancreatic necrosis virus has a genome-linked protein. *J. Virol.* **44**: 437-443.
- PILCHER, K.S. et J.L. FRYER. 1980. The viral diseases of fish: a review through 1978. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **7**: 287-364.
- PIPER, D., B.L. NICHOLSON et J. DUNN. 1973. Immunofluorescent study of the replication of infectious pancreatic necrosis virus in trout and Atlantic salmon cell cultures. *Infect. Immunity* **8**: 249-254.

- PRYDE, A., W.T. MELVIN, et A.L.S. MUNRO. 1993. Nucleotide sequence analysis of the serotype-specific epitope of infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Virol.* **129**: 287-293.
- REDDY, S.K. et A. SILIM. 1991. Comparison of neutralizing antigens of recent isolates of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* **117**: 287-296.
- REDDY, S.K., A. SILIM et M.J.H. RATCLIFFE. 1992. Biological roles of the major capsid proteins and relationships between the two existing serotypes of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* **127**: 209-222.
- RIVAS, C., C. CEPEDA, C.P. DOPAZO, B. NOVOA, M. NOYA et J.L. BARJA. 1993. Marine environment as reservoir of birnaviruses from poikilothermic animals. *Aquaculture* **115**: 183-194.
- ROBERTS, T.E. et P. DOBOS. 1983. Studies on the mechanism of temperature sensitivity of infectious pancreatic necrosis virus replication. *J. Gen. Virol.* **64**: 331-339.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2^e édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- SANO, M., N. OKAMOTO, H. FUKUDA, M. SANEYOSHI et T. SANO. 1992. Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *J. Fish Dis.* **15**: 283-293.
- SANO, M., N. OKAMOTO et T. SANO. 1994. Infectious pancreatic necrosis virus plaque size depends on the larger RNA segment and is not linked to virulence. *J. Fish Dis.* **17**: 657-659.
- SANO, T., K. TANAKA, et S. FUKUZAKI. 1981. Immune response in adult trout against formalin killed concentrated IPNV. *Develop. Biol. Standard.* **49**: 63-70.
- SCHNITZLER, D., F. BERNSTEIN, H. MÜLLER et H. BECHT. 1993. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* **74**: 1563-1571.

- SEDMAN, S.A., P.J. GOOD et J.E. MERTZ. 1989. Leader-encoded open reading frames modulate both the absolute and relative rates of synthesis of the virion proteins of simian virus 40. *J. Virol.* **63**: 3884-3893.
- SILIM, A., M.A.S.Y. ELAZHARY et A. LAGACÉ. 1982. Susceptibility of trouts of different species and origins to various isolates of infectious pancreatic necrosis virus. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**: 1580-1584.
- SNYDER, D.B., V.N. VAKHARIA, S.A. MENGEL-WHEREAT, G.H. EDWARDS, P.K. SAVAGE, D. LÜTTICKEN et M.A. GOODWIN. 1994. Active cross-protection induced by a recombinant baculovirus expressing chimeric infectious bursal disease virus structural proteins. *Avian Dis.* **38**: 701-707.
- SOMOGYI, P. et P. DOBOS. 1980. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **33**: 129-139.
- SPIES, U., H. MÜLLER et H. BECHT. 1989. Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames. *Nucleic Acids Res.* **17**: 7982.
- SPIROPOULOU, C.F. et S.T. NICHOL. 1993. A small highly basic protein is encoded in overlapping frame within the P gene of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **67**: 3103-3110.
- TARRAB, E., L. BERTHIAUME, J. HEPPELL, M. ARELLA et J. LECOMTE. 1993. Antigenic characterization of serogroup 'A' of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **74**: 2025-2030.
- TARRAB, E., L. BERTHIAUME, S. GROTHÉ, M. O'CONNOR-MCCOURT, J. HEPPELL et J. LECOMTE. 1995. Evidence of a major neutralizable conformational epitope region on VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **76**: 551-558.
- VAKHARIA, V.N., D.B. SNYDER, J. HE, G.H. EDWARDS, P.K. SAVAGE et S.A. MENGEL-WHEREAT. 1993. Infectious bursal disease virus structural proteins expressed in a baculovirus recombinant confer protection in chickens. *J. Gen. Virol.* **74**: 1201-1206.
- VAKHARIA, V.N., D.B. SNYDER, D. LÜTTICKEN, S.A. MENGEL-WHEREAT, P.K. SAVAGE, G.H. EDWARDS et M.A. GOODWIN. 1994a. Active and passive protection against variant and

classic infectious bursal disease virus strains induced by baculovirus-expressed structural proteins. *Vaccine* **12**: 452-456.

VAKHARIA, V.N., J. HE, B. AHAMED et D.B. SNYDER. 1994b. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.* **31**, 265-273.

WOLF, K. 1988. "Fish Viruses and Fish Viral Diseases." Cornell University Press, Ithaca, NY.

WOLF, K. et M.C. QUIMBY. 1969. Infectious pancreatic necrosis: clinical and immune response of adult trouts to inoculation with live virus. *J. Fish. Res. Board Canada* **26**: 2511-2516.

WOLF, K. et M.C. QUIMBY. 1971. Salmonid viruses: infectious pancreatic necrosis virus. Morphology, pathology and serology of first European isolations. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **34**: 144-156.

WOLF, K., S.F. SNIESZKO, C.E. DUNBAR et E. PYLE. 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**: 105-108.

WOLSKI, S.C., B.S. ROBERSON et F.M. HETRICK. 1986. Monoclonal antibodies to the SP strain of infectious pancreatic necrosis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**: 373-381.

WU, J.-L., S.-W. YIH, G.-M. HER, C.-C. TUNG, C.-Y. LEE et Y.-L. HSU. 1992. Nucleotide sequences of two cDNA clones of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)-Ab type. *Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica* **31**: 15-22.

ANNEXE A

Liste des publications et des communications

En plus des articles apparaissant dans les chapitres 2 à 4 et dans l'annexe B de cette thèse, les résultats obtenus au cours de mon doctorat ont été présentés sous forme de communications écrites ou orales dans divers congrès scientifiques. La complémentarité de mes recherches avec celles de Mme Esther Tarrab, étudiante au doctorat dans le même laboratoire, a également permis une collaboration qui a résulté en plusieurs publications et communications concernant le VNPI et où mon nom apparaît comme coauteur. La liste des communications dont je suis l'auteur principal, de même que les ouvrages auxquels j'ai participé apparaissent ci-bas.

Communications (auteur principal)

HEPPELL, J., E. TARRAB, L. BERTHIAUME, J. LECOMTE et M. ARELLA. 1995. Comparison of the small open reading frame on genome segment A of five infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains. 5th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses, Djerba (Tunisie).

HEPPELL, J., E. TARRAB, L. BERTHIAUME, J. LECOMTE et M. ARELLA. 1995. Localization of the major epitopes of VP2 on the genome of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). 5th International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses, Djerba (Tunisie).

HEPPELL, J., L. BERTHIAUME, J. LECOMTE, E. TARRAB et M. ARELLA. 1994. Expression in *E. coli* of a putative 17 kDa protein of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Société Canadienne des Microbiologistes/Canadian Bacterial Diseases Network Joint Meeting, Vancouver (Colombie Britannique).

HEPPELL, J., M. ARELLA, F. CORBIN, E. TARRAB, J. LECOMTE et L. BERTHIAUME. 1993. Genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotypes. American Society for Virology, 12th Annual Meeting, Davis (Californie).

HEPPELL, J., F. CORBIN, E. TARRAB, J. LECOMTE, M. ARELLA et L. BERTHIAUME. 1993. Study of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains related to different serotypes. Société Canadienne des Microbiologistes/Society for Industrial Microbiology Joint Meeting, Toronto (Ontario).

HEPPELL, J., L. BERTHIAUME et M. ARELLA. 1992. Comparaison des variations génomiques intra- et intersérotypiques chez le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI). 60^e congrès de l'Acfas, Montréal (Québec).

HEPPELL, J., L. BERTHIAUME, J. LECOMTE et M. ARELLA. 1991. Study of genomic variations between different infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains for the elaboration of specific molecular probes. Third Joint Meeting of the European Group for Rapid Viral Diagnosis and the European Society Against Viral Diseases, Strasbourg (France).

HEPPELL, J., M. ARELLA, J. LECOMTE et L. BERTHIAUME. 1991. Genomic variations between different strains of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Société Canadienne des microbiologistes, 41^e réunion annuelle, London (Ontario).

HEPPELL, J., M. ARELLA, J. LECOMTE et L. BERTHIAUME. 1991. Classification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains based on genomic variations. Congrès Aquatic Biotechnology Network (Aquatech 91), Montréal (Québec).

Publications (coauteur)

TARRAB, E., J. HEPPELL, R. ALAIN, S. GARZON, L. BERTHIAUME et J. LECOMTE. 1995. Localization of the external proteins of infectious pancreatic necrosis virus and epitope analysis of VP3. *J. Virol.* (soumis pour publication).

TARRAB, E., J. HEPPELL, L. BERTHIAUME, M. ARELLA et J. LECOMTE. 1996. Antigenic diversity of Eastern Canadian isolates of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 19 (sous presse).

TARRAB, E., L. BERTHIAUME, S. GROTHÉ, M. O'CONNOR-MCCOURT, J. HEPPELL et J. LECOMTE. 1995. Evidence of a major neutralizable conformational epitope region on VP2 of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* **76**: 551-558.

TARRAB, E., L. BERTHIAUME, J. HEPPELL, M. ARELLA et J. LECOMTE. 1993. Antigenic characterization of serogroup "A" of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **74**: 2025-2030.

BERTHIAUME, L., E. TARRAB, J. HEPPELL, M. ARELLA, P. DOBOS, R. DUNCAN et J. LECOMTE. 1993. Antigenic and genomic differences of two Jasper strains of infectious pancreatic necrosis virus. *Intervirology* **34**: 197-201.

Communications (coauteur)

TARRAB, E., J. HEPPELL, L. BERTHIAUME et J. LECOMTE. 1995. Is infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) endemic in piscicultures in Eastern Canada?. Canadian Conference for Fisheries Research, Ottawa (Ontario).

TARRAB, E., J. HEPPELL, K.E. CHRISTIE, L. BERTHIAUME et J. LECOMTE. 1995. Antigenic evolution of a major neutralizable epitope domain of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Immunobiology of viral infections: *Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol.* (M. Schwyzer, et al., Éd.), pp. 464-469.

TARRAB, E., L. BERTHIAUME, M. ARELLA, J. HEPPELL et J. LECOMTE. 1994. Epitope mapping of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2 protein. Société Canadienne des Microbiologistes/Canadian Bacterial Diseases Network Joint Meeting, Vancouver (Colombie Britannique).

TARRAB, E., L. BERTHIAUME, J. HEPPELL, M. ARELLA et J. LECOMTE. 1993. Monoclonal antibodies against infectious pancreatic necrosis virus for the antigenic characterization of serogroup "A". IXth International Congress of Virology, Glasgow (Écosse).

TARRAB, E., L. BERTHIAUME, J. HEPPELL, M. ARELLA et J. LECOMTE. 1993. Antigenic characterization of serogroup "A" of infectious pancreatic necrosis virus with three

panels of monoclonal antibodies. American Society for Virology, 12th Annual Meeting, Davis (Californie).

TARRAB, E., L. BERTHIAUME, M. ARELLA, J. HEPPELL et J. LECOMTE. 1993. Use of monoclonal antibodies for antigenic characterization of serogroup "A" of infectious pancreatic necrosis virus. Société Canadienne des Microbiologistes/Society for Industrial Microbiology Joint Meeting, Toronto (Ontario).

BERTHIAUME, L., J. HEPPELL, E. TARRAB, M. ARELLA et L. LECOMTE. 1992. Importance of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in aquaculture. 37th Technological Conference on Atlantic Fisheries, Percé (Québec).

LECOMTE, J., E. TARRAB, J. HEPPELL, M. ARELLA et L. BERTHIAUME. 1992. La persistance des virus chez les salmonidés: le modèle de la nécrose pancréatique infectieuse. Journée de vulgarisation sur la recherche en aquiculture d'eau douce réalisée au Québec (organisée par le CAPQ), Drummondville (Québec).

BERTHIAUME, L., J. HEPPELL, E. TARRAB, J. LECOMTE et M. ARELLA. 1991. Antigenic and genomic variations among Canadian infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strains. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada* 91-3: 69-71.

BERTHIAUME, L., E. TARRAB, J. HEPPELL, M. ARELLA et J. LECOMTE. 1991. Sondes moléculaires et diagnostic de la nécrose pancréatique infectieuse du poisson. VI^e conférence annuelle en santé animale, Sherbrooke (Québec).

LECOMTE, J., M. CHÉNARD, J. HEPPELL, M. ARELLA et L. BERTHIAUME. 1990. Monoclonal antibody and molecular probes for the identification of infectious pancreatic necrosis virus strains. VIIIth International Congress of Virology, Berlin (Allemagne).

ANNEXE B

Copie des articles publiés

Cette annexe contient une copie de chacun des quatre articles présentés dans les chapitres 2 à 4. Tel qu'expliqué dans la section "introduction" et souligné par des notes de bas de page, le texte retranscrit à l'intérieur de ces chapitres n'est pas tout à fait conforme à la version publiée. Pour cette raison, un exemplaire des articles originaux a été inclus en annexe.

Pour les articles I, II et IV, un tiré-à-part a été inséré à la suite de cette page. Dans le cas de l'article III, seule une photocopie des épreuves envoyées par la maison d'édition apparaît puisque au moment du dépôt de cette thèse nous ne disposions pas encore des tirés-à-parts.