

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE/IMMUNOLOGIE

PAR

CHARLES PELLERIN

COMPARAISON GÉNOMIQUE DE SOUCHES DU VIRUS

DE LA DIARRHÉE VIRALE BOVINE (BVDV)

A) RÉGION CODANT POUR LA p125

B) RÉGION 5' NON-CODANTE

CP.

Août 1994

Forget all that you've come to know
Cause greed is the way to go
The more you make, the more you get
Have you learned the secret yet
Equip yourself then use them all
Protect yourself then watch them fall
The rich get rich the poor get shit
Ask yourself...where do I fit?

Cause those who have a lot
don't care if you have not
But don't despair
cause when your windfall comes
You'll be just like them

Varga (Greed), 1993

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

PELLERIN, C., J. VAN DEN HURK, J. LECOMTE & P. TIJSSEN. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203:260-268.

PELLERIN, C., S. MOIR, J. LECOMTE & P. TIJSSEN. 1994. Comparison of the p125 coding region of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* (sous presse).

PELLERIN, C., J. VAN DEN HURK, J. LECOMTE & P. TIJSSEN. 1994. New bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains associated with high mortalities in North America. Summary of the symposium of acute bovine diarrhoea, Guelph, Ontario. *Can. Vet. J.* (sous presse).

PELLERIN, C., J. VAN DEN HURK, J. LECOMTE & P. TIJSSEN. 1994. Identification and characterization of a new group of BVDV associated with high mortalities in calves. Proceedings of the 3rd International Congress of European Society for Veterinary Virology. (soumis).

COMMUNICATIONS

VAN DEN HURK, J.V., C. PELLERIN, J. LECOMTE & P. TIJSSEN. Characterization of a new group of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strains associated with severe outbreaks and high mortalities. VIIth International Conference on Comparative and Applied Virology, Montréal, Québec, Canada, October 12-17, 1994.

PELLERIN, C., J. VAN DEN HURK, J. LECOMTE & P. TIJSSEN. Identification and characterization of a new group of BVDV associated with high mortalities in calves. 3rd International Congress of European Society for Veterinary Virology, Interlaken, Switzerland, September 4-7, 1994.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
SOMMAIRE.....	xv
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
1. Historique.....	7
2. Classification du BVDV et des virus voisins.....	9
3. Morphologie du BVDV.....	11
4. Composition du virion.....	11
4.1 Acides nucléiques.....	11
4.2 Protéines structurales.....	14
4.3 Lipides.....	15
5. Cycle viral.....	16
5.1 Entrée.....	16
5.2 Traduction de l'ARN viral.....	17
5.2.1 Organisation génomique.....	17
5.2.2 Initiation de la traduction.....	17
5.2.3 Traduction.....	20
5.2.4 Voie de clivage de la polyprotéine.....	21
5.2.4.1 Rôle des protéases cellulaires.....	21
5.2.4.2 Rôle de la p20.....	21
5.2.4.3 Rôle de la p125 (p54 + p80).....	24
5.2.4.4 Rôle de la p10 et de la p32.....	25
5.3 Réplication de l'ARN viral.....	25
5.3.1 Rôle de la p125 (p54 + p80).....	25
5.3.2 Rôle de la p133 (p58 + p75).....	26
5.4 Maturation et sortie.....	26
6. Diversité du BVDV.....	27
6.1 Variations génomiques.....	27
6.2 Variations antigéniques.....	31
6.3 Variations biotypiques.....	34
7. Aspects cliniques et pathogénèse.....	36
7.1 Infections aiguës.....	36

7.2 Infections congénitales.....	40
7.2.1 Effet du biotype viral.....	40
7.2.2 Effets selon l'âge du fœtus.....	41
7.3 Maladie des muqueuses.....	44
8. Modes de transmission.....	46
9. Diagnostic.....	50
9.1 Détection du virus ou de l'un de ses constituants.....	50
9.1.1 Isolement viral.....	50
9.1.2 Détection des antigènes viraux.....	51
9.1.3 Détection du génome viral.....	53
9.2 Détection des anticorps de l'hôte.....	54
10. Prévention et contrôle.....	56
10.1 Animaux PI.....	56
10.2 Vaccination.....	57
11. Importance économique.....	58
11.1 Pertes liées à l'infection.....	58
11.2 Contamination du sperme.....	59
11.3 Contamination du sérum bovin et des cultures cellulaires.....	61
 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	 63
1. Étude de la région codant pour la p125.....	64
2. Étude de la région 5' non-codante.....	64
 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	 66
1. Souches virales de BVDV.....	67
1.1 Souches prototypes.....	67
1.2 Isolats.....	67
2. Propagation du BVDV.....	68
2.1 Culture cellulaire.....	68
2.2 Infection.....	69
3. Isolement de l'ARN viral.....	70
4. Amplification par la réaction de la polymérase en chaîne (PCR).....	71
4.1 Synthèse du cDNA.....	76
4.2 PCR.....	77
4.2.1 Amplification de cDNA.....	77
4.2.2 Réamplification et amplification d'un fragment cloné...77	
4.3 Analyse sur gel d'agarose.....	78
5. Clonage et sous-clonage.....	78
5.1 Digestions enzymatiques.....	78
5.1.1 Digestions partielles.....	79
5.2 Purification des fragments d'ADN.....	80
5.2.1 Produits par PCR.....	80
5.2.2 Produits par digestion enzymatique.....	81

5.3 Clonage.....	81
5.3.1 Vecteurs.....	81
5.3.2 Clonage des produits de PCR.....	82
5.3.3 Clonage des produits de digestion enzymatique.....	83
6. Manipulations de <i>E. coli</i>	83
6.1 Milieux de cultures.....	83
6.2 Transformation de <i>E. coli</i>	84
6.2.1 Génotypes des souches de <i>E. coli</i> utilisées.....	84
6.2.2 Cellules compétentes.....	84
6.2.3 Transformation.....	85
6.3 Criblage des transformants.....	86
6.3.1 Technique de Le Gouill.....	86
6.3.2 Minipréparations (lyse alcaline).....	87
7. Séquençage.....	88
7.1 Préparation de l'ADN.....	88
7.2 Réaction de séquençage.....	89
7.2.1 Séquençage manuel.....	89
7.2.2 Séquençage automatique.....	91
8. Analyse des séquences.....	92
RÉSULTATS.....	95
1. Étude de la région codant pour la p125.....	96
1.1 Définition des bordures de la p125 (p54/p80).....	96
1.2 Amplification par PCR et clonage.....	97
1.3 Analyse des séquences de cDNA.....	100
1.3.1 Séquences de la région codant pour la p125.....	100
1.3.2 Regroupement des souches.....	112
1.4 Analyse des séquences en acides aminés.....	114
1.4.1 Souches CP sans réarrangement vs souches NCP.....	114
1.4.2 Homologie.....	121
1.4.3 Profil d'hydrophobicité de la p54.....	123
1.5 Analyse partielle de la p54 de cinq isolats.....	123
1.5.1 Amplification P125A/CL4.....	123
1.5.2 Clonage et séquençage.....	123
1.5.3 Cas de la souche Q47/Q47i.....	130
2. Étude de la région 5' non-codante (5'UTR).....	131
2.1 Amplification par PCR et clonage.....	131
2.2 Analyse des séquences de cDNA.....	134
2.2.1 Séquences de la 5'UTR.....	134
2.2.2 Regroupement des souches/isolats.....	134
2.3 Structures secondaires du domaine D.....	140
2.4 Stabilité des structures secondaires du domaine D.....	144

DISCUSSION.....	151
1. Étude de la région codant pour la p125.....	152
1.1 Analyse des souches CP sans réarrangement.....	152
1.1.1 Au niveau de la p54.....	152
1.1.2 Au niveau de la p80.....	154
1.2 Variation de la p54 et de la p80.....	155
1.3 Séquences de la souche NY-1.....	156
1.4 Cas de l'isolat Q47/Q47i.....	160
2. Étude de la région 5' non-codante (5'UTR).....	161
2.1 Identification d'un nouveau groupe de BVDV.....	161
2.1.1 Relation avec les autres pestivirus.....	162
2.1.2 Propagation de l'épidémie.....	165
2.1.3 Développements futurs.....	165
2.2 Analyse des structures secondaires du domaine D.....	167
3. Regroupement génotypiques des souches du BVDV.....	168
CONCLUSION.....	172
REMERCIEMENTS.....	175
BIBLIOGRAPHIE.....	177
ANNEXE A.....	200
ANNEXE B.....	206

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Longueur des différentes régions du génome des 5 pestivirus dont la séquence complète est connue	13
Tableau 2	Taux de mortalité chez les veaux lourds (veaux de lait et veaux de grain) du Québec au cours des trois dernières années	39
Tableau 3	Pourcentage d'homologie entre les différentes souches au niveau du gène de la p125 (p54/p80)	113
Tableau 4	Pourcentage d'homologie entre les différentes souches au niveau des acides aminés de la p125 (p54/p80)	122
Tableau 5	Pourcentage d'homologie entre 12 souches au niveau de la 5'UTR	137
Tableau 6	Valeur du ΔG du domaine D de la 5'UTR des différentes souches	149
Tableau 7	Comparaison des titres de séroneutralisation des différentes souches de BVDV	163
Tableau 8	Regroupement des souches de BVDV étudiées au cours de ce projet ainsi qu'un certain nombre d'autres dont la séquence nucléotidique partielle est publiée	170

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Organisation génomique des différentes protéines produites par le BVDV et mécanismes proposés pour la translocation et le clivage de la polyprotéine.	18
Figure 2	Voie de clivage de la polyprotéine du BVDV.	22
Figure 3	Compilation des génomes des différentes souches CP possédant des insertions et des duplications au niveau de leur p125.	29
Figure 4	Schématisation du double saut de gabarit proposé pour expliquer la présence d'insertion ou d'insertion/duplication dans le génome de certaines souches CP du BVDV.	32
Figure 5	Principaux cycles d'infection du BVDV.	47
Figure 6	Séquence et localisation des amorces utilisées pour l'étude de la p125.	72
Figure 7	Séquence et localisation des amorces BV7 et BV8 utilisées pour l'étude de la région 5' non-codante.	74
Figure 8	Représentation schématique des fragments amplifiés, clonés et séquencés lors de l'étude portant sur la région codant pour la p125 des souches de laboratoire Oregon, Singer, NY-1 et Draper.	98
Figure 9	Exemple du résultat obtenu lors du criblage de 58 transformants en utilisant la technique de Le Guill.	101
Figure 10	Comparaison des séquences de cDNA au niveau de la région codant pour la p125.	103

Figure 11	Dendrogramme obtenu à partir de la séquence nucléotidique complète de la p54.	115
Figure 12	Comparaison des séquences en acides aminés de la p125.	117
Figure 13	Profil d'hydrophobicité de la p54.	124
Figure 14	Amplification par RT-PCR du génome des isolats Q47, Q69, Q713, Q1808 et Q4812 au moyen des amorces P125A et CL4.	126
Figure 15	Comparaison des séquences de cDNA obtenues pour une région de 318 nt située du côté 3' du fragment P125A/CL4 des isolats Q47, Q69, Q713 et Q1808.	128
Figure 16	Amplification par RT-PCR d'une portion de la 5'UTR au moyen des amorces BV7 et BV8.	132
Figure 17	Comparaison des séquences partielles de la 5'UTR.	135
Figure 18	Dendrogramme obtenu à partir de la séquence nucléotidique partielle de la 5'UTR.	138
Figure 19	Comparaison des séquences de la 5'UTR à l'intérieur de chacun des trois groupes défini (Ia, Ib et II).	141
Figure 20	Structures secondaires de la 5'UTR des représentants de groupe NADL (Ia), NY-1 (Ib) et 890 (II).	145
Figure 21	Structures secondaires de la 5'UTR telles qu'obtenues avec le programme FOLD.	147

- Figure 22** Comparaison des séquences obtenues par Brock *et al.* (1993) pour la souche NY-1 avec les séquences correspondantes obtenues lors de la présente étude. 158
- Figure 23** Stratégie employée pour reconstruire la région codant pour la p125 des souches Oregon, Singer et NY-1. 202
- Figure 24** PCR recombinants effectués pour la reconstruction de la p125. 204

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5'UTR	région 5' non-codante
aa	acide aminé
AcM	anticorps monoclonal
ADN	acide désoxyribonucléique
AMP ^r	gène de résistance à l'ampicilline
ARN	acide ribonucléique
ATCC	American type culture collection
b	base
BDV	border disease virus
BVDV	virus de la diarrhée bovine
cDNA	ADN complémentaire
CP	souche cytopathogène
ddNTP	didéoxyribonucléotide triphosphate
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DMF	dimethyl formamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
dNTP	déoxyribonucléotide triphosphate
D.O.	densité optique
DTT	dithiothreitol
ECP	effet cytopathique
EDTA	acide éthylènediamine tétraacétique
EtOH	éthanol
FBS	sérum foétal bovin
gp	glycoprotéine
h	heure
HCV	virus de l'hépatite C
HoCV	hog cholera virus
IPTG	isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside

IRES	site interne d'entrée du ribosome
Kan ^r	gène de résistance à la kanamycine
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KOAc	acétate de potassium
kpb	kilo paire de base
MD	maladie des muqueuses
MDBK	cellules de reins bovins (Madin-Darby)
min	minute
MMLV-RT	transcriptase inverse du virus murin de la leucémie de Moloney
MOI	multiplicité d'infection
NaOAc	acétate de sodium
NCP	souche non-cytopathogène
NH ₄ OAc	acétate d'ammonium
NY-1	souche New York-1 du BVDV
nt	nucléotide
pb	paire de base
PBS	tampon saline phosphaté
PCR	réaction de la polymérase en chaîne
PI	animal infecté en persistance
RE	réticulum endoplasmique
RNase	ribonucléase
RPM	révolutions par minute
RT-PCR	réaction de transcriptase inverse suivit du PCR
SCM	site de clonage multiple
SD-1	souche South Dakota-1 du BVDV
sec	seconde
TEMED	N, N, N', N'-tétramethylethylenediamine
U	unité
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside

SOMMAIRE

En se basant sur leur effet en culture cellulaire, les souches du virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) peuvent être divisées en deux biotypes: cytopathogène (CP) et non-cytopathogène (NCP). L'importance de cette distinction se situe au niveau de la pathogénèse de la maladie des muqueuses (MD), une maladie fatale pour l'animal atteint. En effet, le passage d'une souche NCP en souche CP est à l'origine de la MD. Jusqu'à présent, le seul moyen moléculaire de différencier une souche NCP d'une souche CP est la présence, chez cette dernière, d'une protéine de 80 kDa (p80) contrairement aux souches NCP qui ne produisent que la p125, le précurseur de la p80. Jusqu'à maintenant, les souches CP étudiées au niveau des séquences de la p125 ont révélé divers réarrangements conduisant à la production de la p80. Toutefois, certaines souches CP ne semblent pas contenir de réarrangements génomiques importants au niveau du gène codant pour la p125. Ainsi, des mutations ponctuelles au niveau de la p125, ou encore des réarrangements mineurs (délétions et/ou insertions) imperceptibles sans l'analyse détaillée du génome, pourraient potentiellement expliquer l'origine de la p80 chez ces souches.

Dans la première partie du projet, la région codant pour la p125 (p54/p80) de deux de ces souches CP intéressantes (Singer et Oregon) et de deux souches NCP (Draper et NY-1) fut amplifiée au moyen de la réaction de polymérase en chaîne (PCR), clonée et séquencée. La séquence en acides aminés de la p125 fut ensuite déduite. Mis à part l'insertion connue de 4 acides aminés retrouvée chez la souche NY-1, aucune délétion ou insertion ne fut rencontrée au niveau de la région amplifiée des autres souches. Cependant, en considérant chacun des résidus d'acides aminés un à un, six différencient les souches Oregon et Singer des souches NCP. Tous ces résidus

particuliers se situent au niveau de la portion de la p125 correspondant à la p54. Ceci suggère donc que l'activité protéase de la p80, qui pourrait être responsable du clivage de la p125 en p54 et p80, n'est pas modifiée directement chez les souches CP ne possédant aucun réarrangement. Par contre, il est possible qu'une modification de la p54, ou celle d'un cofacteur hypothétique de la p80, entraîne le clivage de la p125. Du côté de la p54, il est difficile d'attribuer avec certitude une importance quelconque aux six substitutions spécifiques notées car (i) aucun rôle ou domaine de la p54 n'est encore démontré expérimentalement et (ii) beaucoup d'autres mutations sont rencontrées au niveau de la p54; ces mutations ne différencient pas spécifiquement les souches Oregon et Singer des souches NCP, mais pourraient être aussi importantes.

D'autre part, l'analyse des séquences nucléotidiques de la p125 des différentes souches permet de confirmer, sur un plus grand nombre de souches, que la région codant pour la p54 est une région très variable contrairement à celle codant pour la p80. Il a été également possible de discerner deux groupes génomiques de BVDV: le groupe Ia (incluant les souches NADL, Singer, Oregon et SD-1) et le groupe Ib (incluant les souches Osloss, Draper et NY-1). Au niveau de la région codant pour la p54, l'homologie moyenne entre les souches des deux groupes est de 77.3% tandis qu'entre les souches d'un même groupe, elle est de 88.0% (Ia) et de 91.6% (Ib).

Dans la seconde partie du projet, des nouvelles souches de BVDV ayant causé un taux élevé de mortalité associé à des épidémies au Québec en 1993 ont été identifiées. Ces souches furent caractérisées au niveau de la région 5' non-codante (5'UTR) de leur génome. La comparaison des séquences obtenues avec celle des souches de BVDV

classiques démontrent clairement que les souches épidémiques forment un groupe distinct de BVDV. En effet, l'homologie moyenne entre les souches classiques (groupe I) et les souches épidémiques (groupe II) est inférieure à 75 %, tandis qu'elle est supérieure à 90 % entre les souches d'un même groupe. Dans le cas du groupe I, il est possible de subdiviser les souches en deux sous-groupes (Ia et Ib). Les souches membres de l'un ou l'autre de ces sous-groupes sont aussi membres du même sous-groupe quant à leur séquence au niveau de la région codant pour la p125. Ainsi, les groupes Ia, Ib et II pourraient bien représenter la vraie classification génomique des souches du BVDV.

Deng et Brock (1993) ont suggéré que la 5'UTR du BVDV représenterait un site interne d'entrée des ribosomes permettant l'initiation de la traduction par un mécanisme indépendant de la coiffe. Comme les structures secondaires de la 5'UTR seraient essentielles pour assurer ce rôle, nous avons regardé si elles ne pouvaient pas être modifiées chez les souches du groupe II étant donné la différence de 25 % qui existe au niveau des séquences de leur 5'UTR par rapport à celle du groupe I. L'analyse a démontré que les structures secondaires étaient très bien conservées autant dans un groupe que dans l'autre. Ceci indique la présence d'une forte pression évolutive dans le but de maintenir les structures secondaires et suggère l'importance majeure de la 5'UTR dans le cycle du BVDV. Toutefois, si les structures secondaires sont d'apparences similaires entre les deux groupes, la stabilité de ces structures ne l'est pas. En effet, les structures des souches du groupe II sont en moyenne beaucoup plus stables que celles du groupe I. Cette stabilité accrue et/ou les différences nucléotidiques pourraient avoir un lien avec la virulence marquée des souches épidémiques.

INTRODUCTION

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est un petit virus enveloppé dont le génome est composé d'un ARN simple brin à polarité positive. Avec le virus de la fièvre porcine classique (hog cholera virus) et le virus de la maladie des frontières du mouton (border disease virus), le BVDV fait partie du genre des pestivirus qui lui-même appartient à la famille des *Flaviviridae* (Francki *et al.*, 1991). Toutefois, il semble que cette classification ne soit que transitoire puisque les récentes données concernant l'organisation génomique, la composition du virion et la structure de l'ARN génomique (Thiel *et al.*, 1991; Brock *et al.*, 1992) montrent des différences significatives entre les pestivirus et les autres membres des *Flaviviridae*.

À partir d'analyses en culture cellulaire, le BVDV peut être divisé en deux biotypes: cytopathogène (CP) et non-cytopathogène (NCP) (Gillespie *et al.*, 1960). Même si les deux biotypes peuvent être retrouvés dans la population bovine, le biotype NCP demeure le plus répandu et le plus commun (Moennig et Plagemann, 1992). Si une vache subit une infection avec une souche NCP à un stade précis de la gestation, elle pourra donner naissance à un veau infecté en persistance (PI). Ce veau, qui sera spécifiquement immunotolérant à la souche NCP causant la persistance, contribuera à la propagation du virus durant toute son existence (Roeder et Harkness, 1986). Les individus PI, de qui seule une souche NCP peut être isolée, pourront ensuite succomber de la maladie des muqueuses (MD) après quoi les deux biotypes pourront être isolés (Brownlie *et al.*, 1984). Étant donné que ces deux souches, i.e. la CP et la NCP, sont semblables antigéniquement, il est probable que la souche NCP subisse des mutations

conduisant au développement de la souche CP (Howard *et al.*, 1987; Corapi *et al.*, 1988). Des études tentant de différencier les biotypes CP et NCP ont révélé que les souches CP expriment un polypeptide de 80 kDa (p80) ne pouvant pas être identifié chez les cellules infectées avec des souches NCP (Pocock *et al.*, 1987; Donis et Dubovi, 1987a; Magar *et al.*, 1988a). Plutôt, ces dernières produisent un polypeptide de 125 kDa (p125) qui est le précurseur de la p80 (Collett *et al.*, 1988b). Il a donc été suggéré que la mutation, entraînant éventuellement la MD, se produisait dans la région codant pour la p125 de la souche NCP des animaux PI (Donis et Dubovi, 1987a). Dans le but de définir plus précisément la nature de la mutation, la caractérisation génomique de la p125 de plusieurs souches CP fut entreprise. Ces études ont mis en évidence divers réarrangements complexes provoqués suite à un phénomène de recombinaison impliquant l'ARN génomique du BVDV (Meyers *et al.*, 1989b; 1991; 1992; Qi *et al.*, 1992). Ces réarrangements mènent à la production de la p80 par duplication du gène de la p80 (Meyers *et al.*, 1991; Qi *et al.*, 1992; Meyers *et al.*, 1992) ou par clivage protéolytique de la p125 produisant la p54 par la même occasion (Collett *et al.*, 1988b; Wiskerchen et Collett 1991; Tautz *et al.*, 1993). Néanmoins, une étude récente indique que plusieurs souches ou isolats CP ne possèdent pas de réarrangement au niveau du gène de la p125 (Greiser-Wilke *et al.*, 1993). Meyers *et al.* (1992) ont indiqué que le génome des souches Oregon et Singer possédaient une taille suggérant l'absence de duplication du gène de la p80. De plus, ces deux souches CP ne possèdent pas d'insertion entre le gène de la p54 et celui de la p80 (De Moerlooze *et al.*, 1990; Meyers *et al.*, 1992; Greiser-Wilke *et al.*, 1993). Ainsi, les souches Oregon et Singer produiraient la p80 à partir du

précurseur p125 par un mécanisme différent de celui de l'insertion/duplication. Jusqu'à maintenant, l'absence de réarrangement du gène de la p125 chez les souches CP n'a pas été supportée par des études approfondies portant sur le séquençage génomique complet de ce même gène. Dans la première partie de cette étude, nous avons étudié la région complète du gène de la p125 des deux souches CP Singer et Oregon ainsi que celle de deux souches NCP (NY-1 et Draper). Le but étant d'identifier soit des réarrangements mineurs imperceptibles sans l'étude détaillée du génome, soit des mutations ponctuelles pouvant différencier spécifiquement les souches CP Oregon et Singer des souches NCP. L'une ou l'autre de ces modifications pourraient peut-être expliquer l'origine de la p80 chez cette catégorie de souches CP.

Mis à part la MD, une infection au BVDV résulte généralement en une légère diarrhée suivie de l'apparition d'anticorps neutralisants permettant une guérison rapide (Radostits et Littlejohns, 1988). Toutefois, lors de récentes épidémies aux États-Unis, de sévères thrombocytopénies pouvant entraîner la mort de l'animal furent associées à des infections aiguës au BVDV (Rebhun *et al.*, 1989; Corapi *et al.*, 1989; 1990). Les souches responsables de cette maladie furent isolées et semblent plus virulentes que les souches de BVDV classiques (Bolin et Ridpath, 1992).

Plusieurs épidémies de BVDV, également associées avec des infections aiguës mortelles, ont entraîné des pertes économiques sévères parmi les veaux lourds et, de plus en plus, parmi les animaux plus âgés au Canada. En 1993, le taux de mortalité chez

les veaux lourds dans la province de Québec a quadruplé et a été estimé à 31.5% pour les veaux de grain et à 17.1% pour les veaux de lait (Dr. G. Rivard, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), Gouvernement du Québec, communication personnelle). Comme la région 5' non-codante du BVDV pourrait potentiellement jouer un rôle sur le niveau de virulence d'une souche, nous avons ciblé cette région dans le but de différencier les isolats hautement pathogènes associés aux récentes épidémies. Les séquences obtenues ont également été comparées à celles d'autres isolats, à celles de certaines souches de laboratoire et à celles de deux souches thrombocytopéniques.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Historique

C'est à Ithaca, dans l'état de New York, que furent décrits les symptômes d'une "nouvelle maladie bovine transmissible" (Olafson *et al.*, 1946) qui se caractérisait par une diarrhée, des lésions buccales, une leucopénie, une hyperthermie et des avortements. Si la morbidité était très élevée, le taux de mortalité était quant à lui très faible. En réussissant à transmettre la maladie à des animaux susceptibles à partir de sang exempt de bactéries, il fut conclu qu'un agent viral était responsable de cette maladie qui fut nommée "diarrhée virale bovine" (bovine viral diarrhea, BVD) (Olafson *et al.*, 1946; Olafson et Rickard, 1947).

Simultanément, dans la province de la Saskatchewan, Childs (1946) décrit une "maladie bovine X" aux symptômes similaires, mais beaucoup plus sévères. En plus d'une forte diarrhée sanguinolente, les bovins montraient des lésions érosives importantes au niveau des muqueuses du système digestif, des voies respiratoires et du système urogénital. Les quelques animaux atteints étaient voués à une mort quasi certaine. Plus tard, Ramsey et Chivers (1953) firent les mêmes observations que Childs et tentèrent, sans succès, de reproduire la maladie de façon expérimentale. Ils ont avancé le terme "maladie des muqueuses" (mucosal disease, MD) afin de décrire ces symptômes.

Les premières études du virus en culture cellulaire ont suggéré que l'agent causant la BVD serait non-cytopathogène (NCP) (Lee et Gillespie, 1957) tandis que celui causant

la MD serait cytopathogène (CP) (Underdahl *et al.*, 1957). Par contre, une souche CP isolée d'un cas de BVD donnait les symptômes de la BVD lorsqu'injectée à un animal susceptible (Gillespie *et al.*, 1960); un certain rapprochement se créait donc entre les deux agents viraux.

Ainsi, peu de temps après, des tests de séroneutralisation révélèrent l'existence d'une analogie antigénique entre des souches reconnues pour causer la BVD et des souches responsables de la MD (Gillespie *et al.* 1961; Kniazeff *et al.*, 1961). Mais ce n'est qu'en 1963, grâce à une approche clinique combinée à une approche sérologique, que Thomson et Savan (1963) établirent que les deux syndromes étaient causés par le même agent viral, quoique certaines différences entre les souches pouvaient exister. À partir de ce moment, le virus prenait comme seul nom: virus de la diarrhée virale bovine (bovine viral diarrhea virus; BVDV).

Quelques années plus tard, des études étiologiques plus poussées ont démontré la présence d'animaux infectés de façon persistante par le BVDV (Malmquist, 1968). Comme seuls ces animaux dits PI (persistently infected) pouvaient succomber à la MD (Malmquist, 1968; Liess *et al.*, 1974), un intérêt particulier leur fut apporté et, en reproduisant expérimentalement la persistance, il fut conclu que seules des souches NCP pouvaient provoquer cette immunotolérance (McClurkin *et al.*, 1984). Un pas de plus vers la compréhension de la pathogenèse de la MD fut réalisé lors d'analyses d'isolats prélevés chez des animaux PI et chez des animaux morts de MD: uniquement des

souches NCP pouvaient être isolées des premiers comparativement aux seconds où les deux biotypes, CP et NCP, étaient retrouvés (Brownlie *et al.*, 1984). Il fut ensuite démontré que les membres d'une paire, c'est-à-dire la souche CP et la souche NCP provenant d'un même animal atteint de MD, étaient identiques antigéniquement (Howard *et al.*, 1987). Il semblait donc plus probable que les symptômes de la MD se développaient suite à une mutation donnant le caractère CP à la souche NCP présente chez l'animal PI.

2. Classification du BVDV et des virus voisins

Il existe deux autres virus reliés au BVDV: le virus de la fièvre porcine classique (classical swine fever virus, CSFV ou hog cholera virus, HoCV), dont la nature virale fut révélée en 1904 (De Schweinitz et Dorset, 1904), et un virus de mouton, le virus de la maladie des frontières (border disease virus, BDV) qui fut décrit pour la première fois en 1959 (Hughes *et al.*, 1959).

Le genre des pestivirus fut proposé pour la première fois en 1973 afin de regrouper le BVDV et le HoCV (Horzinek, 1973); plus tard, le BDV sera inclu dans ce groupe à la suite d'évidences le rapprochant du BVDV (Acland *et al.*, 1972; Hamilton et Timoney, 1972). Suivant l'approbation du terme, les pestivirus furent classés dans la famille des *Togaviridae* (Fenner, 1975/76) qui comptait alors trois autres genres:

alphavirus, flavivirus et rubivirus. Par contre, l'accumulation de données moléculaires imposa certaines modifications dont la création du genre des arterivirus et le passage des flavivirus comme unique genre de la nouvelle famille des *Flaviviridae* (Westaway *et al.*, 1985). Après avoir démontré, du point de vue de l'organisation génomique et de la stratégie de réplication, que les pestivirus ressemblaient beaucoup plus aux flavivirus qu'aux autres membres des *Togaviridae* (Collett *et al.*, 1988c), les pestivirus furent reclassifiés dans la famille des *Flaviviridae* qui accueillit simultanément le groupe du virus de l'hépatite C (HCV) (Francki *et al.*, 1991).

Néanmoins, des études plus récentes démontrent qu'il existe certaines différences majeures entre les pestivirus et les flavivirus en ce qui concerne l'organisation du génome (Thiel *et al.*, 1991), la structure de l'ARN génomique (Brock *et al.*, 1992) ainsi que la structure et la composition du virion (Thiel *et al.*, 1991). Ces observations viennent donc appuyer ceux qui s'étaient opposés à la reclassification rapide des pestivirus vers les *Flaviviridae* (Meyers *et al.*, 1989a; Moormann *et al.*, 1990; Weiland *et al.*, 1990), et amènent l'idée de création d'une nouvelle famille, les *Pestiviridae*, afin de recevoir le genre des pestivirus (Thiel *et al.*, 1991; Koonin, 1993; Hulst *et al.*, 1994).

3. Morphologie du BVDV

Différentes caractéristiques du BVDV rendent difficile sa purification et son identification *in situ* et, ainsi, retardent grandement les études portant sur sa morphologie. Parmi ces caractéristiques, notons un titre faible en culture cellulaire, une densité semblable à celle des constituants subcellulaires, la fragilité des virions, la labilité des sites antigéniques ainsi que l'intimité des liens entre les particules virales et les membranes cellulaires (Horzinek, 1981; Bielefeldt Ohmann, 1990). Malgré tout, certains traits du BVDV ont pu être déterminés: il s'agit d'une particule pléomorphique, généralement sphérique, dont le diamètre varie de 35 à plus de 100 nm (Hermodson et Dinter, 1962; Hafez *et al.*, 1968; Chu et Zee, 1984; Ward et Kaeberle, 1984, Magar et Lecomte, 1987). Le virus est muni d'une enveloppe bilipidique de 5-7 nm (Chu et Zee, 1984) entourant une nucléocapside isométrique ou hexagonale (Bielefeldt Ohmann, 1990) d'un diamètre de 20-25 nm (Gray et Nettleton, 1987). Des projections de surface de 4-12 nm seraient également présentes (Chu et Zee, 1984; Magar et Lecomte, 1987).

4. Composition du virion

4.1 Acides nucléiques

La nature ribonucléique du génome du BVDV fut dévoilée lors d'expériences démontrant que la multiplication virale n'était pas altérée en présence de déoxyuridines

halogénés, composés inhibant la synthèse d'ADN (Hermodsson et Dinter, 1962). Les études subséquentes révélèrent que cet ARN génomique était monocaténaire (Hafez et Liess, 1972) et toujours infectieux une fois extrait du virion (Diderholm et Dinter, 1966).

Les premières données concernant la longueur du génome variaient entre 8 et 12.5 kb (Pritchett *et al.*, 1975; Tableau VIII dans Horzinek, 1981; Purchio *et al.*, 1983; Renard *et al.*, 1985). Puisque ces résultats furent obtenus à la suite d'analyses par sédimentation et par électrophorèse sur gel, ce grand écart proviendrait du fait que le génome viral possède énormément de structures secondaires comme le démontre sa résistance à une faible concentration de RNase A (Purchio *et al.*, 1983). Les renseignements subséquents, obtenus du séquençage complet du génome, présentèrent une plus grande homogénéité et précisèrent une longueur se rapprochant davantage de 12.5 kb que de 8 kb. Jusqu'à présent, cinq souches de pestivirus ont été séquencées complètement, trois souches de BVDV (Osloss, NADL, SD-1) et deux souches de HoCV (Alfort, Brescia): le tableau 1 résume les données relatives à la longueur de leur génome.

Les études portant sur les extrémités du génome du BVDV ont démontré que ce dernier ne possédait pas une extrémité 3' polyadénylée puisqu'il n'était pas retenu après chromatographie sur colonne d'oligo(dT)-cellulose (Purchio *et al.*, 1983; Renard *et al.*, 1985). L'extrémité 5' fut caractérisée seulement par des évidences indirectes qui suggèrent l'absence d'une structure en coiffe (Brock *et al.*, 1992).

Tableau 1

Longueur des différentes régions du génome des 5 pestivirus
dont la séquence complète est connue.

Souches	5' UTR	Codante	3' UTR	Total
Osloss ¹	383	11,922	189	12,494
NADL ²	385	11,964	229	12,578
SD-1 ³	385	11,694	229	12,308
Alfort ⁴	363	11,694	227	12,284
Brescia ⁵	360	11,694	229	12,283

¹ Renard *et al.*, 1987; modifié par De Moerlooze *et al.*, 1993

² Collett *et al.*, 1988a; modifié par Brock *et al.*, 1992

³ Deng et Brock, 1992

⁴ Meyers *et al.*, 1989a

⁵ Moormann *et al.*, 1990

4.2 Protéines structurales

Les problèmes de purification du BVDV ont rendu difficile l'étude des polypeptides structuraux. C'est pourquoi les premiers travaux ont rapporté un nombre variable de polypeptides ayant des poids moléculaires également variables (Frost et Liess, 1973; Pritchett et Zee, 1975; Matthaeus, 1979; Coria *et al.*, 1983; Purchio *et al.*, 1984). Des données précises furent obtenues à la suite du développement d'antisérums dirigés contre des peptides provenant de l'expression de régions spécifiques du génome. Ces antisérums permirent par une immunoprécipitation suivie d'une déglycosylation, d'identifier trois glycoprotéines et de leur attribuer des poids moléculaires précis (gp53, gp48, gp25) sans toutefois prouver leur caractère structural (Collett *et al.*, 1988b). Ce dernier point fut directement démontré chez le HoCV avec un système de culture cellulaire plus performant. Dans cette étude, les glycoprotéines correspondant à celles du BVDV furent immunoprécipitées à partir de virions purifiés et ce, toujours avec des antisérums dirigés contre le produit de l'expression de régions spécifiques du génome (Thiel *et al.*, 1991). Cette même étude a permis d'établir pour la première fois, chez le HoCV et chez le BVDV, que la nucléocapside possédait un poids moléculaire de 14 kDa (p14) et non de 20 kDa comme il était suggéré jusque là (Collett *et al.*, 1989).

Des études portant sur l'arrangement précis des protéines structurales du virion démontrèrent que des ponts disulfures intermoléculaires rattachent les glycoprotéines entre elles sous forme d'homodimères (gp53-gp53; gp48-gp48) et d'hétérodimères (gp53-gp25) (Weiland *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991). De plus, la gp53 et la gp25 seraient

ancrées dans la membrane bilipidique tandis que le mécanisme associant la gp48 au virion reste encore à définir (Rümenapf *et al.*, 1993; Silva-Krott *et al.*, 1994). La protéine de capsid, la p14, pourrait être également ancrée dans l'enveloppe (Rümenapf *et al.*, 1993). D'autre part, comme des anticorps neutralisants existent contre la gp53 (Bolin *et al.*, 1988; Donis *et al.*, 1988; Magar *et al.*, 1988a) et contre la gp48 (Boulangier *et al.*, 1991; Weiland *et al.* cité dans Thiel *et al.*, 1991), ces protéines se retrouveraient à la surface du virion contrairement à la gp25 qui serait enfoncée dans l'enveloppe dû à la présence de fortes régions hydrophobes (Weiland *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991).

4.3 Lipides

La présence de lipides chez le BVDV fut montrée par la sensibilité du virus à l'éther et au chloroforme (Hermodsson et Dinter, 1962). Ces lipides, formant l'enveloppe du virion, proviendraient du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi de la cellule (Gray et Nettleton, 1987; Collett *et al.*, 1988c; Bielefeldt Ohmann, 1990). D'autres études seront cependant nécessaires pour confirmer l'origine des lipides et pour connaître la composition lipidique détaillée de l'enveloppe.

5. Cycle viral

5.1 Entrée

Lors d'études préliminaires, où des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre des cellules bovines interféraient avec l'infection du BVDV, il a été suggéré que le BVDV pénétrerait via un récepteur situé à la surface cellulaire (Teyssedou *et al.*, 1987; Moennig *et al.*, 1988). Des anticorps anti-idiotypiques polyclonaux dirigés contre des AcM neutralisants (anti-gp53) prouvèrent effectivement l'existence d'un tel récepteur possédant un poids de 50 kDa (Xue et Minocha, 1993). Cependant, ces anti-idiotypes inhibaient les différentes souches de BVDV à un degré variable, même que certaines souches n'étaient pas inhibées du tout. Il est donc probable que le BVDV utilise plusieurs récepteurs différents ou du moins plusieurs sites d'attachement sur le même récepteur afin d'entrer dans la cellule (Moennig, 1990; Xue et Minocha, 1993).

Boulangier *et al.* (1993) ont noté que la production du BVDV était réduite en présence de dansylcadaverine, qui inhibe l'internalisation de divers ligands, ou en présence de chloroquine, qui empêche la chute de pH dans les endosomes. Ceci suggère donc que le BVDV pénétrerait, après liaison au récepteur, par un mécanisme d'endocytose semblable aux alphavirus. Récemment il fut suggéré que des interactions entre la gp48 et la cellule pourraient également faciliter l'entrée du virus (Hulst *et al.*, 1994).

5.2 Traduction de l'ARN viral

5.2.1 Organisation génomique

Puisque le BVDV ne possède qu'un seul grand cadre de lecture, il y a traduction d'une seule polyprotéine (Collett *et al.*, 1988a; Deng et Brock, 1992; De Moerlooze *et al.*, 1993). Les différentes protéines virales sont retrouvées, sur la polyprotéine, dans l'ordre indiqué à la figure 1a. Cette organisation fut établie principalement par une étude d'immunoprécipitation à l'aide d'antisérums dirigés contre des peptides spécifiques provenant de l'expression de petites régions du génome de la souche NADL (Collett *et al.*, 1988b).

5.2.2 Initiation de la traduction

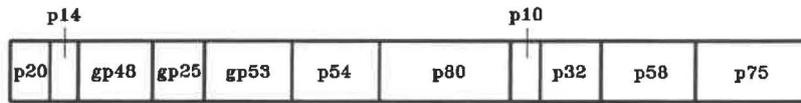
Suite à l'analyse des structures secondaires de la région 5' non-codante (5' untranslated region; 5'UTR) des pestivirus, et considérant le fait que l'ARN génomique du BVDV ne semble pas posséder de coiffe (Brock *et al.*, 1992), il fut suggéré que l'initiation de la traduction se ferait par un mécanisme indépendant de la coiffe (Deng et Brock 1993). Ainsi, la 5'UTR du BVDV posséderait un site interne d'entrée du ribosome (internal ribosome entry site, IRES) comme démontré chez les *Picornaviridae* (Pelletier et Sonenberg 1988; Jang *et al.*, 1988) et chez le virus de l'hépatite C (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992).

D'autre part, des analyses de séquences ont permis d'identifier, du côté C-terminal de la p80, des motifs semblables à ceux d'une hélicase d'ARN/NTPase

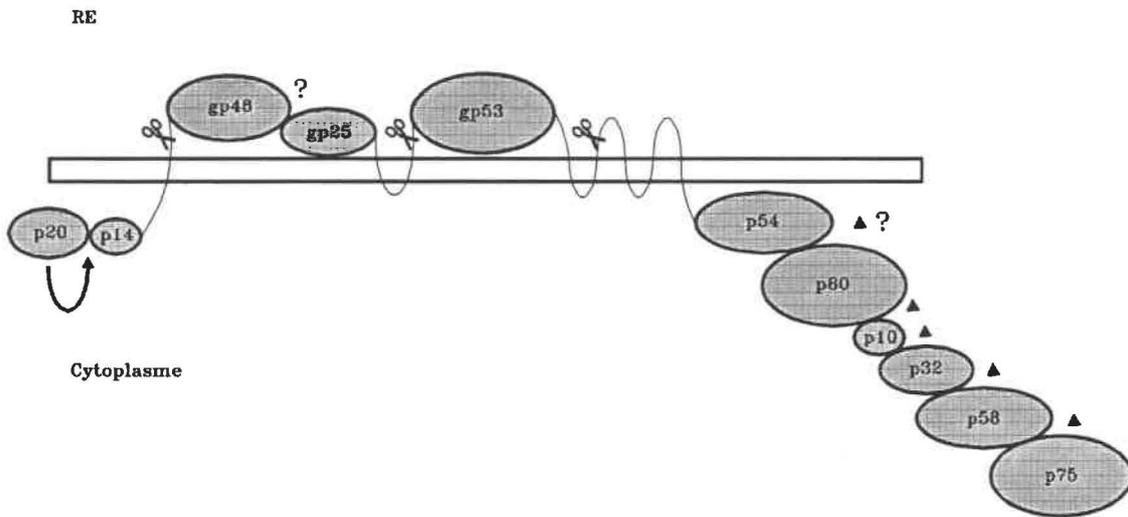
Figure 1

A) Organisation génomique des différentes protéines produites par le BVDV.
B) Mécanismes proposés pour la translocation et le clivage de la polyprotéine. Les ciseaux indiquent les clivages effectués par des signalases cellulaires, les triangles pleins ceux effectués par la p80 et les points d'interrogations représentent les sites clivés par des protéases encore inconnues. La flèche recourbée représente l'activité autocatalytique de la p20. Notons que le clivage du site p54/p80 pourrait être effectué par la p80, mais certains points demeurent obscurs à ce niveau. Adaptée de Rügenapf *et al.* (1993).

Ⓐ



Ⓑ



(Gorbalenya *et al.*, 1989b). Il existe des évidences expérimentales démontrant la présence d'une telle activité NTPase stimulée par l'ARN monocaténaire, mais l'activité hélicase, associée à cette activité NTPase, reste encore à prouver (Tamura *et al.*, 1993). La p80 hélicase, ou le précurseur p125, pourrait être impliquée dans l'initiation de la traduction de la même façon que le facteur cellulaire eIF-4A qui agit en éliminant les structures secondaires de l'ARNm et qui est une hélicase d'ARN/ATPase (Rozen *et al.*, 1990).

5.2.3 Traduction

La traduction débute dans le cytoplasme puis se poursuit en association avec le réticulum endoplasmique (RE) où il y a translocation dû à la présence d'une séquence "signal" interne située entre la p14 et la gp48 (Rümenapf *et al.*, 1993; Silva-Krott *et al.*, 1994) (figure 1b). Ensuite, le transfert serait interrompu à cause de deux régions hydrophobes situées en aval de la gp25, la première jouant le rôle d'un signal d'arrêt du transfert et la seconde, celle d'une séquence "signal" servant à la reprise du transfert de la gp53. Ce dernier se poursuivrait jusqu'à la présence d'une série de signaux d'arrêt et de reprise du transfert situés juste en aval de la gp53 (Rümenapf *et al.*, 1993). La suite de la traduction, celle des protéines non-structurales, n'est pas encore détaillée, mais elle se poursuivrait majoritairement au niveau du cytoplasme.

5.2.4 Voie de clivage de la polyprotéine

Le clivage de la polyprotéine s'effectue, par l'intermédiaire de divers précurseurs polypeptidiques (figure 2), de façon co- et post-traductionnelle (Collett *et al.*, 1988c).

5.2.4.1 Rôle des protéases cellulaires

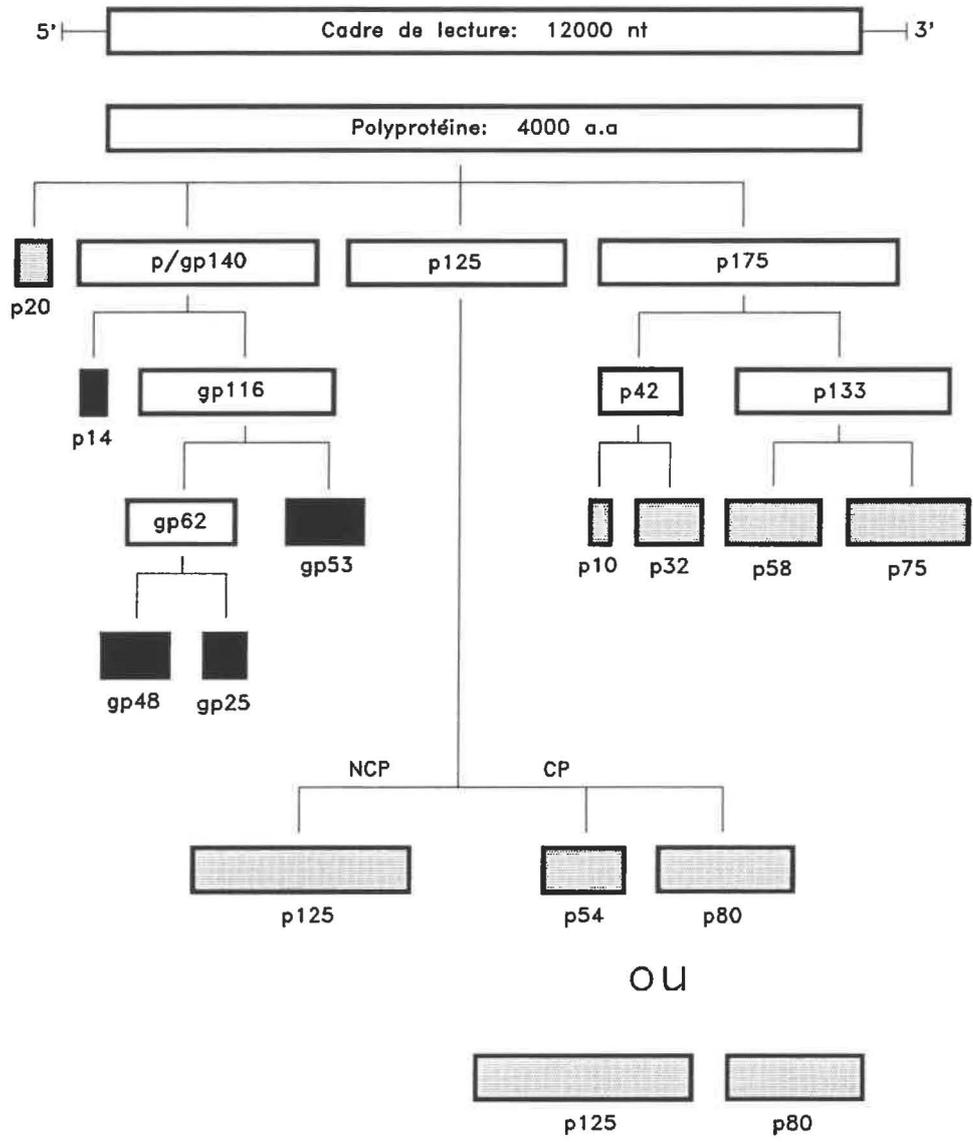
Comme indiqué à la figure 1b, des signalases cellulaires seraient responsables du clivage des sites p14/gp48, gp25/gp53 et gp53/p54. Le clivage du site gp48/gp25 serait effectué par une protéase cellulaire dont l'origine demeure encore à déterminer (Wiskerchen *et al.*, 1991; Rümenapf *et al.*, 1993). Mis à part le site gp53/p54, le site exact de ces clivages fut déterminé par séquençage du côté N-terminal de la gp48, de la gp25 et de la gp53. Même si cette étude portait sur le HoCV, tout porte à croire que ces sites seraient les mêmes pour le BVDV (Rümenapf *et al.*, 1993).

5.2.4.2 Rôle de la p20

Il s'agit d'une protéase virale responsable du clivage *en cis* du site p20/p14, c'est-à-dire entre les acides aminés 168-169 de la polyprotéine de NADL (Wiskerchen *et al.*, 1991; Stark *et al.*, 1993). Ce clivage, qui se produit très rapidement, n'est toutefois pas requis pour permettre le clivage des sites en aval (Wiskerchen *et al.*, 1991). Le rôle précis de la p20 demeure encore inconnu.

Figure 2

Voie de clivage de la polyprotéine du BVDV. Les rectangles blancs représentent des précurseurs polypeptidiques tandis que les rectangles noirs et gris représentent respectivement les protéines structurales et non-structurales. La destinée de la p125 n'est pas la même pour une souche NCP (aucun clivage) que pour une souche CP (réarrangements conduisant au clivage). Adaptée de Collett (1992).



5.2.4.3 Rôle de la p125 (p54 + p80)

Notons que dans le cas où des activités associées à la p80 ou à la p54 sont discutées, il est sous-entendu que le précurseur p125 possède les activités combinées de ces deux polypeptides en jouant, en quelque sorte, le rôle d'une protéine de fusion stable (Collett, 1992). Ceci est très important considérant le fait que les souches NCP ne génèrent que la p125 et que certaines souches CP produisent une p125 et une p80 sans produire de p54 (voir section 6).

Par homologie avec des séquences consensus, il fut suggéré que l'extrémité N-terminale de la p80 pourrait représenter une sérine-protéase ayant pour site actif la triade His-Asp-Ser (Gorbalenya *et al.*, 1989a; Bazan et Fletterick, 1989). Cette activité fut ensuite vérifiée par l'expression de la région du génome codant pour les protéines structurales de la souche CP NADL, en omettant toutefois la majeure partie de la p54, et par mutagenèse dirigée sur le site actif proposé de la p80 (Wiskerchen et Collett, 1991). Réalisée chez des cellules de mammifères, cette étude démontra que la p80 est réellement une sérine-protéase qui est responsable du clivage, *en cis*, des sites p54/p80 et p80/p10 et, *en trans*, des sites p10/p32, p32/p58 et p58/p75 (figure 1b). Le site p58/p75 nécessiterait la présence d'un cofacteur ou d'une condition spéciale pour être clivé. Une deuxième étude identique, mais dans un système baculovirus, donna les mêmes résultats sauf au niveau du site p54/p80 qui ne fut pas clivé; d'autres études à ce sujet seront donc nécessaires (Petric *et al.*, 1992). Notons que l'équivalent de la p54 chez l'HCV, la p21, possède une activité métalloprotéase intervenant dans le clivage du

site analogue au site p54/p80 du BVDV (Hijikata *et al.*, 1993). De plus, chez le virus dengue de type 4 (DEN4), un flavivirus, un domaine essentiel au clivage du site NS2B/NS3, correspondant au site p54/p80, fut identifié dans la protéine NS2B (Falgout *et al.*, 1993). Toutefois, aucune de ces deux caractéristiques majeures ne fut démontrée pour la p54 du BVDV qui pourrait, néanmoins, jouer un rôle similaire.

5.2.4.4 Rôle de la p10 et de la p32

Le rôle de ces polypeptides est encore obscur quoique la p32 pourrait être le cofacteur nécessaire à la p80 lors du clivage du site p58/p75 (Wiskerchen et Collett, 1991). Une étude récente, chez l'HCV, suggère que la p10 serait également nécessaire pour compléter l'activité de la p80 dans le clivage de certains sites situés plus en aval (Failla *et al.*, 1994).

5.3 Réplication de l'ARN viral

5.3.1 Rôle de la p125 (p54 + p80)

Puisque la p54 est munie d'une extrémité amino-terminale très hydrophobe et qu'elle contient un domaine ressemblant à celui d'un doigt de zinc ("zinc finger"), elle pourrait simultanément s'ancrer aux membranes et interagir avec l'ARN viral. Ainsi, son rôle pourrait être de maintenir le complexe de réplication en place et/ou de régulariser la réplication elle-même (De Moerlooze *et al.*, 1990; Collett, 1992). Quant à la p80, son activité hélicase mentionnée ci-haut (section 5.2.2) pourrait également être impliquée dans la réplication de l'ARN viral (Tamura *et al.*, 1993).

5.3.2 Rôle de la p133 (p58 + p75)

Le précurseur p133 est clivé pour donner une protéine stable, la p58, et une protéine transitoire, la p75. Comme le motif "Gly-Asp-Asp" est présent chez tous les ARN polymérase virales (Kamer et Argos, 1984), et que la polyprotéine du BVDV ne possède ce motif que dans la p75, il est fort possible que cette dernière représente l'ARN polymérase dépendant de l'ARN (Collet *et al.*, 1988c). La p58 jouerait également un rôle, encore inconnu, dans la réplication de l'ARN viral (Collett, 1992). Quant à la p133, elle pourrait représenter une forme de réplicase alternative permettant, avec la p75, d'assurer la synthèse des brins négatif et positif du BVDV (Collett, 1992).

5.4 Maturation et sortie

Au cours de la traduction des protéines virales, il y a accumulation de matériel fibrillaire qui sera graduellement internalisé dans des vésicules formées à la suite d'interactions entre diverses structures membranaires. L'assemblage final des virions se produit au niveau de ces vésicules à l'intérieur desquelles les virions matures sont retrouvés (Bielefeldt Ohmann et Bloch, 1982). Puisque les glycoprotéines du virion mature sont organisées exclusivement sous forme hétérodimérique ou homodimérique, cette dimérisation pourrait avoir un rôle très important dans l'assemblage du BVDV (Rümenapf *et al.*, 1993).

La sortie des virions semble se produire par désintégration des vésicules après la mort cellulaire. Par contre, lorsque les cellules demeurent physiologiquement

fonctionnelles, principalement dans le cas des souches NCP, la sortie pourrait se produire par un mécanisme d'exocytose entre la membrane plasmique et les vésicules renfermant les virions (Bielefeldt Ohmann et Bloch, 1982). Notons que le bourgeonnement d'une particule virale seule n'a jamais été observé au niveau de la membrane plasmique (Gray et Nettleton, 1987).

6. Diversité du BVDV

6.1 Variations génomiques

Comme le BVDV est un virus à ARN et que le taux de mutation de ces virus est d'environ 10^{-3} à 10^{-4} mutations par nucléotide incorporé (Holland *et al.*, 1982), il est normal de rencontrer plusieurs mutations ponctuelles d'une souche à l'autre (et même d'une particule à l'autre) donnant à chacune son "empreinte personnelle". Ces mutations ponctuelles, de type silencieuse ou faux-sens, sont plus ou moins nombreuses selon la région du génome. En effet, la région codant pour la p80 est la plus conservée tandis que les régions codant pour la p54 et la gp53 sont les plus variables (Deng et Brock, 1992).

Des délétions sont également rencontrées autant dans les régions codantes que non-codantes. En ce qui à trait aux régions non-codantes du BVDV, il s'agit généralement de délétions mineures, i.e. moins de cinq bases à la fois, quoiqu'une

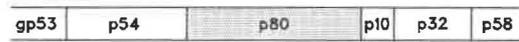
délétion de 41 bases est notée dans la région 3' non-codante de la souche Osloss. (tableau 1; De Moerlooze *et al.*, 1993; Qi *et al.*, 1993). Jusqu'à présent, une seule étude fait état d'une délétion au niveau des régions codantes et elle représente le tiers du génome, soit 4.3 kb. Toutefois cette souche n'est pas autonome pour sa réplication puisqu'il s'agit d'une particule défective (Tautz *et al.*, 1994)

Par ailleurs, des insertions sont rapportées chez plusieurs souches de BVDV et elles se situent toujours dans la région codant pour la p125 (p54/p80) (figure 3). Si l'insertion retrouvée chez la souche NADL représente un ARN d'origine cellulaire de fonction inconnue (Meyers *et al.*, 1990, cité dans Meyers *et al.*, 1991), celle d'Osloss, également d'origine cellulaire, représente l'ARN codant pour l'ubiquitine (Meyers *et al.*, 1989b). Le rôle cellulaire normal de l'ubiquitine est révisé par Finley et Chau (1991) et par Hershko et Ciechanover (1992). L'insertion d'ubiquitine, en une ou plusieurs copies, fut retrouvée dans plusieurs autres cas par la suite (Meyers *et al.*, 1991; Qi *et al.*, 1992). D'autre part, deux souches se sont avéré contenir une insertion d'origine virale soit la région codant pour la p20 du BVDV (Meyers *et al.*, 1992). De plus, ces insertions peuvent être accompagnées d'une duplication totale ou partielle de la région codant pour la p80. L'importance de ces réarrangements sera discutée à la section 6.3 (variations biotypiques).

Figure 3

Compilation des génomes des différentes souches CP possédant des insertions et des duplications au niveau de leur p125. Ces réarrangements conduisent à la production de la p80. Le premier génome de la liste correspond à une souche NCP i.e. sans insertion ni duplication.

Sans
Inser./Dupli.



NADL



OSLOSS



CP1



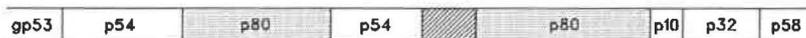
190



TGAC



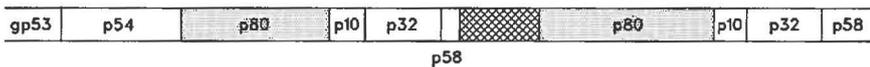
III-C



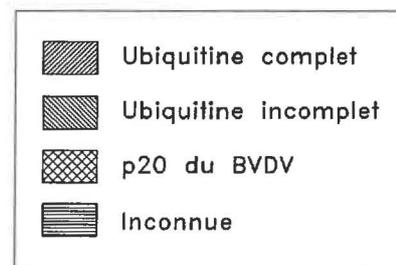
Pe515 CP



CP6



p58



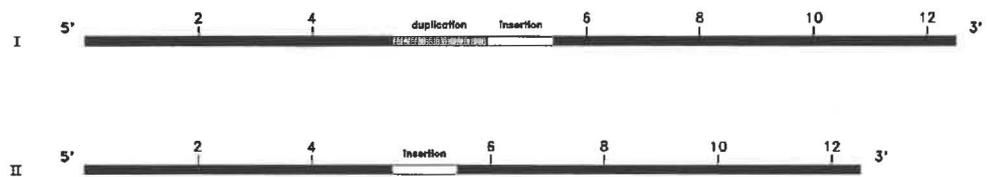
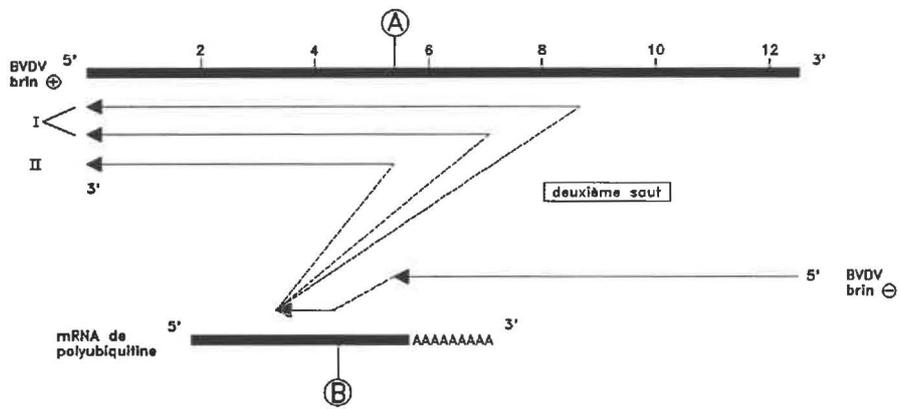
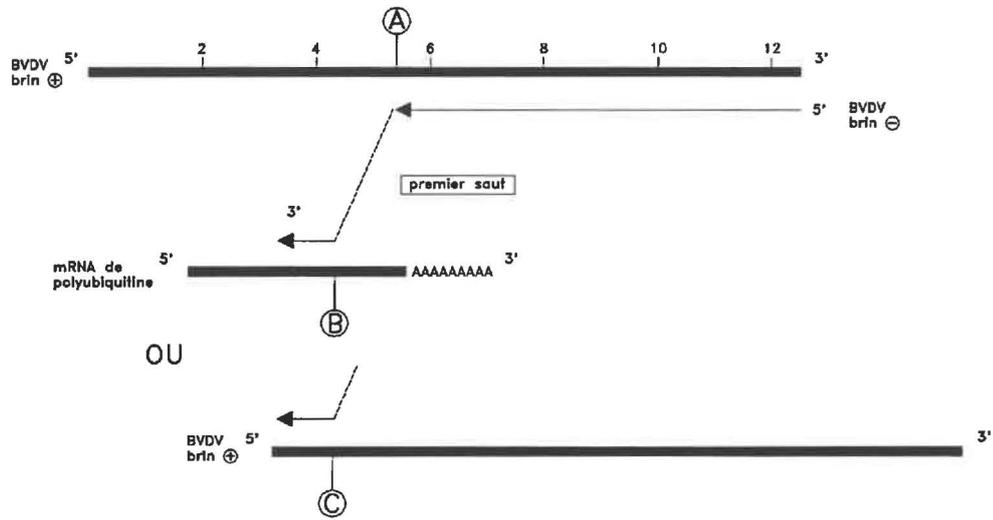
L'hypothèse expliquant la présence d'une insertion/duplication serait celle du double changement de gabarit ("template switch") pendant la synthèse du brin viral négatif (Meyers *et al.*, 1991; Qi *et al.*, 1992). Selon cette hypothèse, schématisée à la figure 4, le premier saut de l'ARN polymérase se ferait de façon homologue à partir du gabarit "BVDV" vers le gabarit "insertion". Ensuite, l'ARN polymérase reviendrait sur son gabarit "BVDV", mais de façon hétérologue causant une simple insertion ou une insertion/duplication. Le deuxième saut serait hétérologue car la région du génome du BVDV située immédiatement en 5' de l'insertion diffère d'une souche à l'autre; ce serait d'ailleurs pourquoi certaines souches contiennent, en plus de la duplication de la région de la p80, la duplication des régions voisines à cette dernière (Qi *et al.*, 1992).

6.2 Variations antigéniques

Il existe un grand nombre de variants antigéniques du BVDV se traduisant par l'inefficacité des vaccins à induire des anticorps neutralisants contre toutes les souches du BVDV (Bolin *et al.*, 1991b) et par le fait qu'un animal PI produira des anticorps contre toute souche antigéniquement différente de la souche NCP créant l'immunotolérance (Brownlie, 1990a). Plus directement, il est possible de démontrer cette variation à l'aide d'AcM, principalement dirigés contre la gp53. Selon les AcM utilisés, et selon le profil de réaction obtenu face aux isolats, il fut possible de diviser le BVDV en 2, 3, 4 ou 6 groupes (Edwards *et al.*, 1988; Magar *et al.*, 1988b; Bolin *et al.*, 1988; Xue *et al.*, 1990). D'autre part, l'étude des épitopes des souches Oregon C24V et NADL a permis de démontrer que des mutants résistants à un AcM spécifique étaient

Figure 4

Schématisation du double saut de gabarit proposé pour expliquer la présence d'insertion ou d'insertion/duplication dans le génome de certaines souches CP du BVDV. Le premier saut se ferait de façon homologue (A vers B ou C) tandis que le deuxième saut se ferait de façon hétérologue résultant en une insertion/duplication (I) ou en une simple insertion (II). Adaptée de Meyers *et al.* (1991).



obtenus à la suite d'une seule mutation ponctuelle, indiquant un potentiel de variations antigéniques très rapide (Paton *et al.*, 1992). Ce haut degré de variabilité du BVDV fait en sorte que de nombreuses différences antigéniques sont rencontrées chez des souches portant le même nom, mais provenant de laboratoires différents, i.e. possédant des antécédents de passages cellulaires différents (Cay *et al.*, 1989).

6.3 Variations biotypiques

Il existe deux biotypes du BVDV pouvant être différenciés d'une part par la présence/absence d'un effet cytopathique (ECP) en culture cellulaire (Gillespie *et al.*, 1960) et d'autre part par la présence/absence d'une protéine de 80 kDa, la p80 (Pocock *et al.*, 1987; Donis et Dubovi, 1987a; Magar *et al.*, 1988a). Le biotype cytopathogène (CP) génère la p80 alors que cette même protéine est absente chez les cellules infectées par le biotype non-cytopathogène (NCP). Aucune relation de cause à effet n'est encore établie entre la présence de la p80 et l'ECP, mais il est suggéré que l'activité protéase de la p80 serait plus destructrice pour les cellules infectées lorsque la p80 est libre (biotype CP) plutôt que lorsqu'elle est sous forme de p125 (biotype NCP). Liée à la p54, qui est fortement hydrophobe, la p80 des souches NCP ne serait limitée qu'à certaines régions de la cellule (Wiskerchen et Collett, 1991). Par contre, la présence de la p80 en absence d'ECP fut notée chez des cellules infectées par les deux biotypes suggérant que la p80 pourrait ne pas être impliquée aussi directement dans l'ECP (Ridpath et Bolin, 1990). En effet, il se peut que des facteurs cellulaires soient également nécessaires puisque la souche NY-1 est NCP pour un type cellulaire, mais

faiblement CP pour un autre (Johnson et Rosenbusch, 1990).

Dans la population bovine, le biotype NCP, considéré comme le BVDV typique, est davantage rencontré que le CP (Moennig et Plagemann, 1992). En fait, les souches CP proviendraient des souches NCP à la suite de divers réarrangements génomiques (voir section 3.1). Ces réarrangements, se produisant au niveau de la région codant pour la p125, conduisent à la production de la p80 par différents mécanismes (voir figure 2 et 3). L'insertion d'ubiquitine génère la p80 via un clivage en C-terminal de l'ubiquitine par l'ubiquitine C-terminal hydrolase, une protéase cellulaire (Tautz *et al.*, 1993). Quant à l'insertion de la p20, ce serait grâce à son activité autocatalytique en *cis* qu'elle engendrerait la p80 (Meyers *et al.*, 1992). Par contre, certaines souches CP (e.g. Singer et Oregon) ne semblent pas posséder de réarrangements au niveau de leur p125 et produisent la p80 par un mécanisme inconnu (Meyers *et al.*, 1992; Greiser-Wilke *et al.*, 1993).

Très récemment, l'analyse d'un isolat, produisant un ECP en culture cellulaire, a mis en évidence un nouveau phénomène conduisant au développement du caractère CP. En effet, cet isolat était constitué d'une souche NCP servant de virus-auxiliaire à une particule défective, exprimant la p80, mais incapable de réplication autonome (Tautz *et al.*, 1994). Ce virus défectif possédait la délétion du gène de la p54 et celle de tous les gènes structuraux. Ainsi, la p20 se retrouvait directement en amont de la p80; la p80 étant donc libérée par le mécanisme décrit ci-haut.

Finalement, les souches CP et NCP ne peuvent être divisées en ces deux mêmes groupes d'un point de vue antigénique à l'aide d'AcM ou d'antisérums (Howard *et al.*, 1987; Corapi *et al.*, 1988; Bolin *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1988; Xue *et al.*, 1990). Il ne semble donc pas y avoir de lien entre la variation antigénique et la variation biotypique du BVDV.

7. Aspects cliniques et pathogénèse

7.1 Infections aiguës

L'infection initiale au BVDV se produit généralement au niveau de la muqueuse oronasale pour ensuite s'étendre de façon systémique, le virus voyageant librement dans le sérum ou en association avec les lymphocytes et les monocytes (buffy coat fraction) (Brownlie, 1990b).

Il a été estimé que 60 à 90% des bovins adultes possédaient des anticorps neutralisants contre le BVDV (Liess *et al.*, 1974; Harkness *et al.*, 1978). Toutefois, ce taux de séroconversion ne reflète pas celui des maladies cliniques puisque 70 à 90% des infections aiguës au BVDV sont classées comme sous-cliniques (Ames, 1986). Un suivi méticuleux des cas sous-cliniques révèle néanmoins une faible leucopénie et une légère hyperthermie (Brownlie, 1990b). L'infection clinique, soit la diarrhée virale bovine, se produit chez des bovins âgés de 6 à 24 mois (Blood *et al.*, 1983) et résulte en une toux,

une dépression, une leucopénie, une anorexie, des sécrétions nasales, une faible diarrhée et parfois des lésions orales (Pritchard, 1963; Baker, 1987). Que la maladie soit clinique ou non, la virémie pourra persister jusqu'à deux semaines après l'infection, période pendant laquelle le virus sera excrété en faible concentration (Duffell et Harkness, 1985). Le développement des anticorps neutralisants surviendra au bout de 3 à 4 semaines post-infection (Duffell et Harkness, 1985) et cette immunisation persiste de 2 semaines à 22 mois (Huck, 1957; Pritchard, 1963) quoiqu'une persistance à vie, avec une légère baisse au cours des années, est aussi décrite (Duffell et Harkness, 1985).

Même si la majorité des infections aiguës sont sous-cliniques, il existe une possibilité de maladies secondaires plus sévères dû à l'immunosuppression passagère qu'engendre une infection au BVDV. C'est d'ailleurs ce que montre l'étude de Reggiardo et Kaeberle (1981) où 85% des animaux infectés par le BVDV étaient également bactériémiques. Outre la leucopénie touchant principalement les cellules B, les cellules T et les neutrophiles (Bolin et al., 1985a; Ellis *et al.*, 1988), le BVDV cause une baisse de la production d'interféron (Malmquist, 1968), une diminution du chimiotactisme des monocytes (Ketlesen *et al.*, 1979) et une altération de la sécrétion d'immunoglobuline par les lymphocytes périphériques (Muscoplat *et al.*, 1973; Atluro *et al.*, 1979). Les agents pathogènes profitant de cette immunosuppression causeront généralement des maladies entériques: *Salmonella* spp. (Wray et Roeder, 1987), rotavirus et coronavirus (Van Openbosch *et al.*, 1981) ou des maladies respiratoires: virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Grieg *et al.*, 1981), virus respiratoire syncytial bovin (Brownlie,

1990b) et *Pasteurella haemolytica* (Potgieter *et al.*, 1984)

Plus récemment, aux États-Unis, des symptômes très sévères (e.g. thrombocytopénie, hémorragie) et des taux élevés de mortalité furent associés à des infections aiguës au BVDV (Rebhun *et al.*, 1989). La reproduction expérimentale de la maladie chez des animaux exempts de BVDV et séronégatifs prouva qu'il s'agissait bien d'infections aiguës et que des souches NCP, plus virulentes que les souches de BVDV normales, étaient impliquées (Corapi *et al.*, 1989, 1990; Bolin et Ridpath, 1992). Il semble peu probable que la baisse de la concentration des plaquettes sanguines soit due à l'infection des mégacaryocytes de la moelle osseuse puisque cette infection n'est pas rencontrée chez tous les animaux thrombocytopéniques. La thrombocytopénie serait plutôt causée par l'action directe du BVDV sur les plaquettes sanguines sans que les immunoglobulines de l'hôte n'interviennent (Corapi *et al.*, 1990; Bolin et Ridpath, 1992).

De façon similaire, au Canada, de fortes épidémies mortelles, associées à des infections aiguës au BVDV, touchent les élevages de veaux lourds du Québec et de l'Ontario depuis l'automne 1992. Le taux de mortalité, autant chez les veaux de lait que chez les veaux de grain du Québec, a quadruplé en 1993 par rapport à 1991 (tableau 2) (Dr G. Rivard, communication personnelle). Dans la majorité des cas, les symptômes thrombocytopéniques et hémorragiques ne furent cependant pas observés lors de cette épidémie.

Tableau 2

Taux de mortalité chez les veaux lourds du Québec
au cours des trois dernières années

	1991	1992	1993*
Veaux de lait	4.5 %	5.8 %	17.1 %
Veaux de grains	7.8 %	13.1 %	31.5 %

* Données correspondant à 6 mois (janvier à juin)

7.2 Infections congénitales

Le BVDV est un virus capable de traverser le placenta de façon très efficace si une vache séronégative subit une infection aiguë en cours de gestation (Duffell et Harkness, 1985). Pour la vache gestante les symptômes seront les mêmes que décrits précédemment (voir section 7.1). Par contre, la réponse foetale au BVDV dépendra du biotype de la souche virale ainsi que de l'âge du foetus au moment de l'infection (Brownlie, 1990b).

7.2.1 Effet du biotype viral

En début de gestation (avant 100 jours), les conséquences d'une infection par l'un ou l'autre des biotypes sont peu différentes. Il y aura donc des avortements, des momifications et des morts-nés (Kendrick, 1971; Casaro *et al.*, 1971; Brownlie *et al.*, 1989). Par contre, après 100 jours de gestation, les souches CP, contrairement aux souches NCP, n'ont plus aucune conséquence sérieuse sur le foetus (Kendrick, 1971; Braun *et al.*, 1973). De plus, jamais une souche CP ne provoquera la naissance d'un veau infecté en persistance (McClurkin *et al.*, 1984; Brownlie *et al.*, 1989). Ces différences s'expliqueraient par le fait que les cellules cibles des souches CP ne seraient pas présentes ou pas suffisamment développées chez le foetus avant une certaine période de la gestation, période où le foetus serait devenu immunocompétent donc capable de neutraliser le virus (Braun *et al.*, 1973; Brownlie *et al.*, 1989). Ainsi, lorsqu'il est question d'infections congénitales, il est surtout question du biotype NCP, car c'est le plus important et le plus répandu. La section suivante (effets selon l'âge du foetus)

traitera donc uniquement des infections congénitales mettant en cause une souche NCP.

7.2.2 Effets selon l'âge du fœtus

Le BVDV ne semble pas une cause majeure de mort embryonnaire précoce, i.e. avant 30 jours de gestation, car le contact entre l'épithélium maternel et le trophoblaste fœtal ne serait pas assez intime pour permettre la transmission verticale du virus (Parsonson *et al.*, 1979). En fait, une infection au BVDV aux alentours du temps de la conception résultera parfois en avortement, mais généralement en une baisse du taux de conception (Grahn *et al.*, 1984; McGowan *et al.*, 1993).

Comme mentionné plus haut, une infection se produisant avant le 100^{ième} jour de la gestation peut résulter en une mort fœtale suivi d'un avortement, d'une momification ou de la naissance d'un veau mort-né (Baker, 1987). L'expulsion du fœtus peut toutefois survenir plusieurs mois après l'infection rendant difficile d'attribuer avec certitude la cause de la mort au BVDV. Des retards de croissance, se manifestant par la naissance de veaux plus légers que normal, peuvent également survenir si une infection se produit durant cette période (Duffell et Harkness, 1985).

Entre 100 et 150 jours de gestation, une infection au BVDV peut générer, en plus des retards de croissance, une variété de défauts congénitaux (Duffell et Harkness, 1985). Ceci est rendu possible puisque cette période de la gestation équivaut aux dernières étapes de l'organogénèse de plusieurs systèmes et organes (Duffell et Harkness, 1985).

Ainsi, le BVDV interférerait avec le développement normal de ces organes en endommageant les cellules impliquées ou encore en inhibant la différenciation ou la division de ces mêmes cellules (Brownlie, 1990b). Parmi les effets tératogènes induits par le BVDV, notons l'hypoplasie du cervelet, la microcéphalie, l'hypomyélogénèse, la dysplasie de la rétine, l'alopecie, l'aplasie du thymus et l'hypoplasie des poumons (Baker, 1990). Toutefois, beaucoup de veaux seront menés à terme, mais les plus affectés mourront tôt après leur naissance. Cependant, si les lésions sont trop sévères, le foetus sera avorté avant terme (Brownlie, 1990b).

Le système immunitaire du foetus se développe aux alentours du 150^{ième} jour de gestation. Ainsi, après cette période, une infection ne causera aucun dommage puisque le foetus sera en mesure d'éliminer le virus. Il en résultera la naissance d'un veau normal séropositif au BVDV (Brown *et al.*, 1979; Bielefeldt Ohmann *et al.*, 1982).

Le dernier effet possible, et le plus important, est la naissance de veaux infectés en persistance (PI) par le BVDV. La période où pourra se produire cette immunotolérance se situe généralement entre le 50^{ième} et le 120^{ième} jour de la gestation (McClurkin *et al.*, 1984), soit avant la maturation complète du système immunitaire foetal. Ainsi, le foetus sera incapable de reconnaître le virus comme "étranger" et, quelques jours plus tard lors du développement du système immunitaire, le virus sera considéré comme un "tissu normal" du foetus (Brownlie, 1990b). Cette immunotolérance, reflétée par le manque d'anticorps spécifiques à la souche persistante,

permettra donc au virus de persister tout au long de la vie de l'animal. Le BVDV sera alors retrouvé au niveau de système nerveux central, où les neurones semblent être les principales cellules cibles (Fernandez *et al.*, 1989; Hewicker *et al.*, 1990), et au niveau d'un très grand nombre d'autres tissus (Cutlip *et al.*, 1980; Barlow *et al.*, 1986). Le BVDV se répliquera également dans toutes les sous-populations de leucocytes, principalement chez les monocytes et les lymphocytes T (Bielefeldt Ohmann *et al.*, 1987; Bolin *et al.*, 1987; Sopp *et al.*, 1994), ce qui pourrait expliquer l'immunosuppression rencontrée chez certains animaux PI (Roth *et al.*, 1986). Malgré tout, les animaux PI demeurent immunocompétents envers les autres antigènes (McClurkin *et al.*, 1984) et envers les souches de BVDV hétérologues à la souche immunotolérée (Bolin *et al.*, 1985b; Brownlie, 1990a).

Comme l'infection se produit entre le 50^{ième} et le 120^{ième} jour de la gestation, beaucoup d'animaux PI présenteront des retards de croissance et/ou des défauts congénitaux. Toutefois, pour des raisons encore inconnues, certains animaux PI paraîtront tout à fait normaux et atteindront l'âge adulte (Baker, 1987). Les vaches PI se rendant jusqu'à la gestation donneront naissance, dans près de 100% des cas, à un veau PI (McClurkin *et al.*, 1979; Brownlie, 1990b).

D'autre part, les animaux PI, qui sécrètent du virus en grande quantité, sont la principale source du maintien du BVDV dans la population bovine (Duffell et Harkness, 1985), et ce, même s'ils ne représentent qu'entre 0.4 et 1.9% de la population générale

(Bolin *et al.*, 1985c; Howard *et al.*, 1986). Considérant que seule une souche NCP peut causer cette persistance, il est tout à fait raisonnable de penser que les souches NCP représentent le vrai BVDV puisqu'elles sont beaucoup mieux adaptées à leur hôte que les souches CP (Moennig et Plagemann, 1992).

7.3 Maladie des muqueuses

La maladie des muqueuses (MD) est une maladie sporadique dont seuls les animaux PI peuvent être atteints (Malmquist, 1968; Liess *et al.*, 1974). Parmi les symptômes de la MD, notons la pyrexie, la hausse du rythme respiratoire et cardiaque, l'émaciation, l'anorexie et l'apparition de diverses lésions orales, nasales et génitales. De plus, la salivation abondante, les écoulements nasaux et la forte diarrhée mèneront à la déshydratation progressive de l'animal. Cette diarrhée est généralement sanguinolante à cause des lésions érosives et ulcéraives impliquant tout le système digestif interne où il y a destruction des cryptes dans les régions du petit intestin, du caecum et du colon. Les tissus lymphoïdes sont également nécrosés, particulièrement les plaques de Peyer qui se retrouvent souvent gonflées et hémorragiques. Une sévère leucopénie sera aussi présente rendant très fréquentes les infections secondaires. L'animal, généralement âgé entre 6 et 24 mois, meurt une à trois semaines après l'apparition des premiers symptômes quoiqu'une MD chronique pouvant durer jusqu'à 18 mois est aussi décrite (Duffell et Harkness, 1985; Baker, 1987; Radostits et Littlejohns, 1988).

Présentement, il semble de plus en plus évident que le déclenchement de la MD se produit lorsque la souche NCP endogène à l'animal PI subit une mutation lui donnant le caractère CP. Cette idée est basée sur une série d'observations:

- 1) Les deux biotypes, CP et NCP, peuvent être isolés d'un animal mort de MD comparativement aux animaux PI où seul le biotype NCP est présent (Brownlie *et al.*, 1984; McClurkin *et al.*, 1985).
- 2) Reproduction expérimentale de la MD en surinfectant un animal PI avec une souche CP (Brownlie *et al.*, 1984; Bolin *et al.*, 1985d).
- 3) Les souches CP ne peuvent pas toutes induire la MD (Harkness *et al.*, 1984; Bolin *et al.*, 1985b).
- 4) La souche CP nouvellement présente est antigéniquement similaire à la souche NCP persistante (Howard *et al.*, 1987; Corapi *et al.*, 1988).
- 5) Reproduction de la MD en sélectionnant des paires de souches CP et NCP homologues (i.e. antigéniquement similaires). La MD ne se développe pas si la paire sélectionnée est hétérologue (Brownlie, 1990a; Moennig, *et al.*, 1990).
- 6) La comparaison génomique de paires isolées de cas de MD révèle que les souches CP dérivent des souches NCP par divers réarrangements de leur génome permettant la production de la p80. Toutefois, certains cas demeurent encore à élucider (voir section 6.3).

Cependant, si la mutation de la souche NCP est l'élément déclencheur de la MD, il ne faut pas négliger la surinfection. En effet, dans un même troupeau les animaux PI

sont généralement immunotolérants à la même souche NCP et il suffit que la mutation se produise chez un seul animal PI pour que celui-ci sécrète la souche CP qui surinfectera les autres animaux PI (Brownlie, 1990a). Mentionnons également que la surinfection par une souche CP partiellement homologue à la souche NCP endogène pourrait être à l'origine de la MD chronique (Brownlie, 1990b).

Les raisons exactes reliant l'apparition du virus CP au développement de la MD, et éventuellement à la mort de l'animal, demeurent encore inconnues, quoique des évidences préliminaires indiquent que le synergisme entre les deux biotypes serait nécessaire à l'expression complète de la MD (Clarke *et al.*, 1989).

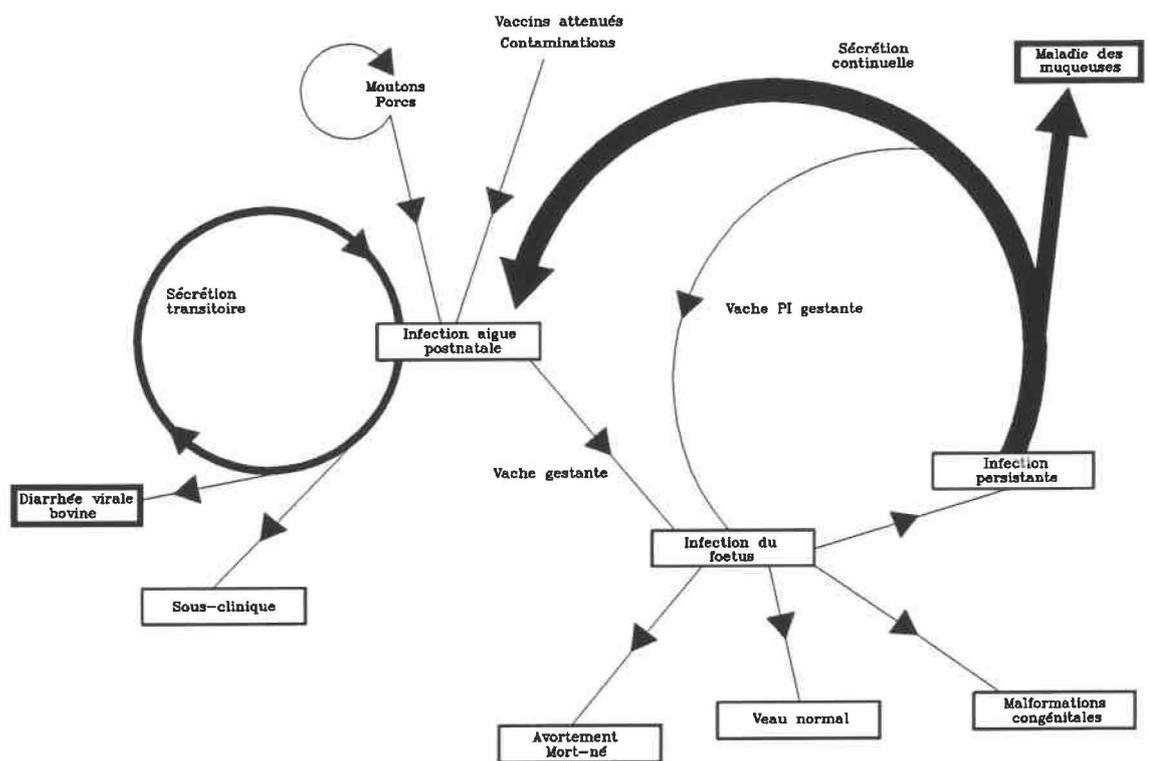
8. Modes de transmission

Les principaux cycles d'infection du BVDV sont représentés à la figure 5.

Le contact direct avec la plupart des sécrétions d'un animal infecté en persistance représente le principal moyen de transmission du BVDV d'un animal à l'autre (Roeder et Drew, 1984). En effet, il a été démontré que le virus pouvait être isolé à partir des écoulements nasaux, de la salive, du sperme, de l'urine, du lait, des larmes et des

Figure 5

Principaux cycles d'infection par lesquels le BVDV peut se maintenir et/ou arriver dans un troupeau. Adaptée de Duffell et Harkness (1985).



excréments d'animaux PI (Radostits et Littlejohns, 1988). Les animaux subissant une infection aiguë sécrètent aussi le virus, mais en quantité beaucoup plus faible que les animaux PI (Duffell et Harkness, 1985). De plus, comme mentionné plus haut, le BVDV peut être transmis au fœtus de façon transplacentaire. Notons que la vaccination contre le BVDV, avec du virus atténué peut également induire la maladie (voir section 10.2).

Puisque le BVDV peut infecter naturellement certains autres animaux domestiques retrouvés sur une ferme (e.g. mouton, porc), ces animaux peuvent être également une source d'infection pour les bovins (Fernelius *et al.*, 1973; Duffell et Harkness, 1985). Le vaste spectre d'hôtes du BVDV représente donc une source potentielle de virus qui n'est pas à négliger.

Le BVDV est souvent présent sous forme de contaminant dans le sérum bovin et les cultures cellulaires (Nuttall *et al.*, 1977; Rossi *et al.*, 1980; Bolin *et al.*, 1991a). Ainsi, la transmission du BVDV sera possible via l'administration d'un vaccin atténué, dirigé contre un autre pathogène, qui aurait été contaminé lors du passage sur culture cellulaire (Lohr *et al.*, 1983). Par ailleurs, le sérum bovin est également utilisé dans le processus du transfert d'embryons qui représente une autre porte d'entrée du BVDV dans un troupeau (Meyling *et al.*, 1990).

D'autre part, le BVDV est suffisamment résistant au changement de température et de pH pour pouvoir demeurer hors de l'hôte pendant une certaine période de temps (Horzinek, 1981). Par conséquent, le virus peut être transmis par divers instruments de chirurgie, par des vêtements et par des seringues souillées de sang (Bolin, 1990; Gunn, 1993). Toutefois, ces sources d'infections peuvent être facilement éliminées dû à la sensibilité du BVDV aux détergents et aux désinfectants (Horzinek, 1981). Finalement, notons que des études ont démontré l'association du BVDV avec des insectes pouvant agir comme vecteur entre un animal virémique et un animal susceptible (Tarry *et al.*, 1991; Gunn, 1993).

9. Diagnostic

Avant d'établir le diagnostic d'une infection au BVDV, les diverses observations cliniques mentionnées ci-haut doivent être confirmées par des tests de laboratoire. Ces tests peuvent être divisés en deux groupes majeurs: la détection du virus ou de l'un de ses constituants et la détection de la réponse immunitaire de l'hôte (Edwards, 1990).

9.1 Détection du virus ou de l'un de ses constituants

9.1.1 Isolement viral

L'isolement viral est surtout utilisé afin d'identifier les animaux virémiques (e.g. infection aiguë et persistante) ou encore afin d'établir un diagnostic de MD après la mort

de l'animal. Malgré sa sensibilité élevée, cette technique demeure longue, coûteuse et laborieuse.

Pour l'isolement du BVDV, la meilleure source est le sang, quoiqu'il est possible d'utiliser, après la mort, des échantillons de divers tissus dont la rate, les reins et les intestins (Duffell et Harkness, 1985). Toutefois, la détection du BVDV, peu importe la source, peut nécessiter plus d'un passage sur culture cellulaire. Le virus est alors mis en évidence par ECP ou, dans le cas des souches NCP, par les diverses méthodes sérologiques et moléculaires mentionnées plus bas (Radostits et Littlejohns, 1988). Afin de différencier les animaux PI des animaux infectés de façon transitoire, l'analyse d'un deuxième échantillon doit être effectuée trois à quatre semaines plus tard. Un animal PI demeurera positif tandis qu'un animal subissant une infection aiguë aura éliminé le virus entre les deux prélèvements (Edwards, 1990).

9.1.2 Détection des antigènes viraux

L'immunofluorescence et l'immunoperoxidase sont les deux principales méthodes utilisées pour la détection des antigènes viraux. En plus de permettre l'identification du BVDV à partir de cultures cellulaires (Ward et Kaerberle, 1984; Katz *et al.*, 1987; Radostits et Littlejohns, 1988; Smith *et al.*, 1988), ces techniques peuvent être utilisées directement sur des coupes de tissus traités de diverses façons (Bielefeldt Ohmann *et al.*, 1981; Bielefeldt Ohmann, 1983; Vickers et Minocha, 1990). L'immunofluorescence s'est avérée efficace également sur des frottis de globules blancs (Bezek *et al.*, 1988) et

des frottis de cellules du nasopharynx (Silim et Elazhary, 1983; Roeder et Drew, 1984).

Ces détections sont généralement effectuées au moyen d'un antisérum qui, afin de réduire le bruit de fond, doit être de très bonne qualité. Les meilleurs antisérums sont obtenus par inoculation de veaux gardés en milieu aseptique. De plus, dû à la grande variation antigénique du BVDV, et afin de détecter la majorité des souches de BVDV, l'inoculation doit être effectuée avec un mélange de souches antigéniquement différentes (Edwards, 1990). Toutefois, des AcM dirigés contre la protéine non-structurale p80 semblent être de bons substituts aux antisérums polyclonaux (Deregt *et al.*, 1990) principalement parce que la p80 est une protéine très conservée parmi les souches de BVDV (Deng et Brock, 1992).

Différentes techniques ELISA, utilisant des antisérums ou un mélange d'AcM, ont été développées dans le but d'identifier rapidement les animaux PI (Shannon *et al.*, 1991; Mignon *et al.*, 1991, 1992). La technique ELISA s'avère une alternative prometteuse à l'isolement viral particulièrement parce qu'elle est peu coûteuse, très sensible et permet l'analyse d'un très grand nombre d'échantillons à la fois. D'autres part, la cytométrie de flux s'est avérée être aussi une méthode efficace et rapide pour la détection du BVDV à partir des leucocytes sanguins d'animaux PI (Qvist *et al.*, 1990, 1991).

9.1.3 Détection du génome viral

La première technique moléculaire développée fut l'hybridation de type dot blot utilisant diverses sondes de cDNA marquées. Avec une sensibilité égale ou supérieure à l'isolement viral (Brock *et al.*, 1988; Brock et Potgieter, 1990) et avec la possibilité d'effectuer l'hybridation directement à partir du sérum et des leucocytes (Brock et Potgieter, 1990; Jensen *et al.*, 1990), cette technique s'avère très prometteuse à condition de choisir les bonnes sondes. Dans un premier temps, l'efficacité des sondes varie selon la localisation génomique de la sonde. Les deux régions les plus conservées du génome, la 5'UTR et la région codant pour la p80, donnent les meilleurs résultats (Kwang *et al.*, 1991a; Lewis *et al.*, 1991; Ridpath *et al.*, 1993; Qi *et al.*, 1993). D'autre part, la longueur des sondes semble également influencer le pourcentage de détection. Certains fragments de cDNA clonés, de longueur allant jusqu'à 2 kb, ont un taux de détection de 100% (Brock *et al.*, 1988; Jensen *et al.*, 1990; Brock et Potgieter, 1990; Qi *et al.*, 1993) ce qui n'est pas le cas des oligonucléotides testés jusqu'à présent (Lewis *et al.*, 1991; Ridpath *et al.*, 1993), quoiqu'un mélange de six oligonucléotides s'est avéré efficace (Lewis *et al.*, 1991). Le meilleur exemple reflétant l'importance de la longueur de la sonde se situe au niveau de la 5'UTR où un oligonucléotide détecte seulement 70% des cas (Ridpath *et al.*, 1993) tandis qu'un fragment de cDNA de 289 nt détecte 100% des cas (Qi *et al.*, 1993).

Quant au RT-PCR, il se bute au même problème que l'hybridation, c'est-à-dire la variation génomique du BVDV. Ainsi, les mêmes régions conservées du génome sont

la cible de la plupart des RT-PCR efficaces (Hertig *et al.*, 1991; Boye *et al.*, 1991; Hooft van Iddekinge *et al.*, 1992; Ridpath *et al.*, 1993). Le principal atout du PCR est sa très grande sensibilité. Toutefois, il est souvent nécessaire d'effectuer une deuxième amplification (Alansari *et al.*, 1993; Gruber *et al.*, 1993) ou encore une hybridation moléculaire (Hertig *et al.*, 1991; Hooft van Iddekinge *et al.*, 1992) sur chacun des produits de RT-PCR afin de détecter un faible niveau d'amplification invisible par coloration au bromure d'éthidium. Récemment, la technique de RT-PCR fut développée afin de détecter l'ARN viral à partir de tissus fixés à la formaline et enrobés dans de la paraffine (Gruber *et al.*, 1993). Une telle méthode est très utile dans le cas où une analyse rétrospective est nécessaire.

La sensibilité du PCR constitue également son plus grand inconvénient puisque la moindre contamination exogène à l'échantillon sera amplifiée. Dans un milieu où le nombre d'échantillon est très élevé, des méthodes très strictes doivent être suivies (Kwok et Higuchi, 1989) et, comme le démontre une étude très récente sur la sensibilité et la spécificité du PCR, celui-ci n'est pas encore en mesure de répondre aux attentes du diagnostic (Noordhoek *et al.*, 1994).

9.2 Détection des anticorps de l'hôte

L'animal subissant une infection au BVDV, expérimentalement ou naturellement, développe des anticorps contre plusieurs protéines virales, mais surtout contre la p80 (p125), la gp48 et la gp53 (Donis et Dubovi, 1987b,c). Ces derniers constituent donc

la cible de la plupart des tests servant à la détection de la réponse humorale de l'hôte. Un tel diagnostic vise principalement au dépistage des animaux PI potentiels, qui pour la plupart sont séronégatifs, avant de procéder à l'isolement viral. Le but ultime est évidemment de contrôler et/ou d'éradiquer la maladie (Moennig et Plagemann, 1992).

Parmi les différentes techniques utilisées, notons la fixation du complément (Gutekunst et Malmquist, 1964), l'immunodiffusion (Harkness *et al.*, 1978; Hopkinson *et al.*, 1979), l'immunofluorescence indirecte (Baker, 1987), la séroneutralisation (Edwards, 1990) et les tests ELISA (Chu *et al.*, 1985; Howard *et al.*, 1985; Justewicz *et al.*, 1987; Katz et Hanson, 1987). La plus grande sensibilité de détection étant obtenue avec le test de séroneutralisation et avec les essais immunoenzymatiques. Le test de séroneutralisation renferme toutefois plusieurs inconvénients dont la contamination potentielle des cultures cellulaires (voir section 11.3) et la variation de la sensibilité du test selon la souche, les cellules et les conditions utilisées (Edwards, 1990). Le principal désavantage des premiers tests ELISA était la difficulté à obtenir une bonne quantité d'antigènes suffisamment purs pour effectuer le test. Ce problème fut cependant résolu suite à la mise au point de systèmes d'expression performants impliquant, jusqu'à présent, l'expression de la p80 (Lecomte *et al.*, 1990; Kwang *et al.*, 1991b; Vanderheijden *et al.*, 1993) ou de la gp48 (Kwang *et al.*, 1992). Notons que la p80 exprimée dans des cellules d'insectes s'est avéré être plus efficace et plus pratique que si elle était produite chez *E.coli* (Vanderheijden *et al.*, 1993).

10. Prévention et contrôle

Il semble peu probable, à des coûts raisonnables, de maintenir un troupeau exempt de BVDV dû aux nombreuses portes d'entrée du virus dans le troupeau (e.g. contact avec d'autres ruminants infectés, arrivée d'un animal PI, fertilisation avec du sperme contaminé, transfert d'embryon, utilisation d'un vaccin atténué, etc.). Toutefois, un bon contrôle peut être assuré en éliminant les animaux PI et en prévenant les infections transplacentaires subséquentes (Baker, 1987).

10.1 Animaux PI

Comme ils représentent la principale source du maintien du BVDV dans la population bovine, les animaux PI sont indésirables et, par conséquent, doivent être identifiés puis éliminés. Lorsqu'un troupeau est certifié exempt d'animaux PI, des mesures adéquates devront alors être prises afin d'éviter leur réapparition. Ainsi, tous les nouveaux arrivants devront être testés (Baker, 1987) et, comme les anticorps maternels semblent protéger le fœtus d'une infection au BVDV (Duffell *et al.*, 1984), les vaches devront être vaccinées au moins trois semaines avant l'insémination afin d'assurer un titre élevé d'anticorps dans le premier trimestre de la gestation (Bolin, 1990). Si la vaccination est impossible, il faudra s'assurer que les vaches gestantes sont tenues à l'écart du troupeau et de toutes autres sources potentielles d'infection (Bolin, 1990). Même si un programme de vaccination est présent, il est conseillé de suivre cette dernière précaution car il a été démontré que la grande variation antigénique du BVDV

entraînait l'inefficacité du vaccin face à certaines souches (Bolin *et al.*, 1991b).

10.2 Vaccination

Présentement, les vaccins les plus répandus sont composés de virus inactivés ou de virus vivants atténués. Même si les vaccins atténués procurent une meilleure réponse immunitaire (Baker, 1987; Bolin, 1990), ils comportent plusieurs désavantages par rapport aux vaccins inactivés. Premièrement, le vaccin peut engendrer une immunosuppression passagère (Roth et Kaeberle, 1983) amenant des infections secondaires plus importantes. Deuxièmement, les vaches en gestation ne doivent pas être vaccinées puisqu'il a été démontré que le virus vaccinal pouvait traverser le placenta et atteindre le foetus (Liess *et al.*, 1984). Troisièmement, les vaches gestantes séronégatives doivent être tenues à l'écart des animaux fraîchement vaccinés car ceux-ci sécréteront du virus pendant une période de temps. Quatrièmement, les souches vaccinales étant majoritairement du biotype CP, la vaccination des animaux PI pourra précipiter la maladie des muqueuses chez ceux-ci (Peter *et al.*, 1967; Lambert, 1973; Bolin *et al.*, 1985b). Quant au vaccin inactivé, il a pour avantage d'être sécuritaire, mais pour être vraiment efficace il doit être réadministré régulièrement (Baker, 1987).

D'autres types de vaccins ont également été développés récemment dans le but de combiner l'efficacité des vaccins atténués à la sécurité des vaccins inactivés. Parmi ceux-ci, notons l'utilisation d'un mutant thermosensible du BVDV (Lobmann *et al.*, 1984, 1986) et l'utilisation d'un vaccin sous-unitaire de type ISCOM (immunostimulating

complex) préparé à partir des protéines de l'enveloppe du BVDV (Carlsson *et al.*, 1991; Kamstrup *et al.*, 1992). De plus, chez le HoCV, un système d'expression baculovirus à été mis au point afin de produire en grande quantité la glycoprotéine de surface E1 qui est la principale cible des anticorps neutralisants et qui correspond à la gp53 du BVDV. Lorsqu'injectée aux animaux, cette protéine s'avère très efficace pour stimuler le système immunitaire et pour protéger l'animal (Hulst *et al.*, 1993).

Le principal obstacle de la vaccination demeure la variation antigénique du BVDV. En effet, il arrive que des animaux vaccinés et séropositifs subissent quand même une infection au BVDV. Ceci indique le besoin d'inclure dans un vaccin le plus grand nombre de souches hétérologues possible afin d'assurer la plus grande protection possible. Malgré tout, les études citées ci-haut démontrent qu'un animal vacciné avec les vaccins disponibles présentement est tout de même beaucoup moins susceptible qu'un animal non-vacciné.

11. Importance économique

11.1 Pertes reliées à l'infection

Les principales pertes économiques engendrées par une infection au BVDV sont reliées aux infections prénatales et se répercutent par des avortements, des morts-nés, des malformations congénitales et des animaux PI qui éventuellement mourront (Duffell *et*

al., 1986). Si ce n'est que par des infections secondaires, les pertes encourues suite aux infections aiguës sont généralement mineures, quoiqu'un épisode d'infections symptomatiques chez un troupeau de bovins laitiers peut engendrer une baisse importante de la production de lait (Duffell et Harkness, 1985). Par contre, des taux élevés de mortalité, associés à des infections aiguës au BVDV, furent enregistrés récemment au Canada et aux États-Unis (voir section 7.1). Au Québec, les élevages de veaux lourds (veaux de lait et veaux de grain), qui comptaient environ 140,000 têtes en 1992, furent les principaux touchés par cette épidémie qui atteignit son summum en 1993. Les pertes économiques furent également considérables pour les producteurs de bovins québécois puisque le prix d'un veau de grain s'élève à près de 470 \$ par tête tandis que celui d'un veau de lait est d'environ 660 \$ par tête (Dr G. Rivard, communication personnelle).

11.2 Contamination du sperme

Le BVDV est retrouvé dans le sperme des taureaux infectés en persistance et dans celui des taureaux subissant une infection aiguë (Coria et McClurkin, 1978; McClurkin *et al.*, 1979; Paton *et al.*, 1989; Howard *et al.*, 1990; Kirkland *et al.*, 1991). L'utilisation de ce sperme pour l'insémination des vaches, ne provoquera pas directement la naissance d'un veau PI par la vache inséminée (voir section 7.1), mais d'autres conséquences majeures peuvent se produire. Premièrement, si une vache séronégative reçoit du sperme contaminé, elle développera une infection aiguë et répandra le virus dans le troupeau à un moment où plusieurs vaches en gestation sont présentes (Howard *et al.*, 1990). Tous les différents problèmes reliés aux infections congénitales sont donc

rendus possibles. Deuxièmement, le sperme contaminé est souvent de qualité inférieure (McClurkin *et al.*, 1979; Revell *et al.*, 1988; Paton *et al.*, 1989) et son utilisation provoquera un faible taux de conception; l'insémination devant être répétée plusieurs fois (McClurkin *et al.*, 1979). Toutefois, plusieurs taureaux PI produisent du sperme de qualité acceptable pour les centres d'insémination artificielle (Howard *et al.*, 1990), et une étude démontre que du sperme provenant d'un taureau PI peut donner de très bons rendements (Meyling et Jensen, 1988).

Ainsi, des efforts continus doivent être exercés dans les centres d'insémination artificielle afin d'éviter l'arrivée d'un taureau PI qui, en plus de produire du sperme contaminé, infectera les autres taureaux qui eux mêmes, de façon transitoire, produiront du sperme infecté (Howard *et al.*, 1990). Parce que les infections aiguës sont généralement inapparentes, des mesures routinières doivent être effectuées pour s'assurer, en tout temps, de l'absence du BVDV dans le sperme. Toutefois, les risques d'infections aiguës peuvent être réduits en maintenant, chez tous les taureaux, un taux élevé d'anticorps neutralisants (Bolin, 1990).

Dans le cas de la fertilisation *in vitro*, le sperme doit subir divers traitements avant d'être utilisé, mais les conséquences mentionnées ci-haut demeurent néanmoins possibles. En effet, il a été démontré que le BVDV n'était pas complètement éliminé du sperme par les techniques de préparation couramment utilisées (Bielanski *et al.*, 1992).

11.3 Contamination du sérum bovin et des cultures cellulaires

Le BVDV de type NCP est constamment retrouvé en tant que contaminant dans plusieurs lots commerciaux de sérum foetal bovin (Nuttall *et al.*, 1977; Rossi *et al.*, 1980; Bolin *et al.*, 1991a; Erickson *et al.*, 1991). Ce dernier étant fréquemment utilisé comme supplément en culture cellulaire, les cultures cellulaires bovines, si elles ne sont pas elles-mêmes déjà contaminées au départ, se retrouveront généralement infectées dans une courte période de temps (Bolin, 1990). Différentes lignées cellulaires d'autres espèces sont aussi susceptibles au BVDV (Horzinek, 1981; Potts *et al.*, 1989) faisant en sorte qu'une contamination au BVDV peut également s'établir dans des systèmes autres que bovins.

L'importance économique de ces contaminations, c'est-à-dire la nécessité d'établir des contrôles stricts, se situe à plusieurs niveaux. Premièrement, comme mentionné à la section 8, ces contaminations peuvent constituer la porte d'entrée du BVDV dans un troupeau via la vaccination contre d'autres pathogènes atténués sur culture cellulaire ou via le transfert d'embryons. Toutes les différentes pertes liées aux infections sont donc possibles. Deuxièmement, les laboratoires de diagnostic du BVDV doivent, de façon routinière, dépenser temps et matériel afin de s'assurer de l'absence du BVDV dans le sérum et dans les lignées cellulaires utilisés. Troisièmement, la vaccination d'autres espèces animales susceptibles (e.g. porc et mouton) avec un vaccin contaminé au BVDV peut également amener des pertes considérables. Récemment, le BVDV a pu être identifié dans des préparations de vaccins humains (Harasawa et Tomiyama, 1994).

Toutefois, même si des humains sont rapportés séropositifs au BVDV (Giangaspero *et al.*, 1988; Wilks *et al.*, 1989) et que des gastroentérites, des microcéphalies et des états de schizophrénie furent associés à des infections aux pestivirus (Potts *et al.*, 1987; Yolken *et al.*, 1989; 1993), aucune preuve formelle ne démontre la capacité du BVDV à induire des symptômes chez l'humain.

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Comme en fait foi le titre, ce projet se divise en deux parties principales reliées par le fait qu'il s'agit, dans les deux cas, d'une comparaison génomique de souches du BVDV. Toutefois, le but précis de chacune de ces parties est très différent l'un de l'autre et il faudra considérer deux objectifs initiaux à ce projet.

1. Étude de la région codant pour la p125

Pour bien comprendre cet objectif, il faut rappeler que 1) la maladie des muqueuses se développe suite à la mutation d'une souche NCP en souche CP, 2) les souches CP, et non les souches NCP, produisent une p80, un sous produit de la p125 et 3) certaines souches CP ne semblent pas avoir de réarrangements au niveau de leur p125 pouvant expliquer l'origine de la p80. Le but de cette étude était donc de séquencer complètement la région codant pour la p125 de deux souches CP sans réarrangement (Oregon et Singer) ainsi que celle de deux souches NCP (NY-1 et Draper) et de vérifier si des petites délétions, des petites insertions ou des mutations ponctuelles pouvaient expliquer l'origine de la p80 chez ces deux souches CP.

2. Étude de la région 5' non-codante

La récente épidémie de BVDV frappant le Québec semblait mettre en présence des souches de BVDV plus virulentes qu'à l'ordinaire (voir tableau 2, p.39). Notre but était donc de vérifier si ces souches, ainsi que d'autres provenant de l'ouest canadien où

des épidémies similaires furent notées, étaient effectivement différentes des souches de BVDV classiques et si elles ne pouvaient pas s'apparenter aux souches thrombocytopéniques américaines, rapportées pour être plus virulentes. Nous avons choisi de regarder au niveau de la région 5' non-codante car cette région, normalement très conservée chez le BVDV, pourrait être impliquée dans la virulence du BVDV et par conséquent être à la base d'une différence entre les souches classiques et les souches épidémiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches virales de BVDV

1.1 Souches prototypes

Les souches de laboratoire utilisées au cours de ce projet furent Singer, Oregon, New York-1 (NY-1) et Draper. Les deux premières sont des souches cytopathogènes (CP) et les deux autres des souches non-cytopathogènes (NCP). Toutes ces souches proviennent du NVSL (National Veterinary Service Laboratories, Ames, IOWA) et avaient déjà été clonées, dans le laboratoire du Dr J. Lecomte, par dilution limite sur culture cellulaire.

1.2 Isolats

Les isolats Q47, Q69, Q126, Q140, Q713, Q1111, Q1808, Q2101 et Q4812 proviennent de la province de Québec et furent obtenus du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) à l'Institut Armand-Frappier. Parmi ces isolats, 5 proviennent de l'épidémie de 1992-1993 (Q126, Q140, Q1111, Q2101 et Q4812) et 4 proviennent de cas isolés de BVDV. Les isolats 1854, C1, C3, 1494, Waters et Bull furent recueillis dans les provinces de la Saskatchewan et de l'Alberta par le Veterinary Infectious Disease Organization (VIDO; University of Saskatchewan). Parmi ces isolats, les trois derniers proviennent d'épidémies similaires à celle du Québec et les trois premiers proviennent de cas isolés. Les souches CD87 et 890 sont des souches thrombocytopéniques isolées aux États-Unis (Corapi *et al.*, 1989; Bolin and Ridpath, 1992) et nous furent gracieusement fournies par les Drs E.J. Dubovi

et S.R. Bolin. Les isolats furent propagés pour un maximum de deux passages en culture cellulaire sans toutefois être clonés afin d'éviter, le plus possible, les modifications *in vitro*.

2. Propagation du BVDV

2.1 Culture cellulaire

Afin de propager les souches prototypes de BVDV, des cellules de reins bovins (MDBK; ATCC CCL22) cultivées en monocouche étaient utilisées. La croissance des cellules était maintenue dans un milieu composé des solutions MEM-Earle et 199-Hanks (rapport 1:1) (Gibco BRL, Burlington, ON) suppléé de 1 mM pyruvate, 2 mM L-glutamine, 50 µg/ml gentamycine, et 10% FBS exempt de gamma-globuline (Gibco BRL). Le FBS était également soumis à 3 passages sur MDBK suivi d'un test d'immunofluorescence afin de s'assurer qu'il ne contenait pas d'antigènes relatifs au BVDV (ces tests étaient effectués de façon routinière par Mme Denise McSween).

Les cellules étaient généralement propagées dans des flacons de 25 et 75cm² (Corning Glass Works, Corning, NY) et lorsqu'elles atteignaient la confluence, le milieu était décanté et le feuillet cellulaire lavé une fois avec 5-10 ml d'une solution de 0.01% trypsine TRL (Cooper Biomedical Inc., Malvern, Pa) et 0.04% EDTA (Gibco BRL).

Par la suite, 5-10 ml de cette même solution de trypsine/EDTA était déposé sur le feuillet. Après avoir incubé à 37°C jusqu'au décollement des cellules, celles-ci étaient resuspendues dans 10 ml de milieu suppléé. Le nombre de cellules vivantes était déterminé à l'aide d'un décompte sur hémacytomètre en mélangeant 0.4 ml de suspension cellulaire à 0.1 ml de trypan bleu 0.1%. La concentration était ensuite ajustée à 7.5×10^4 cellules/ml avec du milieu suppléé afin d'effectuer le passage. Les cellules étaient en tout temps incubées à 37°C en présence de 5% CO₂.

2.2 Infection

Après avoir décanté le milieu de culture d'un flacon de 75 cm² de cellules MDBK ayant 80% de confluence, le virus était ajouté à la monocouche à une MOI de 1. Le tout était ensuite incubé à 37°C pendant 1 h en agitant aux 15 min pour éviter l'assèchement du feuillet cellulaire, puis 14 ml de milieu suppléé, mais sans FBS, était ajouté. Après 72 h d'incubation à 37°C, et ce autant pour les souches CP que NCP, le surnageant était prélevé et soumis à une centrifugation de 800-1000 RPM (IEC-259 rotor; International Equipment Co., Needham Hts., Mass.) à 4°C pour 10 min afin d'éliminer la majorité des débris cellulaires. Le surnageant était finalement aliquoté et conservé à -70°C jusqu'à utilisation.

3. Isolement de l'ARN viral

Pour toutes les étapes impliquant la manipulation de l'ARN, c'est-à-dire de l'isolement de l'ARN à la synthèse de cDNA, les conditions dites "exemptes de RNases" étaient suivies afin de réduire les probabilités de contaminations dues aux ribonucléases (RNases). Ainsi, la verrerie utilisée était chauffée au four Pasteur à 180°C pendant 4 h et toutes les solutions étaient préparées à partir d'eau traitée au DEPC; le traitement se faisant comme suit: l'eau était soumise à une concentration de 0.1% DEPC pendant 24 h sous agitation puis autoclavée pour détruire ce même DEPC.

Dans un premier temps, les particules virales contenues dans 200 μ l de surnageant cellulaire (voir section 2.2) étaient concentrées environ 10 fois dans du PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, pH 7.2 à 7.4) par une ultracentrifugation de 20 min (Airfuge; Beckman Instruments, Toronto, ON). Par la suite, la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) était suivie pour extraire l'ARN viral. Dans un tube Eppendorf contenant 20-100 μ l de virus concentré, les solutions suivantes étaient ajoutées successivement en mélangeant par inversion entre chaque addition: 500 μ l de solution dénaturante (thiocyanate de guanidium 4 M (USB, Cleveland, OH), citrate de sodium 25 mM pH 7, sarcosyl 0.5%, 2-mercaptoethanol 0.1 M), 50 μ l d'acétate de sodium 2 M pH 4, 500 μ l de phénol saturé à l'eau (IBI, New Heaven, CT), et 100 μ l de chloroforme/alcool isoamylique (49:1). Après avoir bien agité environ 10 sec, la suspension finale était laissée sur la glace pour 15 min, puis centrifugée 20 min à 4°C. La phase aqueuse était

récupérée et 500 μ l d'isopropanol y était ajouté avant de laisser précipiter l'ARN à -20°C pour 1-2 h. Après centrifugation (20 min; 4°C), le culot était resuspendu dans 150 μ l de solution dénaturante et l'ARN était reprécipité à -20°C pour 1-2 h en ajoutant 150 μ l d'isopropanol. Finalement, après centrifugation (20 min; 4°C) l'ARN était lavé 2 fois avec 500 μ l d'éthanol 75% puis séché sous vide (Speedvac Concentrator; Savant Instruments inc., Farmingdale, NY) pour 5 min. Selon le volume initial de virus concentré, le culot était resuspendu dans 10 à 50 μ l d'eau traitée au DEPC. La concentration de l'ARN viral ainsi obtenu était mesurée par lecture de la D.O._{260nm} sachant que 40 ng/ μ l équivaut à une D.O._{260nm} = 1. L'ARN était ensuite conservé à la température de -20°C jusqu'à ce qu'il soit requis pour la synthèse du cDNA.

4. Amplification par la réaction de la polymérase en chaîne (PCR)

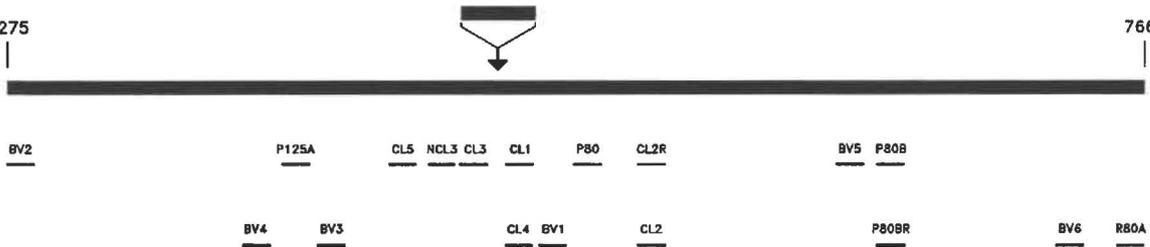
Les figures 6 et 7 donnent la liste des amorces utilisées au cours du projet; les amorces antisens étant celles complémentaires à l'ARN viral tandis que la séquence des amorces sens correspond à celle de l'ARN viral. Les amorces se situent au niveau de la p125 et de la région 5' non-codante du BVDV.

Figure 6

Séquence des amorces sens et antisens utilisées pour l'étude de la p125. La position précise des amorces, relativement au génome de la souche NADL, est indiquée dans le tableau tandis que la position schématique, par rapport à la p125 de la souche NADL qui comporte une insertion, est indiquée dans la partie du haut.

3275

7665



SENS

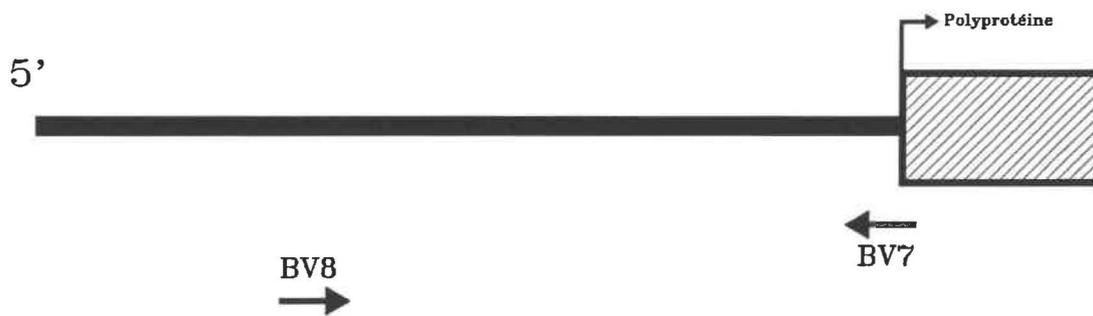
Amorce	Séquence (5' → 3')	Position (NADL)
BV2	AAACT ^T _{A ^G_{A CCTATGCCTTGCA}}	3275–3296
P125A	ACCCTAATACTGATCCTGCCTAC	4271–4293
CL5	GAGAGCAAAGGCTTAAAGAAGT	4661–4682
NCL3	GGGCTTGACACATAACAAGAA	4806–4827
CL3	AACGTGTGGGATGTCGCTAGCAGATT	4915–4940
CL1	GCTCATGGTAGGCAACCTTGGA	5359–5380
P80	GGGATAAGTTCAGTCGACCATGTAAC	5609–5634
CL2R	GAATTCACGTGTGCACCGCA	5843–5863
BV5	AG ^T _{C CAGTCCCTTGA ^T_{C ATAGC}}	6566–6585
P80B	GAGAGGATCCAGCCAATCTGA	6714–6734
R80A	GCCAGTCTTTCAGTTCAGTCTC	7665–7643

ANTISENS

Amorce	Séquence (5' → 3')	Position (NADL)
BV6	CTAGGAGGTC ^T _{A ACTGCCAG}	7397–7379
P80BR	TCAGATTGGCTGGATCCTCTC	6734–6714
CL2	TGCGGTGACACACGTGAATTC	5863–5843
BV1	TGGCATTTTTCTGCTC	5466–5450
CL4	TCCAAGTTGCCTACCATGAG	5380–5360
BV3	ACGCC ^T _{C TCTCCA ^T_{C ^T_{C TCATC}}}	4419–4400
BV4	AAGGTTAGTG ^T _{C CTCCAGTT}	4149–4130

Figure 7

Séquence et localisation des amorces BV7 et BV8 utilisées pour l'étude de la région 5' non-codante.



Amorce	Séquence (5' → 3')	Position (NADL)
BV7	ACTCCATGTGCCATGTACAGC	392-372
BV8	TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC	103-123

4.1 Synthèse du cDNA

La synthèse du cDNA était effectuée à partir de 50-100 ng d'ARN (représentant généralement 5 μ l de la solution obtenue précédemment) à l'aide de la transcriptase inverse MMLV-RT (Pharmacia (Canada) Ltd, Baie d'Urfé, Qué.). Plus précisément, la réaction se déroulait dans 20 μ l de tampon RT 1 X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 μ g/ml de BSA) incluant 0.5 mM de dNTPs, 50 pmoles de l'amorce antisens, 20 U d'inhibiteur de RNases (RNAGuard, Pharmacia) et 10 U de MMLV-RT. Avant l'addition de l'enzyme, le mélange était chauffé à 65°C pendant 15 min, puis mis sur glace pour 1 min. La réaction se déroulait à 42°C pour 1 heure en ajoutant 10 autres unités de MMLV-RT après 30 min. Finalement, le mélange réactionnel était incubé à 95°C pour 10 min afin d'inactiver la MMLV-RT. Le cDNA pouvait être immédiatement utilisé pour l'amplification par PCR ou conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Notons qu'à certaines occasions, notamment lors de l'étude de la région 5' non-codante, 5 μ l de surnageant cellulaire ont pu être utilisés directement pour la synthèse du cDNA sans qu'il soit nécessaire d'extraire l'ARN viral. La méthode utilisée était identique à celle décrite ci-haut sauf que le mélange réactionnel, contenant le surnageant cellulaire, était chauffé pour 3 à 5 min à 95°C avant d'ajouter la MMLV-RT et l'inhibiteur de RNases.

4.2 PCR

4.2.1 Amplification de cDNA

Au produit total de la synthèse de cDNA était ajouté 80 μ l de tampon d'amplification 1X (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) contenant 50 pmoles de l'amorce antisens et 100 pmoles de l'amorce sens. Le mélange était recouvert de 80 μ l d'huile minérale, chauffé à 95°C pendant 5 min et refroidi à 72°C avant d'ajouter 1.5 U de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (Taq DNA polymérase; BIO/CAN Scientific Inc., Mississauga, Ont). La réaction était effectuée au moyen d'un "DNA thermal cycler" automatique (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CN) selon le profil suivant: 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 45-52°C selon les amorces (appariement) et 2 min à 72°C (extension). Après avoir répété ce profil 35 fois, une dernière étape d'élongation de 10 min à 72°C était effectuée afin d'obtenir un maximum de produits complets.

4.2.2 Réamplification et amplification d'un fragment cloné

Deux différents mélanges de 50 μ l étaient préparés, chacun dans du tampon d'amplification 1X. Le mélange A contenait l'ADN à amplifier (1 à 5 μ l du premier PCR dans le cas d'une réamplification ou 10 ng de plasmide dans le cas d'un fragment cloné) et 0.4 mM de dNTPs. Le mélange B contenait 100 pmoles de chacune des amorces et 1.5 U de Taq polymérase. Le mélange A était recouvert d'huile minérale, chauffé à 95°C pendant 5 min, refroidi à 72°C et laissé à cette température le temps d'ajouter le mélange B. Les cycles de PCR étaient ensuite entamés. Ce procédé permet,

en ajoutant les amorces à l'ADN à température élevée, de diminuer l'amplification de régions non-désirées due au mauvais appariement des amorces.

4.3 Analyse sur gel d'agarose

Le résultat des amplifications était vérifié par électrophorèse sur gel contenant entre 0.8 et 1.6% d'agarose (Gibco BRL) dans du tampon TBE 1X (90 mM Tris-borate pH 8.3, 2 mM EDTA) ou TAE 1X (40 mM Tris-acétate pH 8.3, 1 mM EDTA). Un aliquot de 10 μ l du produit d'amplification était mélangé avec un tampon d'alourdissement (10X: 0.42% bleu de bromophénol, 50% glycérol dans de l'eau) avant d'être déposé dans un des puits du gel. Afin d'évaluer la longueur des segments d'ADN, des marqueurs de poids moléculaires étaient également inclus lors de la migration: le marqueur de 1 Kb (Gibco BRL) ou les marqueurs III et VI de Boehringer Mannheim (Laval, Qué). À la fin de l'électrophorèse, le gel était coloré dans une solution de bromure d'éthidium à 0.5 μ g/ml pendant 20 min et photographié sous ultra-violet (UV transilluminator; Fotodyne inc., New Berlin, WI).

5. Clonage et sous-clonage

5.1 Digestions enzymatiques

Les digestions enzymatiques étaient effectuées en mettant en contact l'ADN à cliver et l'enzyme de restriction dans le tampon optimal de l'enzyme (REact™ Buffer, Gibco/BRL: 50 mM Tris-HCl pH 7.4 à 8.0, 5-10 mM MgCl₂, 0-100 mM NaCl, 0-50

mM KCl selon le tampon). Le tout était généralement incubé de 1-3 h à la température optimale. Dans le cas des minipréparations (voir section 6.3.2), 20-30 $\mu\text{g/ml}$ de RNase étaient également ajoutés dans le mélange.

Lorsque deux enzymes devaient être utilisés conjointement et qu'aucun tampon ne pouvait être employé pour effectuer les digestions simultanément, une première digestion était effectuée puis l'ADN était extrait par phénol/chloroforme. Ensuite, l'ADN était précipité en ajoutant 0.1 volume de NaOAc 3 M, 2.5 volumes d'éthanol 100%, et 5 μl d'une solution de polyacrylamide 0.25% (Gaillard et Staruss, 1990). Après lavage à l'éthanol 70%, le culot était resuspendu dans un volume adéquat d'eau. L'ADN ainsi traité pouvait donc être soumis à la deuxième digestion dans le bon tampon.

5.1.1 Digestions partielles

Dans les cas où une digestion partielle était nécessaire, une première expérience était effectuée dans laquelle une même quantité d'ADN (généralement 1 μg) était soumise à un nombre variable d'unité d'enzyme (1 à 0.125 U). Après une incubation de 20 min à la température optimale de l'enzyme, une désactivation à la chaleur et une incubation de 30 min à la température de la pièce, le résultat était analysé sur gel d'agarose. La réaction donnant le meilleur résultat était reprise dans les mêmes conditions.

5.2 Purification des fragments d'ADN

5.2.1 Produits par PCR

Si le fragment d'amplification attendu était le seul présent, la purification de ce dernier était effectuée au moyen de la trousse "Magic™ PCRpreps" (Fisher) afin d'éliminer les dimères d'amorces. Pour ce faire, 100 μ l de tampon de purification (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) étaient ajoutés à 50 μ l du produit de PCR. Après avoir vortexé brièvement, 1 ml d'une résine de composition non-divulguée par le commerçant était ajouté, puis le tout était bien mélangé en vortexant 3 fois sur une période d'une minute. Le contenu du tube était ensuite transféré dans une seringue de 3 ml à laquelle avait été fixée une petite colonne. La résine était alors poussée dans la colonne puis lavée avec 2 ml d'isopropanol 80%. Après une centrifugation de 30 sec, afin d'éliminer l'excès d'isopropanol, 50 μ l d'eau étaient ajoutés à la colonne. Une minute plus tard, une autre centrifugation de 30 sec était effectuée pour éluer l'ADN.

Dans le cas où plusieurs fragments étaient obtenus, la bande d'ADN voulue était purifiée en utilisant la trousse GeneClean® II (BIO 101, La Jolla, CA). Rapidement, 30 μ l du produit de PCR étaient soumis à une électrophorèse dans du tampon TAE 1X, puis, après coloration au bromure d'éthidium, la portion du gel d'agarose contenant le fragment voulu était récupérée et 3 volumes de NaI 6 M y étaient ajoutés. Après une incubation à 56°C afin de faire fondre l'agarose, l'ADN était adhérent sur des billes de verre. Le complexe ADN-billes de verre était ensuite culoté par centrifugation et lavé

3 fois avec la solution de lavage (solution de Tris/EDTA/NaCl/EtOH). Finalement, le culot était resuspendu dans de l'eau (10-20 μ l) et le tout incubé 2 min à 56°C afin d'éluer l'ADN. Après centrifugation, le surnageant, qui contient l'ADN, était prélevé. La présence du fragment purifié était ensuite vérifiée sur gel d'agarose.

5.2.2 Produits par digestion enzymatique

Dans la plupart des cas, les produits de digestion enzymatique n'étaient pas purifiés l'un de l'autre. Le mélange réactionnel était seulement soumis à la trousse de purification sur colonne "Magic™ DNA Clean Up" (Fisher) permettant de remplacer très rapidement le tampon de digestion par de l'eau. Ce protocole est totalement identique à celui décrit ci-haut pour la trousse "Magic™ PCRpreps" (section 5.2.1) excepté qu'aucun tampon de purification n'est utilisé ici. Lorsque nécessaire, généralement pour diminuer le temps de criblage des transformants, le fragment désiré était purifié sur gel d'agarose comme décrit ci-haut (section 5.2.1).

5.3 Clonage

5.3.1 Vecteurs

pUC19 (2686 pb): Vecteur possédant le gène de la résistance à l'ampicilline (Amp^r) et un site de clonage multiple (SCM) dans la région codant pour le peptide α du gène *lacZ* (*LacZ α*) permettant la sélection par complémententation de la β -galactosidase en présence de X-gal et d'IPTG (voir section 6.3).

pCRTM II (3932 pb): Vecteur possédant les gènes de résistance à l'ampicilline (Amp^r) et à la kanamycine (Kan^r), l'origine de réplication colE1, l'origine de réplication du phage filamenteux F1 et le gène *LacZ* α dans lequel les produits de PCR peuvent être directement clonés grâce à la présence d'une thymine en extension 3'. La sélection par complémentation de la β -galactosidase est possible.

T-Vecteur (2719 pb): Vecteur dérivé de pUC19 par clonage, entre les sites de restriction *Bam* HI et *Xba* I du SCM de pUC19, d'un oligonucléotide portant 2 sites *Xcm* I. Après digestion complète avec *Xcm* I, des extensions d'une base (une thymine) se créent en 3' et permettent le clonage direct des produits de PCR. La sélection par complémentation de la β -galactosidase demeure toujours présente. Ce vecteur fut construit par le Dr Jean Bergeron.

5.3.2 Clonage des produits de PCR

Les produits de PCR étaient clonés soit dans le T-Vecteur soit dans le vecteur pCRTMII (Ta cloningTM kit; Invitrogen, San Diego, CA). Dans le cas du T-Vecteur, la réaction de ligation était effectuée à 12°C pour un minimum de 3 h dans un volume de 10 μ l de tampon de ligation 1X (Boehringer Mannheim; MgCl₂ 5 mM, dithioerythritol 1 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 66 mM pH 7.5) contenant un ratio molaire insert:vecteur de 3:1 et 1 U de ligase (T4 DNA ligase; Boehringer Mannheim). Pour pCRTMII, le tampon de ligation ainsi que la ligase étaient ceux fournis par Invitrogen et le protocole était identique sauf que 4 U de ligase étaient utilisées.

5.3.3 Clonage des produits de digestion enzymatique

Que ce soit pour des extrémités cohésives ou franches, le clonage était effectué de façon tout à fait similaire au clonage dans le T-Vecteur (tampon, rapport molaire, unités de ligase) avec pour seule différence que la réaction se déroulait à la température de la pièce dans le cas d'extrémités franches.

Lorsque le vecteur possédait des extrémités compatibles capables de se refermer sur elles-mêmes, une étape de déphosphorylation était effectuée avant la ligation afin de réduire le nombre de transformants non-désirés. Pour ce faire, 1-2 μg de vecteur digéré/purifié (voir section 5.2.2) était incubé 30 min à 37°C dans du tampon "One-Phor-All *PLUS*" (Pharmacia; 1X: 10 mM Tris-acétate pH 7.5, 10 mM Mg-acétate, 50 mM KOAc) en présence de 0.1 U de phosphatase alcaline isolée de la muqueuse intestinale du veau (Pharmacia). La phosphatase alcaline était ensuite désactivée à 85°C pour 15 min.

6. Manipulations de *E. coli*

6.1 Milieux de cultures

2YT: 16 g/l de bacto-tryptone (Difco), 10 g/l d'extrait de levure (Difco), 5 g/l de NaCl. Après avoir ajusté la pH à 7.0 avec du NaOH 5 N, le tout était autoclavé 20 min. Pour les géloses, 15 g/l de bacto-agar (Difco) était inclus au mélange avant

stérilisation.

SOB: 20 g/l de bacto-tryptone (Difco), 5 g/l d'extrait de levure (Difco), 0.5 g/l de NaCl. Après dissolution, 10 ml/l de KCl 250 mM étaient ajoutés et le pH ajusté à 7.0 avec du NaOH 5 N. Après stérilisation (20 min dans l'autoclave), 5 ml/l de MgCl₂ 2 M, également autoclavé 20 min, était ajouté.

6.2 Transformation de *E. coli*

6.2.1 Géotypes des souches de *E. coli* utilisées

SURE (Stratagene): e14⁻(mcrA), Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, recB, recJ, muC::Tn5 (kan^r), uvrC, supE44, lac, gyrA96, relA1, thi-1, λ⁻, endA1, [F':proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (tet^r)].

XL-1 BLUE (Stratagene): recA1, endA1, gyrA96, thi-1, λ⁻, hsdR17, supE44, elA1, lac, [F': proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (tet^r)].

INVαF' (Invitrogen): endA1, recA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, λ⁻, gyrA, relA1, φ80 lacZΔM15Δ(lacZYA-argF), deoR⁺, F'.

6.2.2 Cellules compétentes

Seules les souches de *E. coli* XL-1 BLUE et SURE ont dû être traitées puisque la souche INVαF' était déjà compétente. Le protocole suivi était celui décrit par Inoue *et*

al. (1990). Une dizaine de colonies fraîches étaient utilisées pour inoculer 250 ml de milieu SOB contenant 10 $\mu\text{g/ml}$ de tétracycline, afin de sélectionner les bactéries portant l'épisome F'. Le tout était incubé à 18°C sous agitation jusqu'à obtention d'une D.O._{600nm} de 0.6. Ensuite, le bouillon de culture était centrifugé à 4°C et le culot bactérien resuspendu dans 80 ml de TB froid (10 mM Pipes, 55 mM MnCl_2 , 15 mM CaCl_2 , 250 mM KCl). Après centrifugation, le culot était resuspendu dans 20 ml de TB et 1.4 ml de DMSO était ajouté lentement. Suivant une incubation de 10 min sur la glace, la suspension était distribuée en aliquots de 500 μl dans des tubes Eppendorf puis rapidement déposée dans de la glace sèche/éthanol avant d'être transférée à -70°C. Avant utilisation, les cellules compétentes étaient dégelées à la température de la pièce puis maintenues sur la glace.

6.2.3 Transformation

Dans un premier temps, 50 à 200 μl de cellules compétentes étaient transférées dans un tube de polypropylène de 15 ml (Becton Dickson Labware, Lincoln Park, NJ), et 2 μl de produit de ligation (voir section 5.3) étaient ajoutés. Après une incubation de 30 min sur la glace, le tube était transféré à 42°C pour 45 sec; ceci crée un choc thermique permettant à l'ADN d'entrer dans la bactérie. Ensuite le volume était complété à 1 ml (500 μl pour la souche $\text{INV}\alpha\text{F}'$) avec du 2YT et le tout incubé sous agitation à 37°C pendant 1 h. Finalement 50 à 150 μl de bouillon étaient étalés sur une gélose de milieu 2YT contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline, 2 $\mu\text{l/ml}$ d'IPTG 0.1M et 2 $\mu\text{l/ml}$ de X-Gal 4% dans du DMF (IPTG, X-Gal: Boehringer Mannheim). La gélose

était ensuite incubée à 37°C en position inversée jusqu'à apparition des colonies (12-16 h). Dans le cas de la souche INV α F', la gélose ne contenait pas d'IPTG puisque cette souche n'exprime pas le répresseur *lacI* (voir section 6.3).

6.3 Criblage des transformants

L'ajout aux géloses des 3 éléments mentionnés ci-haut facilite considérablement le criblage des transformants. En effet, la présence d'ampicilline permet l'exclusivité de croissance aux bactéries transformées réduisant ainsi le nombre de colonies sur la gélose. De plus, les deux autres éléments (IPTG et X-Gal) permettent la différenciation entre une bactérie ayant incorporé seulement le vecteur (colonie bleue; *LacZ* fonctionnel) et une bactérie ayant capté un vecteur avec insert (colonie blanche; *LacZ* non-fonctionnel). Dans ce mécanisme, l'IPTG lève la répression exercée par *lacI* sur le promoteur de *LacZ* tandis que le X-Gal est un substrat chromogénique de la β -galactosidase qui, lorsqu'hydrolysé, libère une couleur bleue. Ainsi, lorsque ce type de sélection était présent, seules les colonies blanches étaient analysées à l'aide des techniques décrites plus bas.

6.3.1 Technique de Le Gouill

Après transformation, les colonies choisies étaient analysées, quant à leur contenu plasmidique, par la technique de Le Gouill (Le Gouill et Déry, 1991). À l'aide d'un embout de pipette stérile, une colonie était aspirée et repiquée sur une deuxième gélose avant d'être resuspendue dans 8 μ l du mélange de lyse (9 volumes de tampon

d'alourdissement 10 X + 40 volumes de solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) + 11 volumes d'eau). Après avoir déposé 1.5 μ l de solution III (3 M potassium et 5 M acétate, pH 4.8) sur le côté du tube Eppendorf, une centrifugation de 5 min était effectuée et le surnageant analysé par électrophorèse sur gel d'agarose dans du tampon TBE 1X. Cette technique permet de distinguer facilement une différence de 300 pb entre deux plasmides et permet l'analyse rapide de 240 colonies dans une même journée.

6.3.2 Minipréparations (lyse alcaline)

Suivant l'analyse par la technique de Le Gouill, les transformants intéressants étaient prélevés de la deuxième gélose et inoculés dans 2 ml de milieu 2YT ayant 100 μ g/ml d'ampicilline. Après avoir incubé 12-16 h à 37°C sous agitation, la technique classique de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989) était suivie afin d'isoler l'ADN plasmidique. Dans un premier temps, le culot provenant de la centrifugation de 1.5 ml de bouillon de culture était resuspendu dans 100 μ l de solution I (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM glucose, 10 mM EDTA). Deuxièmement, 200 μ l de solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) étaient ajoutés et le tube était agité doucement par inversions répétées. Troisièmement, 150 μ l de solution III (3 M potassium et 5 M acétate, pH 4.8) étaient ajoutés. Le tout était alors agité par inversion avant d'être centrifugé 5 min. Le surnageant était ensuite récupéré, et un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) était ajouté. Après une centrifugation de 2 min, le surnageant était récupéré, mélangé à 2 volumes d'éthanol puis centrifugé 5 min afin de précipiter l'ADN. Finalement, le culot d'ADN était lavé avec 1 ml d'éthanol 70% puis séché sous vide

avant d'être resuspendu dans 30 μl d'eau distillé. Cet ADN plasmidique était visualisé sur gel d'agarose et analysé par digestion enzymatique. Les clones choisis étaient ensuite conservés à -70°C ou -20°C en mélangeant 400 μl de glycérol stérile et 600 μl de bouillon de culture.

7. Séquençage

7.1 Préparation de l'ADN

Les clones devant être séquencés étaient inoculés dans 4 ml de milieu 2YT ayant 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ampicilline. Après incubation à 37°C pour 12-16 h, 3 ml du bouillon étaient utilisés pour l'extraction de l'ADN plasmidique au moyen de la trousse de purification sur colonne "MagicTM Minipreps" (Fisher). Pour ce faire, le culot de bactéries était resuspendu dans 200 μl de la solution de resuspension (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A). Ensuite, 200 μl de solution de lyse (0.2 N NaOH, 1% SDS) étaient ajoutés puis le tube était agité délicatement par inversion avant d'ajouter 200 μl de solution de neutralisation (2.55 M KOAc, pH 4.8). Après une centrifugation de 5 min, le surnageant était prélevé et 1 ml de résine (composition non-divulguée) y était ajouté. Après avoir bien agité, l'ADN était purifié sur colonne exactement comme décrit à la section 5.2.1 sauf que la solution de lavage, au lieu d'être de l'isopropanol 80%, était la suivante: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 50% EtOH. L'ADN plasmidique ainsi purifié était conservé à -20°C

jusqu'à sa dénaturation précédant la réaction de séquençage.

7.2 Réaction de séquençage

Comme la Taq polymérase peut faire des erreurs d'incorporation lors de l'amplification, un minimum de deux clones ont été séquencés pour chacun des fragments clonés quoique, dans la grande majorité des cas, trois clones ont été analysés.

7.2.1 Séquençage manuel

Le séquençage des divers amplicons clonés était réalisé selon la méthode "dideoxy" décrite par Sanger *et al.* (1977) en utilisant la trousse de séquençage "T7 sequencing kit" (Pharmacia). Comme le fragment à séquencer était sous forme de plasmide (i.e. double-brin), une étape de dénaturation de l'ADN devait être effectuée. Ainsi, à 25 μ l d'échantillon (contenant 1-1.5 μ g d'ADN / kpb) étaient ajoutés 50 μ l d'une solution dénaturante (0.2 N NaOH, 0.2 mM EDTA). Après une incubation de 30 min à 37°C, 7.5 μ l de NH₄OAc 2 M (pH 4.5) étaient ajoutés, puis l'ADN était précipité par addition de 206 μ l d'EtOH froid. Suivant une incubation de 30 min à -70°C et une centrifugation de 15 min, le culot était lavé avec 1 ml d'EtOH 70% froid. Après une autre centrifugation de 10 min, le culot était séché puis resuspendu dans 14 μ l d'une solution composée de 2 μ l de solution d'appariement (1 M Tris-HCl pH 7.6, 100 mM MgCl₂, 160 mM DTT), 2 μ l de l'amorce (5 pmol/ μ l) et 10 μ l d'H₂O. Les amorces utilisées étaient généralement les suivantes: SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATA-3'), T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), UP (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') et

RP (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). La réaction d'appariement se déroulait alors à 37°C pour une période de 20 min puis le mélange était refroidi, pendant au moins 30 min, à la température ambiante. À ce mélange était ensuite ajouté 1 μ l de [α -³⁵S]dATP (Amersham, 37 MBq, 1 mCi, 1000 Ci/mmol), 2 μ l de T7 DNA polymérase (1.5 U/ μ l) et 3 μ l d'une solution de NaCl 333.5 mM contenant 1.375 μ M de chacun des nucléotides non-marqués (dCTP, dGTP et dTTP). Le tout était alors incubé à la température ambiante pour 5 min. Le produit de la réaction était ensuite réparti, en aliquots de 4.5 μ l, dans quatre tubes préchauffés à 37°C et identifiés G, A, T et C. Chacun de ces tubes contenait déjà 2.5 μ l de solution de terminaison composée de 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), de 50 mM NaCl et, par exemple pour le tube "A", de 840 μ M de chacun des nucléotides dGTP, dCTP et dTTP, de 93.5 μ M de dATP et de 4.5 μ M de ddATP. Ces mélanges réactionnels étaient incubés à 37°C pour 5 min puis 5 μ l de solution d'arrêt (97.5 % formamide, 0.3 % bromophénol bleu, 0.3 % xylène cyanol FF, 10 mM EDTA) étaient ajoutés. Le tout était ensuite conservé à -20°C jusqu'à l'électrophorèse.

De façon générale, les gels de séquence étaient préparés à partir d'un mélange d'acrylamide:bisacrylamide (38:2) et d'urée dans du tampon TBE. Pour un gel standard (35 x 42.5 cm), 150 ml d'une solution d'acrylamide 6% et d'urée 7M étaient préparés. À cette solution étaient ajoutés, juste avant de couler le gel, 150 μ l de TEMED et 750 μ l d'ammonium persulfate 10%. Le gel était ensuite coulé entre deux plaques de verre, l'une d'elles ayant été traitée avec du Silane A174 (Pharmacia) et l'autre ayant été traitée avec de l'anti-adhésif de type PAM pour faciliter le décollement du gel. Après

polymérisation de l'acrylamide (30-60 min), le gel était installé sur un appareil IBI modèle STS 45. Le peigne, de type dents de requin, était ensuite inséré et une pré-électrophorèse, dans du tampon TBE 1X, était alors effectuée afin de permettre au gel d'atteindre une température d'environ 45°C. Après avoir bien rincé les puits, 2 μ l de chacun des produits de réaction (G, A, T et C) étaient déposés dans des puits voisins et l'électrophorèse était ensuite entamée à voltage constant de 1800 volts. Le temps de la migration variait selon que la séquence désirée se trouvait près ou loin de l'amorce utilisée lors de la réaction. Les plaques de verres étaient ensuite séparées et le gel était mis 15 min dans la solution de fixation (10% méthanol, 10% acide acétique) puis rincé 2 fois 10 min avec de l'eau distillée. Le gel était finalement séché en position inclinée avec 2 séchoirs à cheveux et mis en contact directement avec un film pour autoradiographie de type X-Omat RP (Kodak). Après le temps d'exposition désiré, le film était développé automatiquement au moyen de l'appareil X-Omat M20 Processor (Kodak). Notons que la majorité de ces réactions furent réalisées au service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier par Mmes Johanne Roger et Lise Forget.

7.2.2 Séquençage automatique

Plusieurs réactions ont été également effectuées par séquençage automatique au moyen du "Automated Laser Fluorescent (A.L.F.) DNA sequencer" (Pharmacia) en employant la trousse "AutoRead sequencing kit" (Pharmacia). Toujours basé sur le principe "dideoxy" décrit par Sanger *et al.* (1977), ce protocole nécessite le marquage des amorces avec des fluorochromes plutôt qu'avec du [³⁵S]. Les résultats nous étaient

alors transmis par ordinateur sous forme de chromatogrammes à partir desquels les séquences étaient analysées. Comme toutes les réactions impliquant le séquençage automatique furent réalisées par le service de séquençage de l'IAF, elles ne seront pas décrites ici quoique le protocole est tout à fait comparable à la technique de séquençage manuel décrite ci-haut.

8. Analyse des séquences

La plupart des analyses (sites de restriction, traduction en séquence d'acides aminés, homologues entre les souches) étaient effectuées avec le programme Pustell (IBI).

Le programme PROSIS (Hitachi) a été utilisé afin d'obtenir le profil d'hydrophobicité de la p54 des différentes souches de BVDV. Ce programme calcul de façon progressive l'hydrophobicité et l'hydrophilicité d'une séquence en acide aminé en se basant sur divers paramètres possibles; ceux choisis pour la présente étude sont ceux décrits par Kyte et Doolittle (1982).

Les dendrogrammes furent effectués au moyen du programme PileUp (GCG) qui utilise une version simplifiée de la méthode décrite par Feng et Doolittle (1987). PileUp génère un alignement multiple à partir d'un groupe de séquences homologues en utilisant

progressivement des alignements pairés. Ainsi, le programme débute en regroupant ensemble les deux séquences les plus homologues et, ensuite, il lie à ce premier groupe l'autre séquence ou l'autre groupe (de deux ou plusieurs séquences) s'y rapprochant le plus. Donc, plus le programme progresse, plus il relie ensemble des séquences se distinguant de plus en plus les unes des autres. En plus de la liste des séquences à aligner, trois paramètres sont requis et les valeurs prédéfinies furent utilisées:

GAPweight = 3.0: pénalité imposée pour les brèches dans la séquence

LENGHTweight = 0.1: pénalité variant selon la longueur de chaque brèche

Density = 100: nombre de séquences par 100 alignements

L'analyse des structures secondaires et le calcul des ΔG correspondants ont été réalisés par le programme PC/GENE (Intelligenetics Inc.) qui utilise la méthode décrite par Zuker et Stiegler (1981) et les valeurs d'énergie libre de Freier *et al.* (1986). Les paramètres utilisés furent les suivants:

Énergie additionnelle de diverses structures: 0

Maximum bulge/interior loop size (0-30 bases): 30 b

Minimum Hairpin loop size (3-50 bases): 3 b

Distance maximale entre les base pairées (5-1000 bases): 1000 bases

Mode de repliement: régulier

À titre de comparaison, une deuxième analyse des structures secondaires a été effectuée avec le programme FOLD (GCG) qui se base lui aussi sur la méthode décrite par Zuker et Stiegler (1981) et les valeurs d'énergie libre de Freier *et al.* (1986). Les paramètres utilisés étaient les paramètres prédéfinis du programme.

RESULTATS

1. Étude de la région codant pour la p125

1.1 Définition des bordures de la p125 (p54/p80)

Au début du projet, les bordures de la p125 n'étaient pas connues précisément, il a donc été décidé d'amplifier et de séquencer une région qui, croyait-on, allait couvrir de façon certaine le gène entier de la p125. En se référant au génome de la souche NADL (Collet *et al.*, 1988a), la région délimitée se situait entre les nucléotides 3297 et 7642. Notons que tous les chiffres qui suivront, et qui font allusion à la position d'un nucléotide ou d'un acide aminé, correspondent également à ceux de la souche NADL.

Très récemment, une étude a fait mention de l'emplacement des bordures de la p125 avec plus de précision (Becher *et al.*, 1994). Dans ce rapport, il est souligné que le gène de la p125 débuterait entre les nucléotides 3515 et 3697 (aa 1044-1104) tandis qu'il se terminerait avant le nucléotide #7555 (aa 2390). La portion du génome que nous avons initialement entrepris de vérifier s'avérait donc contenir la totalité de la région codant pour la p125.

Pour fin de comparaison entre les différentes souches étudiées, nous avons assumé, en nous basant principalement sur l'étude de Becher *et al.*, que le gène de la p125 débutait au nucléotide #3608 (aa 1075) et qu'il se terminait au nucléotide #7555 (aa 2390). Comme la p125 est constituée de la p54 et de la p80, ces deux dernières bordures représenteront également le début de la p54 et la fin de la p80 respectivement. Le point

de jonction entre la p54 et la p80 n'étant pas connu avec précision, nous l'avons placé entre les nucléotides 5422 et 5423 (aa 1679/1680), i.e. à la même position que Becher *et al.* (1994).

1.2 Amplification par PCR et clonage

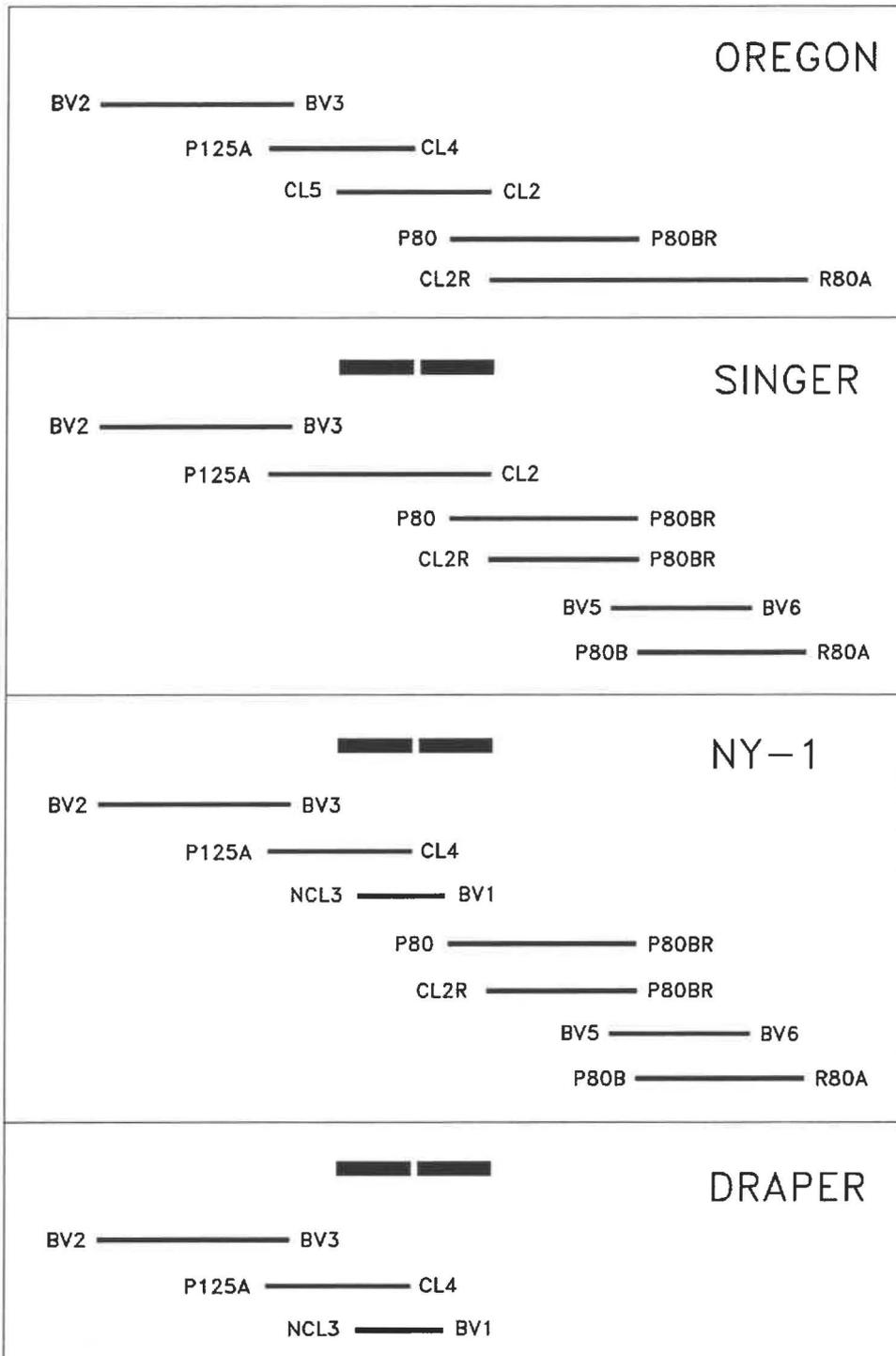
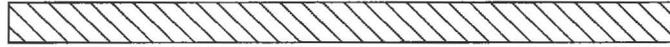
Lors du projet de maîtrise de Mme Susan Moir, effectué à l'IAF dans les laboratoires des Drs Lecomte et Tijssen, la région codant pour la p125 des souches Singer (CP), NY-1 (NCP) et Draper (NCP) fut partiellement étudiée (Moir, 1991). Plus précisément, les régions correspondant aux fragments CL5/CL4 (≈ 420 nt) et CL1/CL2 (≈ 450 nt) furent amplifiées, clonées et séquencées. Ainsi, pour ces trois souches, il s'agissait de compléter la région codant pour la p125 afin d'en obtenir la séquence complète (≈ 3800 nt). En ce qui a trait à la souche Oregon (CP), comme elle n'avait pas fait l'objet du projet de S. Moir, le gène complet de la p125 a dû être amplifié et séquencé.

En utilisant les amorces décrites à la figure 6, divers amplicons, se superposant l'un l'autre, furent obtenus pour chacune des souches étudiées (figure 8). Dans le cas des souches Singer, Oregon et NY-1, ces fragments contribuent à couvrir la portion du génome situé entre les amorces BV2 et R80A, soit plus de la totalité de la région codant pour la p125. Pour la souche Draper, les combinaisons d'amorces P80/P80BR, CL2R/P80BR, P80B/R80A et CL2R/R80A furent utilisées sans succès. Il en est de même pour la combinaison CL1/CL2 qui avait cependant été obtenue et séquencée par

Figure 8

Représentation schématique des fragments amplifiés, clonés et séquencés lors de l'étude portant sur la région codant pour la p125 des souches de laboratoire Oregon, Singer, NY-1 et Draper. Les amorces utilisées lors du PCR sont inscrites aux extrémités du fragment. Pour les souches Singer, NY-1 et Draper, les fragments CL5/CL4 et CL1/CL2, indiqués par deux traits foncés situés dans le haut de chacune des fenêtres, avaient déjà été séquencés par S. Moir (1991). Notons qu'une amplification au moyen de chacune des paires d'amorces fut effectuée à partir du surnageant de cellules non-infectées et que le résultat fut négatif.

p125



Moir (1991). Découlant de cela, seule la région allant des amorces BV2 à BV1 (nt 3297 à 5449), qui comprend toutefois le gène entier de la p54, a pu être amplifiée. Pour des raisons qui seront mentionnées plus loin (section 1.4.1), nous n'avons pas insisté davantage afin d'amplifier la région codant pour la p80 de la souche Draper.

Dans tous les cas, et ce même pour les deux souches CP, la longueur des amplicons obtenus correspond à celle attendue pour des souches de BVDV ne possédant pas d'insertion ni de délétion majeure.

Chacun des fragments d'amplification fut ensuite cloné dans le vecteur T ou dans le vecteur pCRTMII. Après transformation, la technique de Le Guill fut utilisée pour le criblage des transformants. Un exemple des résultats obtenus à l'aide de cette technique est donné à la figure 9.

1.3 Analyse des séquences de cDNA

1.3.1 Séquences de la région codant pour la p125

La compilation des séquences de cDNA des divers amplicons obtenus pour les souches Singer, Oregon, NY-1 et Draper est donnée à la figure 10. Mis à part l'insertion de 12 nt située dans la région codant pour la p54 de la souche NY-1, (De Moerlooze *et al.*, 1990; Moir, 1991), aucune autre insertion ou délétion ne fut rencontrée dans la région codant pour la p125 des souches Oregon, Singer et NY-1 de même que dans la région codant pour la p54 de la souche Draper.

Figure 9

Exemple du résultat obtenu lors du criblage de 58 transformants en utilisant la technique de Le Gouill. Pour chaque série de 30 puits, on inclut un clone contenant un plasmide sans insert (puits 15 et 45; négatif). Les clones dont la migration du plasmide est retardée due à l'insertion d'un fragment peuvent donc être sélectionnés. Pour l'analyse illustrée ici, les clones des puits #8, 13, 14, etc. auraient été choisis. Gel d'agarose 0.8% dans du TBE 1X.

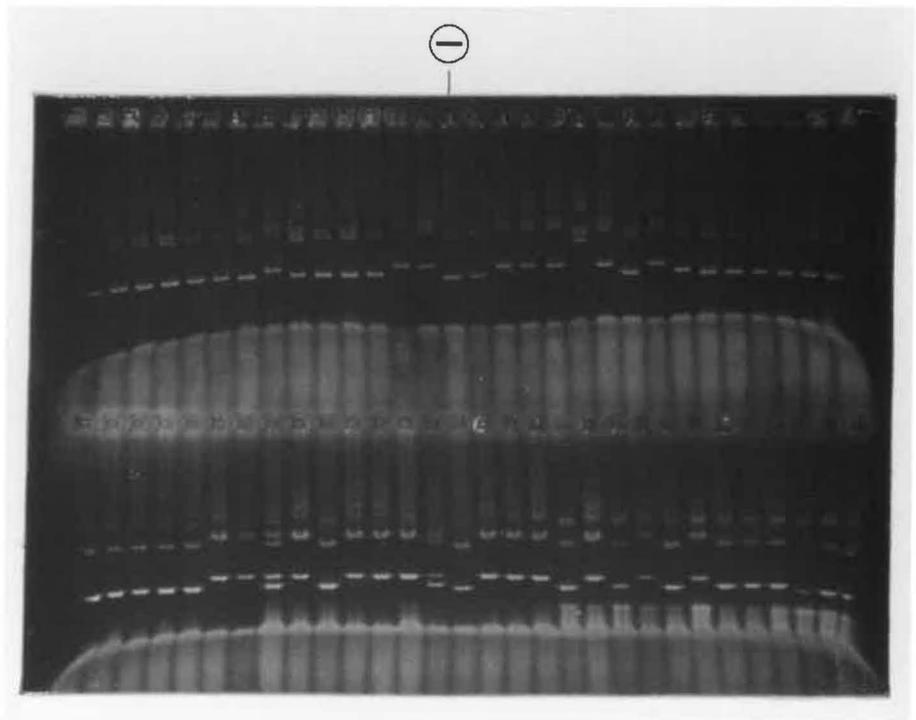


Figure 10

Comparaison des séquences de cDNA au niveau de la région codant pour la p125. Un (.) indique une similarité et une lettre une différence par rapport à la séquence de NADL. Le début et la fin de la p54 et de la p80, tels qu'ils ont été choisis, sont également indiqués. Pour Singer, Oregon, Draper et NY-1, les séquences sont celles obtenues au cours de cette étude et proviennent du séquençage de trois clones. Toutefois, les parties soulignées représentent les régions séquencées par S. Moir (1991), tandis que, dans le cas des souches NADL, Osloss et SD-1, les séquences correspondent à celles déjà publiées. Les insertions retrouvées chez les souches NADL, Osloss et NY-1 sont inscrites à la toute fin, et seule leur emplacement est indiqué dans la séquence. (Région montrée: nt 3297 à 7642 de NADL).

NADL : GACCATATGAAATCATATCAAGTGAGGGGCTGTAGAAAAGACAGCGTGTACTTTCAACTACACTAAGAC 3366
OSLOSS:TC.C.....G.....G.A.....C.....A.A..
OREGON: AG.....G.....C.....C.....G.....G.....C.....C.....A.G..
SINGER:A.....G.....C.....A..
SD-1 : A.....C.....G.....A.....A.C.C.....T.....G.G..
DRAPER: A.....T.....C.C.....G.G.....G.A.C.C.....A.GA..
NY-1 : A.....C.C.....A.G.....G.A.C.C.....T.ACGA..

NADL : ATTAATAATAAGTATTTTGAGCCGACAGACAGCTACTTTCAGCAATACATGCTAAAAGGAGAGTACAA 3436
OSLOSS:G.C.....A.....T.G.T.AT.T.C.A.....T.....G.....C..
OREGON: ..G.....A.....T.....C.A.....T.....
SINGER:C.....
SD-1 :A.....A.....T.....C.....G.....T.....
DRAPER:C.....C.....T.G.....A.....T.C.A.....T.....G.G.....C..
NY-1 :C.....C.....T.G.T.A.....T.C.....T.....G.G.....C..

NADL : TACTGGTTTGACCTGGAGGTGACTGACCATCACCGGGATTACTTCGCTGAGTCCATATTAGTGGTGGTAG 3506
OSLOSS: ..T.....A.A.C.....C.....C.C.G..A.A.G..
OREGON:C.....T.....C.....G..
SINGER:A.C.....T.C.....G..
SD-1 :C.....T.....T.C.....G..
DRAPER: ..T.....A.A.C.....C.....C.C.G..A.A..
NY-1 : ..T.....A.A.C.....C.....T.....C.G.C..A.AA..

NADL : TAGCCCTCTGGGTGGCAGATATGACTTTGGTTACTGGTTACATACATGGTCTTATCAGAACAGAAGGC 3576
OSLOSS: .T.A..C...C.T.G.C.G.C.....T.A.C.....A.T.A..
OREGON:C.....T.....C.G.C.....A.C.....T.....TC.....A.G..
SINGER:C.....A.....
SD-1 : ..T.TC.A.....T.....C.....C.....TC.....A..
DRAPER: .T.A..C...G.C.G.....G.....C.....C.....G.....A.TA..
NY-1 : .T.T..C...G.C.G.....C.G.....C.....A.TC.G.....A.T.A..

NADL : CTTAGGGATTTCAGTATGGATCAGGGGAAGTG GTGATGATGGGCAACTTGCTAACCCATAACAATATTGA 3645
OSLOSS: ..CG..ACG..CAGTAT.GG...T..A.A.....C.....A..G..G..
OREGON: ..C.....CC..A.....GG.....C.....A..G.T.G.G..
SINGER: ..C.....C.....G.....A.....TG.C..
SD-1 : ..C.....GCC.....GG.....G.....A..G.T..G..
DRAPER: ..C.....TGCC.....GG...T..A.A.....C.AT...A..G..G.G..
NY-1 : .A...TGCC.....G...T..A.A.....T...A..CG...GGT...

p54 (#3608)

NADL : AGTGGTGACATACTTCTTGCTGCTGTACTACTGCTGAGGGAGGAGAGCGTAAAGAAGTGGTCTTACTC 3715
OSLOSS:T.T.....A.A.A.....A.A.A.....A.A.A.C..A.A...TA...T
OREGON:T.....T.....A.A.....A.A.....G..
SINGER:T.....A.....T
SD-1 : ..A.....T.....CT.A.A.....G.....A.A.....T.....
DRAPER:T.....A.A.A.....A.A.A.....A.A.A.C..A.A...A.A..
NY-1 :T.....A.A.A.....A.A.....AGA...C..A.A...A...A

NADL : TTATACCACATCTTAGTGGTACACCCAATCAAATCTGTAATTGTGATCCTACTGATGATTGGGGATGTGG 3785
OSLOSS: A.....A.....AA.G.....C.A.....A.G.CG.....A.G.A..G...A.GGA..
OREGON: C.....C.....G.....T.A.....A.....CA.....T.T.....
SINGER:TC.....C.....T.....
SD-1 :G.....C.....T.A.G..A.G..A.....T.A..
DRAPER: A.....A.....AA.G.....C.A.....A.G.CG.....AT.G..A..G...A.G..
NY-1 : A.....A.....AA.G.....C.A.....G.G.CA.....AT...A..G...A.GGA..

NADL : TAAAGCCGATTTCAGGGGGCAAGAGTACTTGGGGAAAATAGACCTCTGTTTTACAACAGTAGTACTAAT 3855
OSLOSS: C.,G...A..AC...C.C...GAGC.T.C.A.A.C.GG.G...GA...T..TGA.CAGC..C..
OREGON: ..G.....C.....A.....G.....A.....C.G.....TG.....C.....TGA.T..G..G..
SINGER:A.C.....G.....T.....C.....T..T.....
SD-1 : .G.....T..CC.....GC.....C.....TC.G.....TG.....C.C.....TG..T..A..
DRAPER: C.....T..AC...T.C...G.G...C.A.A.C.GG.G...TA.....TGA.TACGA.C..
NY-1 : .G.....T..GC...C.C...G.G...C.A.A.C.GG...T.TA.C..C..G.TGA.CAGC..C..

NADL : CGTCATAGGTTTAAATCATAGCTAGGCGTGACCCAACTATAGTGCCACTGGTAACAATAATGGCAGCACTG 3925
OSLOSS: T..AG....C.GG...T..C....C....C....G.G.....A..C....G.T.....
OREGON: ..T.....C.....C.....G.....G.....C.....G.T...T.T..
SINGER: .A.....C.....A.....
SD-1 : .A.A.....G.....C.....T..G..C....A....A.C....G.A...T.G...
DRAPER: ..AG....C.GG.T....C.....C....G.G....G..A.C....G.T.T.....
NY-1 : ..AG.....GG.T....C.....T..C..G.G.....A..C....G.T.G.....

NADL : AGGGTCACTGAACTGACCACCAGCCTGGAGTTGACATCGCTGTGGCGGTCATGACTATAACCCTACTGA 3995
OSLOSS:A..G.G...AGG.TTTGG...C....G..TG.A...A...A...C.A..CT.G.....
OREGON: ..A.....C.G.T.....T..GGA.....G..G..G.A...A.A.....C.C...T.G...
SINGER:G.T....T.....G.....A...A.....C.....
SD-1 :G.T....T..AGC....G..G..TGCA..AA...A...A.C....T.G...
DRAPER: ..A....A.G...GG.TTTGG...C....G..TGCA..CA...A...C.C...CT.....
NY-1 : ..A....A.G...AGG.TTTGG.....G..TG.A..CA...A...C.C..CT...G.....

NADL : TGGTTAGCTATGTGACAGATTATTTAGATATAAAAAATGGTTACAGTGCATTCTCAGCCTGGTATCTGG 4065
OSLOSS: ..A...T.....C..C..C..G..C....GG...C...A..T..C....T.AA..G.C..
OREGON: ..CT.....C.....C.....G.....C.G....A.....T.....A..
SINGER:C.....G.....G.....G.A..
SD-1 :C..C.....G....C.G.....C.....A..
DRAPER: ..A...T.....C..C..C..G....GG...A...A..T..C....T.A..G.C..
NY-1 : ..A...T.....C..C..C..G....G...C...A..T..C....T.A..G.....

NADL : GGTGTTCTTGATAAGAAGCCTAATATACCTAGGTAGAAATCGAGATGCCAGAGGTAACCTATCCCAAAGTGG 4135
OSLOSS: ..T...C.T...C.....T.A.C.T..G..CGAG..T...CC..T...C.G..C.A..G.....
OREGON:C.....T.....C..A.....T.....G..C..T.....
SINGER:GC.....A..G.....C.....
SD-1 :T.....C.....T.....G..C.....G.C.....
DRAPER:C.T..TC.G....T.A.C.TT...GA...C.A.CC..T...C.G..C.A..G.....
NY-1 :C...TC.G....C.A.C.T....GA.G..A.A.CC..T...C.G..C.A..G.....

NADL : AGACCACTAACTTTAATACTATTATATTTGATCTCAACAACAATGTACGAGGTGGAAGGTTGACGTGG 4205
OSLOSS: ..G.....C..C.....G..CC...CT...G.....G...C..AC.A...A.....A.A..
OREGON:T..G.....C.....T.....G...T..ACT.....T..
SINGER:G.....A.T.....A.C..
SD-1 :C.....G..T...C...T.....G...T..A.T...A...T..
DRAPER:C..C.....CC...CT...G.....G...T..A..A...A.....A.A..
NY-1 : ..G.....G..C..C.....CC...CT...G.....G.A..C..A..A...A.....A.A..

NADL : CTGGCCTATTGTGCAATGTGTGCCTATCTTATTGCTGGTCAACAACCTGTGGGCCGACTTCTTAACCCT 4275
OSLOSS:A...AC...G.G.CC..A...C.TC....A.TG.C...C.A...T.....C.G...
OREGON:C...A..GG.....A...TG.....C.....C...T..
SINGER: ..T.G.....CC.....A...C.....
SD-1 : ..C.....A...G.....A...G..C.....T..
DRAPER:A...AC...G.G.CC..A...C.T...A..G.C...C.A.....C.G...
NY-1 :GA...AC...G.G.CC..A...C.T...A..T.C...C.A.....G...

NADL : AATACTGATCCTGCCTACCTATGAATTGGTTAAATTATACTATCTGAAAAGTGTAGGACTGATACAGAA 4345
OSLOSS: TG..T.....C..C.C....A..C..G..G....C....G..C..C.A...GTG...
OREGON: T....A.....C.....C..G.....C....GG...G.A.....T..
SINGER: C.....C.....C.....T..
SD-1 : C.....A...A.....C.....G.....CT.....A..A.....T..
DRAPER: TG.T.....A..C....C....A..C..G..G....C..A..G.AC..C.A.....CGTG...
NY-1 : TG.....T..A..C....C.....C..G..G....C..A..G.ACA.C.A.....GTG...

NADL : AGAAGTTGGCTAGGGGGATAGACTATACAAGAGTTGACTCCATCTACGACGTTGATGAGAGTGGAGAGG 4415
OSLOSS: .AG.....G.G....C.AG.C.A...G...T..T..T..TA.G...A.....
OREGON:C..AG...A..G...A.....T..
SINGER:C.....G.....A.....A..
SD-1 : .A...C....G....T.....AG.....T..
DRAPER: .AG.....T.....C.AG.C.A.....TG.T..T..T..G...A.....A..
NY-1 : .AG..C.....T.....C.AG.C..G.....G.T..T..T..G...A.....

NADL : ATCCAAAGGGGAGTCGTTACCTCCAAAAGACAGGTGGAGAATTCACGTGTGTCACCGCATCAGGCACA 5872
OSLOSS: G...G..A..T..CT..A.....A.....G.....A.....T..T.....G..A..T
OREGON:A.....A.....G.....T.....G
SINGER:G.....C.....
SD-1 : T.....C.....G.....
NY-1 : G...G..A..T..A.....A.....G.....T..A.....T..T.....T..

NADL : CCGGCTTCTTCGACCTAAAAAAGTGAAGGATGGTCAGGCTTGCCTATATTTGAAGCCTCCAGCGGGA 5942
OSLOSS: ..A..C.....T.....G.....T.....G.....TC..A..C.....G..T..T..T..C.
OREGON: ..A..C.....T..T.....G.....G.....G.....C.....C.....T..A.
SINGER:C..T.....A.....C.....
SD-1 :T..T.....G.....G..C..A.....A.
NY-1 : ..A..C.....T.....T.....G..T..A..C.....C.

NADL : GGGTGGTTGGCAGAGTCAAAGTAGGGAAGAATGAAGAGTCTAAACCTACAAAAATAATGAGTGGAAATCCA 6012
OSLOSS:C.....T.....A.....G..A..C..G..C.....T.....T.....
OREGON:G.....C.....C.....G.....T.....
SINGER:
SD-1 :T.....T..G..G.....A..C.....C..G..G.....C.....
NY-1 :C.....G..A.....C..G.....C.....C.....T.....T.....

NADL : GACCGTCTCAAAAAACACAGCAGACCTGACCGAGATGGTCAAGAAGATAACCAGCATGAACAGGGGAGAC 6082
OSLOSS: A.....G.....C..TT..A..A.....
OREGON:G..G..G.....T.....T.....T.....T.....
SINGER:G.....T..A..T.....
SD-1 :G.....T.....T.....T.....T.....T.....
NY-1 : A..T.....G..T.....C..TT..A..A..A.....T.....G..

NADL : TTCAAGCAGATTACTTTGGCAACAGGGGACAGGCAAAACCACAGAACTCCCAAAAGCAGTTATAGAGGAGA 6152
OSLOSS: ..T.....A..CC..T.....A.....T.....G.....G.....
OREGON: ..T.....A..A.....T.....A.....T.....G.....
SINGER:A.....
SD-1 :A..A..A.....A..G.....T.....G.....G.....
NY-1 :A..CC..T.....G..G.....G..G.....G..T..G.....A..

NADL : TAGGAAGACACAAGAGAGTATTAGTTCTTATACCATTAAGGGCAGCGGCAGAGTCACTACCAGTATAT 6222
OSLOSS:C..G..GC.....G.....G..A.....A..T.....T..A..C..
OREGON:C.....G.....C.....
SINGER:T.....
SD-1 :T..C.....GC.....C.....C..G.....A.....
NY-1 :C.....C..G..C..G..G.....A.....A..T.....A..C..

NADL : GAGATTGAAACACCCAAGCATCTCTTTAACCTAAGGATAGGGGACATGAAAGAGGGGACATGGCAACC 6292
OSLOSS:T..C..T.....C..C..T.....A.....A.....T.....
OREGON:T..A.....T.....A.....
SINGER:A.....G.....
SD-1 :T.....T.....G.....T.....
NY-1 :T.....T.....C.....G..A.....T.....G..A.....T

NADL : GGGATAACCTATGCATCATACGGGTACTTCTGCCAAATGCCTCAACCAAAGCTCAGAGCTGCTATGGTAG 6362
OSLOSS:C.....C..C.....T..A..T..T.....G..G..G.....G..C..A.....
OREGON:T.....G.....T.....A.....
SINGER:C.....
SD-1 :G.....T.....A.....T.....
NY-1 :T.....C.....T..A..T..T.....A..G.....G..A..A.....

NADL : AATACTCATACATATTTCTTAGATGAATACCATTGTGCCACTCCTGAACAACCTGGCAATTATCGGGAAGAT 6432
OSLOSS: .G..T.....TC..G.....G..T..C.....T.....G..GT.....TG..C..A..A..A..
OREGON:C.....T.....A..A..
SINGER:A.....
SD-1 :G.....C.....C.....GT.....A..A..
NY-1 :T.....TC..G.....G..T..C..C..T.....G..GT.....TG..C..A..A..A..

NADL : CCACAGATTTTCAGAGAGTATAAGGGTTGTGCGCCATGACTGCCACGCCAGCAGGGTCGGTGACCACAACA 6502
OSLOSS: T.....T..A..C.....G..T..T....C.....C.....A..A..T.....
OREGON:C.....T.....A..G..T.....C..G.....A..A.....
SINGER:A..C.....G.....
SD-1 :A..G..T.....T..C.....A.....
NY-1 : T.....C..T.....C.....G..T.....T..C.....A.....

NADL : GGTCAAAGCACCACCAATAGAGGAATTCATAGCCCCGAGGTAATGAAAGGGGAGGATCTTGGTAGTCAGT 6572
OSLOSS: ..G....A.....A.....T..T....G.....A..C....A..C....
OREGON: ..A.....A..G.....A..C..A..C..C....
SINGER:
SD-1 : ..A.....T.....G..G.....A.....A..C..C....
NY-1 : ..G....A.....A.....T....G....G.....C.....A..C....

NADL : TCCTTGATATAGCAGGGTTAAAAATACCAGTGGATGAGATGAAAGGCAATATGTTGGTTTTGTACCAAC 6642
OSLOSS:C.....G...C.....C..G.....G.....G..T..C...C.....C.....
OREGON:C.....G...C.....C..C.....T..C.....C.....
SINGER:T.....
SD-1 :G...C.....C..C.....G..T..C.....C..G..C..
NY-1 :C.....G.....G..C..C..A..G.....G.....C.....C.....G..C..

NADL : GAGAAACATGGCAGTAGAGGTAGCAAAGAAGCTAAAAGCTAAGGGCTATAACTCTGGATACTATTACAGT 6712
OSLOSS: A.....T..T....C.....A.....C.....C.....A..G..T..C.....
OREGON:T..T....G.....A.....C..T....G.....C.....
SINGER:G.....T.....
SD-1 :T....G..T.....C..T....G.....
NY-1 :T..T....C.....A..T....C.....C.....A....T..C.....

NADL : GGAGAGGATCCAGCCAATCTGAGAGTTGTGACATCACAATCCCCCTATGTAATCGTGGCTACAAATGCTA 6782
OSLOSS: ..G..A..C..G..T..CT...G..G..A.....G....A..C..CG..A..A..C..C.....C..
OREGON:T..C.....A.....G.....T.....T..A..C..G.....C..
SINGER:A.....G..G..T.....C.....
SD-1 :T.....A.....G.....T.....C..G.....C..
NY-1 : ..G..A..C.....C.....G..A.....G....A..C..TG..G..T..C..C.....

NADL : TTGAATCAGGAGTGACACTACCAGATTGTGACACCGGTTATAGACACGGGGTTGAAATGTGAAAAGAGGGT 6852
OSLOSS:G.....G..A..G..G.....A..T..A..G..T....A..TC....G.....
OREGON:T.....CG..G....A.....G.....
SINGER:G.....C.....
SD-1 : ..C..G..G.....T.....C.....A..CG..G..T..A.....A..
NY-1 : ..C..G.....G..A..G..G.....C..A..T..A..G..T....A..TC....C..G.....

NADL : GAGGGTATCATCAAAGATACCCTTCATCGTAACAGGCCTTAAGAGGATGGCCGTGACTGTGGGTGAGCAG 6922
OSLOSS:G.....A.....T....A.....A.....T..C.....C..A..
OREGON:T.....T.....C.....A..
SINGER:T.....
SD-1 :G..G.....A.....T..A.....A..
NY-1 :G.....C..A.....T..A..G.....A..A.....T..C.....C..A..

NADL : GCGCAGCGTAGGGGCAGAGTAGGTAGAGTGAAACCCGGGAGGTATTATAGGAGCCAGGAAACAGCAACAG 6992
OSLOSS: ..T....A..A....G.....G.....T....C....A.....G..C..
OREGON: ..T..A....A.....G.....A.....C.....C.....
SINGER: ..T.....A.....A.....A.....C.....
SD-1 : ..C..A..C....T.....A.....A.....A.....C.....
NY-1 : ..C.....G.....G.....G.....T....C....A..T.....C.....

NADL : GGTCAAAGGACTACCACTATGACCTCTTGACAGGCACAAGATACGGGATTGAGGATGGAATCAACGTGAC 7062
OSLOSS:G..A.....C..G..T....A..A.....
OREGON:C.....T.....C..G.....A..
SINGER:A.....
SD-1 :T.....G.....T.....A..
NY-1 :G..A.....G..G.....C..A.....G.....A..

NADL : GAAATCCTTTAGGGAGATGAATTACGATTGGAGCCTATACGAGGAGGACAGCCTACTAATAACCCAGCTG 7132
OSLOSS: A..G.....A.....G.....T.G..G.....
OREGON: A.....C..A..A.....T.....T.....T.....G.....T.A
SINGER: ..G.....T..
SD-1 : A.....C.....A.....C.....T.....G.....T.A
NY-1 : A..G.....T..C.....G..T.....A.....T...G.....

NADL : GAAATACTAAATAATCTACTCATCTCAGAAGACTTGCCAGCCGCTGTTAAGAACATAATGGCCAGGACTG 7202
OSLOSS: ..G.....G..C.....T.....C.A.....A..A..A.....C.....A.....
OREGON: ..G.....T.....A.....C.....T.....
SINGER:T.....A.
SD-1 :CT.....T.....G.....C.....
NY-1 : ..G.....G..C.....C.....T..A.....A.....C..A.....C.....A..A.....

NADL : ATCACCAGAGCCAATCCAACCTTGCATACAACAGCTATGAAGTCCAGGTCCCGGTCTATTCCCAAAAAT 7272
OSLOSS:A.....G.....T.....G.....T..A..G..T.....
OREGON:C..G.....A..G..G.....G.....
SINGER:G.....
SD-1 :G.....C..G.....A.....G.....
NY-1 :G.....T.....G.....T..G..G..T.....

NADL : AAGGAATGGAGAAGTCACAGACACCTACGAAAATFACTCGTTTCTAAATGCCAGAAAGTTAGGGGAGGAT 7342
OSLOSS:G..G..T.....T..T.....G..C.....A..C.....A.....AC.....A.....
OREGON:T.....T.....C.....A.....CT.....G..A.....C
SINGER:C.....
SD-1 :T.....T.....C.....A.....C..T.....A.....A.....
NY-1 :G.....T.....G..C.....A..C..T.....A..G..AC.....T..C

NADL : GTGCCCGTGTATATCTACGCTACTGAAGATGAGGATCTGGCAGTTGACCTCTTAGGGCTAGACTGGCCTG 7412
OSLOSS: ..A..T.....C..T..T..C..C.....A..C.....A.....TC.....CT..G.....C.....
OREGON: ..A.....C.....T..C.....C.....G.....C.....C.....
SINGER: ..A.....T..C.....
SD-1 : ..T..T..C.....T..C.....C.....AC.....C.....
NY-1 : ..T.....C..T..T..C.....G.....A.....G.....TC.....C..G.....A.....

NADL : ATCCTGGGAACCAGCAGGTAGTGGAGACTGGTAAAGCACTGAAGCAAGTGACCGGGTTGTCTCGGCTGA 7482
OSLOSS: .C..A.....A.....G.....GTA..AC.....T.....
OREGON:T..A.....C.....C..G.....G.....T..A.....
SINGER:C.....
SD-1 :A.....T.....A.....A.....G.....A.....
NY-1 : .C..A.....T.....A.....A.....G.....A.....GT..AC.....T..C..

NADL : AAATGCCCTACTAGTGGCTTTATTGGGTATGTGGGTACCAGGCTCTCTCAAAGAGGCATGTCCCAATG 7552
OSLOSS: G.....G..CA..A..CC..G.....A..A..T..A..T..G.....A..A..C.....
OREGON: G.....TT.....C.....A.....A.....A.....G.....
SINGER:T.....C..A.....T.....
SD-1 : G.....G..C.....C.....A.....T..A.....A..C.....
NY-1 :TT..G..TA..A..CC.....A.....A..CT..G.....A..C..T.....

NADL : ATA ACAGACATATATACCATCGAGGACCAGAGACTAGAAGACACCACCCACCTCCAGTATGCACCCAAC 7621
OSLOSS: ..C.....C.....A..A..T..A.....G.....A.....A.....T..T
OREGON: ..C.....T.....C..T..A.....
SINGER:
SD-1 : ..C.....T.....C.....A.....
NY-1 : ..C.....C.....A..A.....A.....G.....A..A.....T..A.....G.....T

NADL : GCCATAAAAACCGATGGGACA
OSLOSS: ..T....G...T..G....AG
OREGON: ..T.....G..A...
SINGER:A.....
SD-1 :T..G..A...
NY-1 : ..T....G...T..G....A.

7642

Insertions:

NADL : ATGTGCAGCCGATGCCAGGGAAAAGCATAGGAGGTTTGAAATGGACCGGGAACCTAAGAGTGCCAGATACT
GTGCTGAGTGTAATAGGCTGCATCCTGCTGAGGAAGGTGACTTTGGGCAGAGTCGAGCATGTTGGGCCT
CAAAATCACCTACTTTGCGCTGATGGATGGAAAGGTGTATGATATCACAGAGTGGGCTGGATGCCAGCGT
GTGGGAATCTCCCCAGATACCCACAGAGTCCCTTGTCACATCTCATTGGTTACGGGATG

OSLOSS: ATGCAGATCTTCGTGAAAACCCTGACCGGCAAGACCATCACCCCTGGAGGTGGAGCCCAGTGACACCATCG
AGAACGTGAAGGCCAAGATCCAGGATAAGGAAGGCATTCCCCCTGACCAGCAGAGGCTCATCTTTGCCCGG
CAAGCAGCTGGAAGATGGCCGCTCTCTTTCTGATTACAACATCCAGAAAAGAGTCGACCCTGCACCTGGTC
CTCCGCTCGAGGGGTAGT

NY-1 : TATCCTTCAGAA

Comme mentionné plus haut, le fragment CL1/CL2 de la souche Draper n'a pu être reproduit dans cette étude contrairement aux précédents travaux (Moir, 1991) qui décrivent la séquence de deux fragments (CL1/CL2 et CL4/CL5) qui toutefois ne se superposent pas l'un l'autre. Le fragment NCL3/BV1 obtenu ici superpose ces deux fragments, et les résultats du séquençage démontrent une homologie de 100% avec le fragment CL4/CL5, mais une faible homologie de 84% (11 différences sur 69 nt) avec le fragment CL1/CL2 de Moir (1991). Mis à part ce dernier point, toutes les autres séquences relatives aux souches Singer, NY-1 et Draper concordent avec celles de S. Moir; seules deux différences furent rencontrées (Singer nts 4922 et 5791). Pour la souche Oregon, notre région superpose de 154 nt (nt 3297 à 3450) la région de la gp53 étudiée par Paton *et al.* (1992). L'homologie entre les deux régions étant de 100%, ceci indique que la séquence donnée à la figure 10 correspond bien à celle d'Oregon.

1.3.2 Regroupement des souches

Le degré d'homologie entre la séquence nucléotidique de la p125 des différentes souches de laboratoire (NADL, Osloss, Singer, Oregon, SD-1, NY-1 et Draper) est donné au tableau 3. Comme il est possible de constater, deux groupes génotypiques (représentés en gris dans le tableau) peuvent être discernés: le premier (Ia) inclut les souches NADL, Singer, Oregon et SD-1 tandis que le second (Ib) inclut les souches Osloss, NY-1 et Draper. Ce regroupement demeure toujours le même en comparant la région codant pour la p54 ou celle codant pour la p80. Pour le gène de la p54,

Tableau 3

Pourcentage d'homologie entre les différentes souches
au niveau du gène de la p125 (p54/p80)

	SD-1	SINGER	OREGON	OSLOSS	NY-1	DRAPER
NADL	88.7 (86.5/90.2)	95.9 (94.4/96.9)	88.5 (86.1/90.2)	79.7 (75.7/82.7)	81.0 (77.5/83.5)	— (76.8/—)
	SD-1	88.7 (86.9/90.0)	90.8 (88.3/92.5)	80.8 (76.6/83.8)	81.6 (78.7/83.7)	— (78.0/—)
		SINGER	88.6 (85.6/90.7)	79.7 (75.5/82.7)	80.8 (77.1/83.5)	— (76.6/—)
			OREGON	80.9 (77.3/83.5)	81.5 (78.6/83.5)	— (78.6/—)
				OSLOSS	90.8 (90.1/91.4)	— (91.5/—)
					NY-1	— (93.3/—)

* Les insertions retrouvées dans le génome des souches NADL, Osloss et NY-1 sont omises pour la comparaison.

** Les régions ombragées représentent l'homologie entre les souches d'un même groupe.

l'homologie moyenne entre les deux groupes est de 77.3% tandis qu'elle est respectivement de 88.0 et 91.6% à l'intérieur des groupes Ia et Ib. Le dendrogramme représenté à la figure 11 démontre aussi l'existence des deux mêmes groupes. Notons que des membres de chacun des deux biotypes sont retrouvés dans les deux groupes.

1.4 Analyse des séquences en acides aminés

1.4.1 Souches CP sans réarrangement vs souches NCP

Les séquences en acides aminés, déduites à partir de la séquence nucléotidique, sont présentées à la figure 12. Puisque notre but était de trouver des particularités (insertions, délétions, mutations ponctuelles) présentes seulement chez les souches CP sans réarrangement (Singer et Oregon) par rapport aux souches NCP (SD-1, NY-1 et Draper), nous avons comparé les séquences attentivement. Comme mentionné à la section 1.3.1, aucune insertion ni délétion n'est retrouvée dans la p125 des souches Oregon et Singer. Toutefois, en considérant comme équivalent les acides aminés suivants: I=L=V, D=E, A=G=S=T et H=K=R (Falgout *et al.*, 1993), on peut identifier six résidus d'acides aminés spécifiques (ombragés dans la figure 12) qui différencient ces deux souches CP sans réarrangement des souches NCP. Ces six résidus particuliers sont tous retrouvés au niveau de la p54 et aucun ne se situe au niveau de la p80. Dans ce dernier cas, la comparaison n'incluait que les séquences de deux souches NCP (SD-1 et NY-1), mais comme elles furent suffisantes pour démontrer l'absence de mutations importantes au niveau de la p80, nous n'avons pas insisté pour obtenir la séquence de la p80 de la souche Draper. Parmi les six résidus identifiés au niveau de la p54 (aa 1144, 1198, 1242, 1479, 1511, 1645), on en retrouve un (#1511) à l'intérieur du domaine qui conférerait l'activité doigt de zinc à la p54.

Figure 11

Dendrogramme obtenu à partir de la séquence nucléotidique complète de la p54 (nt 3680 à 5422) des sept souches de laboratoire. Plus la ligne verticale se situe à droite de la figure, plus la similarité est élevée entre la séquence des souches reliées.

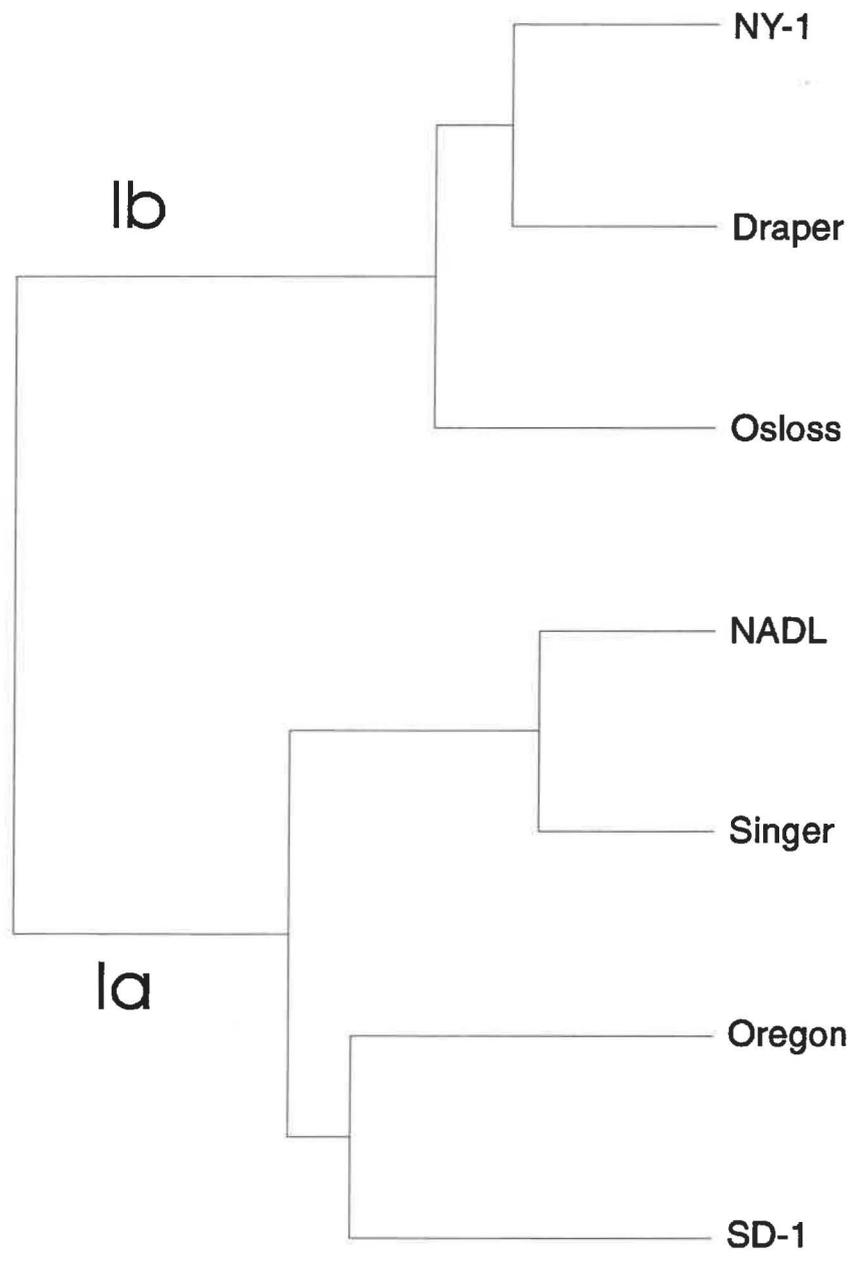


Figure 12

Comparaison des séquences en acides aminés de la p125. Le début et la fin de la p54 et de la p80, tels que choisis, sont indiqués. Les substitutions importantes d'acides aminés (voir texte) retrouvées chez les souches CP sans réarrangement (Oregon et Singer) par rapport aux souches NCP (SD-1, NY-1 et Draper) sont ombragées et correspondent aux aa 1144, 1198, 1242, 1479, 1511 et 1645. Les acides aminés soulignés en double représentent le domaine qui conférerait l'activité doigt de zinc à la p54 (De Moerlooze *et al.*, 1990). Les insertions retrouvées chez les souches NADL, Osloss et NY-1 sont inscrites à la toute fin, et seul leur emplacement est indiqué dans la séquence. (Région montrée: aa 972 à 2419 de NADL).

NADL : PYEIIISSEGPVEKTACTFPNYTKTLKNKYFEPDRDSYFQOYMLKGEYQYWFDFLEVTDDHHRDYFAESILVVVV 1041
OSLOSS: P Y N I L I
OREGON: P R
SINGER: R
SD-1 : .H. I R D
DRAPER: P R N I L I
NY-1 : P SR N I L II

NADL : ALLGGRYVLWLLVTYMLVSEQKALGIQYGSGEV VMMGNLLTHNNIEVVTYFLLLYLLLREESVKKWVLLL 1111
OSLOSS: I MTS . RPVWA . I DS NI I I
OREGON: R . S . T A DSV N
SINGER: S . T A D
SD-1 : S . A A D . V F
DRAPER: I . S . A A I DSV NI II I
NY-1 : I MTI . A A I DRF

p54 (#1075)

NADL : YHILVVHPIKSVIVILLMIGDVVKADSGGQEYLGKIDLCFTTVVLIVIGLIIARRDPTIVPLVTIMAALR 1181
OSLOSS: I . M L T V . GMAR . EP . A . SF . EQV . . S . SMIT . . V . . V V V
OREGON: A L T P . D . G Q V MI V . S
SINGER: S T G Q I I
SD-1 : A L T P G Q V M I I V S
DRAPER: I . M L T V . E . A EP . A . G EQV S MITI V V V K
NY-1 : I . M L T V . GM EP . A . G EQV . FS MIT V V V V K

NADL : VTELTHQPGVDIAVAVMTITLLMVSyvTDYFRYKkWLCILSLVSGVFLIRSLIYLGRITEMPEVTIPNWR 1251
OSLOSS: G . GFG V . M L L I R IA KH E T L
OREGON: G YG V I T T R HI
SINGER: G Y V M R V MH
SD-1 : G YS A M I R R C H T
DRAPER: I . G . GFG A . M L L I R . I A KH E OT L
NY-1 : G . GFG V . M L L I A KH EVKT L

NADL : PLTLILLYLISTTIVTRWKVDVAGLLQCVPIILLVTTLWADFLTLILILPTYELVKLYLKTVRTDTER 1321
OSLOSS: F T . A . V I I GA IA V H K V K
OREGON: V L L L G M . A A K I
SINGER: M I L A I
SD-1 : F V M I L G I IK I K
DRAPER: F T . A . V I I GA IA V N K V K
NY-1 : F T . A . V I I GA IS V NIK V K

NADL : SWLGGIDYTRVDSIYDVDESSEGvYLPFSRQKAQGNFISILLPLIKATLISCVSSKWQLIYMSYLTLDfMY 1391
OSLOSS: V KTIG M K . NGKK . V R I MV A
OREGON: LS . K N K I . Y W VR A V I
SINGER: P C I N G . RS V
SD-1 : L K K M VR A SV
DRAPER: L KTI V KNK . I R I MV A
NY-1 : L KT V K . GKK . I R I MV A

NADL : YMHRKVIEEISGGTNIISRLVAALIELNWSMEEEEESKGLKFFYLLSGRLRNLIKHKVRNETVASWYGE 1461
OSLOSS: I V VI FI KA Q
OREGON: M I I I I D R
SINGER: M I G
SD-1 : M I G
DRAPER: VM VI G FI Q
NY-1 : V VI N FI Q

NADL : EVYGMPKIMTIIKASTLSKSRHCIICTVCEGREWKGCTCPKCGRHGKPIITCGMSLADFEERHYKRIFIRE 1531
OSLOSS: VV R . CS . N . NK AKK N T
OREGON: A R N N I TL
SINGER: K M S M
SD-1 : N NK K
DRAPER: VV R . C N . NK A . K N T
NY-1 : V R . C N . NK A N T

	NADL	NY-1		OSLOSS	
NADL :	GNFEG	PFRQE	YNGFVQYTARGQLFLRNLPVLATKVKMLMVGNLGEEIGNLEHLGWILR	GPAVCKKIT	1688
OSLOSS :	.T...	HS.	I.....I.....V...D.....K.....I		
OREGON :	.D.		I.....I.....V.D.....		
SINGER :			I.....V.....D.....		
SD-1 :			I.....V.D.....		
DRAPER :		.S.	I.....D.....		
NY-1 :		.E. .S.	I.....D.....		

p54 (#1679) — p80 (#1680)

NADL :	EHEKCHINILDKLTAFVGGIMPRGTTAPRVRFPPTSLKVRRLGLETGWAYTHQGGISSVDHVTAGKDLLVC	1758
OSLOSS :	.V.....V.....KI..A.....	
OREGON :	.S.....	
SINGER :		
SD-1 :	.R.....	
NY-1 :	.V.....V.....A.....	

NADL :	DSMGRTRVVCQSNRLTDETEYGVKTDGCPDGARCYVLNPEAVNISGSKGAVVHLQKTGGFTCVTASG	1828
OSLOSS :	.K.....A.....	
OREGON :	.V.....	
SINGER :		
SD-1 :	.K.....	
NY-1 :	.K.....	

NADL :	TPAFFDLKNLKGWSGLPIFEASSGRVVGKVKNEESKPTKIMSGIQTVSKNTADLTEMVKKITSMNRG	1898
OSLOSS :	.L.....S.....	
OREGON :	.S.....	
SINGER :		
SD-1 :		
NY-1 :	.L.....	

NADL :	DFQOITLATGAGKTTELPAKAVIEEIGRHKRVLVLIPLRAAAESVYQYMLKHPISIFNLRIGDMKEGDMA	1968
OSLOSS :		
OREGON :		
SINGER :		
SD-1 :		
NY-1 :		

NADL :	TGITYASYGYFCQMPQPKLRAAMVEYSYIFLDEYHCATPEQLAIGKIHRFSESIRVVAMTATPAGSVTT	2038
OSLOSS :	.V.....	
OREGON :		
SINGER :		
SD-1 :		
NY-1 :	.V.....	

NADL :	TGQKHPIEEFIAPEVMKGEDLGSQFLDIAGLKIPVDEMKGNMLVFVPTRNMAVEVAKKLKAKGYNSGYYY	2108
OSLOSS :	.E.....D.....	
OREGON :		
SINGER :		
SD-1 :	.E.....	
NY-1 :	.E.....D.....	

NADL :	SGEDPANLRVVTSQSPYVIVATNAIESGVTLDDLDTVIDTGLKCEKRVRVSSKIPFIVTGLKRMVAVTVGE	2178
OSLOSS :	.V.....V.....	
OREGON :	.V.....V.....	
SINGER :	.V.....	
SD-1 :	.V.....	
NY-1 :	.V.....V.....	

NADL : QAQRGRVGRVKPGRYRSQETATGSKDYHYDLLQAQRYGIEDGINVTKSFREMNYDWSLYEEDSLITQ 2248
 OSLOSS:H.....
 OREGON:
 SINGER:M.....
 SD-1 :
 NY-1 :

NADL : LEILNLLISEDLPAAVKNIMARTDHPEPIQLAYNSYEVQVPVLPFKIRNGEVTDTYENYSFLNARKLGE 2318
 OSLOSS:S.....
 OREGON:
 SINGER:
 SD-1 :
 NY-1 :D

NADL : DVPVYIYATEDEDLAVDLLGLDWPDPGNQOVVETGKALKQVTGLSSAENALLVALFGYVGYQALSKRHVP 2388
 OSLOSS:V.....I.....
 OREGON:A.....
 SINGER:
 SD-1 :A.....
 NY-1 :E.....V.....I.....

NADL : MI TDIYTIEDQRLEDTHLQYAPNAIKTDGT 2419
 OSLOSS: ..R.E.K
 OREGON: ..E..
 SINGER: ..E..
 SD-1 : ..E..
 NY-1 : ..R.E.K

p80
 (#2390)

Insertions:

NADL : MCSRCQKHRRFEMDREPKSARYCAECNRLHPAEEGDFWAESSMLGLKITYFALMDGKVVDITWAGCQR
 VGISPDTHRVPCHISFGSRM

OSLOSS: MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRSLSDYNIQKESTLHLV
 LRLRGS

NY-1 : YPSE

De Moerlooze *et al.* (1990) ont rapporté la séquence partielle de la p125 (\approx 200 aa) des souches Singer et NY-1. En comparant leurs séquences avec celles données à la figure 12, on note la présence d'une différence pour la souche NY-1 et de deux pour la souche Singer. Dans le cas de NY-1, cette différence correspond à la seule différence nucléotidique qui existe entre les deux séquences (voir section 1.3 de la discussion).

1.4.2 Homologie

Le tableau 4 montre le degré d'homologie qui existe au niveau des acides aminés de la p125 (p54/p80) des différentes souches étudiées. Comme il était possible de constater à la figure 12, la p80 est une protéine très conservée d'une souche à l'autre contrairement à la p54 qui possède plusieurs substitutions d'acides aminés.

En regardant le degré d'homologie de la p54 qui existe entre les différentes souches, il est possible de discriminer les souches en deux groupes (représentés en gris dans le tableau), soit les deux mêmes que ceux mentionnés plus haut (section 1.3.2). En effet, l'homologie moyenne de la p54 des souches du groupe Ia est de 88.8% et celle des souches du groupe Ib est de 93.3% comparativement à une homologie moyenne de 80.4% entre les souches des deux groupes. Par contre, dû à la très grande conservation de la p80, il est impossible de vraiment discriminer deux groupes en se basant sur le degré d'homologie des acides aminés de la p80.

Tableau 4

Pourcentage d'homologie entre les différentes souches
au niveau des acides aminés de la p125 (p54/p80)

	SD-1	SINGER	OREGON	OSLOSS	NY-1	DRAPER
NADL	95.0 (89.1/99.3)	98.7 (92.6/99.7)	93.9 (86.6/99.2)	89.6 (78.6/97.5)	90.9 (81.2/98.0)	— (80.2/—)
	SD-1	94.6 (88.5/99.3)	95.2 (89.9/99.0)	90.1 (80.0/97.5)	91.7 (82.9/98.0)	— (82.9/—)
		SINGER	93.6 (86.0/99.2)	89.4 (78.3/97.5)	90.6 (80.4/98.0)	— (79.4/—)
			OREGON	89.6 (79.0/97.3)	91.0 (81.4/97.6)	— (80.8/—)
				OSLOSS	96.2 (92.4/98.9)	— (92.8/—)
					NY-1	— (94.6/—)

* Les insertions retrouvées dans le génome des souches NADL, Osloss et NY-1 sont omises pour la comparaison.

** Les régions ombragées représentent l'homologie entre les souches d'un même groupe.

1.4.3 Profil d'hydrophobicité de la p54

Comme présenté à la figure 13, le profil d'hydrophobicité de la p54 est très conservé malgré la différence d'environ 20% qui existe entre la séquence en acides aminés des souches du groupe Ia et celle des souches du groupe Ib.

1.5 Analyse partielle de la p54 de cinq isolats

1.5.1 Amplification P125A/CL4

Cinq autres isolats (Q47, Q69, Q713, Q1808 et Q4812) furent partiellement analysés au niveau de la p54. Dans un premier temps, une amplification au moyen des amorces P125A/CL4 fut effectuée (figure 14). Aucune amplification n'a pu être obtenue avec la souche Q4812 autant avec la paire d'amorces P125A/CL4 qu'avec les paires d'amorces BV2/BV4, CL5/BV1, P80/CL2 et BV5/BV6; ces amplifications ne furent cependant tentées que deux fois. En ce qui a trait aux quatre autres isolats, un fragment de la longueur attendue (≈ 800 nt) a été obtenu, mais en plus, pour l'isolat Q47, une deuxième bande d'environ 1100 nt fut amplifiée.

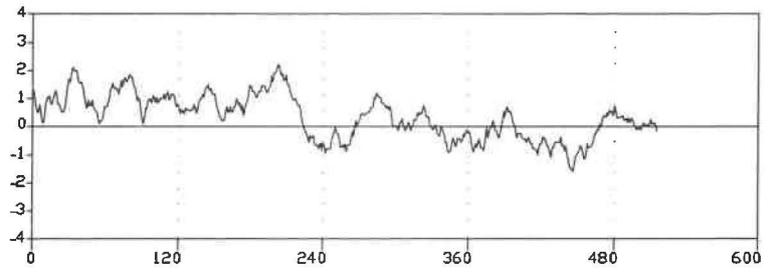
1.5.2 Clonage et séquençage

Après avoir cloné chacun des fragments P125A/CL4, y compris celui de 1100 nt de l'isolat Q47, une portion de la séquence en 3' fut déterminée (figure 15). Pour les besoins de la cause, le fragment de 1100 nt fut considéré comme provenant d'une souche nommée Q47i ("i" pour insertion) et celui de 800 nt comme provenant d'une souche nommée 47. Les séquences données à la figure 15 proviennent du séquençage de deux clones, sauf pour la souche Q47 dont la séquence est celle d'un seul clone. Un certain

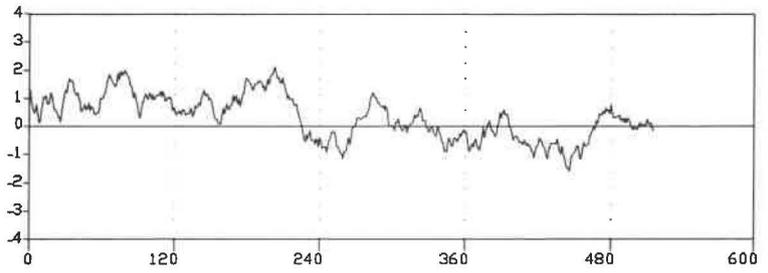
Figure 13

Profil d'hydrophobicité de la p54 (aa 1075 à 1679) de trois souches du groupe Ia (NADL, Singer et Oregon) et de deux souches du groupe Ib (Draper et NY-1). Notons que les insertions, pour NADL et NY-1, sont omises pour la comparaison.

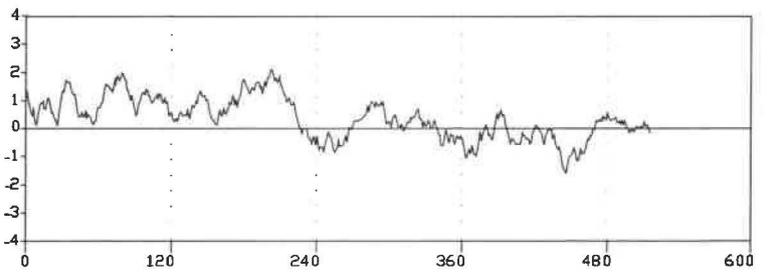
NADL



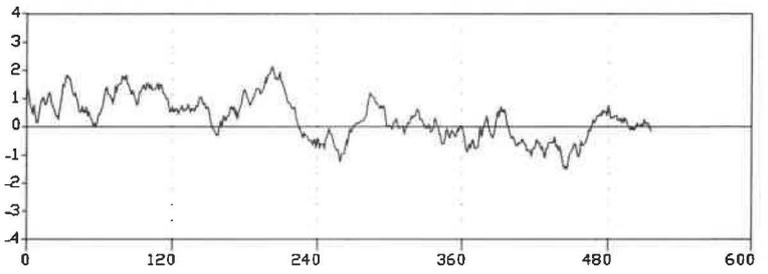
SINGER



OREGON



DRAPER



NY-1

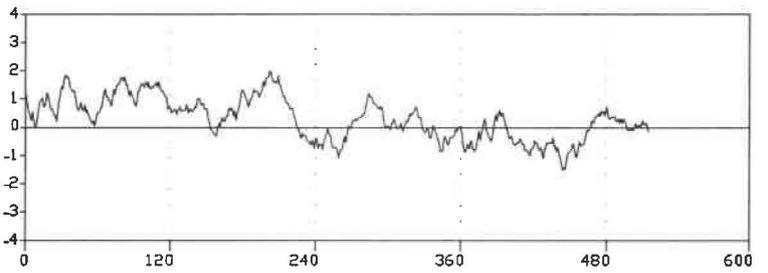


Figure 14

Amplification par RT-PCR du génome des isolats Q47, Q69, Q713, Q1808 et Q4812 au moyen des amorces P125A et CL4. Notons qu'aucune amplification ne fut obtenue, avec les deux mêmes amorces, lorsque l'ARN était remplacé par de l'eau. Le puits M correspond au marqueur de poids moléculaire VI de Boehringer Mannheim dont la valeur de certaines bandes, en pb, est donnée. Gel d'agarose 1% dans du TBE 1X.

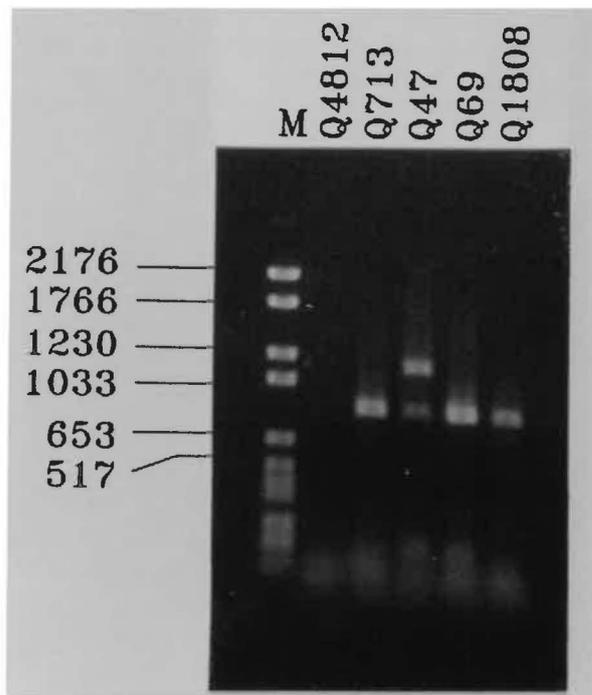


Figure 15

Comparaison des séquences de cDNA obtenues pour une région de 318 nt située du côté 3' du fragment P125A/CL4 des isolats Q47, Q69, Q713 et Q1808. Les séquences des souches NADL (groupe Ia) et NY-1 (groupe Ib) sont également incluses et l'emplacement de leur insertion respective est indiquée. La séquence de la "souche" Q47i représente celle du fragment de 1100 nt amplifié lors du PCR de l'isolat Q47 (voir figure 14). Ce fragment s'est avéré contenir une insertion de 309 nt dont l'emplacement est indiqué. La séquence de cette insertion est donnée au bas de la figure où les différences avec l'insertion de NADL sont en caractère gras. Notons que les séquences de cette figure proviennent du séquençage de deux clones pour les souches Q713, Q47i, Q69 et Q1808 tandis que pour Q47 un seul clone fut séquençé. Les différences notées entre les deux clones sont soulignées (Y= C ou T; R= G ou A).

NADL : GTCTACGGTATGCCAAAGATCATGACTATAATCAAGGCCAGTACACTGAGTAAGAGCAGGCACTGCATAA 4841
 NY-1 :C.....AG.....C.....A.G...TT.C.....A.AC...AT.A...T.....
 Q713 :C.....AG.GG...C.....A.G...T.C.....A.AC...AT.AA..T.....
 Q47i :C.....AG.G...C.....A.....T.C.....A.AC...A.AA..T.....
 Q47 :C.....AG.G...C.....A.....T.C.....A.AC...A.AA..T.....
 Q69 :C.....AG.G...C.....A.G...T.C.....A.AC...A.AA..T.....
 Q1808 :C.....AG.G...C.G..A.G...T.C.....A.AC...AT.AA..T.....

NADL : TATGCACGTGTATGTGAGGGCCGAGAGTGGAAAGGTGGCACCTGCCCAAATGTGGACGCCATGGGAAGCC 4911
 NY-1 :G.....CTA...A.....G.....A.....T.....C..T.....C.....A..
 Q713 :A.....CTA..A.....G..A...A.....T.....C..C..T..C.....
 Q47i :G.....CTA..A.....G..A...A.....Y..T.....C..C.....C.....
 Q47 :A.....CTA..A.....G..A...A.....T.....C..C.nnn.C.....
 Q69 :A.....CTA..A.....G..A...A.....T.....C..C.nnn.C.....
 Q1808 :A.....CTA..A.....G..A...A.....T.....C..C..T..C.....

NADL : GATAACGTGTGGATGTCGCTAGCAGATTTTGAAGAAAGACACTATAAAAGAATCTTTATAAGGGAAGGC 4981
 NY-1 : C..C..T.....A.T....G.....G.....C..G.....T..C.....T.....
 Q713 : C..C..T..C.....A.T....G.....G.....C..G.....T..C.....T.....
 Q47i : C..C..T.....A.T....G.....G.....C..G.....T.....T.....
 Q47 : C..C..T.....A.T....G.....G.....C..G.....T.....T.....
 Q69 : C..C..T.....A.T....G.....G.....C..G.....T.....T.....
 Q1808 : T..C..T.....A.T....G.....G.....C..G..G..T.....T.....

NADL Q47i NY-1

NADL : AACTTTGAGGGT CCTTTTCAGG CAGGAA TACAATGGCTTTGTACAATATACCGCTAGGGGGCAACTAT 5318
 NY-1 :C..A..A ..C..... G..... ..G...G..... ..A.....T.G..
 Q713 :C..A..A ..C..T... ..G...A.....G.....Y.....T.G..
 Q47i :C..A..A ..C..... ..G...G.....G.....C.....T.G..
 Q47 :C..A..A ..C..... ..G...G.....G.....C.....T.G..
 Q69 :C..A..A ..C..... ..T.G...G.....G.....C.....T.G..
 Q1808 : ..G...C..A..A ..C..... ..A... ..G...G.....G...G..C.....T.G..

NADL : TTCTGAGAAACTTGCCCGTACTGGCAACTAAAGTAAAAATG 5359
 NY-1 : .C.....G..T..A...A..T.....C.....
 Q713 : .C.....R..T..A...A..T.....C.....G.....
 Q47i : .CT.....T.....A..T.....A.....
 Q47 : .CT.....T.....A..T.....A.....
 Q69 : .C.....T..R...A..T.....A.....
 Q1808 : .C.....G..T..A...A..T.....C.....

Insertions:

Q47i : **CAAGAAGCAATGAATACGATG**ATGTGCAGCCGATGCCAGGGAAAGCATAGGAGGTYTGAAATGGACCGGG
 AACCTAAGAGTGCCAGATACTGTGCTGAGTGTAATAGGCTGCATCCTGCTGAGGAAGGTGACTTTTGGGC
 AGAGTCAAGCATGTTGGGCCTCAAATCACCTACTTTGCGCTGATGGATGGAAAGGTGATGATATCACA
 GAGTGGGCTGGATGCCAGCGTGTGGGAATCTCCCAGATACCCACAGAGTCCCT**CA**TACATCTCATTTG
 GTTCRCGGATGCC**AGGCACCA**GTGGCGG

nombre de différences nucléotidiques a été rencontré entre les deux clones séquencés; ces différences sont indiquées à la figure 15. Il est intéressant de noter que ces différences, qui sont typiques de celles obtenues lors du séquençage complet de la p125, sont majoritairement en position "wobble" du codon (i.e. en position 3' du codon). Ici, 4 différences sur 6 sont en position "wobble" et n'induisent pas le changement de l'acide aminé.

Les cinq séquences présentées ici correspondent à celles des souches du groupe Ib. En effet, la figure 15 montre une similarité beaucoup plus élevée avec la souche NY-1 (Ib) qu'avec la souche NADL (Ia).

1.5.3 Cas de la souche Q47/Q47i

Comme souligné préalablement, la souche Q47i possède une insertion par rapport aux autres souches de BVDV. Cette insertion, d'une longueur de 309 nt, fut positionnée entre les nucléotides 5002 et 5003, soit dans la même région du génome que l'insertion de NADL et de NY-1. Notons qu'il aurait été possible de placer l'insertion à plus ou moins quelques nucléotides dont au même endroit que l'insertion de NY-1. En regardant de plus près, nous constatons que l'insertion de Q47i possède une très grande homologie avec l'insertion de NADL (Figure 15). Par contre, l'insertion de Q47i a 39 nt de plus (partagés entre les extrémités 5' et 3') que celle de NADL et parmi les 270 nt communs, trois sont vraiment différents et deux resteraient à démontrer à l'aide de la séquence d'un troisième clone. Notons que, mis à part NADL, aucune autre insertion de même origine

que celle de Q47i n'est rapportée dans la littérature.

En comparant la séquence des souches Q47 et Q47i, on note la présence d'une seule vraie différence (position 4849), qui ne change toutefois pas l'acide aminé. De plus, certaines particularités nucléotidiques (A en position 4806 et T en position 5321) ne sont retrouvées que chez ces deux souches lorsque leur séquence est comparée aux autres souches du groupe Ib. Le fait de positionner l'insertion de Q47i au même site que celle de NY-1 occasionnerait une différence de plus entre Q47 et Q47i. C'est d'ailleurs principalement pour cette raison que l'insertion de Q47i fut placée à l'endroit où elle est.

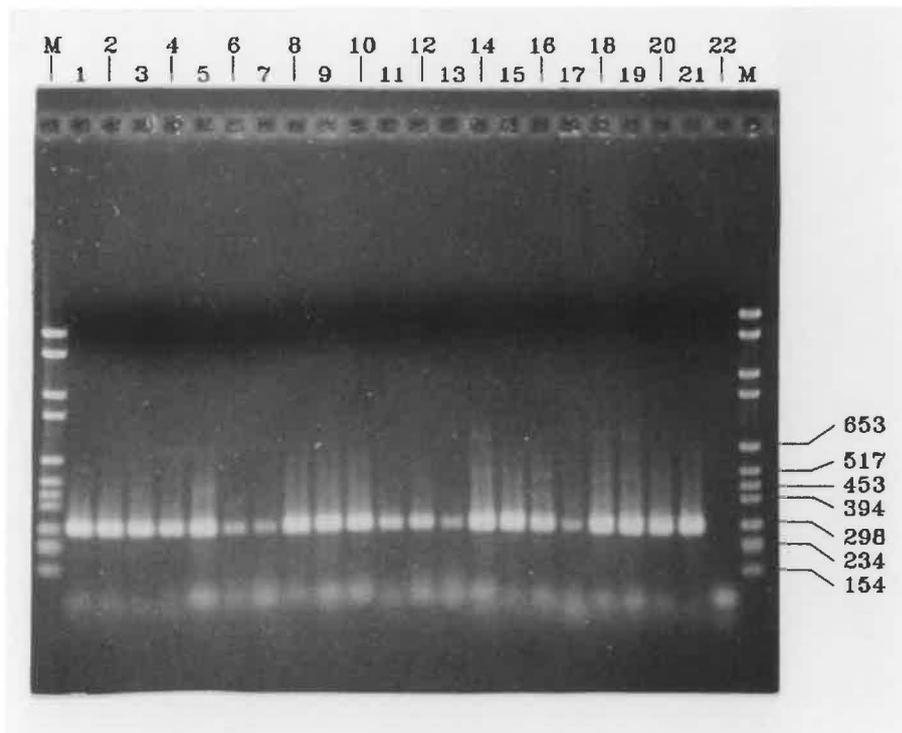
2. Étude de la région 5' non-codante (5'UTR)

2.1 Amplification par PCR et clonage

Pour l'étude de la 5'UTR, 21 différentes souches et isolats furent testés: 4 souches de laboratoires (Oregon, Singer, NY-1 et Draper), 9 isolats québécois (Q47, Q69, Q126, Q140, Q713, Q1111, Q1808, Q2101 et Q4812), 6 isolats provenant de l'ouest canadien (1854, C1, C3, 1494, Waters et Bull) et 2 souches thrombocytopeniques américaines (890 et CD87). Pour chacune de ces souches/isolats, un fragment de longueur attendue (≈ 248 pb) a pu être amplifié au moyen des amorces BV7 et BV8 (figure 16). Ce fragment, représentant les derniers deux-tiers de la 5'UTR, fut ensuite cloné dans le vecteur pCRTMII comme décrit dans la section matériel et méthodes.

Figure 16

Amplification par RT-PCR d'une portion de la 5'UTR au moyen des amorces BV7 et BV8. Les souches représentées sont: Singer (1), Oregon (2), NY-1 (3), Draper(4), Q1111 (5), Q1808 (6), Q69 (7), Q140 (8), Q126 (9), Q2101 (10), Q4812 (11), Q47 (12), Q713 (13), 1854 (14), 1494 (15), Bull (16), Waters (17), C1 (18), C3 (19), CD87 (20) et 890 (21). Puits 22: Amplification à partir du surnageant de culture cellulaire non-infectée. Puits M: marqueur de poids moléculaire VI de Boehringer Mannheim dont la valeur de certaines bandes, en pb, est donnée. Gel d'agarose 1.6% dans du TBE 1X.



2.2 Analyse des séquences de cDNA

2.2.1 Séquences de la 5'UTR

La compilation des diverses séquences obtenues est donnée à la figure 17. La longueur exacte de la région séquencée, qui débute au nt 124 et se termine au nt 371, varie de 247 à 249 nt selon la souche. Si la longueur des amplicons était très homogène d'une souche à l'autre, les séquences ne le sont pas autant, même que des insertions ou des délétions de 1 à 3 nt sont présentes. De Moerlooze *et al.* (1993) ont publié une petite région de 117 nt de la 5'UTR des souches Singer, Oregon et NY-1. En comparant nos séquences avec les leurs, nous remarquons quelques différences (5 en tout, soulignées dans la figure 17).

2.2.2 Regroupement des souches/isolats

À partir des séquences données à la figure 17, nous avons déterminé le degré d'homologie qui existait entre les différentes souches. Le tableau 5 donne, à titre d'exemple, le pourcentage d'homologie qui existe entre la 5'UTR de 12 des 24 souches dont nous possédions la séquence. Le dendrogramme de la figure 18, quant à lui, démontre d'une autre façon la relation qui existe entre la séquence des différentes souches au niveau de la 5'UTR. Comme on peut le constater, il est possible de diviser les souches en deux groupes majeurs. L'un de ces groupes (groupe I) inclut toutes les souches de BVDV classiques (i.e. les souches analogues aux souches de laboratoires) et peut être subdivisé en deux sous-groupes encore plus homogènes (Ia et Ib). L'autre

Figure 17

Comparaison des séquences partielles de la 5'UTR (nt 124 à 371 de NADL) des différentes souches étudiées (pour NADL, Osloss et SD-1, les séquences sont celles déjà publiées). Pour les souches Oregon, Singer et NY-1, les bases soulignées indiquent qu'elles sont différentes de la séquence de 117 nt rapportée par De Moerlooze *et al.* (1993). "*" signifie une délétion.

```

NADL : TAGCATAATGAGGGGGTAGCAACAGTGGTTCGTTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGAC
SD-1 : .....A.....G.....
SINGER : .....A.....G.....
OREGON : .....GC.....
C3 : .....G.....
C1 : .....G.....
NY-1 : .....A.....A.....G.....
DRAPER : .....A.....A.....G.....
OSLOSS : .....A.....CA.....A.....G.....
Q47 : .....A.....A.....G.....
Q713 : .....A.....A.....G.....C.....
Q69 : .....A.....A.....G.....
Q1808 : .....A.....A.....G.....
1854 : .....GA.....A.....G.....
890 : .....A.....G.....AC.....GGT.....CA.....CA.....CG.....C.....G.....A.....
CD87 : .....A.....G.....AC.....GGT.....CA.....A.....CG.....T.....A.....A.....
Q1111 : .....A.....GT.....AC.....GGT.....CA.....CG.....C.....G.....A.....
Q140 : .....A.....GT.....AC.....GGT.....CA.....CG.....C.....G.....A.....
Q126 : .....GT.....AC.....GGT.....CA.....CG.....C.....G.....A.....
Q2101 : .....A.....GT.....AC.....GGT.....CA.....CG.....C.....G.....A.....
Q4812 : .....A.....GT.....AC.....GGT.....CA.....CG.....C.....G.....A.....
1494 : .....A.....AC.....GGT.....CA.....A.....CG.....C.....G.....A.....
BULL : .....A.....AC.....GGT.....CA.....A.....CG.....C.....G.....A.....
WATERS : .....A.....G.....AC.....GGT.....CA.....CG.....C.....G.....A.....

```

```

NADL : GCCTTGGAAAT***AAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCCAAAGCACATCTTAACCTGAGCGGGGTCGCCAG
SD-1 : .....C.....T.....***.....C.....
SINGER : .....***.....
OREGON : .....AAC.....***G.....C.....G.....C.....T.....G.....
C3 : .....T.....C.....***.....T.....
C1 : .....C.....T.....A.....***.....A.....C.....T.....
NY-1 : .....T.....C.....GG.....***.....C.....A.....C.....C.....TT.....
DRAPER : .....T.....C.....GG.....***.....C.....A.....C.....C.....GA.....TT.....
OSLOSS : .....T.....C.....TGTG.....***.....C.....A.....C.....G.....C.....TT.....
Q47 : .....T.....G.....***.....C.....A.....C.....G.....GA.....TT.....
Q713 : .....T.....GG.....***.....C.....A.....C.....C.....GA.....TT.....
Q69 : .....T.....GG.....***.....C.....A.....C.....C.....G.....GA.....TTT.....
Q1808 : .....T.....GG.....***.....C.....A.....C.....T.....C.....GA.....TT.....
1854 : .....T.....GG.....***.....C.....A.....C.....C.....GA.....TT.....
890 : A.TCC...TTT.GTCG.GGA.....T.....CG.....CAC.....T.....GTG.....
CD87 : A.TCC...ATC.ATTG.GGA.....T.....CG.....G.....T.....AT.....
Q1111 : A.TCC...ATT.GTCG.GGA.....T.....CG.....CAT.....T.....ATG.....
Q140 : A.TCC...ACT.GTCG.GGA.....T.....CG.....CAT.....T.....ATG.....
Q126 : A.TCC...ATT.GTCG.GGA.....T.....CG.....CAT.....T.....ATG.....
Q2101 : A.TCC...ATT.GTCG.GGA.....T.....CG.....CAT.....T.....ATG.....
Q4812 : A.TCC...ATT.GTCG.GGA.....T.....CG.....CAT.....T.....ATG.....
1494 : A.TCC...TTC.GTTGGGGA.....T.....CG.....AT.....CT.....ATG.....
BULL : A.TCC...TTC.GTTGGGGA.....T.....T.....CG.....AT.....CT.....ATG.....
WATERS : A.TCC...ATT.GTCG.GGA.....T.....CG.....CAT.....T.....ATG.....

```

```

NADL : GTAAAAGCAGTTTTAACCGACTGTTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCACCTGTATTGCTACTAAAAATCTCT
SD-1 : .....C.....A.....CG.....C.....AAT.....
SINGER : .....C.....G.....TC.....
OREGON : ACG.....A.....*.....G.....T.....A.....C.....
C3 : .....CG.....A.....TAA*.....C.....
C1 : .....C.....A.....G.....C.....AAT.....
NY-1 : .....G.....A.....G.....*.....A.....C.....C.....T.....
DRAPER : .....G.....A.....G.....G.....CTAA.....C.....C.....
OSLOSS : .....G.....G.....*.....A.....C.....C.....
Q47 : .....G.....A.....G.....*.....A.....C.....C.....T.....A.....G.....
Q713 : .....G.....A.....G.....*.....A.....C.....C.....
Q69 : .....G.....A.....G.....*.....A.....C.....C.....T.....A.....G.....
Q1808 : .....G.....A.....G.....*.....A.....C.....C.....G.....
1854 : .....G.....A.....G.....*.....A.....C.....C.....C.....G.....
890 : .....G.....GCCA.....CGTG.....**C.....C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....ACTCC.....G.....*.....
CD87 : .....G.....GCCA.....CGTG.....**C.....C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....A.....CCC.....G.....*.....
Q1111 : .....G.....GC.....A.....CGTG.....**C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....A.....TCC.....G.....*.....
Q140 : .....G.....GC.....A.....CGTG.....**C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....A.....TCC.....G.....*.....
Q126 : .....G.....GC.....A.....CGTG.....**C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....A.....TCC.....G.....*.....
Q2101 : .....G.....GC.....A.....CGTG.....**C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....A.....TCC.....G.....*.....
Q4812 : .....G.....GC.....A.....CGTG.....**C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....A.....TCC.....G.....*.....
1494 : .....G.....GCCA.....CGTG.....**C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....A.....CCC.....G.....A.....
BULL : .....G.....GCCA.....CGTG.....**C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....A.....CCC.....G.....A.....
WATERS : .....G.....GC.....A.....CGTG.....**C.....T.....G.....C.....TA.....A.....TG.....A.....TCC.....G.....*.....

```

Tableau 5

Pourcentage d'homologie entre 12 souches au niveau de la séquence de la 5'UTR

	Singer	Oregon	SD-1	Draper	NY-1	Q69	Q1808	Q1111	Bull	890	CD87
NADL	97.6	91.9	95.6	89.9	91.1	89.5	90.7	74.5	73.7	72.9	74.9
	Singer	90.3	94.0	87.5	89.1	87.5	88.7	75.7	74.1	74.1	75.7
		Oregon	90.7	86.7	87.9	87.0	87.4	72.5	71.3	70.5	73.3
			SD-1	89.5	88.7	86.3	87.5	72.9	72.1	71.7	73.3
				Draper	96.3	95.6	96.8	75.7	74.5	73.7	75.3
					NY-1	96.0	97.2	76.5	75.3	74.5	76.1
						Q69	98.0	73.7	72.5	71.7	74.1
							Q1808	74.1	72.9	72.1	73.7
								Q1111	94.8	96.4	94.0
									Bull	94.4	94.4
										890	92.7

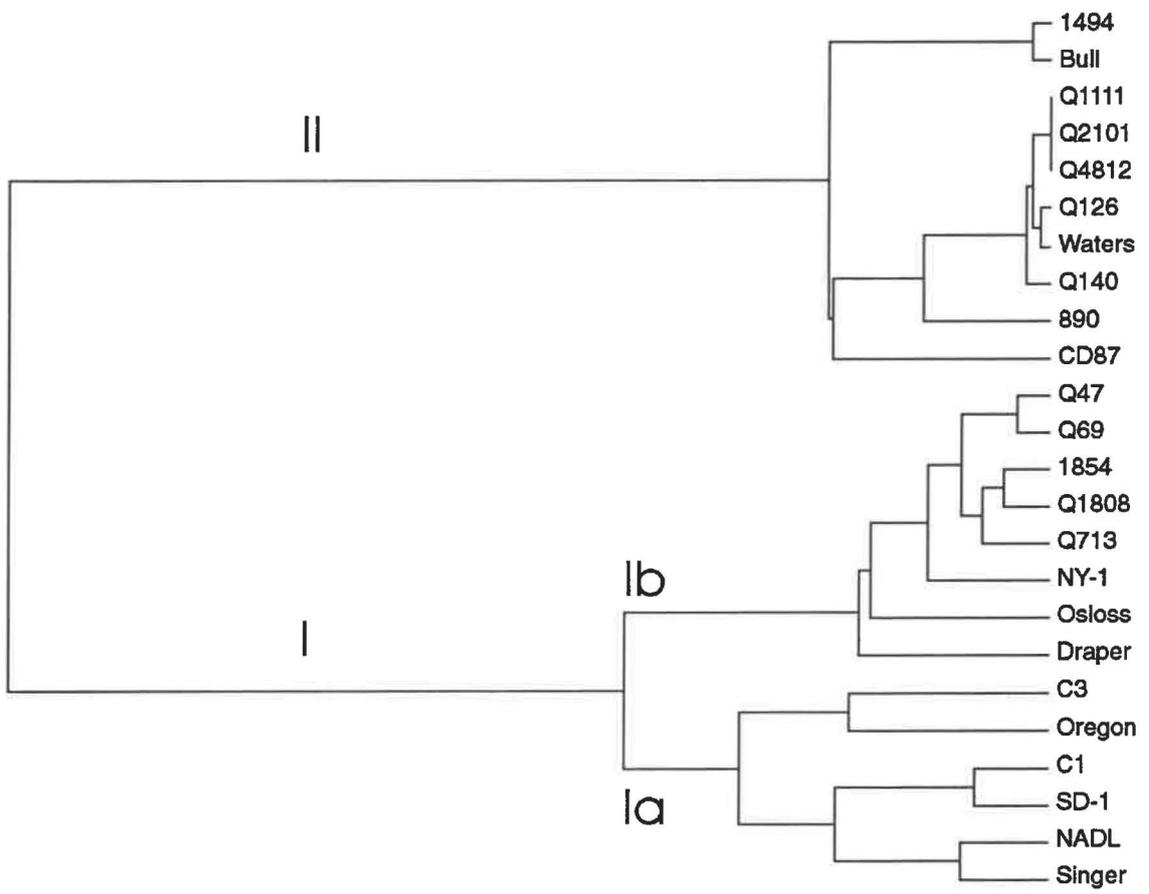
Gris foncé: Homologie entre les souches d'un même groupe. De haut en bas, groupe Ia, Ib et II respectivement.

Gris pâle: Homologie entre les souches du groupe Ia et celles du groupe Ib.

Blanc: Homologie entre les souches du groupe I et celles du groupe II.

Figure 18

Dendrogramme obtenu à partir de la séquence nucléotidique partielle de la 5'UTR (nt 124 à 371) des 24 souches mentionnées à la figure 17. Plus la ligne verticale est située à droite de la figure, plus la similarité est élevée entre les souches reliées. Le regroupement des souches en groupe Ia, Ib et II est inscrit.



groupe (groupe II) renferme toutes les souches épidémiques (Québec et ouest canadien) ainsi que les deux souches thrombocytopéniques américaines. Comme le démontre la figure 19, chacun de ces trois groupes est très homogène et l'homologie moyenne à l'intérieur des groupes Ia, Ib et II est respectivement de 94, 97 et 96%. Toutefois, l'homologie moyenne entre les groupes I et II est inférieure à 75%. Notons que les groupes Ia et Ib furent considérés comme sous-groupes du groupe I et non comme des groupes distincts puisque l'homologie moyenne entre les souches du groupe Ia et celles du groupe Ib est d'environ 89%, donc assez élevée.

Comme certaines souches du groupe I ont également été étudiées au niveau de la région codant pour la p125, il est intéressant de noter que les souches faisant partie d'un des deux sous-groupes (Ia ou Ib) au niveau de la 5'UTR font également partie du même sous-groupe au niveau de la région codant pour la p125 (voir sections 1.3.2 et 1.5.2). Cependant, le degré d'homologie entre les groupes Ia et Ib est beaucoup plus faible au niveau de la région codant pour la p54 (77%) qu'au niveau de la 5'UTR (89%).

2.3 Structures secondaires du domaine D

Deng et Brock (1993) ont suggéré que la 5'UTR du BVDV représenterait un IRES et que les structures secondaires seraient essentielles pour en assurer le rôle. Nous avons donc regardé si la différence de 25% qui existe au niveau des séquences de la 5'UTR des souches du groupe II par rapport à celles du groupe I pouvait modifier ces structures

Figure 19

Comparaison des séquences de la 5'UTR à l'intérieur de chacun des trois groupes défini à la figure 18. Les souches NADL, NY-1 et 890 ont été choisies pour représenter respectivement les groupes Ia, Ib et II. Chacune des souches est comparée à son représentant de groupe. Quant aux représentants NY-1 et 890, ils sont comparés à la souche NADL, une lettre majuscule indiquant une différence et une lettre minuscule une similarité. Les bases soulignées et les "*" sont définis à la figure 17.

150

200

Ia

```

NADL : TAGCATAATGAGGGGGTAGCAACAGTGGTGGAGTTCGTTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGAC
SD-1 : .....
SINGER : .....A.....G.....
OREGON : .....GC.....
C3 : .....G.....
C1 : .....G.....

```

Ib

```

NY-1 : tagcaAaatAagggggtagcaacagtAgtgagttcgttggatggctGaagccctgagtacagggtagtcgtcagtggttcgac
DRAPER : .....G.....
OSLOSS : .....C...A.....G.....
Q47 : .....G.....
Q713 : .....G...G.....C.....
Q69 : .....G.....
Q1808 : .....G.....
1854 : .....G.....G.....

```

II

```

890 : tagcaAaaGagggggACTagcGGTagCAgtgagTcCAttggatggcCGaaCccctgagtacagggGagtcgtcaAtggttcgac
CD87 : .....T.....T.....A.....
Q1111 : .....T.....T.G.....
Q140 : .....T.....T.G.....
Q126 : .....T..T.....T.G.....
Q2101 : .....T.....T.G.....
Q4812 : .....T.....T.G.....
1494 : .....T.....T.....
BULL : .....T.....T.....
WATERS : .....T.....T.G.....

```

250

Ia

```

NADL : GCCTTGAAT***AAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCCAAAGCACATCTTAACCTGAGCGGGGGTCGCCAG
SD-1 : ...C..T...***.....C.....
SINGER : .....***.....
OREGON : ...AAC...***G.....C.....G..C.....T.G.
C3 : ...T.C...***.....T...
C1 : ...C..T.A***.....A.....C.....T...

```

Ib

```

NY-1 : gcTtCggaGG***aCaAgCctcgagatgccacgtggacgagggcatgcccaCagcacatcttaacctgagcgggggtcgtTcag
DRAPER : .....***.....GA.....
OSLOSS : .....TGT...***.....G.....
Q47 : ...T..A...***.....G...GA.....
Q713 : ...T.....***.....GA.....
Q69 : ...T.....***.....G...GA.....T..
Q1808 : ...T.....***.....T.....GA.....
1854 : ...T.....***.....GA.....

```

II

```

890 : AcTCCTTTaGTCGaGGAgctcagagatgccatGtggacgagggcatgcccaCGgcacatcttaaccCACgccccggggtTgcGTGg
CD87 : ...A.C.A.T.....G..TGT.....A.A.
Q1111 : ...A.....T.....A..
Q140 : ...AC.....T.....A..
Q126 : ...A.....T.....A..
Q2101 : ...A.....T.....A..
Q4812 : ...A.....T.....A..
1494 : ...C..T.G.....T.T.....C..A..
BULL : ...C..T.G.....T.....T.....C..A..
WATERS : ...A.....T.....A..

```

300

350

Ia

```

NADL : GTAAAAGCAGTTTTAACCGACTGTTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCACTGTATTGCTACTAAAAATCTCT
SD-1 : .C.....A.CG.C.AAT.....
SINGER : .....C.....G.....TC.....
OREGON : ACG...A...*.G.T.A...C.....
C3 : .CG...A.....TAA*...C.....
C1 : .C.....A..G.C.AAT.....

```

Ib

```

NY-1 : gtGaaaAcGgtt*taaccAacCgCtacgaatacagcctgataggggctgcagaggccIactgtattgctactaaaaatctct
DRAPER : .....TG.CTA.....C.....
OSLOSS : .....G.....*.....C.....
Q47 : .....*.....T.....A.....C.....G.....
Q713 : .....*.....C.....
Q69 : .....*.....T.....A.....C.....G.....
Q1808 : .....*.....C.....G.....
1854 : .....*.....C.....C.....G.....

```

II

```

890 : gtGaaagcGCCAttCGTGg**CgtCaTgGaCacagcctgataggggTAgcagagAccTGctACTCCgctaGtaaaaa*ctct
CD87 : .....**T.CT.....TC.....*...
Q1111 : .....T.....**..T.....T.....*...
Q140 : .....T.....**..T.....T.....*...
Q126 : .....T.....**..T.....T.....*...
Q2101 : .....T.....**..T.....T.....*...
Q4812 : .....T.....**..T.....T.....*...
1494 : .....**..T.....TC.....A...
BULL : .....**..T.....TC.....A...
WATERS : .....T.....**..T.....T.....*...

```

secondaires. La figure 20 démontre, par l'intermédiaire d'une souche représentant chaque groupe, que le domaine D, la structure majeure de la 5'UTR (Deng et Brock, 1993), est très bien conservé. Donc, plusieurs des différences nucléotidiques entre les deux groupes ne sont pas situées n'importe où, mais de façon à maintenir l'appariement des nucléotides et par conséquent les structures secondaires. De plus, il est intéressant de noter que, pour NY-1, Singer et Oregon, les différences retrouvées entre nos séquences et celles de De Moerlooze *et al.* (1993), ne modifient pas les structures secondaires du domaine D.

Les structures secondaires données à la figure 20 ne doivent pas être considérées comme absolues. En effet, les structures varient légèrement selon le programme utilisé pour faire l'analyse et selon les paramètres employés à l'intérieur d'un même programme. L'essentiel est donc de comparer des structures qui sont obtenues à partir d'un même programme en utilisant les mêmes paramètres. À titre d'exemple, la figure 21 illustre les structures secondaires des trois souches représentées à la figure 20 (programme PC/GENE), mais en effectuant l'analyse avec le programme FOLD.

2.4 Stabilité des structures secondaires du domaine D

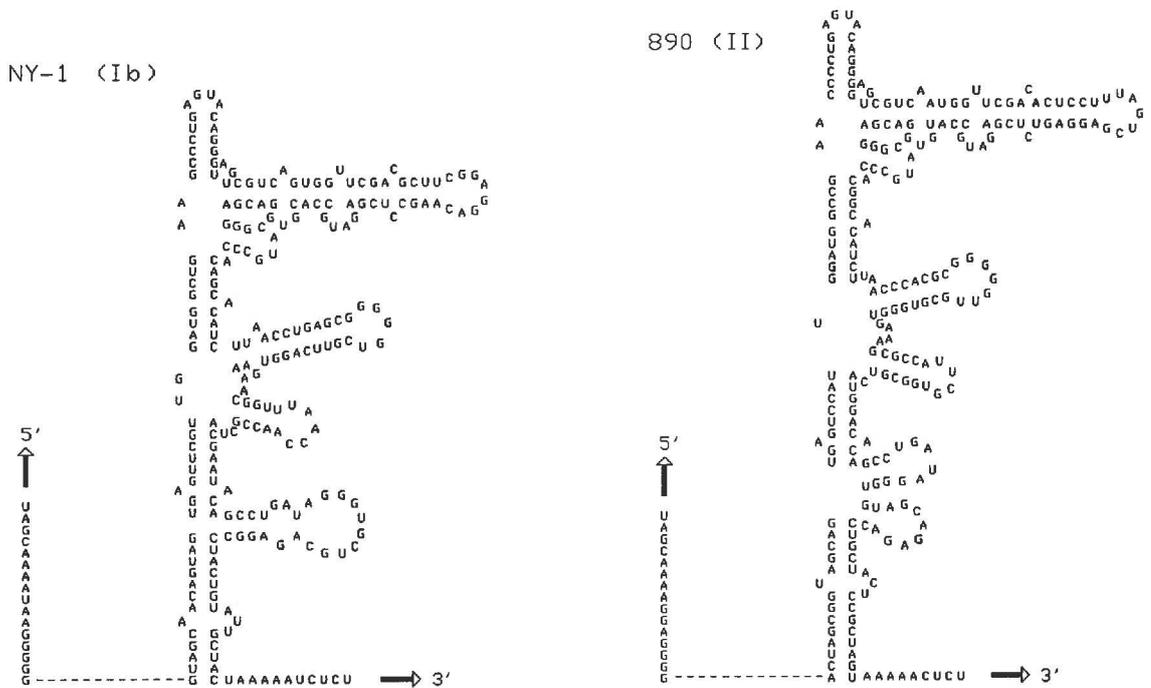
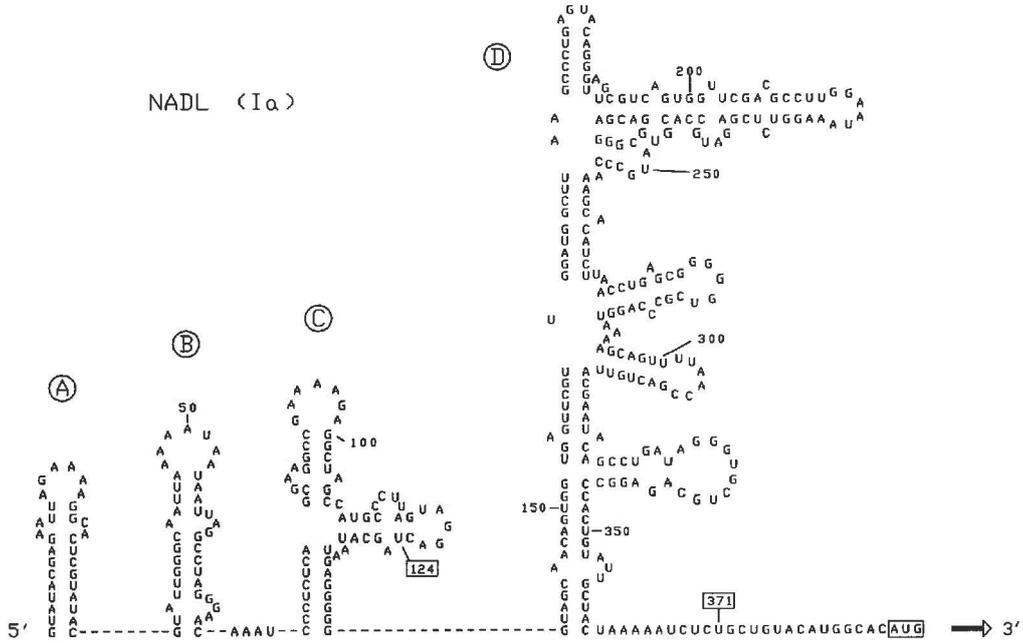
Malgré l'apparence très similaire des structures secondaires du domaine D des différentes souches, le tableau 6 indique des variations quant à la stabilité de ce domaine. En effet, plus la valeur absolue du ΔG est élevée, plus la structure est stable. Ainsi, on note que le domaine D des souches du groupe II, les souches épidémiques, est en général

Figure 20

Structures secondaires de la 5'UTR des représentants de groupe NADL (Ia), NY-1 (Ib) et 890 (II). Pour NADL, toute la structure de la 5'UTR est montrée tandis que pour NY-1 et 890, seul le domaine D, le composant majeur de la 5'UTR, est représenté. Dans la structure de NADL, les nombres encadrés indiquent le début et la fin (entre les amorces BV7 et BV8) du fragment amplifié; l'AUG de la polyprotéine est aussi encadré. Ces structures furent obtenues au moyen du programme PC/GENE.

Figure 21

Structures secondaires de la 5'UTR telles qu'obtenues avec le programme FOLD. Pour plus de détails, voir la légende de la figure 20.



890 (II)

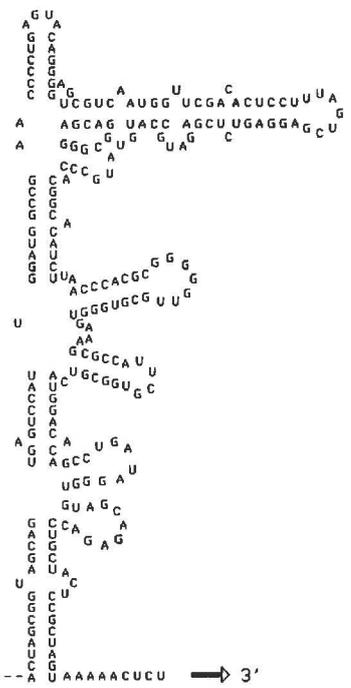


Tableau 6Valeur du ΔG du domaine D de la 5'UTR des différentes souches

	Souches	ΔG du domaine D	
Ia	NADL SD-1 Singer Oregon C1 C3	-68.0 -66.7 -68.7 -63.8 -68.9 -63.3	moy.: -66.6 é.-t.: 2.5
Ib	NY-1 Osloss Draper Q1808 Q69 Q47 Q713 1854	-69.2 -77.3 -68.5 -70.3 -63.4 -65.3 -73.3 -70.3	moy.: -69.7 é.-t.: 4.3
II	890 CD87 Q1111 Q140 Q126 Q2101 Q4812 Bull 1494 Waters	-84.0 -76.0 -79.9 -79.9 -79.9 -79.9 -79.9 -76.0 -78.5 -79.9	moy.: -79.4 é.-t.: 2.3

beaucoup plus stable que celui des souches du groupe I; la souche Osloss étant la seule exception. Les valeurs données au tableau 6 furent calculées à partir des structures secondaires obtenues avec le programme PC\GENE en utilisant toujours les mêmes paramètres. Même en changeant de programme ou de paramètres pour effectuer le calcul, le domaine D des souches du groupe II demeure plus stable que celui des souches du groupe I. Par exemple, en utilisant le programme FOLD, la valeur du ΔG de la souche NY-1 (Ib) est de -72.9 tandis que celle de 890 (II) est de -88.5.

DISCUSSION

1. Étude de la région codant pour la p125

1.1 Analyse des souches CP sans réarrangement

L'absence de duplication du gène de la p80 chez les souches Oregon et Singer a déjà été indiquée auparavant (Meyers *et al.*, 1992; Greiser-Wilke *et al.*, 1993). Ainsi, ces souches, et les autres souches CP du même type, doivent produire la p80 à partir du clivage du précurseur p125. Comme certaines de ces souches, dont Oregon et Singer, ne possèdent pas non plus d'insertion entre le gène de la p54 et celui de la p80 (De Moerlooze *et al.*, 1990; Moir, 1991; Meyers *et al.*, 1992; Greiser-Wilke *et al.*, 1993), ce clivage doit se faire d'une façon différente du mécanisme déjà décrit pour les souches avec insertion. En séquençant complètement le gène de la p125 de deux de ces souches CP (Oregon et Singer), nous avons confirmé l'absence d'insertion entre la p54 et la p80. De plus, nous avons pu identifier, parmi un très grand nombre de mutations ponctuelles, seulement six résidus d'acides aminés spécifiques capables de différencier ces deux souches CP des souches NCP.

1.1.1 Au niveau de la p54

Tous les six résidus mentionnés ci-haut sont rencontrés au niveau de la p54. L'importance de leur substitution n'est cependant pas claire puisqu'aucun rôle, ou domaine critique, associé à la p54 ne fut démontré expérimentalement, même pas l'activité doigt de zinc suggérée par De Moerlooze *et al.* (1990). Toutefois, chez des virus voisins au BVDV, il fut démontré que la protéine équivalente à la p54 avait un rôle

important dans le clivage du site analogue au site p54/p80. Premièrement, chez le HCV, le clivage du site p21/p70 requiert l'activité protéase de la p70 et une activité métalloprotéase zinc-dépendante présente chez la p21 (Hijikata *et al.*, 1993). Deuxièmement, chez le virus dengue de type 4, des expériences ont démontré qu'un domaine de 40 acides aminés présent dans la protéine NS2B était nécessaire au clivage du site NS2B/NS3 par la protéase NS3 (Falgout *et al.*, 1993). Même si la p54 ne démontre pas d'homologie avec la p21 ni avec le domaine de la NS2B, il demeure possible qu'une région équivalente soit présente chez la p54. En fait, le domaine doigt de zinc de la p54 ne fait que ressembler à un domaine doigt de zinc et il est tout à fait possible que ce domaine ne soit pas du tout associé à cette activité. Par exemple, on peut penser que ce domaine, où se situe l'une des six substitutions identifiées, lierait effectivement le zinc, mais dans le but d'assurer à la p54 une activité métalloprotéase analogue à celle de la p21 du HCV. Ainsi, ce domaine, ou tout autre encore inconnu, ne serait pas actif chez les souches NCP, mais, suite à l'une des mutations notées ici, contribuerait au clivage de la p125. Quoiqu'il en soit, seule l'expression de la p125 d'une souche CP sans réarrangement, jumelée à une étude de mutagenèse dirigée, pourrait établir si la p54 est effectivement nécessaire au clivage du site p54/p80.

De plus, par rapport à la région correspondante chez les souches NCP, ces six substitutions ne modifient pas le repliement local de la p54 des souches CP sans réarrangement. Ceci suggère donc que ces mutations, si elles ont un rôle, n'agiraient pas en modifiant les structures secondaires de la p54, mais davantage en modifiant l'activité

d'un domaine précis comme mentionné ci-haut.

D'autre part, dû au grand nombre de substitutions d'acides aminés présentes au niveau de la p54, il est possible qu'une combinaison de mutations soit responsable du clivage de la p125. Ces combinaisons pourraient être différentes d'une souche CP à l'autre tout en ayant le même effet. Dans ce cas, une analyse d'autres souches CP sans réarrangement serait nécessaire à la vérification de cette hypothèse et, le cas échéant, à l'identification des combinaisons de mutations effectives.

1.1.2 Au niveau de la p80

Comme aucune substitution d'acide aminé spécifique aux souches CP sans réarrangement n'est rencontrée au niveau de la p80, ceci suggère que l'activité protéase de la p80, qui pourrait être responsable du clivage du site p54/p80 (Wiskerchen et Collett, 1991), n'est pas modifiée directement chez les souches Singer et Oregon. Par contre, il fut noté que, pour le clivage du site p58/p75, la p80 nécessitait la présence d'un cofacteur ou d'une "condition spécifique" (Wiskerchen et Collett, 1991). Ainsi, il est possible qu'un cofacteur ou qu'un répresseur soit également impliqué spécifiquement dans le clivage de la p125 par la p80. Dans ce cas, la modification de ce cofacteur/répresseur putatif mènerait au clivage du site p54/p80 et au développement du caractère CP.

1.2 Variation de la p54 et de la p80

Du côté de la p80, les résultats démontrent qu'il s'agit d'une protéine très conservée. Il semble donc y avoir une sélection favorable pour le maintien de l'intégrité de la p80. Ceci est compréhensible considérant que la p80 est une protéine possédant plusieurs rôles essentiels au cycle viral du BVDV (e.g. protéase, hélicase). En regardant les séquences nucléotidiques de la p80, il est possible d'observer l'effet de cette grande sélection. En effet, la majorité des différences qui existent entre deux souches se situent en position "wobble" du codon et ne contribuent pas à changer l'acide aminé correspondant.

Quant à la p54, c'est une protéine beaucoup plus hétérogène que la p80 comme le démontre l'homologie de moins de 80% qui existe entre certaines souches. Toutefois, le profil d'hydrophobicité de la p54 demeure pratiquement identique malgré cette grande hétérogénéité. Ceci suggère donc que l'hydrophobicité de l'acide aminé est plus importante que l'acide aminé comme tel, du moins pour certaines régions de la p54. Malgré le fait que le rôle précis de la p54 demeure encore inconnu, il est facile d'imaginer que le profil d'hydrophobicité de cette dernière est impliqué dans l'une de ses fonctions.

Les observations mentionnées ci-haut, quant au degré de variation de la p54 et de la p80, avaient déjà été soulignées lors d'une étude antérieure portant sur l'analyse du génome de la souche SD-1 (Deng et Brock, 1992). Dans cette étude les auteurs

comparaient la séquence de SD-1 avec celle de NADL, Osloss ainsi qu'avec celle des souches du HoCV, Alfort et Brescia. Les résultats rapportés ici confirment donc ces observations sur un plus grand nombre de souches de BVDV et renforcent l'idée d'une sélection génomique associée au rôle de chacune de ces protéines.

Tout au long de l'étude, des différences furent observées entre la séquence de deux clones portant le même fragment d'amplification. Ces différences étaient typiques de celles décrites à la figure 15, c'est-à-dire que plus de la moitié d'entre elles se situaient en position "wobble" du codon et ne modifiaient pas l'acide aminé. Donc, si certaines différences peuvent être attribuées au RT-PCR, d'autres peuvent être potentiellement dues à une population hétérogène de particules virales dans l'échantillon lui-même. Une telle variation dans la population virale est bien documentée dans le cas des virus à ARN (Domingo *et al.*, 1985; Holland *et al.*, 1992; Clarke *et al.*, 1993). Plus précisément, dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) et du virus de l'immunodéficience simienne (SIV), il a été démontré que suite à une infection, la population virale devenait, avec le temps, un mélange de quasi-espèces différentes génétiquement l'une de l'autre (Pedroza Martins *et al.*, 1992; Sala *et al.*, 1994; Campbell et Hirsch, 1994).

1.3 Séquences de la souche NY-1

Au cours de ce projet, une équipe a rapporté le séquençage partiel (1105 nt) de la région codant pour la p80 de la souche NY-1 (Brock *et al.*, 1993). En comparant leur

séquence avec celle obtenue ici (figure 22), une homologie de 92.5% est obtenue, ce qui est très faible pour deux souches supposées identiques et qui suggère fortement qu'une des deux équipes ne travaille pas avec la souche NY-1. D'autre part, une troisième équipe (De Moerlooze *et al.*, 1990) a publié la séquence en acides aminés d'une autre région de la p125 de NY-1 (aa 1422 à 1724). La séquence nucléotidique correspondant à cette région (nt 4647 à 5557) a pu nous être acheminée (De Moerlooze, communication personnelle) et l'analyse n'a révélé qu'une seule différence sur 653 nt (un T au lieu d'un A à la position 4715) par rapport à la région analogue de la souche NY-1 présentée à la figure 10. Ainsi, il semble plus probable que la "mauvaise" NY-1 est celle de Brock *et al.* (1993). Ceci peut être affirmé même si la région étudiée par De Moerlooze *et al.* (1990) ne superpose pas celle de Brock *et al.* (1993) car notre séquence, qui contient ces deux régions, fut obtenue à partir de divers fragments qui se superposent et qui, en quelque sorte, se valident l'un l'autre.

Ces observations soulignent les difficultés pouvant survenir lorsque l'on veut maintenir une souche de BVDV, principalement du biotype NCP, en culture cellulaire. En effet, le BVDV est constamment présent dans les lots commerciaux de sérum bovin utilisés pour suppléer les cultures cellulaires (Bolin *et al.*, 1991; Erickson *et al.*, 1991). Lors du passage sur cellules, une souche de BVDV peut donc être contaminée par une souche présente dans le sérum. Par la suite, la souche contaminante peut supplanter la souche originale ou encore, si un clonage par dilution limite est effectué à partir du mélange, remplacer complètement la souche originale. Comme mentionné par Cay *et*

Figure 22

Comparaison des séquences obtenues par Brock *et al.* (1993) pour la souche NY-1 (NY-Brock) avec les séquences correspondantes obtenues lors de la présente étude (NY-IAF). La région illustrée représente la séquence partielle de la p80 (1105 nt) et débute au nt 6346 pour se terminer au nt 7450.

NY - IAF : CAGGGCAGCAATGGTAGAATATTCATACATATTTCTGGATGAGTATCACTGCGCTACTCCTGAGC 6410
 NY-Brock:G.....C.C.....C.....

NY - IAF : AGTTGGCTGTTCATAGGAAAAATTCACAGATTCTCTGAGAGCATAAGGGTGGTTGCCATGACTGCT 6475
 NY-Brock:T.....T.....C

NY - IAF : ACCCCAGCAGGGTCAGTGACCACAACAGGGCAAAAACACCCAATAGAAGAATTCATAGCCCCTGA 6540
 NY-Brock:A.....

NY - IAF : GGTGATGAAGGGGAGGACCTTGAAGCCAGTTCCTTGACATAGCGGGTTAAAGATCCCCGTAG 6605
 NY-Brock:A.....T.....

NY - IAF : AGGAGATGAAGGGCAACATGTTGGTCTTTGTGCCACGAGAAACATGGCAGTTGATGTAGCCAAG 6670
 NY-Brock:A.....TT.G....C...T.CG.C....TG...T.....CA....G..

NY - IAF : AAACCTAAAGCCAAGGGCTACAACCTCAGGATATTAACACAGTGGGGAAGACCCAGCCAACCTGAG 6735
 NY-Brock: G....A...A.....C.....GC.....G.....T....

NY - IAF : AGTGGTAACATCACAGTCCCCATACGTTGTGGTTGCCACCAATGCTATCGAGTCAGGGGTAACGC 6800
 NY-Brock:G.....C.....

NY - IAF : TGCCAGATCTAGATACAGTTGTTGACACAGGCTGAAATGCGAGAAGAGGGTGAGGGTGTTCATCC 6865
 NY-Brock:T.....T.....T...

NY - IAF : AAAATACCCTTTATAGTGACAGGCCTTAAAAGAATGGCTGTCACTGTGGGCGAACAGGCCAGCG 6930
 NY-Brock:C.....T.....

NY - IAF : GAGGGGCAGGGTAGGTAGAGTGAAGCCCGGTAGGTACTATAGAAGTCAGGAAACAGCAACCGGGT 6995
 NY-Brock: ...A.....T.....

NY - IAF : CAAAGGACTACCACTATGACCTGTTACAGGCACAGAGGTACGGGATCGAAGATGGGATCAACGTA 7060
 NY-Brock:T.....G.G.....G

NY - IAF : ACAAAGTCCCTTAGGGAGATGAATTATGACTGGAGCCTGTATGAGGAAGACAGCTTACTGATAAC 7125
 NY-Brock: G.G.....C.....G.....A.....

NY - IAF : CCAGCTGGAGATACTGAACAATCTACTCATCTCCGAAGATTTACCAGCAGCTGTCAAAAACATCA 7190
 NY-Brock: T.....A.....A.....T..TA..A.....TG...G.....

NY - IAF : TGGCAAGAAGTATCAGCCAGGCAATCCAGCTTGCATACAACAGTTATGAGGTCCAGGTCCCT 7255
 NY-Brock:C.....T.....C...G.....A..T...

NY - IAF : GTGCTGTTTCCAAAAATAAGGAATGGGGAAGTCACAGACACTTACGAGAAGTACTCATTCTCTAA 7320
 NY-Brock:C...G.G.....G.GT.....C.....G..

NY - IAF : TGCAAGGAACTAGGGGATGACGTTCCCGTGTACATTATGCCACTGAGGATGAAGATCTGGCAG 7385
 NY-Brock:A.....G.....C..A.....

NY - IAF : TGGACCTTCTAGGCCTGGACTGGCCAGACCCAGGGAATCAGCAAGTAGAGGAGACTGGGAAAGCA 7450
 NY-Brock:AT.....T.....

al. (1989), il faut faire attention avant de comparer les résultats obtenus à partir d'une souche de BVDV portant le même nom, mais provenant de laboratoires différents. Ceci est vrai non seulement pour le BVDV, mais aussi pour d'autres virus (Berthiaume *et al.*, 1992)

1.4 Cas de l'isolat Q47/Q47i

La séquence nucléotidique obtenue pour Q47 est, mis à part l'insertion, quasiment identique (une seule différence) à celle de Q47i. En plus, certaines particularités nucléotidiques ne sont retrouvées que chez ces deux souches. Ceci suggère que la souche Q47i dérive de la souche Q47 suite à une recombinaison génomique à l'origine de l'insertion. Ainsi, il semble probable que l'isolat Q47, i.e l'échantillon original, contienne un mélange de deux souches: Q47 et Q47i. Comme cet isolat donnait un ECP sur culture cellulaire, et comme plusieurs souches CP proviennent du réarrangement génomique d'une souche NCP, il serait intéressant d'isoler ces deux souches l'une de l'autre et de vérifier l'hypothèse voulant que Q47 soit du biotype NCP et que Q47i soit la dérivée CP de Q47. Il serait d'autant plus intéressant d'étudier de plus près la paire Q47/Q47i car l'insertion retrouvée chez la souche Q47i n'est décrite que pour la souche CP NADL qui ne possède pas de souches analogues sans insertion. Par conséquent, nous possédons un outil permettant de prouver directement le rôle d'une insertion de type NADL dans le phénotype CP.

En comparant NADL et Q47i, on note que leur insertion respective, quoique nécessairement de même origine, diffère par la longueur et l'emplacement génomique. Comme ce type d'insertion représente un ARN messager cellulaire qui a une fonction encore inconnue (Meyers *et al.*, 1990 cité dans Meyers *et al.*, 1991), le mécanisme potentiel pouvant expliquer le clivage de la p125 est également inconnu. Il est par conséquent difficile de donner une importance aux différences notées entre les deux insertions. Toutefois, il est possible de suggérer que, si le mécanisme employé par Q47i et NADL est le même, il ne dépend pas du site précis de l'insertion et par conséquent il ne dépend pas des jonctions insertion/BVDV. Ceci serait tout de même particulier car, pour toutes les souches rapportées pour posséder l'insertion de l'ubiquitine ou de la p20, la jonction 3'-insertion/5'-BVDV est la même.

2. Étude de la région 5' non-codante (5'UTR)

2.1 Identification d'un nouveau groupe de BVDV

À partir des séquences partielles de la 5'UTR, il a été possible de démontrer la grande disparité qui existe entre les souches épidémiques et les souches classiques (seulement 75% d'homologie). Il faut cependant se demander si le fait d'observer des différences sur une région représentant 2% du génome est suffisant pour affirmer que les souches épidémiques constituent un nouveau groupe de BVDV. La réponse est probablement oui car la 5'UTR est reconnue comme étant une région très conservée du

génomique (Deng et Brock, 1992; Qi *et al.*, 1993). Toutefois sans les résultats sérologiques obtenus en collaboration avec le Dr Jan van den Hurk (VIDO, Saskatoon), un doute aurait persisté. Dans cette étude, six antisérums polyclonaux monospécifiques ont été utilisés; quatre étaient dirigés contre des souches classiques (NADL, NY-1, C1 et C3) et deux étaient dirigés contre des souches du nouveau groupe (Waters et CD87). Au moyen de ces antisérums, des tests de séroneutralisation furent effectués sur la quasi-totalité des souches dont nous avons déterminé la séquence en 5'UTR. Les titres obtenus par les diverses souches envers les divers antisérums (tableau 7) permettent de séparer les souches en deux groupes, exactement les mêmes que ceux obtenus par notre étude sur la 5'UTR. La combinaison des résultats moléculaires et sérologiques nous permettent donc d'affirmer que les souches épidémiques forment, avec les souches thrombocytopéniques, un nouveau groupe de BVDV.

2.1.1 Relation avec les autres pestivirus

La raison pour laquelle nous avons parlé d'un "nouveau groupe de BVDV" découle du fait que toutes les souches mentionnées ci-haut furent isolées du bovin. Toutefois, avec une homologie aussi faible, autant moléculaire que sérologique, nous pouvons nous demander s'il s'agit vraiment de BVDV?

Lors de deux récents congrès, Ridpath et Bolin (1993a,b) ont montré que les souches thrombocytopéniques étaient différentes des souches de BVDV vaccinales et qu'elles ressemblaient davantage au BDV. Comme nous avons démontré que les souches

Tableau 7

Comparaison des titres de séroneutralisation des différentes souches de BVDV

Souches		Titres obtenus avec les antisérums d'animaux infectés avec la souche...					
		GROUPE II		GROUPE I			
		CD87	Waters	C1	C3	NADL	NY-1
G R O U P E I	Oregon	100	800	800	800	3200	6400
	NADL	200	800	800	800	12800	3200
	Singer	100	1600	800	1600	2400	2400
	Draper	200	1600	800	1600	3200	6400
	NY-1	100	600	800	1600	2400	4800
	SD-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Osloss	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	C1	100	3200	800	800	3200	6400
	C3	100	800	800	3200	3200	3200
	1854	100	800	800	400	3200	6400
I	Q1808	800	3200	1600	1600	1600	3200
	Q69	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Q47	200	800	800	800	3200	3200
	Q713	200	3200	800	800	1600	3200
G R O U P E I I	CD87	6400	12800	200	100	50	50
	Waters	12800	51200	200	200	200	100
	890	25600	25600	150	150	200	200
	1494	12800	25600	200	100	200	400
	Bull	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Q1111	6400	12800	150	75	100	200
	Q140	12800	25600	200	200	400	200
	Q126	3200	12800	150	150	150	150
	Q2101	6400	12800	100	100	50	50
Q4812	25600	25600	100	50	200	200	

ND, test non-effectué sur ces souches

thrombocytopéniques se classaient avec les souches épidémiques canadiennes, nous pouvons extrapoler en disant que tout le nouveau groupe de BVDV s'apparente au BDV. Encore plus récemment, Paton *et al.* (1994) ont défini trois groupes de BDV au moyen d'AcM. L'un de ces groupes de BDV contient des souches analogues aux souches de BVDV classiques tandis que les deux autres groupes semblent représenter le vrai BDV. Mais lequel de ces deux groupes seraient similaires aux nouvelles souches de BVDV? L'un des groupes définis par Paton *et al.* inclut les souches Aveyron et Moredun qui furent séquencées partiellement au niveau de la 5'UTR (De Moerlooze *et al.*, 1993). Comme ces séquences ne correspondent pas à celles obtenues ici pour les nouvelles souches, nous pouvons suggérer que ces dernières s'apparentent au deuxième groupe de BDV qui inclut des souches telles que 59386 et Vosges, une souche de HoCV atypique. Toutefois, avant d'affirmer que les nouvelles souches de BVDV identifiées ici sont des souches de BDV, il faudra faire plusieurs autres analyses, principalement du côté du BDV qui est très peu étudié génomiquement.

En combinant nos résultats avec ceux de de Paton *et al.* (1994) ainsi qu'avec ceux de Ridpath et Bolin (1993a,b), nous soulevons une certaine complexité existant dans le regroupement des souches de pestivirus. Cependant, ces trois mêmes études décrivent des outils (5'UTR, AcM, antisérums) qui permettront, dans un avenir probablement rapproché, d'éclaircir cette classification en définissant des groupes de pestivirus définitifs. Ainsi, un isolat pourra être rapidement classé dans l'un ou l'autre de ces groupes indépendamment de l'hôte où il fut isolé.

2.1.2 Propagation de l'épidémie

La grande similitude qui existe entre les nouvelles souches provenant des États-Unis et celles provenant du Canada suggère que toutes ces souches originent d'un même point et qu'elles se sont ensuite répandues partout en Amérique du Nord. Ce point d'origine est difficile à identifier, mais une étude récente (Harasawa et Tomiyama, 1994) pourrait expliquer, du moins en partie, le pourquoi de la propagation de l'épidémie. Cette étude fait mention de la présence du BVDV, identifiée par séquençage partiel de la 5'UTR, dans des préparations de vaccins humains. Certaines de ces contaminations (deux sur cinq) correspondent à des souches faisant partie du même groupe que les souches épidémiques. La source probable de ces contaminations est le sérum bovin utilisé pour la culture cellulaire. Ainsi, l'utilisation de tels sérums, pour la préparation de vaccins bovins ou pour le transfert d'embryon, constitue un très bon moyen de disperser le virus à travers plusieurs troupeaux géographiquement éloignés. Notons que la pratique de certains éleveurs de veaux, qui revendent des veaux malades aux encans, n'est pas à négliger non plus dans la propagation d'une épidémie.

2.1.3 Développements futurs

Comme le démontrait le tableau 7, la réaction croisée entre les souches classiques et les souches épidémiques est très faible, les titres obtenus étant au moins quatre fois plus élevés pour les souches du groupe homologue à l'antisérum que pour les souches du groupe hétérologue. Ceci suggère que les vaccins actuels, produits seulement à partir de souches de BVDV classiques, seraient peu efficaces lorsqu'utilisés en dose normale.

Dans un futur rapproché, il sera donc essentiel d'inclure ces nouvelles souches dans la préparation des vaccins. L'importance d'un bon programme de vaccination, avec un vaccin adéquat, est d'autant plus pressant que les nouvelles souches de BVDV sont beaucoup plus virulentes que les souches classiques et qu'elles peuvent même causer la mort lors d'une simple infection aigüe.

De plus, il sera probablement nécessaire, dans le but de suivre la prolifération des nouvelles souches et de prévenir d'éventuelles épidémies, de mettre au point des tests de diagnostic capables de différencier les nouvelles souches des souches classiques. Par exemple, l'utilisation d'antisérums tels que décrits à la section 2.1 pourraient être très pratiques pour des tests immunologiques de diagnostic (e.g. immunofluorescence, ELISA). D'autre part, à partir des séquences de la 5'UTR obtenues ici, il est possible de générer des oligonucléotides qui seraient spécifiques aux nouvelles souches et qui pourraient servir d'amorces pour le PCR ou de sondes pour l'hybridation. Dans le cas du PCR, trois amorces (A,B,C) pourraient être utilisées simultanément afin de discriminer instantanément entre les souches classiques et les nouvelles souches. Dans un tel test, le produit d'amplification AC se produirait pour toutes les souches de BVDV tandis que le produit AB, dû à la spécificité de l'amorce B, se produirait seulement s'il s'agit d'une souche du nouveau groupe.

2.2 Analyse des structures secondaires du domaine D

Malgré la faible homologie de 75 % qui existe entre les souches épidémiques et les souches classiques au niveau de la 5'UTR, il a été possible de démontrer que les structures secondaires du domaine D étaient très bien maintenues d'un groupe à l'autre. Ceci indique donc la présence d'une forte pression évolutive forçant le maintien de structures spécifiques. Ceci suggère également que la 5'UTR, et plus particulièrement les structures secondaires, a un rôle très important dans le cycle viral du BVDV. Comme suggéré par Deng & Brock (1993), ce rôle pourrait bien être celui d'un IRES qui rend possible la traduction par un mécanisme indépendant de la coiffe.

En analysant la stabilité du domaine D des différentes souches, nous avons remarqué que, de façon générale, le domaine D des souches épidémiques est significativement plus stable que celui des souches classiques. En supposant que le BVDV possède un IRES, il est possible d'imaginer que des structures plus stables seront plus rapidement et plus souvent reconnues par le ribosome. Par le fait même, le niveau de traduction de la polyprotéine serait plus élevé. Ainsi, cette stabilité accrue, ou encore certaines différences nucléotidiques notées dans la 5'UTR, pourrait bien être la cause directe de la forte virulence des nouvelles souches. En fait, dans le cas du poliovirus, qui possède un IRES, des mutations au niveau de la 5'UTR peuvent modifier l'efficacité de la traduction de la polyprotéine du virus. En retour, la vitesse de répllication, le titre ainsi que la neurovirulence du virus peuvent être modifiés (Sonenberg 1990).

Dans l'avenir, après avoir prouvé que la 5'UTR du BVDV est bien un IRES, il serait intéressant de comparer l'efficacité de la 5'UTR des nouvelles souches à celle de la 5'UTR des souches classiques. Pour ce faire, on pourrait placer les différentes 5'UTR devant un gène reporteur quelconque dont le produit est facilement quantifiable. Advenant que la 5'UTR des souches épidémiques soit plus efficace à induire la traduction, une étude de mutagenèse dirigée pourrait peut-être, comme pour le poliovirus, mettre en évidence des nucléotides précis responsables de la virulence du BVDV ou des pestivirus en général.

3. Regroupement génotypique des souches du BVDV

Les différentes séquences nucléotidiques que nous avons déterminées nous permettent de distinguer deux groupes majeurs de BVDV: le groupe I, lui-même divisible en deux sous-groupes (Ia et Ib), renferme les souches classiques, et le groupe II inclut les souches épidémiques canadiennes ainsi que les souches thrombocytopéniques américaines. Au niveau de la 5'UTR, la différence entre les groupes I et II est évidente tandis que la différence entre les groupes Ia et Ib l'est moins. En ce qui concerne la p125, la différence entre les groupes Ia et Ib est beaucoup plus marquée, tandis que l'hétérogénéité du groupe II ne peut être démontrée qu'indirectement par l'absence d'amplification notée pour la souche Q4812 avec cinq paires d'amorces différentes. Même si ce dernier point reste à être prouvé de façon plus approfondie, il demeure

indicatif de la séquence probable des souches du groupe II au niveau de la p125. L'analyse sérologique effectuée par le Dr van den Hurk démontre également l'existence des groupes I et II, sans toutefois faire la distinction entre Ia et Ib. Indirectement, ces résultats indiquent que la séquence nucléotidique de la gp53, la principale cible des anticorps neutralisants, diffère entre les groupes I et II.

Dans le but de vérifier la validité des groupes génotypiques Ia, Ib et II, nous avons tenté de classer d'autres souches de BVDV dont les séquences nucléotidiques de la 5'UTR ou de la p125 étaient disponibles à même les publications. Le tableau 8 montre que seules deux souches (SSDC et 88753C) ne peuvent pas être classées précisément à partir des séquences données. Toutefois, ces deux souches font inévitablement partie du groupe I et avant de conclure qu'elles sont distinctes des groupes Ia et Ib, il faudra attendre les résultats de l'analyse d'autres régions de leur génome. Notons que Brock *et al.* (1993) avaient aussi séparé les souches de BVDV en trois groupes, mais seulement par hybridation moléculaire avec quatre différentes sondes (trois provenant de la p80 et une issue de la 5'UTR). Les deux premiers groupes renfermaient des souches dont les résultats d'hybridation se comparaient à ceux de la souche NADL (\approx Ia) ou à ceux de la souche NY-1 (\approx Ib). L'autre groupe contenait trois souches n'hybridant avec aucune des trois sondes (\approx II). Dans leur étude, une seule souche faisant partie soit du groupe de NY-1 ou du groupe de NADL, n'a pas pu être classée précisément.

Tableau 8

Regroupement des souches de BVDV étudiées au cours de ce projet ainsi qu'un certain nombre d'autres dont la séquence nucléotidique partielle est publiée

Ia	Ib	II	Référence
NADL, SD-1, Singer, Oregon, C1, C3	NY-1, Q713, Osloss, Q47, Draper, Q69, 1854, Q1808, NY-Brock	890, CD87, Q1111, Q140, Q126, Q2101, Q4812, Bull, 1494, Waters	Souches discutées lors de la présente étude
CP1, NCP1			Meyers <i>et al.</i> 1991 ¹
Pe515CP, Pe515NCP	CP6		Meyers <i>et al.</i> 1992 ¹
Emerson, Burt, 88088, 1185C, 1185NC, 7443, 9657, 190C, VM	2110C, NE, TGAC, TGAN, SNC, (SSDC) ³ Sanders		Qi <i>et al.</i> , 1993 ²
	Osloss-NC, Vp123NC, Ve48NC, Lamspringe, (88753C) ³	Singer-NC	De Moerlooze <i>et al.</i> , 1993 ²
Sérum A, Sérum B	Sérum F	Sérum C, Sérum E	Harasawa et Tomiyama, 1994 ²

¹ Séquences partielles de la région codant pour la p125.

² Séquences partielles de la 5'UTR.

³ Il serait nécessaire d'avoir plus de séquences pour s'assurer de la classification précise des souches SSDC et 88753C.

Ainsi, nous pouvons dire que les trois groupes Ia, Ib et II, qui n'ont aucun lien avec les biotypes CP et NCP, sont représentatifs de la grande majorité des souches de BVDV. Toutefois, dû aux possibilités de recombinaison pouvant survenir entre le génome de deux souches, il ne faudrait pas se surprendre de rencontrer une même souche possédant une région génomique correspondant à un groupe et une autre région correspondant à un autre groupe. De plus, il est à prévoir que plus les données s'accumuleront plus il sera possible de diviser chacun des trois groupes en sous-groupes plus homogènes. Ce point est particulièrement vrai pour le groupe Ia qui est le plus hétérogène des trois groupes.

CONCLUSION

Dans un premier temps, cette étude démontre que les souches CP Oregon et Singer, qui ne possèdent pas de réarrangements de leur p125 pouvant expliquer l'origine de la p80, ne diffèrent pas des souches NCP par des mutations au niveau de la p80 elle-même. Par contre, la modification de la p54, ou celle d'un cofacteur hypothétique de la p80, pourrait bien être à l'origine du clivage de la p125 des souches CP telles Oregon et Singer. Cependant, d'autres études seront nécessaires afin de prouver l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Dans la deuxième partie du projet, il nous a été possible de démontrer que les souches de BVDV responsables d'épidémies au Québec et dans l'ouest canadien constituent, avec les souches thrombocytopéniques américaines, un nouveau groupe de BVDV très distinct des souches classiques. Comme ces nouvelles souches possèdent une réaction croisée très faible avec les souches classiques constituant les vaccins actuels, des mesures devront être prises dans le but de développer des vaccins adéquats. L'analyse des structures secondaires de la 5'UTR, qui pourrait représenter un IRES, nous a amené à suggérer que la virulence élevée des souches épidémiques pourrait être causée par des structures plus stables ou encore par des différences nucléotidiques au niveau de la 5'UTR.

De façon plus générale, notre étude a démontré que le BVDV doit faire face à de nombreuses pressions sélectives, probablement reliées au rôle de chacune des régions du génome dans le cycle viral. Ainsi, il y a sélection pour le maintien du profil

d'hydrophobicité de la p54, pour le maintien de l'intégrité de la p80 et pour le maintien des structures secondaires de la 5'UTR.

Enfin, nous avons pu regrouper les souches de BVDV en trois groupes génotypiques représentatifs de la grande majorité, sinon de la totalité, des souches de BVDV. Les groupes Ia et Ib incluent les souches de BVDV classiques tandis que le groupe II renferme les souches épidémiques canadiennes et les souches thrombocytopéniques américaines. Les mêmes regroupements sont présents autant au niveau de la p125 qu'au niveau de la 5'UTR, mais le degré d'homologie entre les groupes varie d'une région génomique à l'autre.

REMERCIEMENTS

Je voudrais principalement remercier les Drs Jacqueline Lecomte et Peter Tijssen pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et m'avoir dirigé tout au long de mes études. Je voudrais également remercier Denise McSween, Hélène Drolet, Diane Tremblay, Lise Forget et Johanne Roger pour leur aide technique ainsi que Benoît Hébert pour son assistance sur ordinateur. Je tiens aussi à dire merci au Dr Jan van den Hurk pour l'intéressante collaboration.

En plus des personnes ci-haut mentionnées, je remercie Jacques Beaubien, Stéphane Faubert, Jean Bergeron, Roger Dubuc, Nicole Sawyer et Louise Wilson pour la richesse des discussions autant scientifiques et philosophiques que divers !!!

Pour m'avoir supporté, aidé et encouragé tout au long de mon cheminement, je tiens à remercier mes parents. Également pour m'avoir supporté et encouragé, mais surtout pour m'avoir prouvé qu'il existe des choses beaucoup plus importantes que la science, je tiens à dire merci à Chantal et Mylène.

En terminant, j'aimerais remercier le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour m'avoir supporté financièrement au cours de cette maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

- ACLAND, H.M., G.P. GARD & J.W. PLANT. 1972. Infection of sheep with a mucosal disease virus. *Aust. Vet. J.* 48:70.
- ALANSARI, H., K.V. BROCK & L.N.D. POTGIETER. 1993. Single and double polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in tissue culture and sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5:148-153.
- AMES, T.R. 1986. The causative agent of BVD: its epidemiology and pathogenesis. *Vet. Med.* 81:848-869.
- ATLURO, D., W. NOTOWIDJOJO, D.W. JOHNSON & C.C. MUSCOPLAT. 1979. Suppression of *in vitro* immunoglobulin biosynthesis in bovine spleen cells by bovine viral diarrhoea virus. *Clin. Immun. Immunopath.* 13:254-260.
- BAKER, J.C. 1987. Bovine viral diarrhoea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 190:1449-1458.
- BAKER, J.C. 1990. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea virus infection. *Rev. Sci. Tech.* 9:25-41.
- BARLOW, R.M., P.F. NETTLETON, A.C. GARDINER, A. GREIG, J.R. CAMPBELL & J.M. BONN. 1986. Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull. *Vet. Rec.* 118:321-324.
- BAZAN, J.F. & R.J. FLETTERICK. 1989. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171:637-639.
- BECHER, P., A.D. SHANNON, N. TAUTZ & H.-J. THIEL. 1994. Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology* 198:542-551.
- BERTHIAUME, L., E. TARRAB, J. HEPPELL, M. ARELLA, P. DOBOS, R. DUNCAN & J. LECOMTE. 1992. Antigenic and genomic differences of two Jasper strains of infectious pancreatic necrosis virus. *Intervirology* 34:197-201.
- BEZEK, D.M., J.C. BAKER & J.B. KANEENE. 1988. Immunofluorescence of bovine virus diarrhoea viral antigen in white blood cells from experimentally infected immunocompetent calves. *Can. J. Vet. Res.* 52:288-290.
- BIELANSKI, A., C. DUBUC & W.C.D. HARE. 1992. Failure to remove bovine diarrhoea virus (BVDV) from bull semen by swim up and other separatory sperm techniques associated with *in vitro* fertilization. *Reprod. Domes. Anim.* 27:303-306.

- BIELEFELDT OHMANN, H., M.H. JENSEN, K.J. SORESENSEN & K. DALSGAARD 1981. Demonstration of bovine viral diarrhoea virus antigen in cryostat- and paraffin-sections of bovine tissues by the immunoperoxidase technique. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 89:281-285.
- BIELEFELDT OHMANN, H. & B. BLOCH. 1982. Electron microscopic studies of bovine viral diarrhoea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. *Arch. Virol.* 71:57-74
- BIELEFELDT OHMANN, H., M.H. JENSEN, E.J. SORESENSEN & K. DALSGAARD. 1982. Experimental fetal infection with bovine viral diarrhoea virus. I. Virological and serological studies. *Can. J. Comp. Med.* 46:357-362.
- BIELEFELDT OHMANN, H. 1983. Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. *Res. Vet. Sci.* 34:5-10.
- BIELEFELDT OHMANN, H., L. RONSHOLT & B. BLOCH. 1987. Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J. Gen. Virol.* 68:1971-1982.
- BIELEFELDT OHMANN, H. 1990. Electron microscopy of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech.* 9:61-73.
- BLOOD, D.C., O.M. RADOSTITS & J.A. HENDERSON. 1983. *Veterinary Medicine*. Baillière Tindall, London, 6th ed. 754-761.
- BOLIN, S.R., A.W. MCCLURKIN & M.F. CORIA. 1985a. Effects of bovine viral diarrhoea virus on percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 46:884-886
- BOLIN, S.R., A.W. MCCLURKIN, R.C. CUTLIP & M.F. CORIA. 1985b. Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46:2467-2470.
- BOLIN, S.R., A.W. MCCLURKIN & M.F. CORIA. 1985c. Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in selected cattle herds. *Am. J. Vet. Res.* 46:2385-2387.
- BOLIN, S.R., A.W. MCCLURKIN, R.C. CUTLIP & M.F. CORIA. 1985d. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46:573-576.

- BOLIN, S.R., J.M. SACKS & S.V. CROWDER. 1987. Frequency of association of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus with mononuclear leukocytes from persistently infected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 48:1441-1445.
- BOLIN, S., V. MOENNIG, N.E. KELSO GOURLEY & J. RIDPATH. 1988. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups. *Arch. Virol.* 99:117-123.
- BOLIN, S.R. 1990. Control of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech.* 9:163-171.
- BOLIN, S.R., P.J. MATTHEWS & J.F. RIDPATH. 1991a. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3:199-203.
- BOLIN, S.R., E.T. LITLEDIKE & J.F. RIDPATH. 1991b. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea viruses in a vaccinated herd. *Am. J. Vet. Res.* 52:1033-1037.
- BOLIN, S.R. & J.F. RIDPATH. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *Am. J. Vet. Res.* 53:2157-2163.
- BOULANGER, D., S. WAXWEILER, L. KARELLE., M. LONCAR, B. MIGNON, J. DUBUISSON, E. THIRY & P.P. PASTORET. 1991. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. *J. Gen. Virol.* 72:1195-1198.
- BOULANGER, D., A. VANDERPLASSCHEN, J. DUBUISSON & P.P. PASTORET. 1993. Entry of bovine viral diarrhoea virus. Abstracts of the IXth International Congress of Virology Glasgow, Scotland. p. 148.
- BOYE, M., S. KAMSTRUP & K. DALSGAARD. 1991. Specific sequence amplification of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. *Vet. Microbiol.* 29:1-13.
- BRAUN, R.K., B.I. OSBURN & J.W. KENDRICK. 1973. Immunologic response of bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 34:1127-1132.
- BROCK, K.V., D.A. BRIAN, B.T. ROUSE & L.N.D. POTGIETER. 1988. Molecular cloning of complementary DNA from a pneumopathic strain of bovine viral diarrhoea virus and its diagnostic application. *Can. J. Vet. Res.* 52:451-457.
- BROCK, K.V. & L.N.D. POTGIETER. 1990. Detection of bovine viral diarrhoea virus in serum from cattle by dot blot hybridization assay. *Vet. Microbiol.* 24:297-306.

- BROCK, K.V., R. DENG & S.M. RIBLET. 1992. Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR. *J. Virol. Methods* 38:39-46.
- BROCK, K.V., J.F. RIDPATH & R. DENG. 1993. Comparative hybridization and nucleotide sequence information from two noncytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 36:69-82
- BROWN, T.T., A.D. SCHULTZ, J.R. DUNCAN & S.I. BISTNER. 1979. Serological response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. *Infect. Immunity* 25:93-97.
- BROWNLIE, J., M.C. CLARKE & C.J. HOWARD. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 114:535-536.
- BROWNLIE, J., M.C. CLARKE & C.J. HOWARD. 1989. Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.* 46:307-311.
- BROWNLIE, J. 1990a. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 23:371-382.
- BROWNLIE, J. 1990b. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech.* 9:43-59.
- CAMPBELL, B.J. & V.M. HIRSCH. 1994. Extensive envelope heterogeneity of simian immunodeficiency virus in tissues from infected macaques. *J. Virol.* 68:3129-3137.
- CARLSSON, U., S. ALENUS & B. SUNDQUIST. 1991. Protective effect of an ISCOM bovine virus diarrhoea virus (BVDV) vaccine against an experimental BVDV infection in vaccinated and non-vaccinated pregnant ewes. *Vaccine* 9:577-580.
- CASARO, A.P.E., J.W. KENDRICK & P.C. KENNEDY. 1971. Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 32:1543-1562
- CAY, B., G. CHAPPUIS, C. COULIBALY, Z. DINTER, S. EDWARDS, I. GREISER-WILKE, M. GUNN, P. HAVE, G. HESS, N. JUNTTI, B. LIESS, A. MATEO, P. MCHUGH, V. MOENNIG, P. NETTLETON & G. WENSVOORT. 1989. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an international workshop. *Vet. Microbiol.* 20:123-129.
- CHILDS, T. 1946. X-disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.* 10:316-319.
-

- CHOMCZYNSKI, P. & N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- CHU, H.-J. & Y.C. ZEE. 1984. Morphology of bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 45:845-850.
- CHU, H.-J., Y.C. ZEE, A.A. ARDANS & K. DAI. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhea virus in bovine sera. *Vet. Microbiol.* 10:325-333.
- CLARKE, D.K., E.A. DUARTE, A. MOYA, S.F. ELENA, E. DOMINGO & J. HOLLAND. 1993. Genetic Bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J. Virol.* 67:222-228.
- CLARKE, M.C., J. BROWNLIE & C.J. HOWARD. 1989. The effect of immunosuppression with corticosteroid on the infection of calves with bovine virus diarrhoea virus. *Immunobiol.* 4:151-152.
- COLLETT, M.S., R. LARSON, C. GOLD, D. STRICK, D.K. ANDERSON & A.F. PURCHIO. 1988a. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 165:191-199.
- COLLETT, M.S., R. LARSON, S.K. BELZER & E. RETZEL. 1988b. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165:200-208.
- COLLETT, M.S., D.K. ANDERSON & E. RETZEL. 1988c. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 69:2637-2643.
- COLLETT, M.S., V. MOENNIG & M.C. HORZINEK. 1989. Recent advances in pestivirus research. *J. Gen. Virol.* 70:253-266.
- COLLETT, M.S. 1992. Molecular genetics of pestiviruses. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 15:145-154.
- CORAPI, W.V., R.O. DONIS & E.J. DUBOVI. 1988. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. *J. Virol.* 62:2823-2827.
- CORAPI, W.V., T.W. FRENCH & E.J. DUBOVI. 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* 63:3934-3943.

- CORAPI, W.V., ELLIOTT, R.D., FRENCH, T.W., ARTHUR, D.G., BEZEK D.M. & DUBOVI, E.J. 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:590-596.
- CORIA, M.F. & A.W. MCCLURKIN. 1978. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172:449-451.
- CORIA, M.F., M.J. SCHMERR & A.W. MCCLURKIN. 1983. Characterization of the major structural proteins of purified bovine viral diarrhoea virus. *Arch. Virol.* 76:335-339.
- CUTLIP, R.C., A.W. MCCLURKIN & M.F. CORIA. 1980. Lesions in clinically healthy cattle persistently infected with the virus of bovine viral diarrhoea-glomerulonephritis and encephalitis. *Am. J. Vet. Res.* 41:1938-1941.
- DE MOERLOOZE, L., M. DESPORT, A. RENARD, C. LECOMTE, J. BROWNLIE & J.A. MARTIAL. 1990. The coding region for the 54-kDa protein of several pestiviruses lacks host insertions but reveals a "zinc-finger-like" domain. *Virology* 177:812-815.
- DE MOERLOOZE, L., C. LECOMTE, S. BROWN-SHIMMER, D. SCHMETZ, C. GUIOT, D. VANDENBERGH, D. ALLAER, M. ROSSIUS, G. CHAPPUIS, D. DINA, A. RENARD & J.A. MARTIAL. 1993. Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J. Gen. Virol.* 74:1433-1438.
- DENG, R. & K.V. BROCK. 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence of a Pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* 191:867-879.
- DENG, R. & K.V. BROCK. 1993. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res.* 21:1949-1957.
- DEREGT, D., S.A. MASRI, H.J. CHO & H. BIELEFELDT OHMANN H. 1990. Monoclonal antibodies to the p80/125 gp53 proteins of bovine viral diarrhoea virus: their potential use as diagnostic reagents. *Can. J. Vet. Res.* 54:343-348.
- DE SCHWEINITZ, E.A. & E.A. DORSET. 1904. New facts concerning the etiology of hog cholera. *U.S. Dep. Agric. 20th Annu. Rep. Bai.* 157-162.
- DIDERHOLM, H. & Z. DINTER. 1966. Infectious RNA derived from bovine virus diarrhoea virus. *Zentbl. Bakt. Paras. I Abt. Orig.* 201:270-272.

- DONIS, R.O. & E.J. DUBOVI. 1987a. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology* 158:168-173.
- DONIS, R.O. & E.J. DUBOVI. 1987b. Glycoproteins of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in infected bovine cells. *J. Gen. Virol.* 68:1607-1616.
- DONIS, R.O. & E.J. DUBOVI. 1987c. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes. *Am. J. Vet. Res.* 48:1549-1554
- DONIS, R.O., W. CORAPI & E.J. DUBOVI. 1988. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 69:77-86.
- DUFFELL, S.J., M.W. SHARP, C.E. WINKLER, S. TERLECKI, C. RICHARDSON, J.T. DONE, P.L. ROEDER & C.N. HEBERT. 1984. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus-induced fetopathy in cattle: Efficacy of prophylactic maternal pre-exposure. *Vet. Rec.* 114:558-561.
- DUFFELL, S.J. & J.W. HARKNESS. 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* 117:240-245.
- DUFFELL, S.J., M.W. SHARP & D. BATES. 1986. Financial loss resulting from BVD-MD virus infection in a dairy herd. *Vet. Rec.* 118:38-39.
- EDWARDS, S. 1990. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *Rev. Sci. Tech.* 9:115-130.
- EDWARDS, S., J.J. SANDS & J.W. HARKNESS. 1988. The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Arch. Virol.* 102:197-206.
- ELLIS, J.A., W.C. DAVIS, E.L. BELDEN & D.L. PRATT. 1988. Flow cytometric analysis of lymphocyte subset alteration in cattle infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Pathol.* 25:231-236.
- ERICKSON, G.A., S.R. BOLIN & J.G. LANDGRAF. 1991. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Dev. Biol. Stand.* 75:173-175.
- FAILLA, C., L. TOMEI & R. DE FRANCESCO. 1994. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 68:3753-3760.
-

FALGOUT, B., R.H. MILLER & C.-J. LAI. 1993. Deletion of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J. Virol.* 67:2034-2042.

FENG, D.F. & R.F DOOLITTLE. 1987. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* 25:351-360.

FENNER, F. 1975/76. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Madrid, September 1975. *Intervirology* 6:1-12.

FERNANDEZ, A., M. HEWICKER, G. TRAUTWEIN, J. POHLENZ & B. LIESS. 1989. Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Path.* 26:26-32.

FERNELIUS, A.L., W.C. AMTOWER, G. LAMBERT, A.W. MCCLURKIN & P.J. MATTHEWS. 1973. Bovine viral diarrhoea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. *Can. J. Comp. Med.* 37:13-20.

FINLEY, D. & V. CHAU. 1991. Ubiquitination. *Annu Rev. Cell Biol.* 7:25-69.

FRANCKI, R.I.B., C.M. FAUQUET, D.L. KNUDSON & F. BROWN. 1991. Classification and nomenclature of viruses, fifth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. (Suppl.)* 2:223-233.

FREIER, S.M., R. KIERZEK, J.A. JAEGER, N. SUGIMOTO, M.H. CARUTHERS, T. NEILSON & D.H. TURNER. 1986. Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9373-9377.

FROST, J.W. & B. LIESS. 1973. Separation of structural proteins of bovine viral diarrhoea virus after degradation by different splitting techniques. *Arch. Ges. Virusforsch.* 42:297-299.

GAILLARD, C. & F. STARUSS. 1990. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res.* 18:378.

GIANGASPERO, M., G. WELLEMANS, E. VANOPDENBOSCH, A. BELLOLI & A. VERHULST. 1988. Bovine viral diarrhoea. *Lancet* 2:110.

GILLESPIE, J.H., J.A. BAKER & K. McENTEE. 1960. A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.* 50:73-79.

- GILLESPIE, J.H., L. COGGINS, J. THOMPSON & J.A. BAKER. 1961. Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. *Cornell Vet.* 51:155-159.
- GORBALENYA, A.E., A.P. DONCHENKO, E.V. KOONIN & V.M. BLINOV VM. 1989a. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* 17:3889-3897.
- GORBALENYA, A.E., E.V. KOONIN, A.P. DONCHENKO & V.M. BLINOV. 1989b. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17:4713-4730.
- GRAHN, T.C., M.L. FAHNING & R. ZEMJANIS. 1984. Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185:429-432.
- GRAY, E.W. & P.F. NETTLETON. 1987. The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J. Gen. Virol.* 68:2339-2346.
- GREISER-WILKE, I., L. HAAS, K. DITTMAR, B. LIESS & V. MOENNIG. 1993. RNA insertions and gene duplication in the nonstructural protein p125 region of pestivirus strains and isolates *in vitro* and *in vivo*. *Virology* 193:977-980.
- GRIEG A., I.R. GIBSON, P.F. NETTLETON & J.A. HERRING. 1981. Disease outbreak in calves caused by a mixed infection with infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 108:480.
- GRUBER, A.D., I.M. GREISER-WILKE, L. HAAS, M. HEWICKER-TRAUTWEIN & V. MOENNIG. 1993. Detection of bovine viral diarrhea virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue by nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 43:309-320.
- GUNN, H.M. 1993. Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 132:584-585.
- HAFEZ, S.M., K. PETZOLDT & E. RETZKO. 1968. Morphology of bovine viral diarrhea virus. *Acta Virol.* 12:471-473.
- HAFEZ, S.M. & B. LIESS. 1972. Studies on bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. II. Stability and some physico-chemical properties. *Acta. Virol.* 16:399-408
- HAMILTON, A. & P.J. TIMONEY. 1972. BVD virus and "Border disease". *Vet Rec.* 91:468.

- HARASAWA, R. & T. TOMIYAMA. 1994. Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccines. *J. Clin. Microbiol.* 32:1604-1605.
- HARKNESS, J.W., J.J. SANDS & M.S. RICHARDS. 1978. Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. *Res. Vet. Sci.* 24:98-103.
- HARKNESS, J.W., P.L. ROEDER & L. WOOD. 1984. Mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 115:186.
- HERMODSON, S. & Z. DINTER. 1962. Properties of bovine viral diarrhea virus. *Nature* 194:893-894.
- HERSHKO, A. & A. CIECHANOVER. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61:761-807.
- HERTIG, C. U. PAULI, R. ZANONI & E. PETERHANS. 1991. Detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 26:65-76.
- HEWICKER, M., T. WÖHRMANN, A. FERNANDEZ, G. TRAUTWEIN, B. LIESS & V. MOENNIG. 1990. Immunohistological detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 23:203-210.
- HIJIKATA, M., H. MIZUSHIMA, T. AKAGI, S. MORI, N. KAKIUCHI, N. KATO, T. TANAKA, K. KIMURA & K. SHIMITOHNO. 1993. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J. Virol.* 67:4665-4675.
- HOLLAND, J., K. SPINDLER, F. HORODYSKI, E. GRABAU, S. NICHOL & S. VAN DE POL. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215:1577-1585.
- HOLLAND, J.J., J.C. DE LA TORRE & D. STEINHAEUER. 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176:1-20.
- HOOFT VAN IDDEKINGE, B.J.L., J.L.B. VAN WAMEL, H.G.P. VAN GENNIP & R.J.M. MOORMANN. 1992. Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhea virus infections in cattle. *Vet Microbiol.* 30:21-34
- HOPKINSON, M.F., L.T. HART, C.L. SEGER, A.D. LARSON & R.W. FULTON. 1979. An immunodiffusion test for detection of bovine viral diarrhea virus antibodies in bovine serum. *Am. J. Vet. Res.* 40:1189-1191.
- HORZINEK, M.C. 1973. The structure of togaviruses. *Prog. Med. Virol.* 16:109-156.

- HORZINEK, M.C. 1981. Non-arthropod-borne Togaviruses. Academic Press, London.
- HOWARD, C.J., M.C. CLARKE & J. BROWNLIE. 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera. *Vet. Microbiol.* 10:359-369.
- HOWARD, C.J., J. BROWNLIE & L.H. THOMAS. 1986. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia in cattle in the UK. *Vet. Rec.* 119:628-629.
- HOWARD, C.J., J. BROWNLIE & M.C. CLARKE. 1987. Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet. Microbiol.* 13:361-369.
- HOWARD, T.H., B. BEAN, R. HILLMAN & D.R. MONKE. 1990. Surveillance for persistent bovine viral diarrhoea virus infection in four artificial insemination centers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:1951-1955.
- HUCK R.A. 1957. Mucosal disease complex. *J. Comp. Pathol. Therap.* 67:267-276.
- HUGHES, L.E., G.P. KERSHAW & I.G. SHAW. 1959. 'B' or border disease. An undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.* 71:313-317.
- HULST, M.M., D.F. WESTRA, G. WENSVOORT & R.J.M. MOORMANN. 1993. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J. Virol.* 67:5435-5442.
- HULST, M.M., G. HIMES, E. NEWBIGIN & R.J.M. MOORMANN. 1994. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology* 200:558-565.
- INOUE, H., H. NOJIMA & H. OKAYAMA. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.
- JANG, S.K., H.-G. KRAUSSLICH, M.J.H. NICKLIN, G.M. DUKE, A.C. PALMENBERG & E. WIMMER. 1988. A segment of the 5' non-translated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* 62:2636-2643.
- JENSEN, J., J. AIKEN & R.D. SCHULTZ. 1990. Detection of bovine viral diarrhoea virus genome in leukocytes from persistently infected cattle by RNA-cDNA hybridization. *Can. J. Vet. Res.* 54:256-259.

- JOHNSON, J.C. & R.F. ROSENBUSCH. 1990. Effect of host cell on the in vitro characteristics expressed by two bovine viral diarrhoea virus strains. *Vet. Microbiol.* 21:319-328.
- JUSTEWICZ, D.M., R. MAGAR, G. MARSOLAIS & J. LECOMTE. 1987. Bovine viral diarrhoea virus-infected MDBK monolayer as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of antibodies in bovine sera. *Vet. Immun. Immunopath.* 14:377-384.
- KAMER, G. & P. ARGOS. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 12:7269-7282.
- KAMSTRUP, S., L. RONSHOLT, M.H. JENSEN & K. DALSGAARD. 1992. A novel subunit ISCOM vaccine against bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech.* 11:873-877.
- KATZ, J.B., L. LUDEMANN, J. PEMBERTON & M.J. SCHMERR. 1987. Detection of bovine virus diarrhoea virus in cell culture using an immunoperoxidase technique. *Vet. Microbiol.* 13:153-157.
- KATZ, J.B. & S.K. HANSON. 1987. Competitive and blocking enzyme-linked immunoassay for detection of fetal bovine serum antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods* 15:167-175.
- KENDRICK, J.W. 1971. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection in pregnant cows. *Am. J. Vet. Res.* 32:533-544.
- KETLESEN, A.T., D.W. JOHNSON & C.C. MUSCOPLAT. 1979. Depression of bovine monocyte chemotactic responses by bovine viral diarrhoea virus. *Infect. Immun.* 25:565-568.
- KIRKLAND, P.D., S.G. RICHARDS, J.T. ROTHWELL & D.F. STANLEY. 1991. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 128:587-590.
- KNIAZEFF, A.J., R.A. HUCK, W.F.H. JARRETT, W.R. PRITCHARD, F.K. RAMSEY, I.A. SCHIPPER, M. STOBER & B. LIESS. 1961. Antigenic relationship of some bovine viral diarrhoea-mucosal disease viruses from the United States, Great Britain and West Germany. *Vet. Rec.* 73:768-769.
- KOONIN, E.V. 1993. A draft of phylogenetic taxonomy of positive-strand RNA viruses. Abstracts of the IXth International Congress of Virology Glasgow, Scotland. p. 367.
-

- KWANG, J., E.T. LITTLEDIKE, S. BOLIN & M.S. COLLETT. 1991a. Efficiency of various cloned DNA probes for detection of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 28:279-288
- KWANG, J., S. BOLIN, E.T. LITTLEDIKE, E.J. DUBOVI & R.O. DONIS. 1991b. Expression of the p80 region of bovine viral diarrhoea virus and identification of specific antibodies to this recombinant protein in bovine sera. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 178:1326-1334.
- KWANG, J., E.T. LITTLEDIKE, R.O. DONIS & E.J. DUBOVI. 1992. Recombinant polypeptide from the gp48 region of the bovine viral diarrhoea virus (BVDV) detects serum antibodies in vaccinated and infected cattle. *Vet. Microbiol.* 32:281-292.
- KWOK, S. & R. HIGUCHI. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-238.
- KYTE, J. & R.F. DOOLITTLE. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- LAMBERT, G. 1973. Bovine viral diarrhoea: prophylaxis and postvaccinal reactions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163:874-876.
- LECOMTE, C., J.J. PIN, L. DE MOERLOOZE, D. VANDENBERGH, A.F. LAMBERT, P.P. PASTORET & G. CHAPPUIS. 1990. ELISA detection of bovine viral diarrhoea virus specific antibodies using recombinant antigen and monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 23:193-201.
- LEE, K.M. & J.H. GILLESPIE. 1957. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* 18:952-953.
- LE GOUILL, C. & C.V. DÉRY. 1991. A rapid procedure for the screening of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res.* 23:6655.
- LEWIS, T.L., J.F. RIDPATH, S.R. BOLIN & E.S. BERRY. 1991. Detection of BVD viruses using synthetic oligonucleotides. *Arch. Virol.* 117:269-278.
- LISS, B., H.-R. FREY, H. KITTSTEINER, F. BAUMANN & N. NEUMANN. 1974. Beobachtungen und Untersuchungen über die "Mucosal disease" des Rindes. *Dt. tierärztl. Wschr.* 81:477-500.
- LISS, B., S. ORBAN, H.R. FREY, G. TRAUTWEIN, W. WIEFEL & H. BLINDOW. 1984. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. *Zentbl. Vet. Med. B* 31:669-681.
-

- LOBMANN, M., P. CHARLIER, G. FLORENT & N. ZYGRAICH. 1984. Clinical evaluation of a temperature-sensitive bovine viral diarrhea vaccine strain. *Am. J. Vet. Res.* 45:2498-2503.
- LOBMANN, M., P. CHARLIER, C.L. KLAASSEN & N. ZYGRAICH. 1986. Safety of a temperature-sensitive vaccine strain of bovine viral diarrhea virus in pregnant cows. *Am. J. Vet. Res.* 47:557-560.
- LOHR, C.H., J.F. EVERMANN & A.C. WARD. 1983. Investigation of dams and their offspring inoculated with a vaccine contaminated by bovine viral diarrhea virus. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 78:1263-1266
- MAGAR, R. & J. LECOMTE. 1987. Comparison of methods for concentration and purification of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods* 16:271-279.
- MAGAR, R., H.C. MINOCHA & J. LECOMTE. 1988a. Bovine viral diarrhea virus proteins: heterogeneity of cytopathogenic and non-cytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Vet. Microbiol.* 16:303-314.
- MAGAR, R., H.C. MINOCHA, C. MONTPETIT, P.S. CARMAN & J. LECOMTE. 1988b. Typing of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus reference and Canadian field strains using a neutralizing monoclonal antibody. *Can. J. Vet. Res.* 52:42-45.
- MALMQUIST, W.A. 1968. Bovine viral diarrhea-mucosal disease: etiology, pathogenesis and applied immunology. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 152:763-768.
- MATTHAEUS, W. 1979. Detection of three polypeptides in preparations of bovine viral diarrhoea virus. *Arch. Virol.* 59:299-305.
- MCCLURKIN, A.W., M.F. CORIA & R.C. CUTLIP. 1979. Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174:1116-1119,
- McCLURKIN, A.W., E.T. LITTLEDIKE, R.C. CUTLIP, G.H. FRANK, M.F. CORIA & S.R. BOLIN. 1984. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can. J. Comp. Med.* 48:156-161.
- MCCLURKIN, A.W., S.R. BOLIN & M.F. CORIA. 1985. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186:568-569.
-

- MCGOWAN, M.R., P.D. KIRKLAND, S.G. RICHARDS & I.R. LITTLEJOHNS. 1993. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Vet. Rec.* 133:39-43.
- MEYERS, G., T. RÜMENAPF & H.-J THIEL. 1989a. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171:555-567.
- MEYERS, G., T. RÜMENAPF & H.J. THIEL. 1989b. Ubiquitin in a togavirus. *Nature* 341:491.
- MEYERS, G., N. TAUTZ, E.J. DUBOVI & H.J. THIEL. 1991. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* 180:602-616.
- MEYERS, G., N. TAUTZ, R. STARK, J. BROWNLIE, E.J. DUBOVI, M.S. COLLETT & H.J. THIEL. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191:368-386
- MEYLING, A. & A.M. JENSEN. 1988. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet. Microbiol.* 17:97-105.
- MEYLING, A., H. HOUE & A.M. JENSEN. 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech.* 9:75-93.
- MIGNON, B., S. WAXWEILER, E. THIRY, D. BOULANGER, J. DUBUISSON & P.-P. PASTORET. 1992. Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting bovine viral diarrhoea pestivirus antigens in field blood samples of persistently infected cattle. *J. Virol. Methods* 40:85-94.
- MIGNON, B., J. DUBUISSON, E. BARANOWSKI, I. KOROMYSLOV, E. ERNST, D. BOULANGER, S. WAXWEILER & P.-P. PASTORET. 1991. A monoclonal ELISA for bovine diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J. Virol. Methods* 35:177-188.
- MOENNIG, V., R.S. BOLIN, A. MATEO, N.E. KELSO-GOURLEY, I. WILKE & B. LIESS. 1988. Identification of a single receptor for bovine viral diarrhoea virus (BVDV) on the surface of cultured bovine cells. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology Miami Beach, Florida, 8-13 May p. 326.
- MOENNIG, V. 1990. Pestiviruses: a review. *Vet Microbiol.* 23:35-54.

- MOENNIG, V., H.R. FREY, E. LIEBLER, J. POHLENZ & B. LIESS. 1990. Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro. *Vet. Rec.* 127:200-203.
- MOENNIG, V. & P.G.W. PLAGEMANN. 1992. The pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 41:53-98.
- MOIR, S. 1991. Identification of biotype differences in the coding sequence around the putative p54/p80 cleavage site of the bovine viral diarrhoea virus. *Mémoire de maîtrise, Institut Armand-Frappier.*
- MOORMANN, R.J.M., P.A.M. WARMERDAM, B. VAN DER MEER, W.M.M. SCHAAPER, G. WENSVOORT & M.M. HULST. 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* 177:184-198.
- MUSCOPLAT, C.C., D.W. JOHNSON & E. TEUSCHER. 1973. Surface immunoglobulin of circulating lymphocytes in chronic bovine diarrhoea: abnormalities in cell populations and cell function. *Am. J. Vet. Res.* 34:1101-1105.
- NOORDHOEK, G.T., A.H.J. KOLK, G. BJUNE, D. CATTY, J.W. DALE, P.E. FINE, P. GODFREY-FAUSSETT, S.-N. CHO, T. SHINNICK, S.B. SVENSON, S. WILSON & J.D.A. VAN EMBDEN. 1994. Sensivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 32:277-284.
- NUTTALL, P.A., P.D. LUTHER & E.J. STOTT. 1977. Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures. *Nature* 266:835-837.
- OLAFSON, P., A.D. MacCALLUM & F.H. FOX. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36:205-213.
- OLAFSON, P. & C.G. RICKARD. 1947. Further observations on the virus diarrhoea (new transmissible disease) of cattle. *Cornell Vet.* 37:104-106.
- PARSONSON, I.M., M.L. O'HALLORAN, Y.C. ZEE & W.A. SNOWDON. 1979. The effect of bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD) virus on the ovine foetus. *Vet. Microbiol.* 4:279-292.
- PATON, D.J., R. GOODEY, S. BROCKMAN & L. WOOD. 1989. Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Vet. Rec.* 124:63-64.
-

- PATON, D.J., J.P. LOWINGS & D.T. BARRETT. 1992. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 190:763-772
- PATON, D.J., J.J. SANDS & S. EDWARDS. 1994. Border disease virus: delineation by monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 135:241-252.
- PEDROZA MARTINS, L., N. CHENCINER & S. WAIN-HOBSON. 1992. Complex intrapatient sequence variation in the V1 and V2 hypervariable regions of the HIV-1 gp120 envelope sequence. *Virology* 191:837-845.
- PELLETIER, J. & N. SONENBERG. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-325.
- PETER, C.P., D.E. TYLER & F.K. RAMSEY. 1967. Characteristics of a condition following vaccination with bovine virus diarrhoea vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 150:46-52.
- PETRIC, M., R.H. YOLKEN, E.J. DUBOVI, M. WISKERCHEN & M.S. COLLETT. 1992. Baculovirus expression of pestivirus non-structural proteins. *J. Gen. Virol.* 73:1867-1871.
- POCOCK, D.H., C.J. HOWARD, M.C. CLARKE & J. BROWNLIE. 1987. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus. *Arch. Virol.* 94:43-53.
- POTGIETER, L.N.D., M.D. McCracken, F.M. HOPKINS, R.D. WALKER & J.S. GUY. 1984. Experimental production of bovine respiratory disease with bovine diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 45:1582-1585.
- POTTS, B.J., J.L. SEVER, N.R. TZAN, D. HUDDLESTON & G.A. ELDER. 1987. Possible role of pestiviruses in microcephaly. *Lancet* 1:972-973.
- POTTS, B.J., M. SAWYER, I.C. SHEKARCHI, T. WISMER & D. HUDDLESTON. 1989. Peroxidase-labeled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cell cultures. *J. Virol. Methods* 26:119-124.
- PRITCHARD, W.R. 1963. The bovine virus diarrhoea-mucosal disease complex. *Adv. Vet. Sci.* 8:1-47.
- PRITCHETT, R., J.S. MANNING & Y.C. ZEE. 1975. Characterization of bovine viral diarrhoea virus RNA. *J. Virol.* 15:1342-1347.
-

- PRITCHETT, R.F. & Y.C. ZEE. 1975. Structural proteins of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 36:1731-1734.
- PURCHIO, A.F., R. LARSON & M.S. COLLETT. 1983. Characterization of virus-specific RNA synthesized in bovine cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 48:320-324.
- PURCHIO, A.F., R. LARSON & M.S. COLLETT. 1984. Characterization of bovine viral diarrhoea viral proteins. *J. Virol.* 50:666-669.
- QI, F., J.F. RIDPATH, T. LEWIS, S.R. BOLIN & E.S. BERRY. 1992. Analysis of the bovine viral diarrhoea virus genome for possible cellular insertions. *Virology* 189:285-292.
- QI, F., T. GUSTAD, T.L. LEWIS & E.S. BERRY. 1993. The nucleotide sequence of the 5'-untranslated region of bovine viral diarrhoea virus: its use as a probe in rapid detection of bovine viral diarrhoea viruses and border disease viruses. *Mol. Cel. Probes.* 7: 349-356.
- QVIST, P., H. HOUE, B. AASTED & A. MEYLING. 1991. Comparison of flow cytometry and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Clin. Microbiol.* 29:660-661
- QVIST, P., B. AASTED, B. BLOCH, A. MEYLING, L. RONSHOLT & H. HOUE. 1990. Flow cytometric detection of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood leukocytes of persistently infected cattle. *Can. J. Vet. Res.* 54:469-472.
- RADOSTITS, O.M. & I.R. LITTLEJOHNS. 1988. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of disease caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Can. Vet. J.* 29:513-528
- RAMSEY, F.K. & W.H. CHIVERS. 1953. Mucosal disease of cattle. *N. Amer. Vet.* 34:629-633.
- REBHUN, W.C., FRENCH, T.W., PERDRIZET, J.A., DUBOVI, E.J., DILL, S.G. & KARCHER, L.F. 1989. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 3:42-46.
- REGGIARDO, C. & M.L. KAEBERLE. 1981. Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 42:218-221.
- RENARD, A., C. GUIOT, D. SCHMETZ, L. DAGENAIS, P.-P. PASTORET, D. DINA & J.A. MARTIAL. 1985. Molecular cloning of bovine viral diarrhoea viral sequences. *DNA* 4:429-438.
-

- RENARD, A., D. DINA & J.A. MARTIAL. 1987. Vaccines and diagnostics derived from bovine viral diarrhoea virus. European Patent Application 86870095.6. Publication 0208672.
- REVELL, S.G., D. CHASEY, T.W. DREW & S. EDWARDS. 1988. Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 123:122-125.
- RIDPATH, J.F. & S.R. BOLIN. 1990. Viral protein production in homogeneous and mixed infections of cytopathic and noncytopathic BVD virus. *Arch. Virol.* 111:247-256.
- RIDPATH, J.F., S.R. BOLIN & J. KATZ. 1993. Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from 5' noncoding region for detection of bovine viral diarrhoea virus. *J. Clin. Microbiol.* 31:986-989.
- RIDPATH, J.F. & S.R. BOLIN. 1993a. Comparison of viruses isolated from hemorrhagic syndrome outbreaks to BVDV vaccine viruses. Abstracts of the IXth International Congress of Virology Glasgow, Scotland. p. 148.
- RIDPATH, J.F. & S.R. BOLIN. 1993b. A potential new genotype of bovine viral diarrhoea virus. *Proc. 74th Annu. Meeting Conf. Res. Workers Anim. Dis.* p34
- ROEDER, P.L. & T.W. DREW. 1984. Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. *Vet. Rec.* 114:309-313.
- ROEDER, P.L. & J.W. HARKNESS. 1986. BVD virus infection: prospects for control. *Vet. Rec.* 119:143-147.
- ROSSI, C.R. C.R. BRIDGMAN & G.K. KIESEL. 1980. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. *Am. J. Vet. Res.* 41:1680-1681.
- ROTH, J.A. & M.L. KAEBERLE. 1983. Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhoea virus with and without the administration of ACTH. *Am. J. Vet. Res.* 44:2366-2372.
- ROTH, J.A., S.R. BOLIN & D.E. FRANK. 1986. Lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 47:1139-1141.
- ROZEN, F., I. EDERY, K. MEEROVITCH, T.E. DEVER, W.C. MERRICK & N. SONENBERG. 1990. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* 10:1134-1144.
-

- RÜMENAPF, T., G. UNGER, J.H. STRAUSS & H.-J. THIEL. 1993. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* 67:3288-3294.
- SALA, M., G. ZAMBRUNO, J.-P. VARTANIAN, A. MARCONI, U. BERTAZZONI & S. WAIN-HOBSON. 1994. Spatial Discontinuities in human immunodeficiency virus type 1 quasispecies derived from epidermal Langerhans cells of a patient with AIDS and evidence for double infection. *J. Virol.* 68:5280-5283.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER, F., S. NICKLEN & A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- SHANNON, A.D., S.G. RICHARDS, P.D. KIRKLAND & A. MOYLE. 1991. An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J. Virol. Methods* 34:1-12.
- SILIM A. & M.A.S.Y. ELAZHARY. 1983. Detection of infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhoea viruses in the nasal epithelial cells by the direct immunofluorescence technique. *Can. J. Comp. Med.* 47:18-22.
- SILVA-KROTT, I.U., M.A. KENNEDY & L.N.D. POTGIETER. 1994. Cloning, sequencing, and in vitro expression of glycoprotein gp48 of a noncytopathogenic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 39:1-14.
- SMITH, G.H., J.K. COLLINS, J. CARMAN, H.C. MINOCHA. 1988. Detection of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in cell culture with an immunoperoxidase test. *J. Virol. Methods* 19:319-324.
- SONENBERG, N. 1990. Poliovirus translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 161:23-47.
- SOPP, P., L.B. HOPPER, M.C. CLARKE, C.J. HOWARD & J. BROWNLIE. 1994. Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. *J. Gen. Virol.* 75:1189-1194.
- STARK, R., G. MEYERS, T. RÜMENAPF & H.J. THIEL. 1993. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* 67:7088-7095.
-

- TAMURA, J.K., P. WARRENER & M.S. COLLETT. 1993. RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 193:1-10.
- TARRY, D.W., L. BERNAL & S. EDWARDS. 1991. Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *Vet. Rec.* 128:82-84.
- TAUTZ, N., G. MEYERS & H.J. THIEL. 1993. Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology* 197:74-85.
- TAUTZ, N., H.J. THIEL, E.J. DUBOVI & G. MEYERS. 1994. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J. Virol.* 68:3289-3297.
- TEYSSEDOU, E., R. MAGAR, D.M. JUSTEWICZ & J. LECOMTE. 1987. Cell-protective monoclonal antibodies to bovine enterovirus-3 and partial or no activity against other serotypes. *J. Virol.* 61:2050-2053.
- THIEL, H.-J., R. STARK, E. WEILAND, T. RÜMENAPF & G. MEYERS. 1991. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* 65:4705-4712.
- THOMSON, R.G. & M. SAVAN. 1963. Studies on virus diarrhoea and mucosal disease of cattle. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 27:207-214.
- TSUKIYAMA-KOHARA, K., N. IIZUKA, M. KOHARA & A. NOMOTO. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 66:1476-1483.
- UNDERDAHL, N.R., O.D. GRACE & A.B. HOERLEIN. 1957. Cultivation in tissue-culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 94:795-797.
- VANDERHEIJDEN, N., L. DEMOERLOOZE, D. VANDENBERGH, G. CHAPPUIS, A. RENARD & C. LECOMTE. 1993. Expression of the bovine viral diarrhoea virus Osloss p80: its use as ELISA antigen for cattle serum antibody detection. *J. Gen. Virol.* 74:1427-1431.
- VAN OPENBOSCH E., G. WELLEMANS & J. OUDEWATER. 1981. Interaction of BVDV, corona and rotavirus in neonatal calf diarrhoea: experimental infections in newborn calves. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 50:163-173.
- VICKERS, M.L. & H.C. MINOCHA. 1990. Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infection using monoclonal antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2:300-302.

- WARD, V. & M.L. KAEBERLE. 1984. Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopies. *Am. J. Vet. Res.* 45:165-170.
- WEILAND, E., R. STARK, B. HAAS, T. RÜMENAPF, G. MEYERS & H.-J. THIEL. 1990. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.* 64:3563-3569.
- WESTAWAY, E.G., M.A. BRINTON, S.Y. GAIDAMOVICH, M.C. HORZINEK, A. IGARASHI, L. KÄÄRIÄINEN, D.K. LVOV, J.S. POTERFIELD, P.K. RUSSELL & D.W. TRENT. 1985. Flaviviridae. *Intervirology* 24:183-192.
- WILKS, C.R., G. ABRAHAM & D.K. BLACKMORE. 1989. Bovine pestivirus and human infection. *Lancet* 1:107.
- WISKERCHEN, M. & M.S. COLLETT. 1991. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* 184:341-350.
- WISKERCHEN, M., S.K. BELZER & M.S. COLLETT. 1991. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* 65:4508-4514.
- WRAY C. & P.L. ROEDER. 1987. Effect of bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection on salmonella infection in calves. *Res. Vet. Sci.* 42:213-218.
- XUE, W., F. BLECHA & H.C. MINOCHA. 1990. Antigenic variations in bovine viral diarrhoea viruses detected by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 28:1688-1693.
- XUE, W. & H.C. MINOCHA. 1993. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* 74:73-79.
- YOLKEN, R., E. DUBOVI, F. LEISTER, R. REID, J. ALMEIDO-HILL & M. SANTOSHAM. 1989. Infantile gastroenteritis associated with excretion of pestivirus antigens. *Lancet* 1:517-520.
- YOLKEN, R.H., M. PETRIC, M. COLLETT & E. FULLER TORREY. 1993. Pestivirus infection in identical twins discordant for schizophrenia. Abstracts of the IXth International Congress of Virology Glasgow, Scotland. p. 148.
- ZUKER, M. & P. STIEGLER. 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* 9:133-148.
-

ANNEXE A

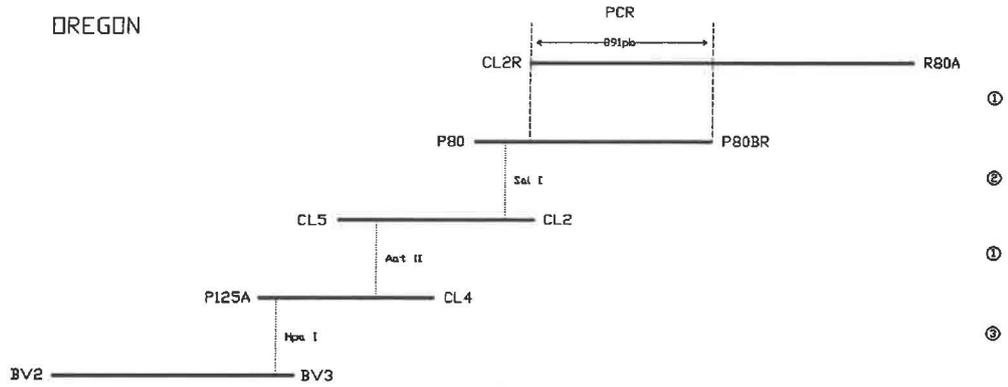
Dans un but éventuel d'expression, la p125 des souches Singer, Oregon et NY-1 fut reconstruite à partir de divers fragments de PCR. La stratégie employée est illustrée à la figure 23. Mentionnons que, pour unir certaine région l'une à l'autre, il a été nécessaire d'effectuer des PCR recombinants (figure 24). Afin de s'assurer de l'absence de mutations changeant le cadre de lecture ou modifiant un acide aminé, seule la région de superposition entre deux fragments unis au moyen du PCR recombinant fut reséquencée.

La technique du PCR recombinant a permis d'unir deux fragments d'ADN se chevauchant l'un l'autre. Dans un premier temps chacun des deux fragments était amplifié séparément puis purifié au moyen de la trousse de purification sur colonne Magic™ PCRpreps (voir matériel et méthodes, section 5.2.1). Puisque la Taq polymérase a la propriété d'ajouter un "A" de trop en 3' du produit amplifié, il a été nécessaire d'éliminer cette extension afin de ne pas inclure de mutations dans le produit recombiné. Pour ce faire, le produit de PCR purifié était traité avec le fragment Klenow de la polymérase I (Gibco BRL) dans un volume de 20 μ l de tampon 1X (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) contenant 3 U de Klenow et 0.2 mM de dNTPs. Le tout était incubé à 37°C pendant 30 min et l'enzyme était inactivé à 75°C pendant 15 min. De ce produit final, 1 μ l de chacun des deux fragments à unir était prélevé et inclus dans une réaction de PCR selon la technique décrite à la section 4.2.2 (matériel et méthodes) en employant les deux amorces extrêmes. Alternativement, la digestion enzymatique d'un fragment, à l'intérieur de la région qui superpose le deuxième fragment, a été employé. Ceci à pour effet d'éliminer le "A" en extension 3', mais seulement du côté important, i.e. le côté où il y a chevauchement entre les deux fragments.

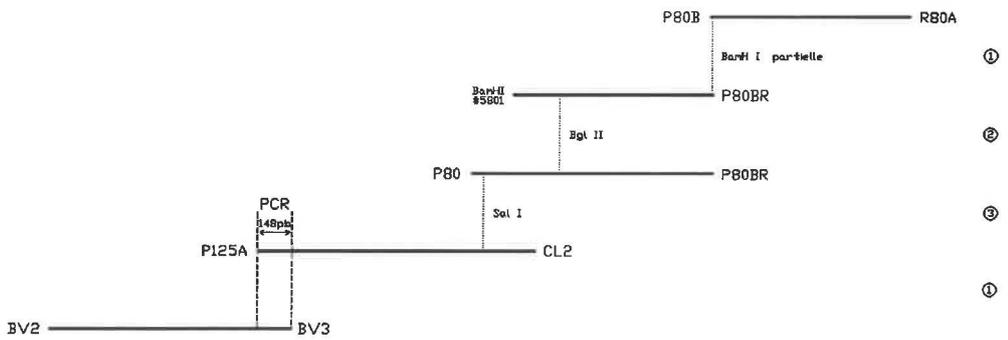
Figure 23

Stratégie employée pour reconstruire la région codant pour la p125 des souches Oregon, Singer et NY-1 à partir des divers fragments de PCR. Les chiffres de droite indiquent l'ordre des manipulations; deux chiffres identiques signifiant que les deux manipulations furent effectuées simultanément. Dans le cas où les fragments ont dû être reliés par PCR, la longueur de la région de superposition entre les deux fragments est mentionnée.

OREGON



SINGER



NY-1

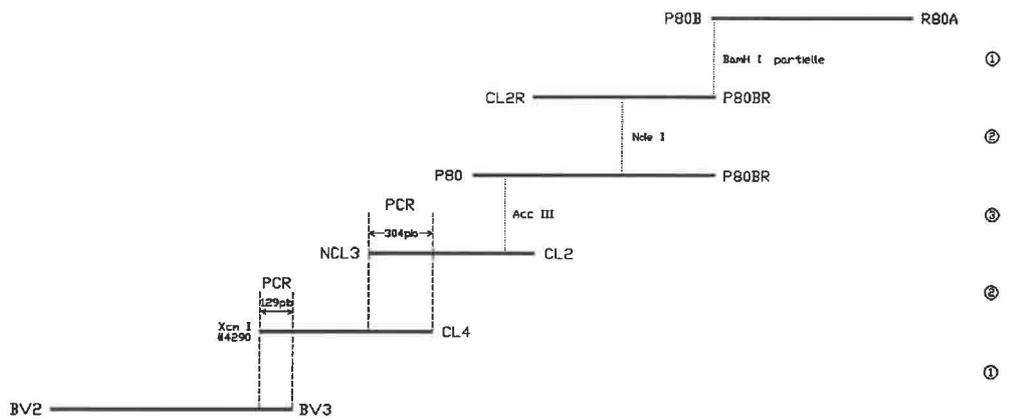
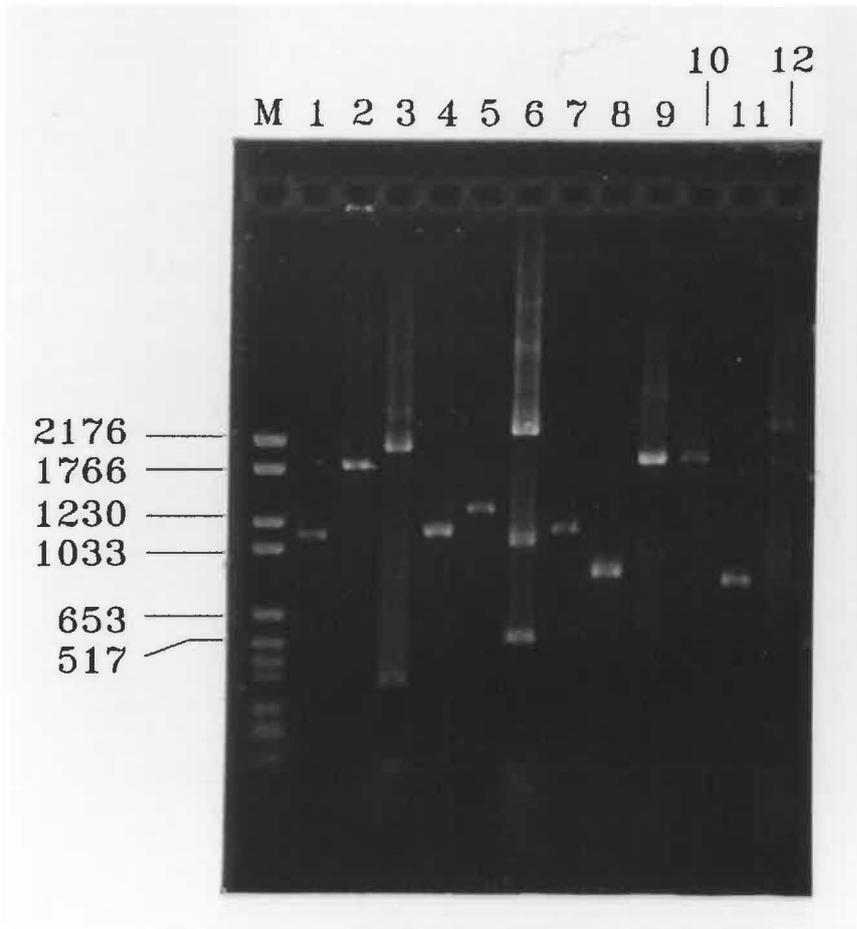


Figure 24

PCR recombinants effectués pour la reconstruction de la p125. Puits 1 à 3: PCR recombinant Oregon P80/R80A (puits 3) à partir des fragments P80/P80BR (puits 1) et CL2R/R80A (puits 2). Puits 4 à 6: PCR recombinant Singer BV2/CL2 (puits 6) à partir des fragments BV2/BV3 (puits 4) et P125A/CL2 (puits 5). Puits 7 à 9: PCR recombinant NY BV2/CL4 (puits 9) à partir des fragments BV2/BV3 (puits 7) et P125A/CL4 digéré avec *Xcm* I (puits 8). Puits 10 à 12: PCR recombinant NY BV2/CL2 (puits 12) à partir des fragments BV2/CL4 (puits 10) et NCL3/CL2 (puits 11). Puits M: marqueur de poids moléculaire VI de Boehringer Mannheim dont la valeur de certaine bande, en pb, est donnée. Notons que les divers fragments ayant servi aux PCR recombinants sont illustrés ici après traitement à la Klenow sauf pour le fragment NY-1 P125A/CL4 (puits 8) qui est représenté après digestion *Xcm* I. Gel d'agarose 1.2% dans du TBE 1X.



ANNEXE B