

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE**

**PRÉSENTÉ**

**À**

**L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE**

**DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE**

**PAR**

**FERNANDO ECHEVERRY-ALZATE**

**PURIFICATION DE LA GLYCOPROTÉINE DE L'ENVELOPPE DU  
VIRUS DE LA DIARRHÉE À VIRUS BOVINE-MALADIE DES  
MUQUEUSES PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ**

**FÉVRIER 1992**

Une partie des résultats de la présente recherche a été présentée sous forme:

### **COMMUNICATION**

Echeverry, F. et J. Lecomte. Purification de la gp53 du virus BVD par chromatographie d'affinité. EUROPEAN group for rapid viral diagnosis-society against virus disease. THIRD JOINT MEETING. Strasbourg, France, 25-29 août, 1991.

**TABLE DES MATIÈRES**

TABLE DES MATIÈRES .....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
SOMMAIRE .....	XII
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. DÉCOUVERTE DE LA MALADIE.....	5
2. L'AGENT.....	6
2.1 Taxonomie .....	6
2.2 Morphologie.....	7
2.3 Morphogenèse.....	8
2.4 Cytopathogénicité.....	8
2.5 Génome viral .....	9
2.6 Protéines virales .....	12
2.7 Organisation génomique.....	14
3. LA MALADIE .....	19
3.1 Pathogénèse .....	19

3.1.1	Diarrhée à virus bovine.....	19
3.1.2	Maladie des Muqueuses .....	20
3.2	Épidémiologie .....	22
3.3	Modes de transmission.....	23
3.4	Diagnostic .....	24
4.	IMPORTANCE ÉCONOMIQUE.....	27
5.	PRÉVENTION ET CONTRÔLE.....	28
5.1	Contrôle des infections persistantes.....	28
5.2	Vaccination .....	29
6.	CONCLUSION .....	31
	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	33
1.	CELLULES .....	34
1.1	Origine des cellules.....	34
1.2	Cultures cellulaires.....	34
2.	LE VIRUS .....	34
2.1	Concentration des virus.....	35
2.2	Mesure du titre viral.....	35
3.	ANTICORPS MONOCLONAL ET ANTISÉRUMS.....	36
3.1	Anticorps monoclonal D-89 .....	36
3.1.1	Caractérisation de l'anticorps monoclonal D-89.....	36
3.1.1.1	Immuno-Diffusion Double (IDD).....	36
3.1.1.2	Immuno-Diffusion Radiale (IDR) .....	37

3.1.2 Purification de l'anticorps monoclonal D-89.....	37
3.1.3 Couplage de l'AcM au Sépharose activé au CNBr.....	38
3.2 Antisérums .....	39
3.3 Test d'immunofluorescence.....	39
3.3.1 Montage de lames avec des cellules non-infectées .....	39
3.3.2 Montage de lames avec des cellules infectées.....	40
3.4 Test de neutralisation.....	41
3.5 Test ELISA .....	41
3.5.1 ELISA indirect.....	41
3.5.2 ELISA direct .....	42
4. IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES.....	43
4.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	43
4.2 Immuno-empreinte (western blot).....	44
4.3 Marquage radioactif des protéines virales.....	45
4.4 Immunoprécipitation.....	45
5. PURIFICATION DE LA GP53.....	47
5.1 Détermination de la spécificité de l'immunoabsorbant.....	47
5.2 Chromatographie d'affinité .....	47
6. IMMUNISATION DES SOURIS.....	48
RESULTATS.....	49
1. MULTIPLICATION VIRALE.....	50
2. PURIFICATION DE L'ANTICORPS MONOCLONAL D-89.....	51

3. IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES.....	58
3.1 Marquage radioactif des protéines.....	58
3.2 Titrage de l'anticorps monoclonal par ELISA.....	58
3.2.1 ELISA direct .....	58
3.2.2 ELISA indirect.....	59
4. PURIFICATION DE LA GP53.....	66
4.1 Détermination de la spécificité de l'immunoabsorbant .....	66
4.2 Chromatographie d'affinité .....	66
5. IMMUNISATION DES SOURIS.....	76
DISCUSSION.....	86
CONCLUSION.....	94
REMERCIEMENTS.....	97
BIBLIOGRAPHIE.....	98

**LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau I.** Poids moléculaires x 10<sup>3</sup> des protéines du virus  
BVD selon la littérature. .... 13

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Organisation génomique du virus BVD selon Collett <i>et al.</i> , 1988c.....	16
<b>Figure 2.</b>	Modèle d'organisation génomique et nouvelle nomenclature du virus BVD proposé par Akkina (1991).....	18
<b>Figure 3.</b>	Purification de l'anticorps monoclonal D-89 par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A-Sépharose à partir de liquide d'ascite.....	52
<b>Figure 4.</b>	Analyse du liquide d'ascite et des pics obtenus après chromatographie d'affinité par immunodiffusion double.....	54
<b>Figure 5.</b>	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS des fractions récoltées suite à la chromatographie d'affinité du liquide d'ascite.....	56
<b>Figure 6.</b>	Immunoprécipitation des polypeptides de la souche NADL du virus BVD.....	60
<b>Figure 7.</b>	Titration par ELISA direct de l'anticorps monoclonal D-89 anti-gp53.....	62
<b>Figure 8.</b>	Titration par ELISA indirect de l'anticorps monoclonal D-89 anti-gp53.....	64
<b>Figure 9.</b>	Détermination de la spécificité de l'immuno-adsorbant envers l'antigène viral.....	68
<b>Figure 10.</b>	Analyse par ELISA indirect des fractions obtenues par chromatographie d'affinité de la souche NADL du virus BVD.....	70

<b>Figure 11.</b>	Analyse par SDS-PAGE des fractions obtenues par chromatographie d'affinité de la souche NADL du virus BVD. ....	72
<b>Figure 12.</b>	Détermination par ELISA direct de la présence de la protéine gp53 dans un pool correspondant aux fractions 62 à 68 obtenues par chromatographie d'affinité.....	74
<b>Figure 13.</b>	Détermination par ELISA de la présence d'anticorps anti-gp53 dans les sérums de souris obtenus 13 jours après la deuxième inoculation intrapéritonéal avec la protéine gp53 purifiée par chromatographie d'affinité.....	77
<b>Figure 14.</b>	Immuno-empreinte de la protéine gp53 du virus BVD à l'aide du sérum produit chez la souris.....	79
<b>Figure 15.</b>	Immunoprécipitation de la protéine gp53 du virus BVD avec le sérum des souris inoculées avec la gp53 purifiée par chromatographie d'affinité.....	81
<b>Figure 16.</b>	Immunofluorescence des cellules MDBK non-infectées ou infectées avec les virus BVD-NADL.....	84

**LISTE DES ABREVIATIONS**

BVD	Diarrhée à virus bovine (Bovine Virus Diarrhea)
BVDV	Virus de la diarrhée à virus bovine
BVD-MD	Complexe de la diarrhée à virus bovine-maladie des muqueuses
CP	Cytopathogène
NCP	Non-cytopathogène
ECP	Effet cytopathique
MOI	Multiplicité d'infection
PBS	Tampon salin phosphaté
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
p.i.	Post-infection
DICT50	Dose infectant 50% des cultures <i>in vitro</i>
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium
SFB	Sérum foetal bovin
BSA	Albumine de sérum bovin

## SOMMAIRE

Le virus responsable de la diarrhée à virus-maladie des muqueuses (BVD-MD) est un pathogène important chez les bovins. Sa répartition est mondiale et il est associé à des pertes économiques importantes. Les signes cliniques de la maladie qu'il induit sont complexes, variables et très reliés à l'âge de l'animal au moment de l'infection.

Plusieurs études ont été réalisées dans le but d'identifier les polypeptides viraux bien qu'une détermination précise n'ait pas encore été faite. L'établissement d'une relation structurale entre les différentes protéines virales n'a pas été possible non plus, si ce n'est du fait que la p80, présente uniquement dans les souches cytopathogènes, provient du clivage de la p125 et que la gp53 fait partie de l'enveloppe virale. Cette glycoprotéine pourrait d'ailleurs jouer un rôle important dans la réponse immunitaire de l'hôte puisque des anticorps monoclonaux dirigés contre la gp53 et ayant une activité neutralisante *in vitro* ont été obtenus.

Dans le but de poursuivre la caractérisation de la gp53, celle-ci a été purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant l'anticorps monoclonal D-89 spécifique pour cette glycoprotéine. La méthode de purification s'est avérée appropriée bien que seulement de faibles quantités de protéine aient été obtenues. L'inoculation de l'antigène purifié à des souris BALB/c a induit une forte réaction immunologique puisque les sérums murins ont montré des titres élevés lorsque testés par ELISA. Malgré cela, aucune neutralisation de l'infectivité virale n'a été observée *in vitro*. Ceci est possiblement dû à des

changements conformationnels subis par la protéine lors de sa purification. Toutefois les résultats obtenus par immuno-empreinte, immunofluorescence et immunoprécipitation ont démontré que les souris ont bel et bien été inoculées avec l'antigène viral purifié, puisqu'aucune réaction avec les cellules non-infectées n'a été observée. De même, sur les gels de polyacrylamide une seule bande de protéine correspondant à la gp53 est apparue. Ces résultats ouvrent la voie à plusieurs applications directes ou indirectes telles que la localisation de la séquence de la protéine sur le génome et la production de peptides synthétiques pour un éventuel vaccin sous-unitaire.

## **INTRODUCTION**

Le virus BVD, agent causal du complexe de la diarrhée à virus-maladie des muqueuses (BVD-MD) est classé dans le genre *Pestivirus* où on retrouve également deux autres virus, le HCV et le BDV, qui sont antigéniquement apparentés (Horzinek, 1973). À cause des caractéristiques structurales de la particule virale, les *Pestivirus* ont été inclus initialement dans la famille *Togaviridae* (Westaway *et al.*, 1985a). Récemment des études portant sur l'organisation génomique et la réplication virale (Collett *et al.*, 1988a; 1988b) ont permis une reclassification du genre *Pestivirus* à l'intérieur de la famille *Flaviviridae* (Francki *et al.*, 1991).

L'expression de la maladie causée par l'infection avec le virus BVD est très complexe et variable (Ames, 1986). Cependant certaines formes de la maladie sont associées à des pertes économiques plus considérables que les autres (Roeder et Harkness, 1986).

Les difficultés rencontrées dans la multiplication virale *in vitro* ainsi que la fragilité du virus et l'association de matériel cellulaire avec les virions purifiés, n'ont pas permis un avancement rapide des connaissances sur la biologie du BVDV.

Même si l'avènement des techniques modernes de biologie moléculaire ont permis une meilleure compréhension de la réplication virale et de l'organisation génomique du virus, une détermination précise des composants viraux, c'est-à-dire la distinction entre les protéines codées et les protéines induites par le virus ou entre les protéines structurales et non-structurales n'a pas encore été faite. Seule une relation entre les polypeptides p125 et p80 (Purchio

*et al.*, 1984a) ainsi que l'identification de la gp53 comme étant la glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale (Donis et Dubovi, 1987c) ont été rapportées. Le rôle important de cette glycoprotéine dans la réponse immunitaire de l'hôte pendant l'infection virale a été suggéré à maintes reprises puisque plusieurs anticorps monoclonaux produits contre cette protéine ont un effet neutralisant *in vitro*.

Dans le but de mieux connaître le rôle immunologique de la gp53 nous avons voulu purifier cette protéine afin de déterminer son antigénicité chez la souris. Pour atteindre ce but trois objectifs ont été fixés: premièrement développer une méthode pour isoler la protéine gp53 en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre cette protéine, deuxièmement produire des anticorps murins contre la protéine purifiée et troisièmement vérifier le pouvoir neutralisant des anticorps produits, *in vitro*.

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. DÉCOUVERTE DE LA MALADIE

Olafson *et al.* ont décrit pour la première fois en 1946 une maladie contagieuse chez le bovin, dont les symptômes cliniques étaient une fièvre accompagnée de diarrhée, de lésions de la muqueuse buccale et d'une morbidité élevée. Par contre le taux de mortalité était faible. Ces auteurs ont également démontré que la maladie avait une étiologie virale, étant donné l'absence de bactérie dans le sang et dans les émulsions spléniques provenant d'animaux infectés. Ils ont par conséquent nommé cette maladie "diarrhée à virus bovine" (Bovine Viral Diarrhea ou BVD) (Olafson *et al.*, 1946; Olafson et Richard, 1947).

Quelques années plus tard Ramsey et Chivers (1953) identifièrent une maladie semblable mais qui différait toutefois de la précédente par un taux de mortalité très élevé et des signes cliniques plus sévères, alors que la morbidité demeurait faible. Ils ont utilisé le terme de "maladie des muqueuses" (Mucosal disease ou MD) pour décrire cette nouvelle affection.

En 1961, Gillespie *et al.* ont démontré une relation antigénique étroite entre les isolats provenant d'animaux ayant la diarrhée à virus (BVD) et ceux ayant la maladie des muqueuses (MD).

Le terme "Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease Complex" fut utilisé par Pritchard (1963) pour distinguer les deux formes sous lesquelles se présente cette maladie. Au même moment les travaux portant sur la sérologie et les relations antigéniques entre les souches virales responsables des cas de MD et

de BVD, réalisés par Thomson et Savan (1963), ont permis de démontrer qu'il s'agissait en réalité d'une seule et unique maladie. Ces auteurs ont donc proposé que cette maladie soit nommée BVD.

## 2. L'AGENT

Le BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus) est un virus enveloppé, possédant un génome constitué d'ARN monocaténaire de polarité positive. La symétrie de sa nucléocapside n'est pas connue avec certitude, mais on croit qu'elle serait de type icosaédrique (Horzinek *et al.*, 1971).

### 2.1 Taxonomie

Il existe une très grande relation antigénique entre le BVDV et le virus de la peste porcine (HCV), ce qui a permis de classer ces deux agents pathogènes dans le même genre taxonomique, soit celui des *Pestivirus* (Horzinek, 1973). Un troisième agent infectieux, le virus de la maladie de Border (BDV) a été ajouté à ce groupe, toujours sur la base de ses relations antigéniques avec le BVDV (Gardiner et Barlow, 1972; Hamilton et Timoney, 1972).

À cause de la nature de leur acide nucléique et de leur morphologie, les virus appartenant au genre *Pestivirus* ont été classés parmi les "non Arthropod-Borne" de la famille *Togaviridae* (Horzinek, 1981; Westaway *et al.*, 1985a). On retrouvait également dans cette famille trois autres genres : *Alfavirus*, *Rubivirus* et *Flavivirus*. Toutefois, les particularités au niveau de la structure et de l'organisation du génome, ainsi que dans le mode d'expression des *Flavivirus*, ont obligé une reclassification de ce genre. C'est ainsi qu'une nouvelle famille, celle des *Flaviviridae*, fut créée en 1984, (Westaway *et al.*, 1985b; Brown, 1986;

Schlesinger et Schlesinger, 1986). Dernièrement une étude plus approfondie de l'organisation génomique et de la séquence nucléotidique du BVDV (Collett *et al.*, 1988a; 1988b) a permis de faire un rapprochement de ce dernier avec les membres de la nouvelle famille *Flaviviridae*. Ces nouvelles données ont justifié une autre reclassification dans laquelle les *Pestivirus* forment un nouveau genre "non Arthropod-Borne" à l'intérieur de la famille *Flaviviridae* (Collett *et al.*, 1988c; Francki *et al.*, 1991).

## 2.2 Morphologie

Les études en microscopie électronique du virus de la diarrhée à virus bovine (BVDV) ont démontré la présence de particules grossièrement sphériques ou pléomorphiques, dont le diamètre varie entre 35 et 100 nm (Hafez *et al.*, 1968; Horzinek, 1973; Bielefeldt Ohmann et Bloch, 1982; Chu et Zee, 1984; Magar et Lecomte, 1987).

La présence d'une enveloppe de 5 à 7 nm d'épaisseur, entourant un nucléoïde central, de même que des projections de surface mesurant 5 à 12 nm, a été rapportée (Maess et Retzko, 1970; Horzinek *et al.*, 1971; Stott *et al.*, 1974; Chu et Zee, 1984; Magar et Lecomte, 1987). Récemment Bielefeldt Ohmann (1990) a démontré la présence de particules sphériques, ayant un diamètre de 40 à 60 nm associées aux membranes cellulaires dans des préparations virales purifiées, de même que dans des cultures de cellules infectées et des tissus provenant d'animaux infectés. Ces observations ont également démontré la présence d'une membrane virale lisse et bilamellaire entourant un nucléoïde dense ou semi-dense de 20 à 25 nm de diamètre. Ce nucléoïde est isométrique ou hexagonal. Une très grande ressemblance morphologique avec les *Flavivirus*

a aussi été notée. Aucune description détaillée de la morphologie et de la structure des virions n'a toutefois été rapportée à ce jour. Ceci est dû à la fragilité du virus, aux faibles titres obtenus *in vitro* ainsi qu'à l'association des protéines de membranes cellulaires avec les virions, qui rendent sa purification très difficile.

### **2.3 Morphogenèse**

Au début du cycle de réplication, les protéines virales produites se retrouvent libres dans le cytoplasme ou en relation avec des structures membranaires cellulaires. Suite à cela, on observe une accumulation de matériel fibrillaire qui est graduellement internalisé lors de la formation de vésicules. L'assemblage final des virions semble se réaliser dans ces vésicules par interaction entre la nucléocapside et la membrane vésiculaire. Les virus sont finalement libérés lors de la désintégration des vésicules consécutive à la mort cellulaire et/ou pendant un processus d'exocytose, suite à la fusion des vacuoles contenant les virus à la membrane cytoplasmique (Bielefeldt Ohmann et Bloch, 1982). La morphogenèse du BVDV ressemble à celle des *Flavivirus* (Bielefeldt Ohmann, 1990). Aucun bourgeonnement de particules virales n'a été observé jusqu'à maintenant (Ritchie et Fernelius, 1969; Chasey et Roeder, 1981; Bielefeldt Ohmann et Bloch, 1982; Ward et Kaeberle, 1984).

### **2.4 Cytopathogénicité**

Chez les *Pestivirus*, la possibilité d'induire ou non un effet cytopathique en culture cellulaire est une caractéristique qui dépend de facteurs génétiques et du type de cellules infectées (Horzineck, 1981). Dans le cas du BVDV, de nombreuses souches cytopathogènes (CP) ont été isolées chez des animaux

atteints de MD ou de BVD. Cependant un autre type de virus, non cytopathogène (NCP), a également été isolé (Lee et Gillespie, 1957; Gillespie *et al.*, 1960).

Récemment beaucoup d'importance a été accordée à la présence des biotypes CP et NCP dans la pathogénèse de la maladie. Le fait que ces souches, isolées de cas de MD, ne puissent être distinguées par des méthodes sérologiques, suggère que les altérations génomiques entre les deux soient très faibles. Toutefois une comparaison des profils électrophorétiques des polypeptides des deux biotypes viraux révèle la présence, dans les souches CP, des protéines p80 et p125 alors que dans les souches NCP, seule la p125 est visible (Donis et Dubovi, 1987a; Pocock *et al.*, 1987; Magar *et al.*, 1988). Il a été démontré que ces protéines sont structurellement apparentées (Purchio *et al.*, 1984a).

Cette différence entre les souches CP et NCP a soulevé beaucoup de questions concernant le rôle de la p125 et de ses produits de clivage, la p80 et la p54. Howard *et al.* (1987) ont suggéré que les souches CP soient apparues suite à une mutation de la souche NCP chez des animaux ayant une infection persistante.

## 2.5 Génome viral

Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la réplication de l'ADN, on a pu déterminer que le matériel génétique du virus BVDV est constitué d'ARN (Hermodsson et Dinter, 1962). Le pouvoir infectieux de ce dernier a été démontré par Diderholm et Dinter (1966), suggérant ainsi que l'acide nucléique soit monocaténaire et de polarité positive. Ceci fut corroboré plus tard par Hafez et

Liess (1972), suite à une coloration des cellules infectées avec l'acridine orange.

Certaines caractéristiques physiques du génome viral restent encore peu connues. Des coefficients de sédimentation variant entre 24S et 40S ont été rapportés (Pritchett *et al.*, 1975; Horzinek, 1981; Moennig, 1990). Récemment, Collett *et al.* (1988) ont estimé avec une plus grande exactitude la taille du génome du virus BVDV à 12,5 kb.

Les caractéristiques de sédimentation particulières de l'ARN du virus BVDV, sa capacité d'attachement à la cellulose en présence d'éthanol 15% (Purchio *et al.*, 1984a), sa résistance à de faibles doses de RNase A (Purchio *et al.*, 1983) et sa solubilité dans le LiCl 2 M (Collett *et al.*, 1988b) suggèrent la présence de plusieurs structures secondaires dans le génome viral.

Les régions terminales de l'ARN viral ne sont pas encore bien caractérisées. Il semble toutefois que l'extrémité 3' ne soit pas suffisamment polyadénylée pour adhérer à la cellulose oligo (dt) (Purchio *et al.*, 1983; Renard *et al.*, 1985). Pour ce qui est de la région 5' terminale, on n'en connaît presque rien.

Il n'y a pas d'évidence de la présence des formes sous-génomiques répliquatives (RF) ou répliquatives immédiates (RI) de l'ARN viral dans les cellules infectées. Par contre des ARN de taille génomique ont été observés en association avec des ribosomes (Purchio *et al.*, 1984a).

La réplication de l'ARN viral n'est pas inhibée par l'actinomycine D, un inhibiteur de la synthèse de l'ARN cellulaire (Horzinek, 1981; Purchio *et al.*, 1983), ce qui démontre que le virus ne dépend pas des enzymes cellulaires pour

la réplication de son ARN. Toutefois, la présence d'un gène viral codant pour une protéine jouant le rôle d'une ARN polymérase ARN dépendante n'est pas encore certaine.

Une partie du génome de trois souches du virus BVDV a été clonée récemment, soit la souche Osloss (Renard *et al.*, 1985 et 1987), la souche NADL (Collett *et al.*, 1988b) et la souche Singer (Dale *et al.*, 1987). Une région de 12 500 nucléotides approximativement a été clonée et séquencée dans le cas des souches Osloss et NADL. Suite à l'analyse de ces séquences, Renard *et al.* (1987) rapportèrent la présence de deux cadres ouverts de lecture (ORF) pour la souche Osloss. Un an plus tard cependant, Collett *et al.* (1988c) n'en trouvèrent qu'un seul dans tout le génome de la souche NADL. Le séquençage de deux souches du virus HCV (Meyers *et al.*, 1989a; Moormann *et al.*, 1990) effectué dernièrement vient toutefois appuyer l'hypothèse de la présence d'un seul ORF dans le génome des *Pestivirus*.

Un modèle de traduction virale a été proposé par Collett *et al.* (1989). Ces auteurs ont suggéré qu'une seule polyprotéine serait traduite à partir de l'ORF et serait par la suite clivée par des protéases virales et/ou cellulaires. L'ORF, dont le codon de départ (ATG) est localisé à la position 386, pourrait en principe coder pour une protéine de 449 kDa. Ce modèle exclut une régulation différentielle de l'expression des gènes, ce qui pourrait impliquer que la présence de certaines protéines en plus grande abondance que d'autres serait due à une stabilité variable. Cette hypothèse est supportée par l'absence d'ARN sous-génomique pendant l'infection, de même que par l'association de molécules d'ARN, de la taille du génome viral, avec des ribosomes de la cellule hôte.

## 2.6 Protéines virales

On retrouve dans la littérature plusieurs rapports décrivant les protéines du virus BVDV (Pritchett et Zee, 1975; Matthaeus, 1979; Coria *et al.*, 1983; Purchio *et al.*, 1984b; Donis et Dubovi, 1987a; 1987b; 1987c; Pocock *et al.*, 1987; Magar *et al.*, 1988).

Bien que certains polypeptides soient communs à toutes les études réalisées, le nombre total de protéines varie d'une publication à l'autre (voir tableau I). Plusieurs raisons peuvent expliquer ces différences: le faible titre viral obtenu *in vitro*, l'association des virions au matériel cellulaire, les différentes méthodologies et les différents produits utilisés dans chaque étude de même que la difficulté de distinguer entre les protéines virales, les protéines cellulaires induites par le virus et les protéines cellulaires associées aux virions.

Des travaux ont démontré qu'à partir de virus purifiés, quatre protéines pouvaient être révélées après électrophorèse, deux de celles-ci étant des glycoprotéines (75K et 54K) alors que les deux autres sont des polypeptides non-glycosylés de 66K et 26K (Coria *et al.*, 1983). Purchio *et al.* (1984b) ont identifié par radio-immunoprécipitation trois protéines principales (p115, p80 et gp55) et deux polypeptides moins abondants (45K et 38K) dans des préparations de virus semi-purifiés et dans des lysats cellulaires infectés. Des travaux plus récents effectués par Pocock *et al.* (1987), démontrent la présence de huit polypeptides

Auteurs	Prichett <i>et al.</i> (1975)	Matthaeus (1979)	Coria <i>et al.</i> (1983)	Purchio <i>et al.</i> (1984)	Donis et Dubovi (1987)	Pocock <i>et al.</i> (1987)	Magar <i>et al.</i> (1988)	Collett <i>et al.</i> (1989)
Souches	NADL	NADL	SINGER	NADL	SINGER	NADL	NADL	Pestivirus
					165			
					135			
	93-110			115	gp118	120	120	p120
				80	80	87	80	p80
	70		gp75		gp75			
			66		gp65	gp69	gp65	gp62
	50-59	gp57	gp54	gp55	gp57	gp57	gp55-53	gp53
		gp44		45	gp48	gp49	gp47	gp48
		34		38	37	37	38	
					32	33		
	25		26		gp23	gp23	gp26	gp25
								p20

**Tableau I: Poids moléculaires x 10<sup>3</sup> des protéines du virus BVDV selon la littérature**

spécifiques au virus BVDV, quatre des ces derniers étant des glycoprotéines. Finalement Magar *et al.* (1988), en analysant les profils électrophorétiques de lysats cellulaires infectés avec la souche CP NADL après immunoprécipitation, ont démontré la présence de quatre protéines principales (120K, 80K, 55-53K et 47K) et trois mineures (65K, 38K et 26K). L'immunoprécipitation de lysats infectés et marqués à la D-(<sup>14</sup>C(U)) glucosamine a montré que les polypeptides 65K, 55-53K, 47K, et 26K sont glycosylés.

La détermination de la relation structurale entre les différents polypeptides du virus n'a pas encore été faite. Néanmoins Purchio *et al.* (1984a) ont démontré, par cartographie peptidique, l'existence d'une relation structurale entre les polypeptides p125 et p80. Une relation antigénique, entre ces deux derniers, a également été démontrée par Donis et Duvobi (1987c) avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ils ont aussi identifié la protéine gp53 comme étant une glycoprotéine de l'enveloppe. Aucune fonction certaine n'a été attribuée aux autres protéines.

## 2.7 Organisation génomique

L'expression de segments du génome viral dans *E. coli* a permis d'identifier et de localiser sur le génome viral certains produits codés par le virus (Collett *et al.*, 1988c). Ainsi la plupart des protéines décrites pour le BVDV ont pu être localisées sur le génome, à l'exception des polypeptides de 32K et de 38K qui ont été rapportés dans certains travaux. Toutefois il y a deux régions pour lesquelles aucun produit n'a été assigné et qui pourraient en principe coder pour des protéines de 30K et 38K. Ces derniers travaux de Collett *et al.* (1988c) ont permis d'identifier trois précurseurs principaux (gp118, p125 et p133) de même

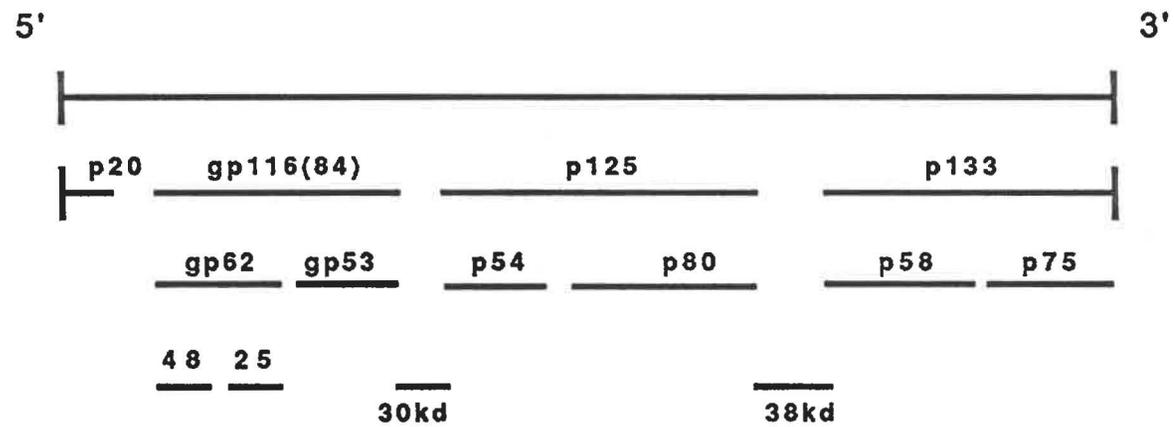
que l'établissement d'une nomenclature uniforme pour les différents polypeptides en utilisant leurs valeurs de mobilité relative après électrophorèse (figure 1).

Les gènes codant pour les glycoprotéines ont été localisés dans la région 5' terminale du génome mais il n'y a pas de preuve directe permettant d'affirmer que ces glycoprotéines sont vraiment les polypeptides structuraux du virion.

Se basant sur le fait que les protéines structurales du virion sont codées à l'extrémité 5' du génome, la protéine p20 pourrait être elle aussi une protéine structurale, et en l'occurrence la protéine de la nucléocapside. Elle serait donc équivalente à la protéine C de la nucléocapside chez les *Flavivirus* (Collett *et al.*, 1988a). Les autres régions de l'ORF pourraient quant à elles coder pour les protéines non-structurales qui participent à la réplication et à la maturation du virus. Les polypeptides p125 et p133 et leurs produits de clivage pourraient représenter ces protéines.

Une comparaison entre l'organisation génomique des *Flavivirus* et celle du BVDV suggère que les polypeptides analogues ont des fonctions biologiques similaires. Par exemple certaines régions codant pour la p125 et la p133 du BVDV possèdent des courtes séquences de très grande homologie en acides aminés avec certaines régions assignées à la NS3 et à la NS5 des *Flavivirus*. Ce qui pourrait indiquer que ces régions sont essentielles pour certaines fonctions (Collett *et al.*, 1988a).

Sur la base des homologies retrouvées avec plusieurs autres ARN de polymérase virales (Kamer et Argos, 1984), il est possible que la protéine NS5 des *Flavivirus* soit une composante d'une ARN polymérase-ARN dépendante



**Figure 1. Organisation génomique du virus BVDV selon Collett *et al.* (1988c)**

(Rice *et al.*, 1985). Une fonction similaire pourrait être attribuée à la protéine p133 chez le BVDV.

Des régions homologues entre la portion p80 de la protéine p125 et la protéine NS3 des *Flavivirus*, suggère une fonction hélicase (Gorbalenya *et al.*, 1989). Un domaine de protéase trypsine-sérine a également été localisé dans la région N-terminale de la NS3 et de la p80 (Bazan et Fletterick, 1989). La région codant pour la p80 est une des régions les plus conservées parmi les *Pestivirus*.

Aucune fonction n'a été attribuée à la portion p54 de la protéine p125. Toutefois, on sait que celle-ci possède une région riche en cystéine qui pourrait être impliquée dans l'activation de l'ARN viral lors de l'infection, de même que dans la régulation de sa réplication (De Moerlooze *et al.*, 1990).

Récemment, en utilisant plusieurs antisérums spécifiques aux produits de certaines régions du génome du BVDV exprimées chez *E. coli*, Akkina (1991) a démontré la présence de deux nouveaux précurseurs (175K et 172K) plus grands que ceux trouvés par Collett *et al.* (1987c). Ces précurseurs protéiques, avec deux autres protéines décrites auparavant (p22 et gp118), correspondent à la polyprotéine précurseure de 449K. L'auteur propose aussi un nouveau modèle d'organisation génomique du virus expliquant les sites possibles de clivage du précurseur lors de la maturation des protéines. Une nouvelle nomenclature est également suggérée pour désigner les différents polypeptides viraux, telle que montrée à la Figure 2.

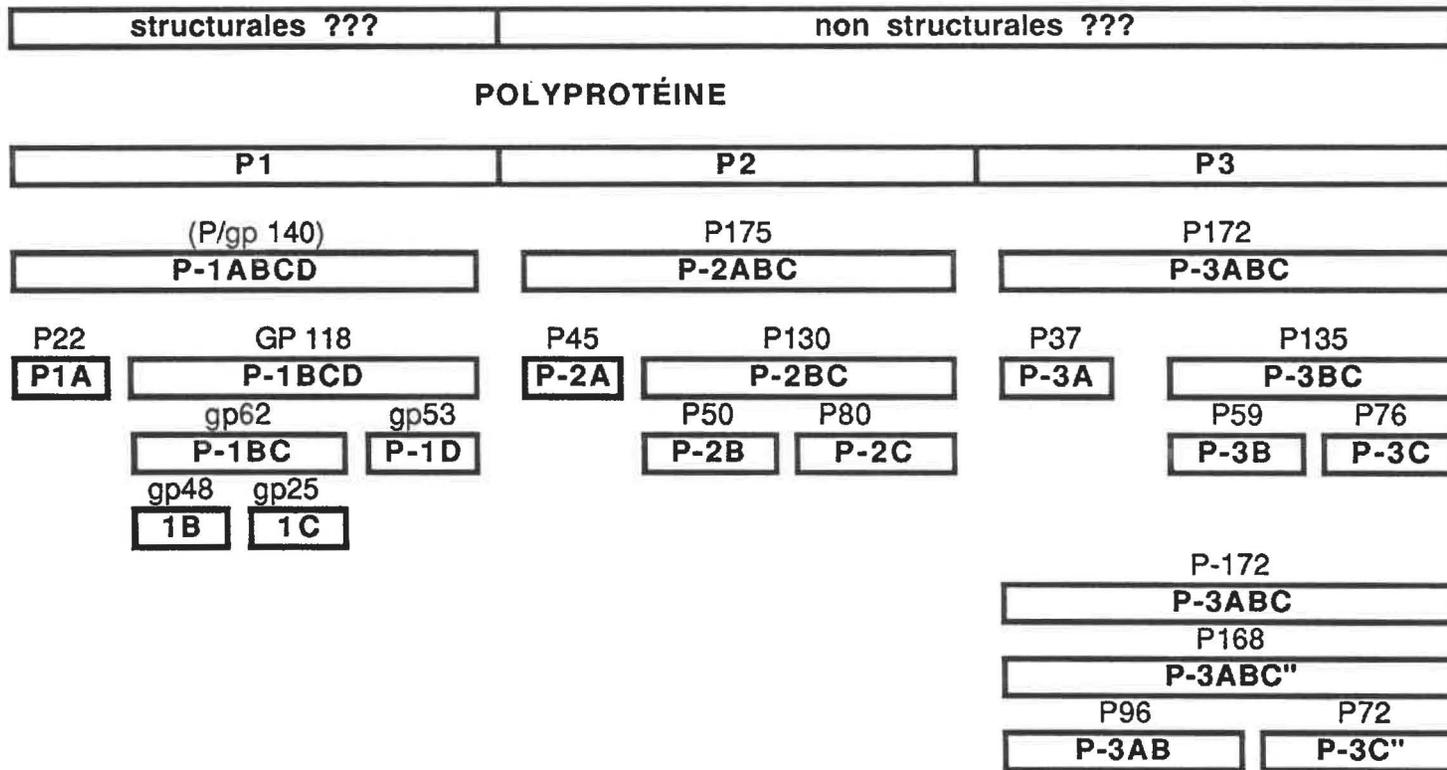


Figure 2: Modèle d'organisation génomique et nouvelle nomenclature proposé par Akkina (1991).

### **3. LA MALADIE**

#### **3.1 Pathogénèse**

La majorité des infections causées par le virus BVDV chez le bovin adulte sont subcliniques (Ames, 1986). La pathogénèse de la maladie est déterminée par certaines caractéristiques de l'infection telles que: la virémie, la possibilité d'infecter les cellules du système immunitaire, l'infection transplacentaire et l'induction d'une immunotolérance au virus jusqu'au 180<sup>e</sup> jour de gestation.

##### **3.1.1 Diarrhée à virus bovine**

Il s'agit généralement chez l'adulte d'une maladie bénigne qui induit la production d'anticorps neutralisants permettant l'élimination du virus. Des symptômes cliniques plus graves apparaissent lorsque des bovins âgés de 6 à 24 mois sont infectés (Blood *et al.*, 1983). La période d'incubation est alors de 5 à 7 jours et est suivie d'une fièvre, d'une leucopénie et d'une virémie qui persiste environ 15 jours. Des anticorps neutralisants peuvent être détectés 3 à 4 semaines après l'infection (Duffell et Harkness, 1985).

Chez les jeunes veaux âgés de moins de 6 mois, on admet généralement que le virus BVDV engendre rarement de maladie (Blood *et al.*, 1983). Par contre, il semble certain qu'il puisse traverser la barrière placentaire et ainsi infecter le fœtus. Dépendant du stade de développement de l'embryon au moment de l'infection, le virus peut provoquer des avortements, des momifications ou encore

toute une variété de malformations congénitales (Kendrick, 1971; Roeder *et al.*, 1986). Lorsque l'infection se produit durant les 4 premiers mois de gestation (McClurkin *et al.*, 1984), soit avant la maturation complète du système immunitaire, il peut se produire une immunotolérance (Coria et McClurkin, 1987). Il en résulte alors une infection persistante (IP) chez le nouveau-né (McClurkin *et al.*, 1984; Brownlie *et al.*, 1987). L'immunotolérance et l'infection persistante sont associées aux souches NCP du virus BVDV (McClurkin *et al.*, 1985; Bolin *et al.* 1985b).

### **3.1.2 Maladie des Muqueuses**

Cette maladie est considérée comme une forme sporadique de l'infection chez les bovins âgés entre 6 et 24 mois. Principalement elle se caractérise par des signes cliniques sévères tels que: fièvre et diarrhée très intenses, ulcération de la muqueuse buccale, dépression, anorexie, déshydratation, leucopénie et diminution de la production de lait chez l'adulte. La mort peut survenir 2 semaines après l'apparition des signes cliniques (Duffell et Harkness, 1985).

Certains auteurs suggèrent que la maladie des muqueuses ne survient que lorsque les bovins, infectés de façon persistante par une souche NCP, sont surinfectés par une souche CP (Brownlie *et al.* 1984; Bolin *et al.*, 1985c). Ces deux biotypes de souches ont été isolées à partir de tissus d'animaux ayant la maladie des muqueuses (McClurkin *et al.*, 1985).

L'origine de la souche CP chez les animaux affectés par la maladie des muqueuses n'est pas connue avec certitude. Toutefois, Littlejohns et Walker (1985) ont proposé qu'un agent infectieux défectif incapable de se répliquer sans

l'intervention d'un autre pestivirus "helper" soit impliqué dans la cytopathogénicité observée *in vitro* de même que dans la pathogénicité chez l'animal.

Bien que la maladie des muqueuses ne se développe pas dans tous les cas d'infection persistante (Harkness *et al.*, 1984) et que ce ne soit pas toutes les souches CP qui puissent induire cette maladie fatale (Bolin *et al.*, 1985c), une homologie antigénique entre les souches virales NCP et CP doit jouer un rôle important dans la pathogenèse de la maladie (Brownlie *et al.*, 1987; Howard *et al.*, 1987).

Une fois que les conditions expérimentales nécessaires à l'induction de la MD ont été établies (Brownlie *et al.*, 1984; Bolin *et al.*, 1985c), Howard *et al.* (1987) ont émis l'hypothèse voulant que cette maladie puisse être induite suite à une mutation spontanée de la souche NCP, ce qui donnerait naissance à une souche CP pouvant déclencher la maladie. Il n'y a toutefois pas d'évidence au niveau moléculaire pour appuyer cette proposition.

Un nouveau modèle expliquant la pathogenèse de la MD a été proposé par Meyers *et al.* (1989b). Selon ces derniers, la souche NCP acquerrait des séquences d'origine cellulaire par un processus de recombinaison et deviendrait ainsi un biotype CP mutant.

Une comparaison plus approfondie entre les souches CP et NCP, au niveau moléculaire, serait nécessaire afin de mieux comprendre la pathogenèse de la MD.

### 3.2 Épidémiologie

Les études sérologiques ont démontré que le virus BVD a une distribution mondiale. Son incidence est de 50 à 90% chez les bovins âgés de moins d'un an (Ernst et Butler, 1983; Bolin *et al.*, 1985a; Duffell et Harkness, 1985). L'infection naturelle est généralement subclinique et accompagnée d'une séroconversion qui est suivie de l'élimination du virus (Duffell et Harkness, 1985; Ames, 1986).

Plusieurs travaux font état de la présence de la maladie à travers le monde. Ainsi, Littlejohns et Horner (1990) ont rapporté que l'infection des bovins par le virus BVD est amplement répandue en Australie et en Nouvelle-Zélande où 60% des animaux adultes présentent des anticorps contre le virus. Au Japon, la fréquence des anomalies congénitales associées au BVDV chez le bovin a augmenté lors des dernières années (Shimizu, 1990). D'autre part, en URSS, la maladie qui fut décrite pour la première fois en 1967 est aujourd'hui présente dans 20 à 80% des fermes, dépendant de la zone climatique et géographique (Zhidkov et Khalenev, 1990). Finalement Meyling *et al.* (1990) rapportèrent que 53% des élevages testés dans une région endémique au Danemark présentaient un ou plusieurs animaux ayant une infection persistante.

Pour ce qui est de l'Amérique du Sud, l'apparition de la diarrhée associée à l'érosion des muqueuses des voies respiratoires et digestives et diagnostiquée comme étant des cas de BVD-MD, fut rapportée en Argentine et au Brésil dès 1960. Cependant l'isolement du virus lui-même remonte à 1974 au Brésil, 1981 en Colombie, 1984 en Argentine et 1985 au Chili. Des études sérologiques ont confirmé la présence de l'infection avec une prévalence de 37% en Argentine et

77% au Chili (Rweyemamu *et al.*, 1990)

La maladie des muqueuses est généralement sporadique et n'affecte pas plus de 5% du cheptel. En Amérique du Nord cette maladie apparaît plus fréquemment pendant les périodes automnale et hivernale, bien qu'on puisse l'observer à n'importe quel moment de l'année (Radostits et Littlejohns, 1988).

L'infection naturelle se produit également chez les ovins, les caprins et les porcins (Fernelius *et al.*, 1973; Van Oirschot, 1983), ainsi que chez des ruminants indigènes et exotiques (Doyle et Heuschele, 1983). Les travaux réalisés par Lamontagne et Roy, (1984) ont démontré que 11% des ovins et 16% des caprins du Québec, étaient séropositifs. Le rôle de cette infection croisée n'est pas encore déterminé.

### **3.3 Modes de transmission**

La transmission du virus se fait généralement par contact direct avec un animal porteur (Roeder et Drew, 1984). En effet, les virions peuvent être isolés dans la plupart des sécrétions de même que dans les excréments de ces animaux (Duffell et Harkness, 1985).

L'atteinte du fœtus peut conduire à l'avortement, à la réabsorption fœtal ou à des malformations congénitales (Van Oirschot, 1983). Elle peut aussi induire une infection virale persistante et à la naissance de veaux séronégatifs et virémiques (Duffell *et al.*, 1984; McClurkin *et al.*, 1984; Roeder *et al.*, 1986). Chez ces derniers, le taux de mortalité est de l'ordre de 50% la première année (Brownlie *et al.*, 1984). Les survivants peuvent toutefois demeurer indéfiniment asymptomatiques et se reproduire normalement. Ceci représente un mécanisme

important de perpétuation de l'infection puisque le virus se transmet ainsi d'une génération à l'autre, une fois que les femelles porteuses peuvent se reproduire normalement. En outre, les porteurs sains deviennent une source constante d'infection pour les animaux susceptibles (Littlejohns et Walter, 1985; Duffell et Harkness, 1985).

Cependant, le BVDV peut aussi être introduit par les vaccins administrés contre d'autres maladies. On a en effet pu démontrer qu'il pouvait occasionnellement être retrouvé comme contaminant dans ces préparations (Lohr *et al.*, 1983). De la même façon, l'emploi de sérum de bovin foetal contaminé dans les processus de haute technologie, tel que le transfert d'embryons, peut constituer une autre source importante d'infection (Radostits et Littlejohns, 1988; Howard *et al.* 1990).

### **3.4 Diagnostique**

Les méthodes les plus couramment utilisées pour la détection du BVDV chez l'animal sont l'isolement viral en culture cellulaire et la recherche d'anticorps anti-viraux dans le sang ou dans les tissus. Ceci peut se faire en utilisant des techniques d'immunofluorescence ou encore de diagnostique sérologique par des tests de séroneutralisation ou d'ELISA (Baker, 1987; Radostits et Littlejohns, 1988). Le développement de tests rapides et peu coûteux destinés à une utilisation à grande échelle pour la détection des infections persistantes chez les animaux demeure une priorité.

Les principales difficultés rencontrées dans le diagnostique du BVDV sont, premièrement, la présence d'une très grande réactivité croisée à l'intérieur du

genre *Pestivirus*, deuxièmement, la pathogénicité très complexe de la maladie et finalement, la nécessité de détecter la présence des souches NCP. Une fois le diagnostic de la MD posé, il est en effet très difficile de démontrer la présence simultanée des souches CP et NCP. Des méthodes ont toutefois été rapportées pour faire cette démonstration; la technique de dilution limite et le blocage de la souche CP avec un sérum révélant la présence de la souche NCP par interférence ou immunofluorescence (McClurkin *et al.*, 1985) en sont des exemples.

Le diagnostic de la MD se fait généralement sur la base de la présence de signes cliniques et pathologiques caractéristiques. Cependant, le diagnostic étiologique définitif de la MD par l'isolement du virus, peut être très long, coûteux et évasif. L'isolement du virus de n'importe quelle source, en culture de tissus, requiert plus d'un passage avant que le virus soit détectable. Les deux types de souches (CP et NCP) ont été isolées d'animaux ayant une MD (Brownlie *et al.*, 1984).

Plusieurs techniques sérologiques sont utilisées pour la détection des anticorps anti-BVD dans le sang des animaux. Par exemple, un test de neutralisation permet de détecter les anticorps contre des souches virales qui sont identiques ou très apparentées à la souche de laboratoire utilisée dans le test. D'autres méthodes comme la fixation du complément (CF), l'immunofluorescence (IF) ou l'"Enzyme-linked immunosorbent assays" (ELISA) détectent les anticorps contre toutes les souches mais leur spécificité peut varier selon la méthode utilisée pour la préparation de l'antigène. Récemment plusieurs tests ELISA ayant une très grande sensibilité pour la détection des anticorps ont

été mis au point (Chu *et al.*, 1985; Howard *et al.*, 1985; Justewicz *et al.*, 1987; Lecomte *et al.*, 1990). Ceux-ci permettent un regroupement des souches du virus BVDV sur la base des variations antigéniques.

L'arrivée des anticorps monoclonaux (AcM) a offert une perspective intéressante pour l'identification directe et rapide des différentes souches virales (Wensvoort *et al.*, 1986; Hess *et al.*, 1988; Edwards et Sands, 1990; Greiser-Wilke *et al.*, 1990). Plusieurs études ont été faites dans l'intention de définir une batterie d'AcM qui serait reconnue officiellement pour le diagnostic différentiel des virus HCV, BVDV et BDV (Edwards *et al.*, 1991).

Du côté de la biologie moléculaire, les techniques d'hybridation *in situ* ou sur membrane ont permis la détection de l'acide nucléique viral. C'est ainsi que des sondes moléculaires marquées peuvent révéler la présence d'un très grand nombre de souches du virus BVDV dans le sérum de bovins infectés naturellement (Brock et Potgieter, 1990). Kwang *et al.* (1991) ont démontré l'efficacité de plusieurs sondes moléculaires pour la détection du virus. Ces auteurs ont testé plusieurs souches CP et NCP en utilisant quatre différents segments du génome de la souche NADL comme sonde. Ces résultats ont également permis de proposer que l'emploi d'une combinaison appropriée de séquences d'ADNc provenant du génome de souches CP et NCP comme sondes d'hybridation pourrait permettre l'utilisation de la technique "Dot Blot" comme test général de diagnostic du virus BVDV. L'amplification de segments du génome viral par la technique de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) constitue un outil additionnel pour la détection spécifique du virus (Schroeder et Balassu-Chan, 1990; Hertig *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1991).

#### 4. IMPORTANCE ÉCONOMIQUE

Les pertes économiques engendrées par l'infection avec le virus BVDV sont reliées aux avortements, à la mortalité néonatale, à la diminution de la croissance prénatale, aux déformations congénitales et au développement de la MD chez les animaux ayant une infection persistante (Duffell *et al.*, 1986). Une estimation exacte des pertes encourues est difficile à établir à cause de la nature de la maladie et de la présence d'un grand nombre de cas non identifiés (Roeder et Harkness, 1986). La période de temps très longue qui s'écoule entre l'infection asymptomatique et la perte du nouveau-né dû à la MD rend l'investigation plus difficile. Harkness (1987) a rapporté que les trois quarts des pertes économiques étaient associées à l'infection prénatale.

L'amplitude des pertes peut fluctuer d'un troupeau infecté à l'autre. Elles sont très élevées lorsque la maladie est présente à une échelle épidémique suite à la transmission horizontale à des vaches non immunes et en gestation. Par contre, elle sont considérablement plus basses quand une infection endémique est maintenue dans le troupeau par l'intermédiaire de familles porteuses (Raddostits et Littlejohns, 1988).

D'autres considérations importantes, telles que la contamination de vaccins et l'utilisation de sperme de taureaux infectés avec les conséquences qui en découlent sur la progéniture ainsi que sur les programmes d'insémination artificielle (McClurkin *et al.*, 1979; Gardiner et Barlow, 1981, Barlow *et al.*, 1986) vont également contribuer à ces pertes économiques.

Ces dernières années les risques d'infection persistante, provenant de la

technologie du transfert d'embryons ainsi que de l'utilisation de sérum bovin foetal contaminé avec du virus BVD, lors de la transplantation d'ovules, sont devenus appréciables (Rossi *et al.*, 1980; Rodostits et Littlejohns, 1988; Bolin, 1990).

## **5. PRÉVENTION ET CONTRÔLE**

### **5.1 Contrôle des infections persistantes**

Maintenir des troupeaux exempts de BVDV apparaît très difficile à cause des différentes routes par lesquelles le virus peut atteindre la ferme. Un contrôle efficace peut cependant être obtenu en prévenant l'infection des animaux stressés, en identifiant et en éliminant les animaux présentant une infection persistante et en immunisant les bovins avant leur premier accouplement afin de prévenir la transmission trans-placentaire.

L'identification et l'élimination des animaux atteints d'une infection persistante revêt une très grande importance dans un programme de contrôle du virus BVDV car ceux-ci présentent une virémie persistante et une grande quantité de virus est répandue par leurs excréments et leurs sécrétions corporelles. De plus les femelles ayant une infection persistante peuvent donner naissance à des nouveaux-nés qui sont eux aussi infectés de façon persistante, ce qui génèrent des lignées familiales présentant une infection persistante. Après avoir éliminé les animaux porteurs, il faut exercer une sélection et un contrôle stricte sur toutes les introductions dans la ferme.

## 5.2 Vaccination

Des vaccins atténués et inactivés sont disponibles. Les vaccins atténués ont l'avantage de permettre un niveau plus élevé d'immunisation sans avoir recours à une dose de rappel. Par contre la souche vaccinale peut traverser le placenta et ainsi provoquer une infection foetal. Il a aussi été démontré que les vaccins atténués peuvent induire une immunosuppression (Roth *et al.*, 1983) et qu'ils peuvent être associés à une augmentation de la mortalité due à des maladies respiratoires (Martin, 1983). Des épizooties de MD après vaccination ont été rapportées (Chernefatu *et al.*, 1967; Rosner, 1968; Lambert, 1973).

Le développement d'un vaccin thermo-sensible a été rapporté par Lobmann *et al.* (1984). Ce vaccin induit la production d'anticorps mais n'est pas associé à des signes cliniques ou à une leucopénie.

L'utilisation de vaccins inactivés présentent des avantages par rapport aux vaccins atténués, puisqu'ils peuvent être utilisés chez les bovins en gestation sans causer de maladie ni d'immunosuppression. Ce type de vaccin possède néanmoins des désavantages, tels que le besoin d'une dose de rappel et une très courte période de protection.

Étant donné que le contrôle du virus BVD est basé principalement sur la vaccination et que la sécurité des vaccins couramment utilisés est remise en question, des vaccins sous-unitaires comprenant les protéines immunogéniques du virus ou seulement des portions de celles-ci devraient être considéré comme une alternative. Dans cette optique, la purification des antigènes viraux ayant un rôle majeur dans la réponse immunitaire de l'hôte, revêt une grand importance.

rôle majeur dans la réponse immunitaire de l'hôte, revêt une grande importance. Chez le BVDV, ce sont probablement les glycoprotéines de surface qui remplissent cette fonction. Il a été rapporté que la glycoprotéine gp53 était capable d'induire la production d'anticorps neutralisants *in vitro* (Magar *et al.*, 1988; Bolin *et al.*, 1988; Donis *et al.*, 1988), d'où l'importance de développer des méthodes de détection et de purification de cette protéine. Wensvoort *et al.*, en 1990, ont rapporté avoir purifié par chromatographie d'affinité la protéine E1 du virus HCV, un virus apparenté au BVDV. L'utilisation de cette méthode, qui fait appel à des anticorps monoclonaux pourrait donc s'avérer appropriée pour la purification des glycoprotéines du BVDV en vue d'une éventuelle utilisation pour la production d'un vaccin sous-unitaire.

## 6. CONCLUSION

Même si le complexe de la diarrhée à virus-maladie de muqueuses (BVD-MD) est connu depuis plus de 40 ans, plusieurs questions restent encore sans réponse. Les principaux problèmes qui ont ralenti l'avancement des connaissances sur la biologie du BVDV concernent la multiplication virale, de même que la présence de protéines cellulaires indissociables des préparations de virus purifiés.

On retrouve dans la littérature une description détaillée de la pathologie et de l'épidémiologie engendrées par l'infection virale. Ainsi, il est bien connu que la maladie des muqueuses apparaît seulement lorsque des animaux infectés d'une façon persistante par une souche NCP sont surinfectés par une souche CP du virus. Par contre la signification de la présence de la protéine p80 dans les souches CP n'est pas encore claire puisqu'aucune relation moléculaire entre les deux biotypes n'a été déterminée.

Ces dernières années, l'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis de déterminer la séquence génomique de deux souches du virus BVD. Ceci a permis des progrès importants dans la compréhension de la réplication et de l'organisation génomique du virus, amenant ainsi une reclassification du genre *Pestivirus* à l'intérieur de la famille *Flaviviridae*.

En ce qui concerne les protéines virales on retrouve une grande variation quant à leur nombre et leur poids moléculaire d'une publication à l'autre. À cause de cela, la détermination précise du nombre de polypeptides viraux de même que de leurs relations structurales n'a pas encore été faite. La relation entre les

polypeptides p125 et p80 ainsi que l'identification de la gp53 comme la glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale sont les seuls éléments connus avec certitude.

L'utilisation de la technique d'immunopurification pourrait contribuer à la différenciation des polypeptides viraux et cellulaires. L'obtention des antigènes viraux purifiés pourrait également permettre leur caractérisation afin de déterminer leurs rôles dans la réplication virale, dans la réponse immunitaire de l'hôte de même que dans la structure virale.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **1. CELLULES**

### **1.1 Origine des cellules**

Les cellules de reins de bovins MDBK (Madin Darby Bovine Kidney cells, *Bos taurus*, BVD virus-free, CCL 22) ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.) tandis que les cellules de reins d'agneaux (OK) utilisées proviennent de l'Institut Armand-Frappier (Laval, Qc).

### **1.2 Cultures cellulaires**

Les cellules ont été cultivées dans un milieu constitué d'un mélange 1:1 de 199-Hanks (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.) et de MEM-Earle. Ce milieu était enrichi de 10% de sérum foetal bovin (SFB, GIBCO) inactivé pendant 30 min à 56 °C et additionné de 50 µg/ml de gentamycine (GIBCO), 1 mM de L-glutamine et 1 mM de pyruvate de sodium (GIBCO).

Les feuillets cellulaires confluent, après rinçage au PBS stérile (Dulbecco's phosphate buffered saline, pH 7,2 à 7,4, GIBCO) ont été dispersés à l'aide d'une solution de 0,01% (p/v) de trypsine TRL (Cooper Biomedical, Inc., Malvern, Pa.) et 0.04% (p/v) d'EDTA (GIBCO). Le comptage cellulaire a été réalisé en utilisant une solution de 1% (p/v) de Bleu de Trypan selon Payment et Pavilanis (1980).

## **2. LE VIRUS**

La souche de virus BVD utilisée était la souche cytopathogène NADL (ATCC VR-534). Le virus a été multiplié en inoculant des feuillets cellulaires

cultivés en flacons de 25 cm<sup>2</sup> (Corning Glass Works, Corning, N.Y.) avec un MOI de 1. Après une période d'adsorption de 90 min à 37°C, avec agitation aux 15 min afin d'empêcher l'assèchement du feuillet cellulaire, 5 ml de milieu sans SFB ont été ajoutés et les flacons furent incubés pendant 48h. Les surnageants ont ensuite été récoltés, clarifiés par centrifugation (1000 x g pendant 10 min) et distribués en aliquots avant d'être congelés à -70°C jusqu'à utilisation. Le titre infectieux des surnageants a été déterminé par effet cytopathique (DICT<sub>50</sub>/ml).

## **2.1 Concentration des virus**

Des cellules MDBK ont été cultivées en bouteilles de 490 cm<sup>2</sup> (Corning Glass Works, Corning, N.Y.) et infectées avec 10 ml d'une suspension virale de façon à avoir un MOI d'environ 1. Après 90 min d'adsorption, 80 ml de milieu de croissance ont été ajoutés et les cellules ont été maintenues pendant 48h. Par la suite, les surnageants ont été récoltés et clarifiés par centrifugation (10 000 x g 30 min) à 4°C. Les virus ont ensuite été précipités au culot par ultracentrifugation à 90 000 x g pendant 90 min puis resuspendus dans 20 ml de tampon TEN (0,05 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA, 0,15 M NaCl, pH 7,4). Une deuxième ultracentrifugation a été réalisée selon les mêmes paramètres et le culot fut resuspendu cette fois-ci dans 1 ml de tampon TEN. Le virus ainsi concentré a été gardé à -70°C jusqu'à utilisation.

## **2.2 Mesure du titre viral**

Le titre infectieux de la souche cytopathogène NADL du virus BVDV a été évalué sur des cellules MDBK et OK. Le titre infectieux en DICT<sub>50</sub>/ml a été déterminé dans des plateaux Linbro (Flow Laboratories, Inc., McLean, Va.) de 96

cupules. Des dilutions décimales du virus dans le milieu sans sérum ont été distribuées à raison de 50 µl par cupule (8 cupules par dilution). À ceci, 100 µl de cellules MDBK ou OK, ayant une concentration de 350 000 cellules par ml de milieu contenant 5% de SFB, ont été ajoutés dans chaque cupule. Deux rangées contrôles, où les dilutions virales ont été remplacées par 50 µl de milieu de culture, ont été incorporées dans chaque plateau. Ceux-ci ont ensuite été incubés à 37°C en présence de CO<sub>2</sub>. L'effet cytopathique (ECP) a été évalué tous les jours et le titre infectieux (DICT<sub>50</sub>) a été déterminé le quatrième jour par la formule de Kärber (Payment et Pavilanis, 1980).

### **3. ANTICORPS MONOCLONAL ET ANTISÉRUMS**

#### **3.1 Anticorps monoclonal D-89**

Un anticorps monoclonal neutralisant (D-89) produit contre la souche NADL du virus BVD a été obtenu du Dr Harish C. Minocha (Kansas State University, Manhattan, Kansas). Cet anticorps monoclonal ne possède aucune activité neutralisante contre les virus HCV et BDV (Xue *et al.*, 1990).

##### **3.1.1 Caractérisation de l'anticorps monoclonal D-89**

###### **3.1.1.1 Immuno-Diffusion Double (IDD)**

Une solution d'agarose SeaKem 1% a été préparée dans du PBS 0,01 M pH 7,1 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 127 mM). Trois ml de cette solution ont été coulés sur des plaques de verre. Après gélification, des trous de 3 mm de diamètre ont été percés avant d'y déposer 10 µl de l'échantillon. Les plaques ont ensuite été placées dans une chambre humide pendant toute la nuit à

température de la pièce. Suite à plusieurs lavages avec du PBS et séchage, les gels ont été colorés en les submergeant dans une solution de bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie R-250 0.5%, méthanol 50%, acide acétique 7,5%) pendant 10 min.

Les anti-immunoglobulines utilisées, provenant de Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Ind. et produites chez le lapin, sont les suivantes: anti-souris IgG1 (Cat. # 64-360), anti-souris IgG2a (Cat. # 64-361), anti-souris IgG2b (Cat. # 64-362), anti-souris IgG3 (Cat. # 64-363), anti-souris IgG totale (Cat. # 65-125-1), anti-souris IgGA (Cat. # 64-364), anti-souris IgM (Cat. # 64-365), anti-souris chaîne k (Cat. # 64-366) et anti-souris chaîne  $\lambda$  (Cat. # 64-367).

#### 3.1.1.2 Immuno-Diffusion Radiale (IDR)

Une solution d'agarose SeaKem 1% a été préparée dans du PBS. À trois ml de cette solution, on a rajouté 20  $\mu$ l d'antisérum (Miles anti-mouse IgG (H+L) Rb, 2,8 mg/ml) puis le mélange a été déposé sur des plaques de verre. Les standards ont été préparés en faisant des dilutions de l'antisérum dans du PBS contenant 1% de BSA (50, 25, 12,5, 6,25 et 3,125  $\mu$ g/ml).

Après coloration du gel, le diamètre a été déterminé pour chacune des dilutions et une courbe standard a été tracée selon la moyenne des diamètres au carré en fonction de la concentration en  $\mu$ g/ml. À partir de cette courbe, la concentration d'IgG dans le liquide d'ascite de départ a été déterminée.

#### 3.1.2 Purification de l'anticorps monoclonal D-89

Une colonne de type Pharmacia (K16/20, 1,6 cm x 5,6 cm) contenant 10 ml

de protéine A-Sépharose CL-4B, préalablement gonflé selon les instructions du fabricant, a été équilibré à pH 8,1 avec tampon phosphate 0,1 M additionné de 0,02% (p/v) de  $\text{NaN}_3$ .

Deux ml du liquide d'ascite ayant une concentration de 2 mg/ml d'IgG ont été tamponés à pH 8,1 avec tampon phosphate 1 M pH 8,5 puis centrifugés à 12 800 x g pendant 30 min. L'échantillon a ensuite été passé sur la colonne à un débit d'environ 10 ml/h. Une fois que la totalité de l'échantillon eut été passé, la colonne a été lavée avec du tampon phosphate 0,1 M pH 8,1, jusqu'à l'obtention d'une densité optique (D.O.) égale à zéro pour une longueur d'onde de 280 nm. L'anticorps, fixé à la protéine A dans la colonne, a été élué avec du tampon citrate de sodium/acide citrique 0,1 M contenant 0,02% de  $\text{NaN}_3$  à différents pH (6,0, 5,0, 4,0 et 3,5). Des fractions de un ml ont été récoltées et leur pH ajusté à 7,5 avec du tampon carbonate/bicarbonate 1 M pH 9,5. Les pics de protéines ont été analysés par IDD et par électrophorèse en présence de SDS.

### **3.1.3 Couplage de l'AcM au Sépharose activé au CNBr**

Un gramme de Sépharose 4B activé au CNBr sec a été gonflé selon les recommandations du fabricant (Pharmacia). Le Sépharose gonflé a été mélangé avec l'anticorps monoclonal D-89 purifié puis incubé pendant une période de 18h à 4°C. Après cette incubation, les groupes actifs non-conjugués ont été bloqués avec une solution de glycine 0,2 M à pH 8,0. Pour enlever les protéines attachées d'une façon non-covalente, un lavage avec du tampon acétate 0,1 M pH 4,0 additionné de 0,5 M de NaCl a été effectué. L'immunoabsorbant ainsi préparé a été conservé en présence de  $\text{NaN}_3$  à 4°C jusqu'à utilisation.

## **3.2 Antisérums**

Un antisérum bovin spécifique multivalent contre le BVDV, provenant d'une hyperimmunisation de veaux gnotobiotiques avec les cinq souches de référence (NADL, Singer, Orégon C24V, New York 1 et Draper), a été obtenu du Dr E. A. Carbrey (NVSL: National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa).

Un antisérum dirigé contre les cellules MDBK a été produit chez un lapin "New Zealand". L'animal a été inoculé avec 1 ml d'une solution contenant  $10^7$  cellules MDBK au jours 0 et 14, par voie intra-musculaire et intra-dermique à des sites multiples, en utilisant l'adjuvant complet de Freund. Au jour 54, un rappel (1 ml) sans adjuvant a été administré intra-musculairement. Le titre de cet antisérum était de 1/1280 lorsqu'évalué par immunofluorescence sur cellules MDBK non-infectées et il ne possédait pas d'anticorps détectables contre le virus BVDV lors de la séroneutralisation de 100 doses (DICT<sub>50</sub>) du virus.

## **3.3 Test d'immunofluorescence**

### **3.3.1 Montage de lames avec des cellules non-infectées**

Des cellules MDBK ayant peu de passages ont été cultivées dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup>. Les feuillets cellulaires, une fois confluents, ont été trypsinés afin de resuspendre les cellules dans du milieu de croissance enrichi de 2% de SFB, à raison d'un million de cellules par ml. Des lames à cupules multiples (Multitest, Flow Laboratories, Inc., McLean, Va.) ont ensuite été préparées en déposant 25 µl de la suspension cellulaire dans chaque cupule, puis elles ont été placées dans une étuve à 37°C en présence de CO<sub>2</sub> pendant environ 17h. Par la

suite, les lames ont été lavées une fois dans du PBS avant d'être fixées pendant 30 min avec de l'acétone à -20°C. Finalement elles ont été asséchées à température de la pièce puis gardées à -70°C jusqu'à utilisation.

### **3.3.2 Montage de lames avec des cellules infectées**

Des cellules MDBK à un nombre de passage réduit ont été infectées avec la souche NADL du virus BVDV. Après une période d'adsorption de 90 min, du milieu de croissance enrichi de 2% de SFB a été ajouté avant incubation dans une étuve à 37°C en présence de CO<sub>2</sub> pendant 24h. Les feuillets cellulaires ont ensuite été trypsinés et les cellules infectées ont été resuspendues dans 4 ml de milieu de croissance. Les lames ont ensuite été préparées en déposant une goutte de suspension cellulaire (50 µl) dans chaque cupule. Après une incubation d'environ 3h à 37°C en présence de CO<sub>2</sub>, les lames ont été rincées au PBS et fixées pendant 30 min avec de l'acétone refroidie à -20°C. Elles ont été gardées à -70°C jusqu'à leur utilisation. Les antisérums à tester ont été dilués dans du PBS stérile. Avec un crayon gras, les cupules des lames ont été séparées et 25 µl d'anticorps ont été déposés par cupule avant d'être incubées à 37°C en présence de CO<sub>2</sub> pendant 30 min. Un témoin positif, soit l'antisérum BVDV multivalent dilué 1:150, a été utilisé.

Après trois lavages au PBS et séchage, 25 µl d'une dilution 1:50 dans du PBS de l'anti-IgG (H+L) bovin produit chez le lapin et conjugué à la FITC (ICN Pharmaceutical Inc., Irvine, Calif.), pour les échantillons provenant de bovins, ou de l'anti-IgG F(ab')<sub>2</sub> de souris conjugué à la FITC (Cappel, Laboratories, Cochranville, Pa.) dilué 1:70, pour les échantillons provenant de la souris, ont été rajoutés pendant 30 min à 37°C. Les lames ont ensuite été lavées dans plusieurs

bains de PBS pendant 45 min avant l'addition de 25  $\mu$ l d'une solution de 0,003% de Bleu d'Evans dans l'eau tridistillée pendant environ 15 min. Après rinçage et séchage, une goutte de glycérol:PBS (9:1) a été déposée sur chaque cupule avant de les recouvrir d'une lamelle pour l'observation au microscope à fluorescence Leitz Orthoplan (Leitz/Opto-Metric Div. of E. Leitz Inc., Rockleigh, N.J.)

### **3.4 Test de neutralisation**

Des dilutions par deux de l'antisérum anti-gp53 ou une dilution 1:1000 de l'anticorps monoclonal D-89 ont été mélangés avec 50  $\mu$ l d'une suspension virale contenant 100 DCIT<sub>50</sub>/ml avant d'être incubés pendant 1h à température de la pièce. Un titrage à rebours de même que des contrôles cellulaires non-infectés ont été inclus dans tous les plateaux. Dans chaque cupule, 100  $\mu$ l d'une suspension cellulaire contenant 350 000 cellules MDBK/ml ont été ajoutés. Les plateaux ont ensuite été incubés à 37°C en présence de CO<sub>2</sub> et le nombre de cupules possédant des cellules sans effet cytopathique a été noté après quatre jours.

### **3.5 Test ELISA**

#### **3.5.1 ELISA indirect**

Dans un plateau Linbro de 96 cupules, on a déposé 50  $\mu$ l de l'anticorps polyclonal (Antisérum BVDV, NVSL, Ames) dilué 1:400 dans du tampon carbonate/bicarbonate 0,1 M pH 9,5, avant de l'incuber toute la nuit à 4°C. Ensuite 200  $\mu$ l/cupule de tampon de blocage contenant 1% (p/v) d'ovalbumine (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) et 0,05% (p/v) de Tween-20 dans du PBS

pH 7,2 ont été ajoutés. Après 1h d'incubation à température de la pièce, trois rinçages avec tampon de lavage (PBS pH 7,2 contenant 0,1% (v/v) de Tween-20) ont été effectués avant de déposer 50 µl d'une suspension virale diluée 1:10 dans le tampon de lavage. Les plateaux ont été incubés pendant 90 min à température de la pièce. Ensuite 50 µl/puits de l'antisérum à tester (l'anticorps monoclonal D-89 ou l'antisérum anti-gp53) ont été déposés puis incubé encore une fois pendant 90 min à température de la pièce. Après lavage, 50 µl de conjugué HRP anti-IgG de souris produit chez la chèvre et dilué 1:1000 dans du tampon de blocage, ont été ajoutés et les plateaux réincubés pendant 90 min à température de la pièce, à l'abri de la lumière. Finalement 100 µl/puits de substrat constitué d'O-Phénylènediamine (Sigma) 2,2 mM dans du tampon citrate (acide acétique 0,05 M, phosphate dibasique de sodium 0,1 M pH 5,0 et 8 µl de solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) ont été rajoutés avant d'être incubé pendant 30 min à température de la pièce et à l'abri de la lumière. La réaction a été arrêtée avec 100 µl d'une solution 1 N de HCl avant de faire les lectures à la densité optique (D.O.) de 492 nm à l'aide d'un appareil Multiscan (Titertek Multiskan, Flow laboratories, Inc., McLean, Va.).

### **3.5.2 ELISA direct**

Dans des plateaux Linbro de 96 puits, 50 µl d'une suspension virale diluée 1:10 dans du tampon carbonate/bicarbonate 0,1 M pH 9,5 ont été déposés puis incubés toute la nuit à 4°C. Les sites non actifs ont été inhibés avec 200 µl de tampon de blocage et des dilutions de l'anticorps polyclonal, de l'anticorps monoclonal ou de l'antisérum anti-gp53 ont été ajoutés et incubés pendant 90 min à la température de la pièce. Les étapes suivantes sont identiques à celles

décrites dans la section 3.1 sauf que l'antisérum provenant du bovin a été révélé à l'aide d'un antisérum anti-bovin marqué à la peroxidase (HRP anti-IgG bovin produit chez le lapin, Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Ind.).

#### **4. IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES**

##### **4.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS**

Les électrophorèses ont été réalisées sur des gels de 1,5 mm d'épaisseur en présence de SDS, selon la méthode de Laemmli (1970). La concentration des gels de regroupement était de 3,5% acrylamide et celle des gels de séparation de 12,5%, selon la technique de Hames (1981). Les échantillons dénaturés dans un tampon constitué de 4% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de 2-mercaptoéthanol, 20% (v/v) de glycérol, 0,002% (p/v) de bleu de bromophénol et 0,125 M Tris-HCl pH 6,8 (Takacs, 1979), étaient chauffés 5 min à 95°C avant leur application sur le gel. L'électrophorèse a été exécutée sous un voltage constant de 50 V et à une température de 4°C jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait atteint le bas du gel. Ensuite une solution de 50% (v/v) de méthanol et 7,5% (v/v) d'acide acétique glacial a servi pour la fixation des gels, qui ont par la suite été colorés avec une solution de 0,2% (p/v) de bleu de Coomassie R-250 (Hames, 1981) ou avec du nitrate d'argent selon la méthode d'Oakley *et al.*, 1980. Le séchage sous vide des gels était finalement réalisé à l'aide d'une plaque chauffante Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.).

Les marqueurs de poids moléculaire utilisés (Bio-Rad Laboratories) étaient: la myosine ayant un poids moléculaire de 200 000, la  $\beta$ -galactosidase de 116 250, la phosphorilase b de 92 500, l'albumine bovine de 66 200,

l'ovalbumine de 45 000, l'anhydrase carbonique de 31 000, l'inhibiteur de la trypsine de 21 500 et la lysozyme de 14 400.

#### **4.2 Immuno-empreinte (western blot)**

Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les protéines ont été transférées électrophorétiquement selon la méthode de Towbin *et al.* (1979) sur une membrane de nitrocellulose (0,2  $\mu$ m, Schleicher & Schuell BA - 83) à l'aide d'un appareil Bio-Rad, à 50 V pendant 1h. Le tampon de transfert était constitué de 25 mM de Tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glycine et 20% de méthanol. La membrane de nitrocellulose a été découpée en languettes de 5 mm et celles-ci ont été incubées 1h à température de la pièce dans du tampon de saturation (154 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6) contenant 3% (v/v) de gélatine (Norland products New Brunswick, N.J.). Les languettes ont ensuite été incubées pendant 1h à la température de la pièce en présence de l'antisérum anti-MDBK, de l'antisérum anti-BVDV bovin multivalent, de l'antisérum anti-gp53 ou de l'anticorps monoclonal. Suite à trois lavages successifs de 15 min dans du tampon de lavage (154 mM NaCl, 0,05% Tween-20, 10 mM Tris-HCl pH 7,6). Les anticorps conjugués à la peroxidase (Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Ind.) soit, selon le cas, un anti-IgG de lapin préparé chez la chèvre (1:400), un anti-IgG de bovin préparé chez le lapin (1:500) ou encore un anti-IgG de souris préparé chez la chèvre (1:400) (Cappel, Laboratories, Cochranville, Pa.) ont été rajoutés pendant 30 min à la température de la pièce. Toutes les dilutions ont été faites dans le tampon de dilution (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 154 mM NaCl et 1% de gélatine). Après trois lavages, la révélation était faite à l'aide d'une solution de 0,06% (p/v) de 4-Chloro-1 naphthol, 50 mM de Tris-HCl pH 7,6 et 20% (v/v) de

méthanol, à laquelle 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était ajouté avant l'utilisation. Les standards de poids moléculaires connus (Bio-Rad) utilisés ont été colorés dans un bain d'amido black (0,1% amido black, 0,6% acétate de sodium, 0,25% d'acide acétique, 5% de glycérol) pendant 4 min et décolorés dans une solution de 7,5% d'acide acétique et 5% de glycérol.

### **4.3 Marquage radioactif des protéines virales**

Des cellules MDBK et OK cultivées en flacons de 25 cm<sup>2</sup> ont été infectées avec le virus BVDV (NADL) à un MOI de 1. Pour les cellules contrôles, les suspensions virales étaient remplacées par du milieu de culture. Les feuillets confluents ont été lavés deux fois avec du PBS stérile à 19 h p.i et du milieu reconstitué sans méthionine et enrichi de 1% de SFB dialysé a été ajouté pendant 1h. Ce milieu a ensuite été remplacé par un milieu sans méthionine mais additionné de 100 µCi par ml de L-[<sup>35</sup>S] méthionine (40,07 TBq/mmol; New England Nuclear Corp. Boston, Mass) et de 1% de SFB dialysé, pour une période de 4h. Ensuite, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS froid et le tampon d'immunoprécipitation RIPA (0,15 M NaCl, désoxycholate de sodium 1% (p/v), Triton X-100 1% (v/v), SDS 0,1% (p/v), aprotinine 1% (v/v), 1 mM PMSF, 0,01 M Tris-HCl pH 7,4) a été ajouté pendant 30 min à 4°C. Le lysat cellulaire a finalement été clarifié par centrifugation (12 800 x g) pendant 15 min, puis distribué en aliquots de 100 µl.

### **4.4 Immunoprécipitation**

Les lysats cellulaires ont été pré-incubés pendant 1h à la température de la pièce en présence de protéine A-Sépharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala,

Sweden) afin d'éliminer la précipitation de produits non-spécifiques. Des volumes de 10 µl d'antisérum bovin anti-BVDV multivalent ou d'anticorps monoclonal (liquide d'ascite clarifié à 12 800 x g, 15 min) ont été ajoutés aux lysats cellulaires contenus dans des tubes Eppendorf. Ceux-ci ont ensuite été incubés à 37°C pendant 90 min avec agitation. Après cette incubation, 30 µl de protéine A-Sépharose CL-4B en solution 10% (p/v) dans du tampon RIPA ont été ajoutés avant de replacer les tubes à 37°C pendant 60 min. Les complexes immuns ont été centrifugés (12 800 x g, 3 min) et lavés trois fois (resuspendus et centrifugés) dans le tampon RIPA. Le dernier culot obtenu après lavage a été resuspendu dans du tampon d'échantillons, puis chauffé à 95°C pendant 5 min. Enfin, après une dernière centrifugation, le surnageant a été déposé sur un gel de polyacrylamide. Suite à l'électrophorèse, les gels ont été traités au En<sup>3</sup>Hance (New England Nuclear) puis séchés et mis en contact avec des films radiographiques X-Omat AR-5 (Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.) dans des cassettes rigides (Wolf X-ray Corp., Picker Canada Ltée, St Laurent, Qc) pendant 3 à 4 jours à -70°C.

Les marqueurs de poids moléculaire radiomarqués (Protein molecular weight standards, methyl-<sup>14</sup>C-protein labeled, GIBCO, BRL) utilisés étaient la myosine ayant un poids moléculaire de 200 000, la phosphorylase b de 97 400, l'albumine de 68 000, l'ovalbumine de 43 000, l'anhydrase carbonique de 29 000, la β-lactoglobuline de 18 400 et la lysozyme 14 300. Une dilution des marqueurs 1:70 dans du tampon pour standards (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% (p/v) et 2% (v/v) de 2-β-mercaptoéthanol) a été utilisée et 50 µl ont été déposés par puits.

## **5. PURIFICATION DE LA GP53**

### **5.1 Détermination de la spécificité de l'immunoabsorbant**

Des lysats cellulaires marqués à la  $^{35}\text{S}$ -méthionine, infectés ou non-infectés avec le virus BVD, ont été utilisés pour déterminer la spécificité de l'immunoabsorbant. Un volume de 50  $\mu\text{l}$  de ces lysats a été pré-incubé à température de la pièce pendant 1h en présence de protéine A Sépharose CL-4B afin de minimiser la précipitation de produits non-spécifiques. Ensuite, 50  $\mu\text{l}$  de l'immunoabsorbant ont été ajoutés à 50  $\mu\text{l}$  de lysat cellulaire avant d'être incubé toute la nuit (16h) à 4°C. Les complexes immuns ont été lavés plusieurs fois dans du tampon RIPA avant d'être resuspendu dans 50  $\mu\text{l}$  de tampon d'électrophorèse et chauffés à 95°C pendant 5 min. Après centrifugation, le surnageant obtenu a été soumis à une électrophorèse. Les gels de polyacrylamide ont été séchés puis mis en présence de pellicules photographiques pendant 3 à 4 jours.

### **5.2 Chromatographie d'affinité**

Une solution de virus concentrée et solubilisée avec 1% (v/v) de NP-40 a été mélangée avec l'immunoabsorbant puis incubée pendant 16h à 4°C avec agitation. Le mélange a ensuite été versé dans une colonne et stabilisé par lavage avec 10 ml de tampon TEN contenant 1% (v/v) de NP-40, puis avec 10 ml de tampon TEN contenant 0,4 M de NaCl et 1% de NP-40 et finalement avec 10 ml de tampon TEN contenant 0,1% de SDS et 1% de NP-40 (Chong et Gillam, 1985). Les protéines couplées au gel ont été éluées avec le tampon d'éluion contenant de l'iodure de sodium 3 M dans du Tris-HCl 0,05 M pH 9,0 (Lecomte et

Tyrrell, 1976). Le débit d'élution était de 30 ml/h et des fractions de 0,5 ml ont été récoltées et vérifiées par électrophorèse.

## **6. IMMUNISATION DES SOURIS**

Deux souris BALB/c ont été inoculées intra-péritonéalement avec 15 µg de protéine gp53 purifiée en utilisant l'adjuvant complet de Freund (jour 0) et l'adjuvant incomplet (jours 17). Au jour 30, les souris ont été saignées au plexus rétro-orbital à l'aide de tubes capillaires héparinés. Les souris ont reçu un rappel au jour 38. Les sérums récoltés ont été testés par ELISA afin de déterminer s'il y a présence d'anticorps produits contre la gp53.

## RÉSULTATS

## 1. MULTIPLICATION VIRALE

Les cellules MDBK et OK utilisées pour la multiplication virale étaient exemptes de virus BVD. Ceci a été vérifié par immunofluorescence à l'aide de l'antisérum bovin anti-BVDV multivalent obtenu du NVSL. L'absence de mycoplasme a également été confirmée par le test de Hoechst (Mycoplasma stain kit, Flow Laboratories, Mississauga, Ont.).

Aucune différence significative n'a été observée dans le titre infectieux obtenu en utilisant ces deux types de cellules. En effet, le DCIT<sub>50</sub>/ml moyen obtenu avec les cellules MDBK à 48h p.i. était de  $10^{7,3}$ , alors que celui obtenu avec les cellules OK dans les mêmes conditions était de  $10^{7,1}$ . Toutefois l'effet cytopathique apparaissait plus rapidement dans les cellules OK, soit vers 16h p.i. comparativement à 24h p.i. dans le cas des cellules MDBK.

Bien qu'aucune différence significative n'a été observée dans le titre infectieux, les deux types de cellules ont quand même été utilisés dans les expériences de radiomarquage. Les cellules OK ayant subi beaucoup moins de passages que les cellules MDBK, il est possible que l'incorporation de matériel radioactif soit meilleure.

## 2. PURIFICATION DE L'ANTICORPS MONOCLONAL D-89

L'anticorps monoclonal D-89 a été obtenu du Dr Minocha (Kansas University) sous forme de liquide d'ascite. Afin de le coupler au Sépharose activée au CNBr, cet anticorps de classe IgG2a, a d'abord été purifié par chromatographie d'affinité. Sur le graphique obtenu avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 280 nm on peut observer trois pics (figure 3). Le premier correspond au matériel non fixé à la colonne tandis que les deux autres, élués à pH 4,5 et 3,5, contiennent les IgG fixées à la protéine A. Les fractions récoltées dans ces deux pics ont été analysées par IDD et SDS-PAGE.

Les résultats obtenus par IDD (figure 4) montrent la présence d'une immunoglobuline de type IgG1 dans le pic élué à pH 4,5. L'autre contient une immunoglobuline de type IgG2a. La chaîne légère de ces deux immunoglobulines est de type k, tel que le démontre la présence d'un précipité avec l'antisérum anti-k (figure 4, III-h).

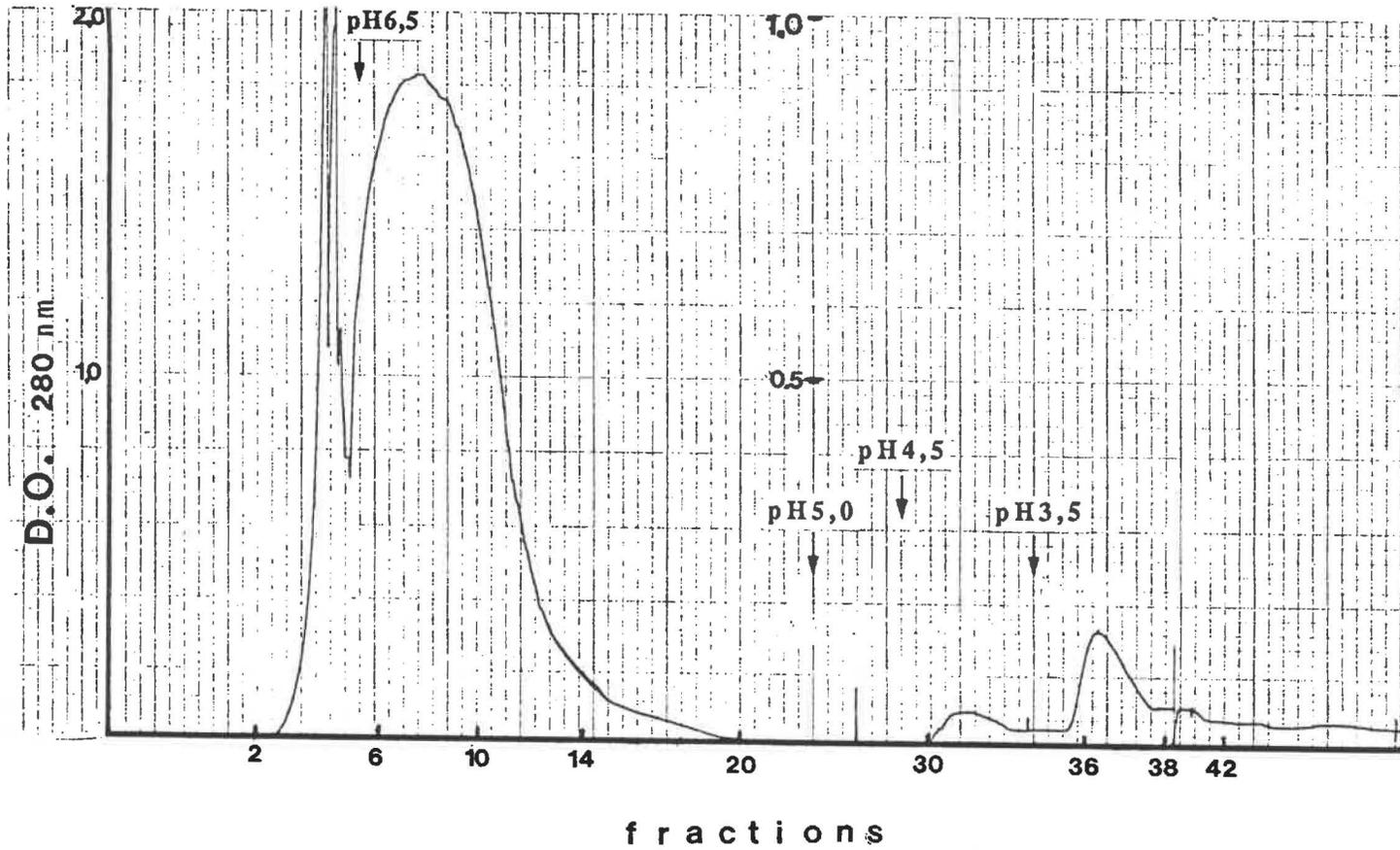
La pureté de l'IgG2a, correspondant à l'anticorps monoclonal D-89 a ensuite été vérifiée sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (figure 5, puits 4). On observe sur ce gel, en condition réductrice, deux bandes, une à 52K et l'autre à 28K approximativement, qui correspondent aux chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline. Aucune autre bande n'apparaît dans ces puits, confirmant ainsi la pureté des fractions récoltées à pH 3,5.

L'anticorps monoclonal purifié a été couplé ultérieurement au Sepharose activé au CNBr dans le but de purifier la protéine gp53 du virus BVD.

**Figure 3.** Purification de l'anticorps monoclonal D-89 par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A-Sépharose à partir de liquide d'ascite.

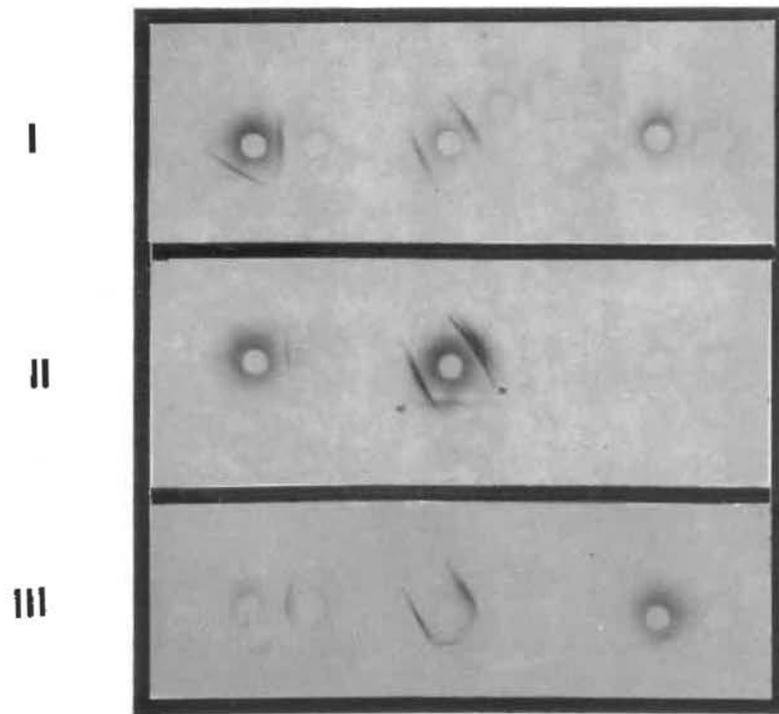
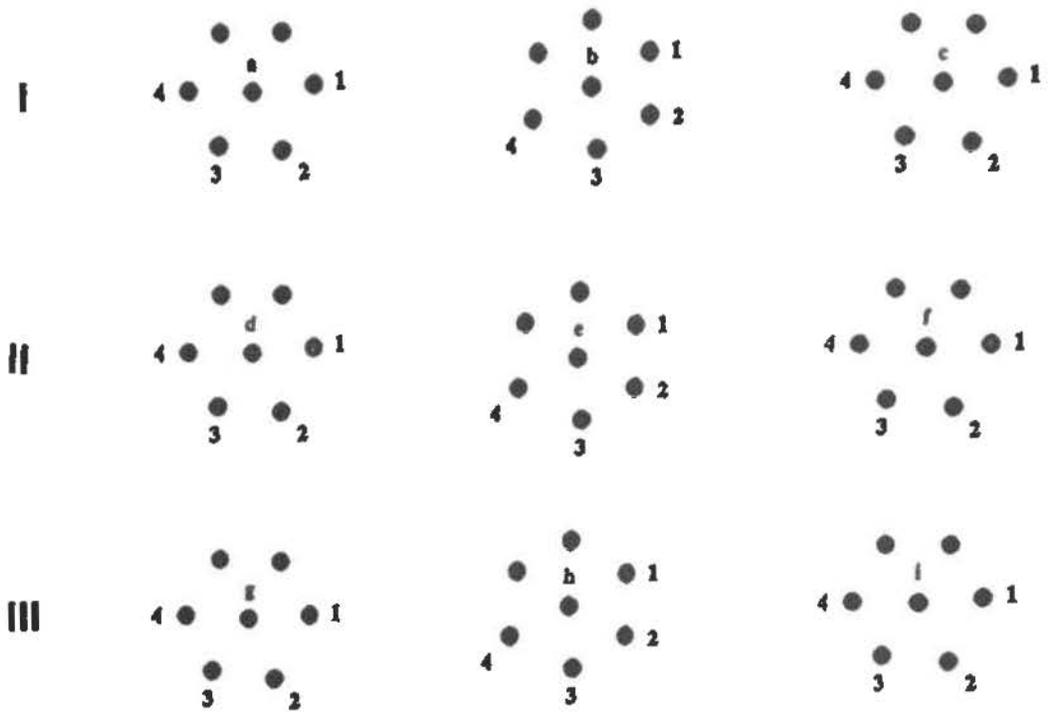
Sur le tracé obtenu avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 280 nm on peut observer 3 pics. Le premier, correspondant aux fractions 5 à 20, contient le matériel qui ne s'est pas fixé à la colonne. Les deuxième et troisième, correspondant aux fractions 30 à 34 et 36 à 38 respectivement, contiennent les IgG de souris (éluées à pH 4,5) et l'anticorps monoclonal (élué à pH 3,5).

# PURIFICATION DE L'ANTICORPS MONOCLONAL



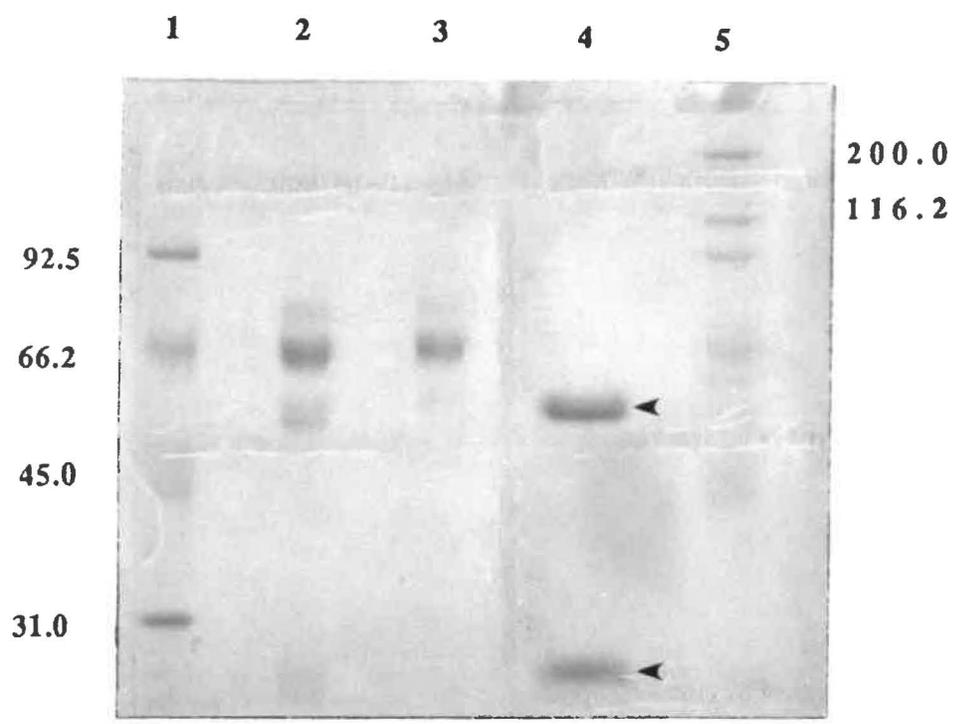
**Figure 4.** Analyse du liquide d'ascite et des pics obtenus après chromatographie d'affinité par immunodiffusion double.

Un volume de 10  $\mu$ l de chacun des échantillons a été déposé dans les puits autour d'un antisérum connu. 1 = liquide d'ascite de départ; 2 = fractions éluées à pH 5,0; 3 = fractions éluées à pH 4,5; 4 = fractions éluées à pH 3,5. Le typage a été réalisé en utilisant les antisérums suivants: a = anti-IgG1, b = anti-IgG2a, c = anti-IgG2b, d = anti-IgG3, e = anti-IgG, f = anti-IgA, g = anti-IgM, h = anti-k, i = anti- $\lambda$ .



**Figure 5.** Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS des fractions récoltées suite à la chromatographie d'affinité du liquide d'ascite.

Une concentration équivalente de protéine a été déposée dans chaque puits. Liquide d'ascite avant chromatographie (puits 2), matériel non fixé à la colonne élué à pH 6,0 (puits 3), fractions éluées à pH 3,5 contenant l'anticorps monoclonal purifié (puits 4). Le gel a été coloré au bleu de Coomassie. Les chiffres indiquent les poids moléculaires  $\times 10^3$  des standards (puits 1 et 5).



### **3. IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES**

#### **3.1 Marquage radioactif des protéines**

Les protéines virales provenant des cellules MDBK ou OK infectées avec la souche NADL du virus BVD ont été marquées à l'aide de <sup>35</sup>S-méthionine puis immunoprécipitées avec l'antisérum bovin anti-BVDV multivalent ou l'anticorps monoclonal D-89. L'autoradiographie obtenue suite à l'électrophorèse révèle la présence de plusieurs polypeptides viraux (figure 6). Avec l'antisérum bovin des protéines de poids moléculaires approximatifs de 120K, 80K, 64K, 53K et 38K ont été immunoprécipitées (figure 6, puits 2). Des résultats similaires ont été obtenus avec les deux types de cellules infectées à l'exception du fait que le polypeptide de 38K n'apparaît pas dans les cellules OK infectées (figure 6, puits 4). Les polypeptides de 80K et 53K semblent plus abondants que ceux de 64K et 38K. Quant à l'anticorps monoclonal D-89, il n'a immunoprécipité que la protéine de 53K (figure 6, puits 6), confirmant ainsi la spécificité de cet anticorps.

#### **3.2 Titrage de l'anticorps monoclonal par ELISA**

Deux tests ELISA, un direct et un indirect, ont été mis au point dans le but de déterminer la dilution optimale de l'anticorps monoclonal pour détecter la présence de l'antigène viral dans les fractions qui ont été récoltées subséquemment lors de la purification de la gp53.

##### **3.2.1 ELISA direct**

Un test ELISA direct a été mis au point pour détecter l'antigène viral en utilisant l'anticorps monoclonal D-89. La dilution de travail de l'anticorps

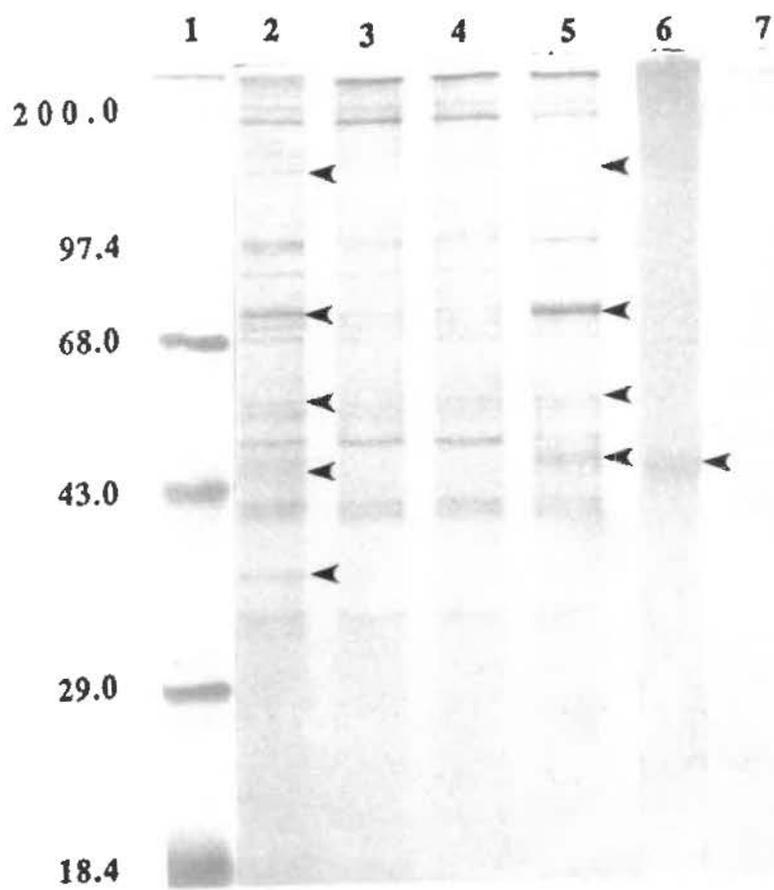
monoclonal a été déterminé à 1:2000 (figure 7). Pour déterminer le bruit de fond dans la réaction, l'anticorps a été remplacé par un sérum de souris normal, contrôle qui, à une dilution de 1:500, avait un D.O. de 0,2 approximativement.

### **3.2.2 ELISA indirect**

Un test ELISA indirect a aussi été développé, en utilisant l'antisérum bovin anti-BVDV multivalent pour fixer l'antigène viral. Une dilution de travail pour l'anticorps monoclonal de 1:1000 a été déterminée (figure 8). Le bruit de fond a été déterminé de la même façon que pour l'ELISA direct à 0,25.

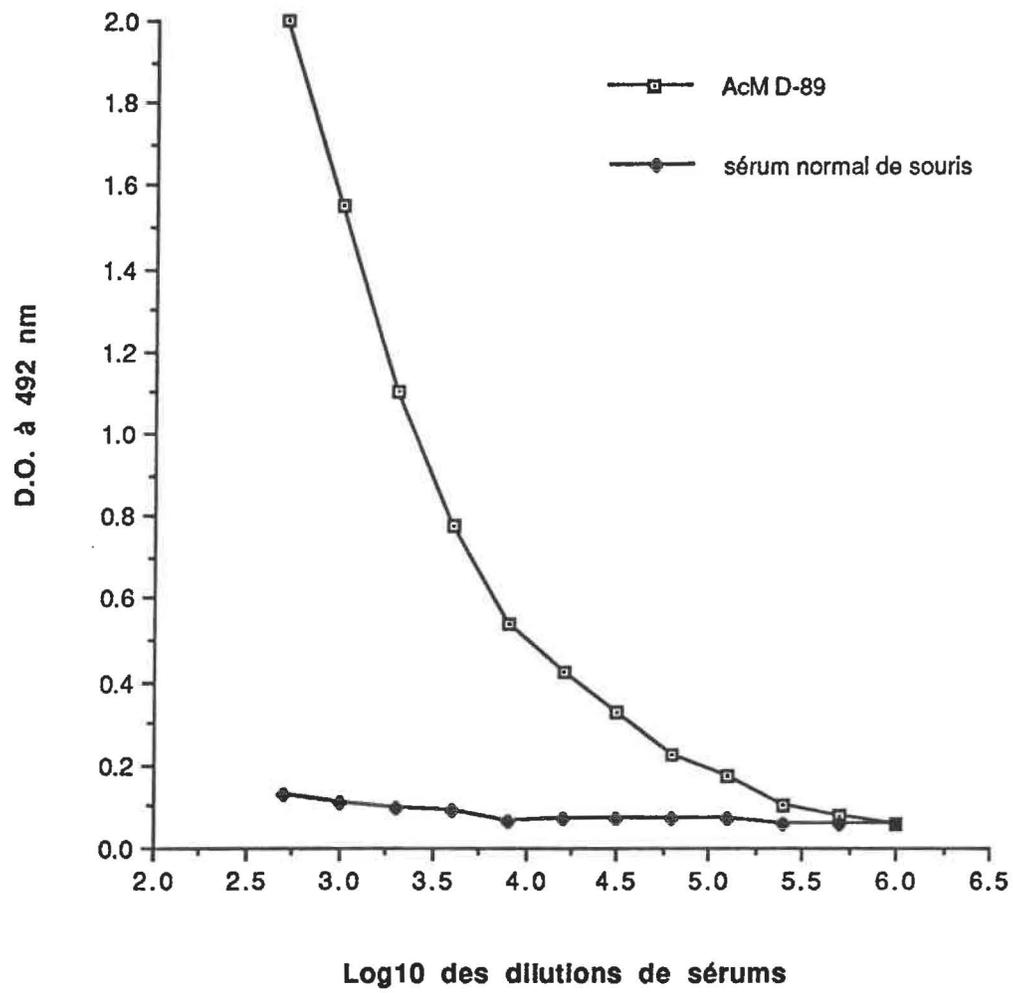
**Figure 6.** Immunoprécipitation des polypeptides de la souche NADL du virus BVD .

Les protéines de lysats cellulaires ont été marquées avec la  $^{35}\text{S}$ -méthionine et immuno-précipitées à l'aide de l'antisérum bovin anti-BVDV multivalent (puits 2 à 5) ou de l'anticorps monoclonal D-89 préparé contre le virus BVD (puits 6 et 7). Lysat de cellules MDBK infectées (puits 2 et 6); de cellules MDBK non-infectées (puits 3 et 7); de cellules OK infectées (puits 5) et de cellules OK non-infectées (puits 4). Les flèches indiquent les polypeptides viraux. Les poids moléculaires  $\times 10^3$  des marqueurs (puits 1) sont inscrits à la gauche.



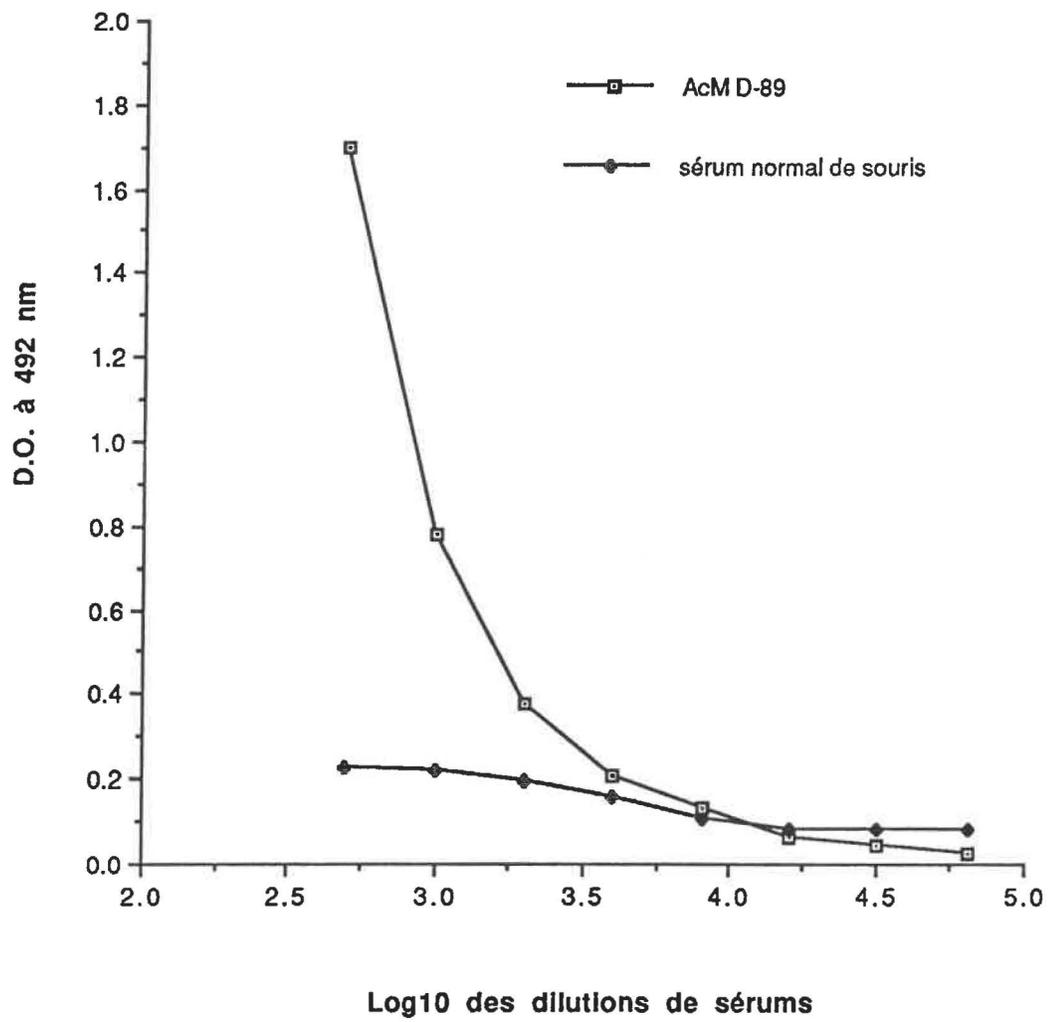
**Figure 7.** Titrage par ELISA direct de l'anticorps monoclonal D-89 anti-gp53.

Des plateaux de 96 puits ont été incubés avec une suspension de virus concentré. Ensuite les plateaux ont été incubés avec différentes dilutions de l'anticorps monoclonal sous forme de liquide d'ascite. La présence de l'antigène a été révélée à l'aide de l'antisérum anti-IgG de souris préparé chez le lapin et marqué à la peroxidase.



**Figure 8.** Titrage par ELISA indirect de l'anticorps monoclonal D-89 anti-gp53.

L'antisérum bovin anti-BVDV multivalent a été déposé dans des plateaux de 96 puits à une dilution de 1:400. Ensuite les plateaux ont été mis en contact avec une suspension virale concentrée. Après incubation, différentes dilutions de l'anticorps monoclonal sous forme de liquide d'ascite ont été testées. La présence de l'antigène viral a été révélée à l'aide de l'antisérum anti-IgG de souris préparé chez le lapin et marqué à la peroxidase.



## **4. PURIFICATION DE LA GP53**

### **4.1 Détermination de la spécificité de l'immunoabsorbant**

Une immunoprécipitation des antigènes viraux marqués à la  $^{35}\text{S}$ -méthionine a été réalisée avec l'immunoabsorbant. Sur la figure 9 on peut voir qu'un seul polypeptide de 53K approximativement a été immunoprécipité à partir des lysats de cellules MDBK infectées de même que de cellules OK infectées (figure 9, puits 2 et 5 respectivement). Aucun polypeptide a été immunoprécipité en utilisant des lysats de cellules non-infectées (figure 9, puits 3 et 4). Ces résultats démontrent la spécificité de l'immunoabsorbant pour la gp53.

### **4.2 Chromatographie d'affinité**

La purification de la protéine gp53 a été réalisée à partir de virus concentrés par ultracentrifugation et solubilisés avec le détergent NP-40. Un total de 80 fractions a été récolté suite au dépôt du matériel viral sur la colonne. Les protéines fixées spécifiquement à l'immunoabsorbant ont été éluées avec de l'iodure de sodium 3 M, qui a été ajouté à partir de la fraction 60. Les fractions 57 à 72 ont été analysées par ELISA afin de détecter la présence de l'antigène viral. Parmi celles-ci, seules les fractions 62 à 68 semblaient contenir l'antigène viral (figure 10).

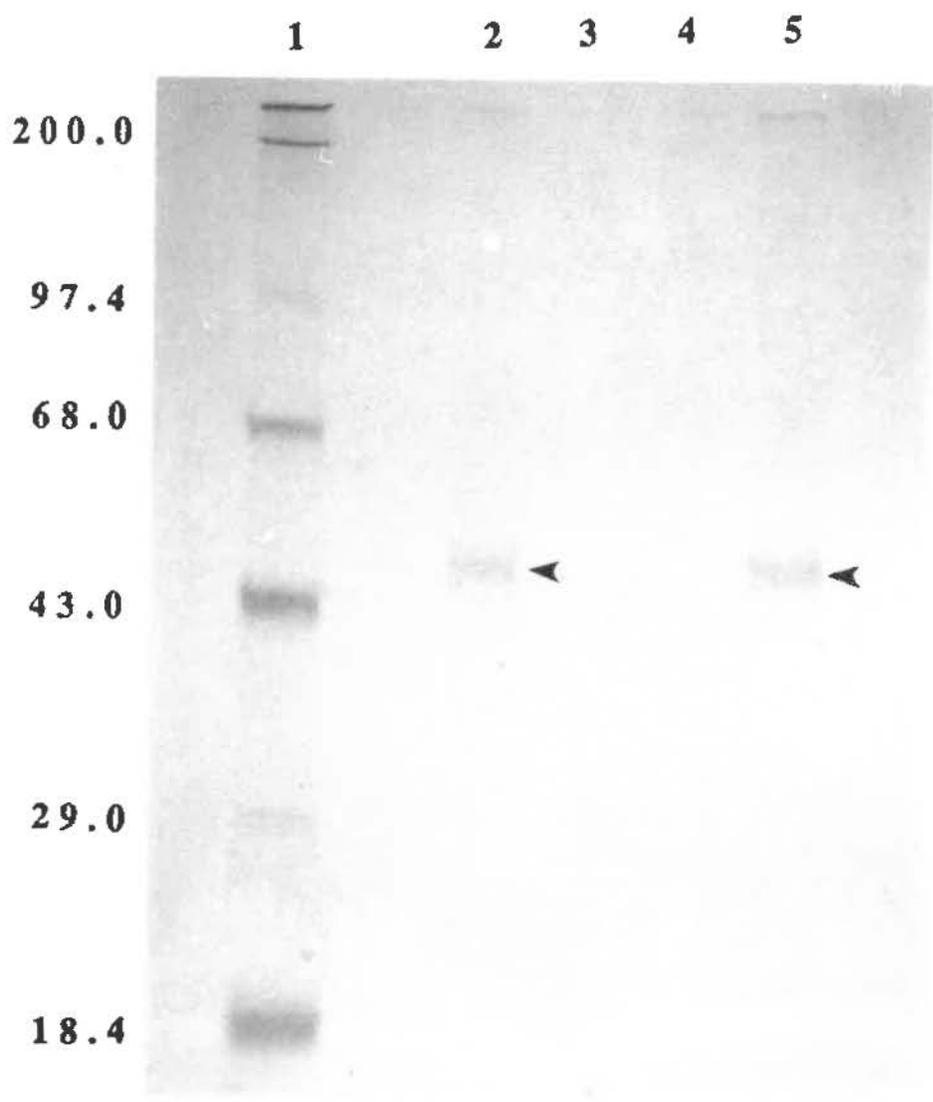
Les fractions 58, 62, 64 et 66 ont également été analysées par électrophorèse en présence de SDS. La coloration à l'argent du gel de polyacrylamide a révélé la présence d'un polypeptide, apparaissant comme un doublet de poids moléculaire d'environ 53-55K, dans les fractions 62, 64 et 66

testées (figure 11, puits 5, 6 et 7 respectivement). Dans la fraction 58, correspondant à une fraction éluée au dernier lavage, aucun polypeptide a été décelé (figure 11, puits 4).

En faisant un test ELISA direct, la protéine purifiée a été identifiée comme étant la gp53 puisque on a observé une réaction positive avec l'anticorps monoclonal D-89 (figure 12).

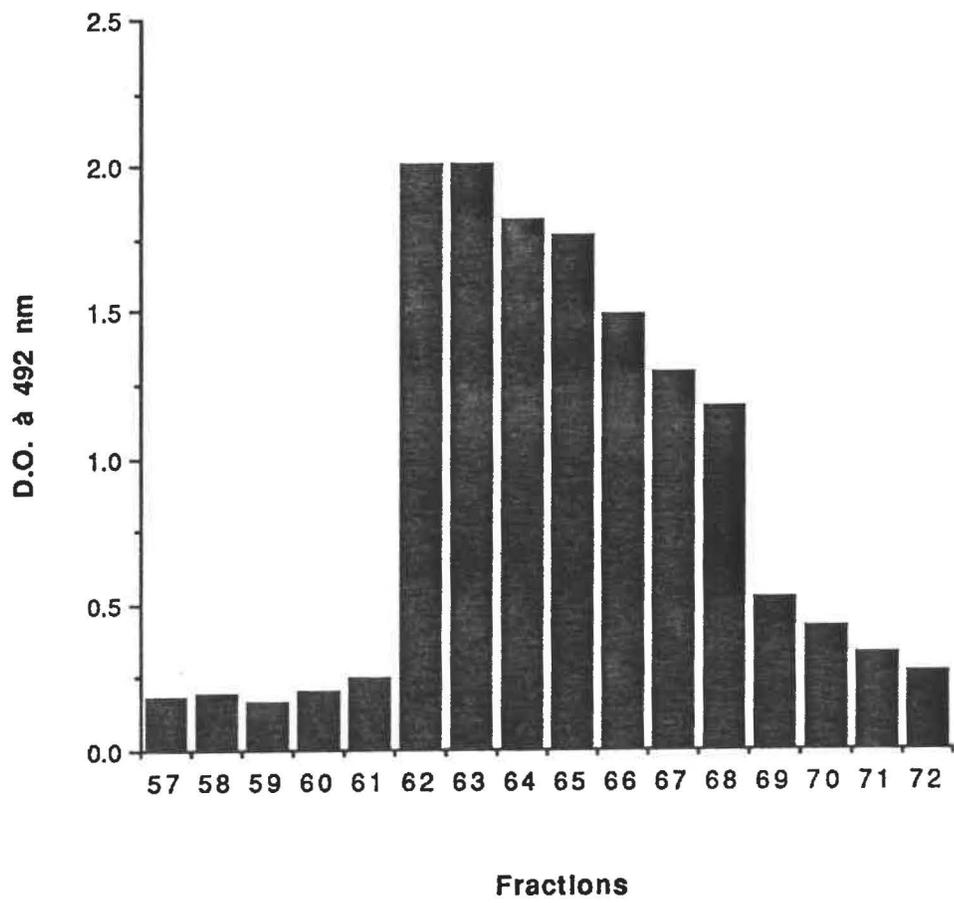
**Figure 9.** Détermination de la spécificité de l'immuno-adsorbant envers l'antigène viral.

Les protéines marquées à l'aide de  $^{35}\text{S}$ -méthionine proviennent de lysats de cellules MDBK (puits 2 et 3) ou de cellules OK (puits 4 et 5). Dans les puits 2 et 5 les cellules ont été infectées avec le virus BVD tandis que dans les puits 3 et 4 on retrouve des cellules non-infectées. Les flèches indiquent les polypeptides fixés à l'immunoadsorbant et élués avec le tampon d'électrophorèse. Les poids moléculaires  $\times 10^3$  des marqueurs (puits 1) sont indiqués à gauche.



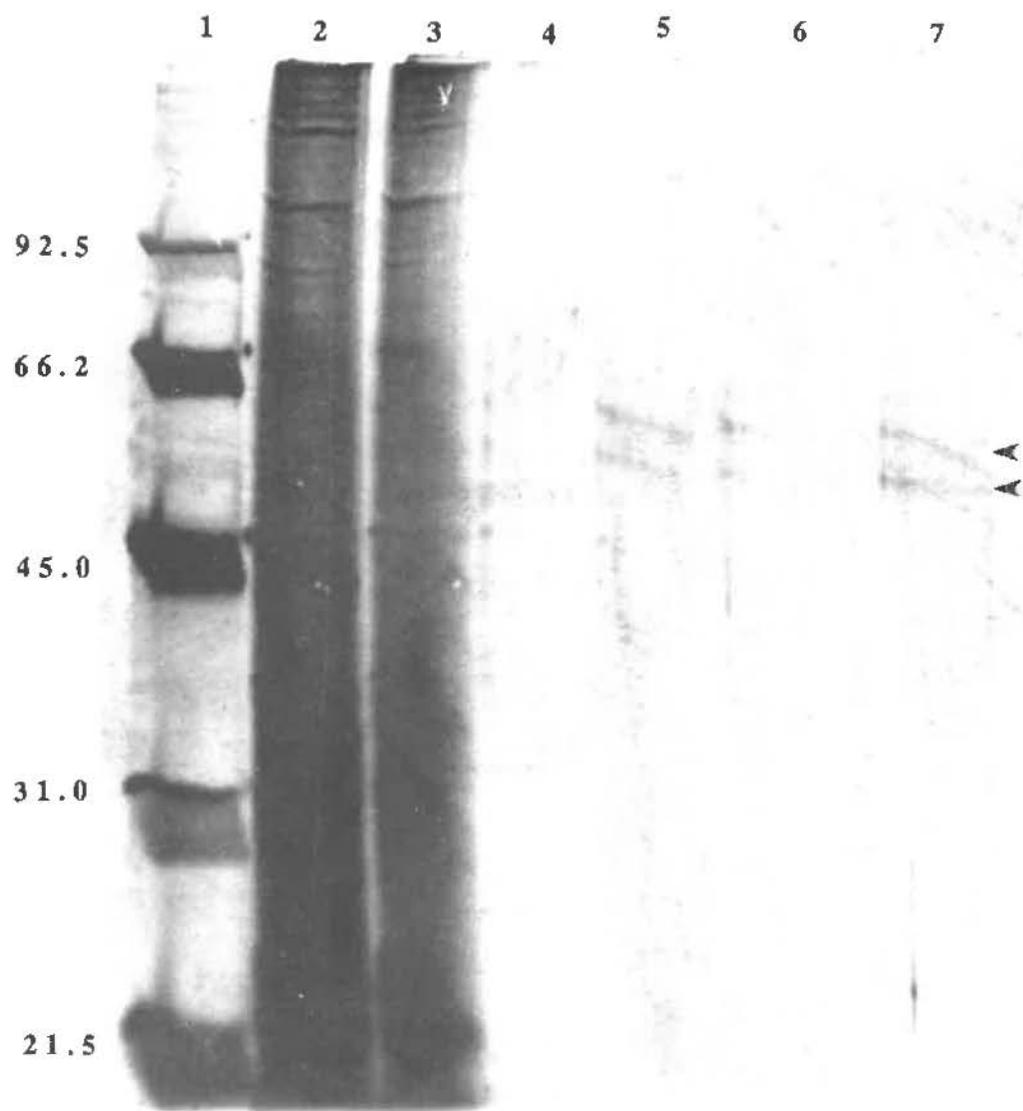
**Figure 10.** Analyse par ELISA indirect des fractions obtenues par chromatographie d'affinité de la souche NADL du virus BVD.

Des virus traités au NP-40 ont été mélangés avec du sépharose 4B activé au CNBr couplé à l'anticorps monoclonal purifié. Le matériel spécifiquement fixé à l'anticorps monoclonal a été élué avec de l'iodure de sodium 3 M à partir de la fraction 60. Les fractions obtenues par la suite ont été testées pour vérifier la présence de l'antigène viral. Un volume de 100 µl de chacune des fractions a été déposé dans des plateaux de 96 puits préalablement incubés avec l'antisérum bovin anti-BVDV multivalent. Une incubation avec l'anticorps monoclonal a été réalisée avant de révéler la présence de l'antigène viral à l'aide d'une anti-IgG de souris préparée chez le lapin et marquée à la peroxidase.



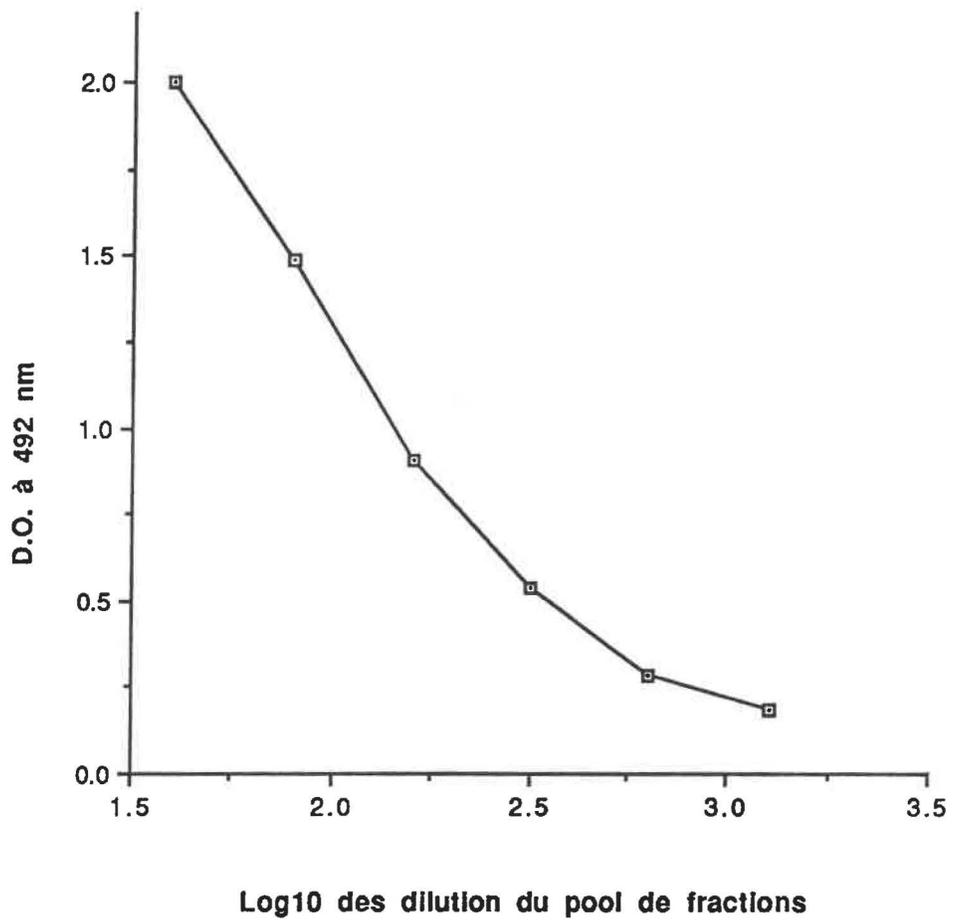
**Figure 11.** Analyse par SDS-PAGE des fractions obtenues par chromatographie d'affinité de la souche NADL du virus BVD.

Les échantillons ont été soumis à l'électrophorèse en conditions dénaturantes. Virus concentrés avant chromatographie (puits 2), matériel non fixé à la colonne (puits 3), fraction 58 (puits 4), fractions 62, 64 et 66 éluées avec iodure de sodium (puits 5, 6, et 7 respectivement). Les flèches indiquent la présence d'une protéine apparaissant comme un doublet de 53-55 K. Les poids moléculaires  $\times 10^3$  des marqueurs (puits 1) sont indiqués à gauche. Les protéines ont été révélées par coloration à l'argent.



**Figure 12.** Détermination par ELISA direct de la présence de la protéine gp53 dans un pool correspondant aux fractions 62 à 68 obtenues par chromatographie d'affinité.

Différentes dilutions du pool ont été déposées dans des plateaux de 96 puits. Après incubation avec une dilution 1:100 de l'anticorps monoclonal, la présence de l'antigène viral a été révélée à l'aide de l'antisérum anti-IgG de souris préparé chez le lapin et marqué à la peroxidase.



## 5. IMMUNISATION DES SOURIS

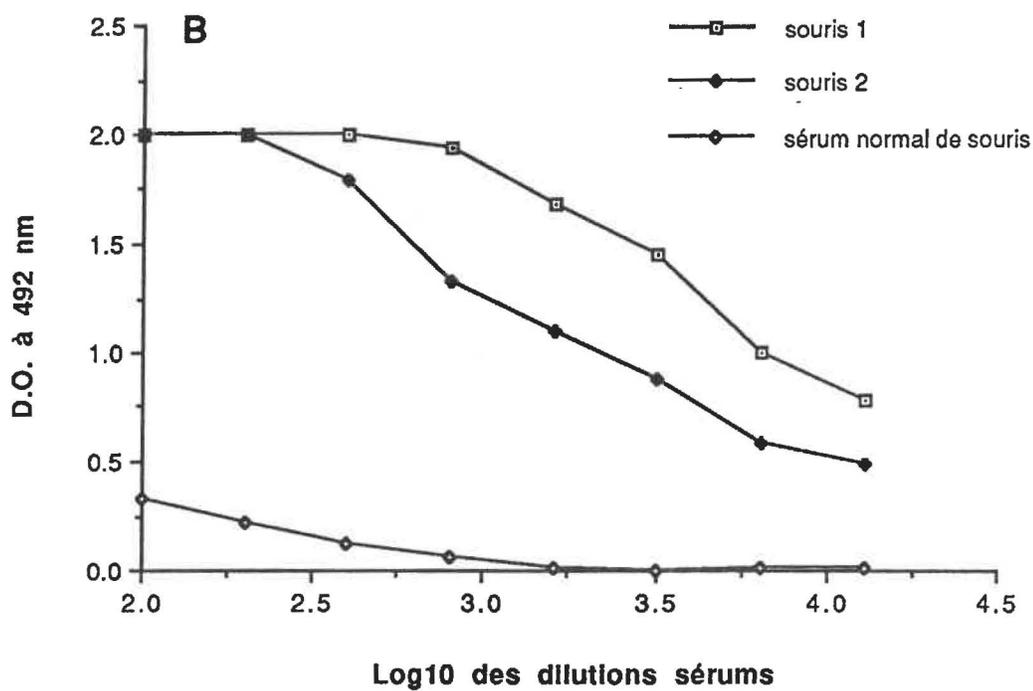
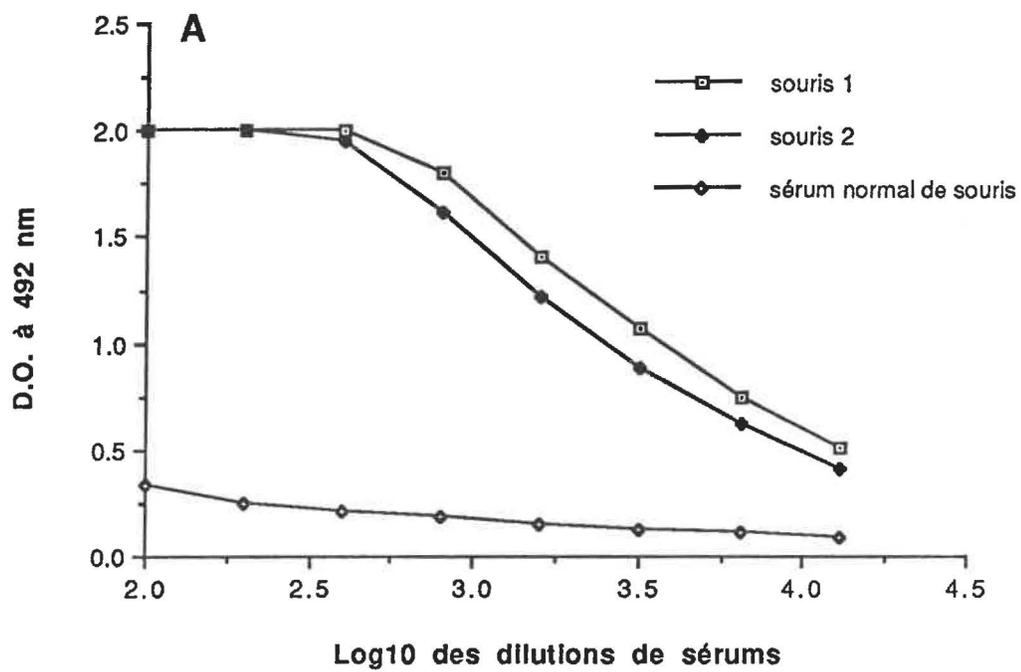
Deux souris BALB/c ont été inoculées avec la protéine gp53 purifiée. Au jour 30 suivant la première inoculation, le sérum des deux animaux a été récolté et testé par ELISA, afin de déterminer l'antigénicité de la protéine inoculée. Les graphiques de la figure 13 montrent que les deux souris ont produit des anticorps contre la gp53. En effet on observe une forte réaction entre les sérum des souris et l'antigène viral tant par la technique directe que par la technique indirecte (figure 13A et 13B respectivement). Toutefois aucun des deux sérums ne possède un pouvoir neutralisant. Même à une dilution de 1:40 du sérum aucune inhibition des 100 DCIT<sub>50</sub> du virus BVD n'a été observée.

Au jour 30 les souris ont reçu une dose de rappel et 18 jours plus tard, un des deux animaux a été saigné. Le sérum récolté fut analysé par immunoprecipitation. Une réaction avec une protéine d'environ 58K a été observée (figure 14, puits 5). Une protéine de poids moléculaire similaire a réagit avec l'anticorps monoclonal D-89 (figure 14, puits 4) alors qu'aucune bande n'est apparue lorsque le sérum de souris a été mis en contact avec les protéines provenant de cellules MDBK non-infectées (figure 14, puits 2). Le même sérum de souris a ensuite été analysé par immunoprécipitation. Une protéine ayant migrée comme un doublet de poids moléculaire entre 53-56K a été immunoprécipitée (figure 15, puits 2). Une réaction similaire a été observée avec l'antisérum bovin anti-BVDV multivalent (figure 15, puits 3). Avec les cellules non-infectées aucune protéine n'a été immunoprécipitée avec le sérum de la souris (figure 15, puits 4).

**Figure 13.** Détermination par ELISA de la présence d'anticorps anti-gp53 dans les sérums de souris obtenus 13 jours après la deuxième inoculation intrapéritonéal avec la protéine gp53 purifiée par chromatographie d'affinité.

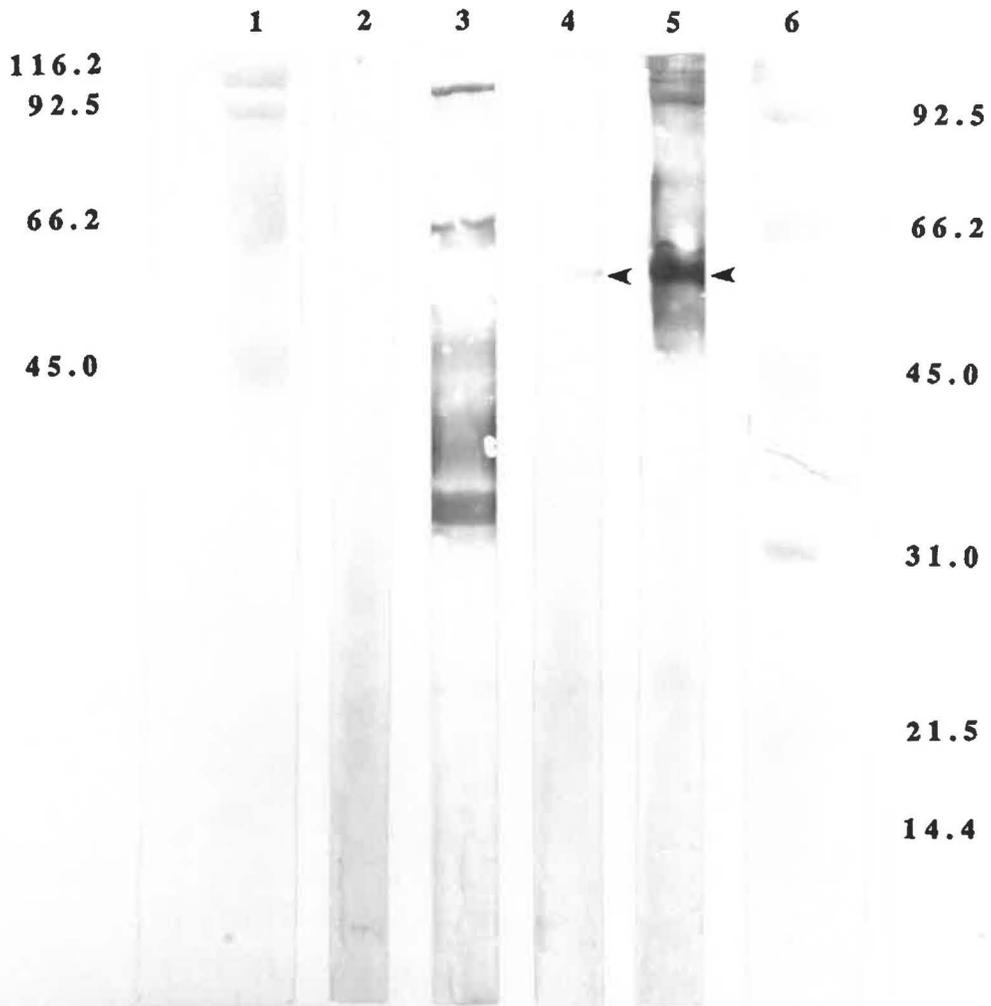
**A.** ELISA direct: Des plateaux de 96 puits ont été incubés avec une suspension de virus complets. Différentes dilutions des sérums provenant des souris inoculées ont été testées. La réaction a été révélée à l'aide d'une anti-IgG de souris préparée chez le lapin et marquée à la peroxidase.

**B.** ELISA indirect: Des virus complets ont été fixés dans des plateaux de 96 puits préalablement incubés avec l'antisérum bovin anti-BVDV multivalent. Différentes dilutions des sérums provenant des souris inoculées ont été testées et la réaction a été révélée à l'aide d'une anti-IgG de souris préparée chez le lapin et marquée à la peroxidase.



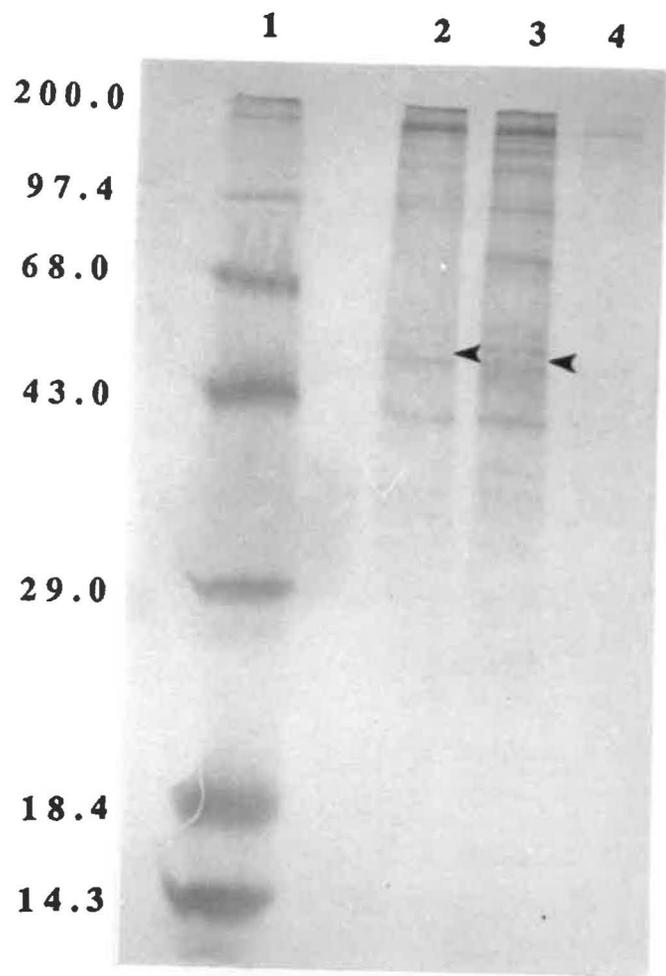
**Figure 14.** Immuno-empreinte de la protéine gp53 du virus BVD à l'aide du sérum produit chez la souris.

Les protéines des cellules infectées (puits 4 et 5) et des cellules non-infectées (puits 2 et 3), après séparation par électrophorèse, ont été transférées sur membranes de nitrocellulose. Ces dernières ont été incubées avec un antisérum anti-MDBK (puits 3), avec l'anticorps monoclonal D-89 (puits 4) ou avec une dilution 1:40 des sérums provenant des souris inoculées avec la gp53 purifié (puits 2 et 5). Les flèches indiquent les polypeptides viraux immunoprécipités. Les poids moléculaire des marqueurs (puits 1 et 6)  $\times 10^3$  sont indiqués.



**Figure 15.** Immunoprécipitation de la protéine gp53 du virus BVD avec le sérum des souris inoculées avec la gp53 purifiée par chromatographie d'affinité.

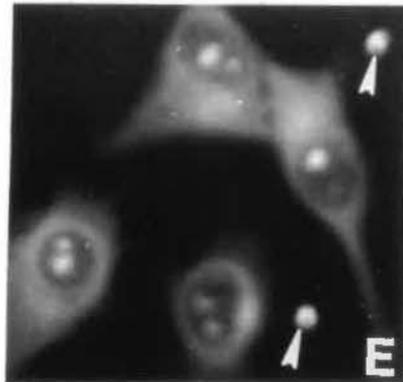
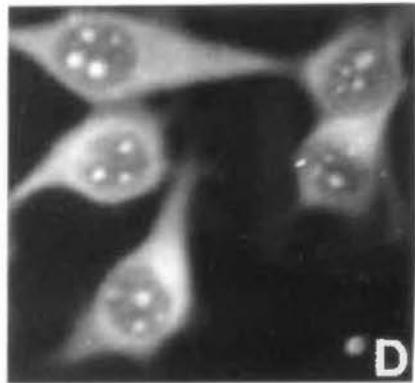
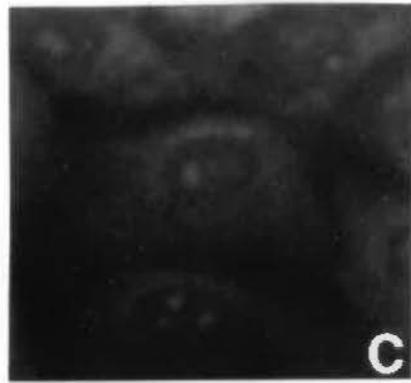
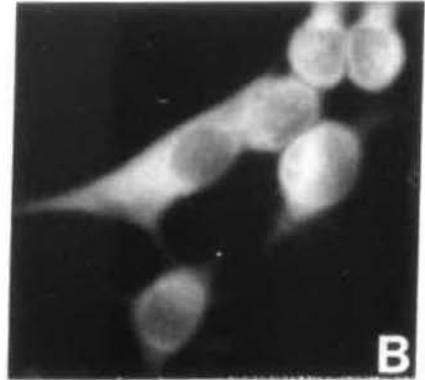
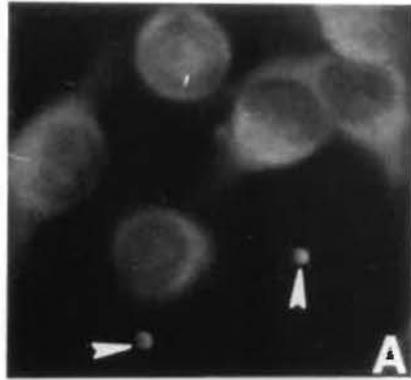
Des protéines provenant de lysats cellulaires infectés marqué à la  $^{35}\text{S}$  Méthionine (puits 2 et 3) et non-infectés (puits 4) ont été immunoprécipités avec les sérums des souris inoculées (puits 2 et 4) ou avec l'antisérum bovin anti-BVDV multivalent (puits 3). Les flèches indiquent la gp53 immunoprécipitée par le sérum de la souris et l'antisérum anti-BVDV dans les puits 2 et 3 respectivement. Les poids moléculaire des marqueurs (puits 1)  $\times 10^3$  sont indiqués à gauche.



Une analyse par immunofluorescence a permis de confirmer la présence d'anticorps dirigés contre les virus dans le sérum de souris (figure 16). Une fluorescence cytoplasmique similaire à celle obtenue avec l'anticorps monoclonal D-89 a été observée bien que des agrégats de fluorescéine soient visibles autant à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules.

**Figure 16.** Immunofluorescence des cellules MDBK non-infectées ou infectées avec les virus BVD-NADL.

La présence de l'antigène viral a été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal D-89 (B) ou à l'aide de l'antisérum anti-gp53 obtenu après inoculation des souris avec la gp53 purifiée (D et E). Dans les contrôles de cellules non-infectées aucune immunofluorescence apparaît (A et C). Les flèches indiquent une fluorescence non spécifique.



## **DISCUSSION**

Un des principaux problèmes dans l'étude de la biologie du virus BVD est son faible taux de multiplication *in vitro*, et conséquemment la manipulation de grands volumes de milieu de culture afin d'obtenir une quantité suffisante de virus. À ceci s'ajoute la fragilité du virus, tel que démontré par les études en microscopie électronique et lors de la purification du virus où la fragilité de l'enveloppe virale de même que la présence de protéines d'origine cellulaire et de fragments de membranes associés aux virions ont été mis en évidence (Schlesinger, 1980).

La multiplication du virus est généralement réalisée dans des cellules d'origine bovine. Parmi celles-ci, les cellules MDBK sont les plus couramment utilisées. Cependant il est toujours possible que les cellules utilisées pour la multiplication virale soient contaminées par du virus BVD (Nuttall *et al.*, 1977). Dans le but d'obtenir un titre infectieux plus élevé et de minimiser les probabilités d'avoir un virus endogène, les cellules de reins d'agneaux (OK) ont également été utilisées dans la présente étude. Toutefois aucune différence n'a été observée entre les deux types de cellules infectées dans des conditions similaires, à l'exception du fait que l'effet cytopathique apparaissait plus tôt dans les cellules OK, possiblement à cause de leur plus grande permissivité. Horzinek (1981) a rapporté que la cytopathogénicité chez les *Pestivirus* est une caractéristique qui dépend autant des facteurs génétiques du virus que du type de cellule infectée. Malgré les études réalisées dans le but d'améliorer la croissance virale, aucun résultat satisfaisant n'a été obtenu jusqu'à ce jour.

L'importance biologique de la glycoprotéine majeure de l'enveloppe du virus BVD, la gp53, a été démontrée lors de la neutralisation *in vitro* de l'infectivité

virale par des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre cette protéine (Magar *et al.*, 1988; Bolin *et al.*, 1988; Donis *et al.*, 1988). Toutefois, nos connaissances sur le rôle de la gp53 s'arrêtent là.

Dans le but de mieux caractériser la glycoprotéine de l'enveloppe du virus BVD, cette dernière a été purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant l'anticorps monoclonal D-89 qui lui est spécifique. Le choix de cette technique est justifié par la faible quantité de protéines produites par le virus, la co-migration de protéines cellulaires et la disponibilité d'un anticorps monoclonal spécifique pour la gp53 ayant un pouvoir neutralisant. De plus, l'utilisation de la chromatographie d'affinité, rapportée dernièrement pour la purification de la glycoprotéine E1 du virus HCV, un virus apparenté au BVDV, s'avérait intéressante (Wensvoort *et al.*, 1990).

Dans le processus de purification de la gp53, la première étape à franchir a été la purification de l'anticorps monoclonal D-89 à partir du liquide d'ascite. La purification des différentes immunoglobulines est réalisée couramment en utilisant la chromatographie d'affinité avec la protéine A-Sépharose (Ey *et al.*, 1978). Cette technique nous a permis d'obtenir une IgG2a pure et fonctionnelle, étant donné que la dénaturation des déterminants antigéniques dû au clivage protéolytique ou à l'acidité du tampon d'élution a été minimisée en effectuant la séparation à 4°C et ajustant à pH 7,0 les fractions récoltées immédiatement après leur élution. L'anticorps monoclonal ainsi purifié fut couplé au Sépharose 4B activé au CNBr, constituant de cette façon l'immunoabsorbant.

Le marquage des protéines virales à l'aide de la <sup>35</sup>S-méthionine a été réalisé afin de déterminer la spécificité de l'immunoabsorbant. De plus, la

possibilité d'utiliser les antigènes viraux marqués pour retracer la protéine gp53 dans les fractions récoltées pendant la chromatographie a été envisagée. Même si on pouvait s'attendre à une meilleure incorporation de matériel radioactif dans les protéines virales dans les cellules OK infectées, aucune différence significative n'a été observée comparativement aux résultats obtenus avec les cellules MDBK infectées. En outre l'incorporation de matériel radioactif dans les protéines virales a été masquée par un marquage important des protéines cellulaires et ce, dans les deux lignées cellulaires. Le virus ne semble donc pas induire un arrêt ("shut off") important des synthèses de l'hôte, tel qu'on peut l'observer avec les picornavirus par exemple.

Par immunoprécipitation à l'aide de l'antisérum bovin anti-BVDV multivalent, des polypeptides de 120K, 80K, 65K, 53K et 38K ont pu être identifiés dans les lysats de cellules MDBK infectées et marquées 20h p.i. avec la <sup>35</sup>S-méthionine. Les mêmes polypeptides ont aussi été identifiés dans les lysats de cellules OK, à l'exception de celui de 38K. Ces polypeptides ont été rapportés par Magar *et al.* (1988) bien que la présence de deux protéines supplémentaires, ayant un poids moléculaire de 47 et 26K ait aussi été soulignée. Ces derniers n'apparaissent toutefois qu'en très faible quantité et seulement après une exposition prolongée des films. Ceci pourrait s'expliquer par leur niveau de synthèse réduit ou par leur faible antigénicité, ce qui rend difficile leur détection par immunoprécipitation.

Suite à l'obtention d'un marquage acceptable de la gp53, la spécificité de l'immunoabsorbant a pu être confirmée. En effet, seul un polypeptide d'environ 53K a été précipité à partir des lysats de cellules infectées. Aucun polypeptide n'a

été précipité en utilisant des cellules non-infectées. Toutefois le signal de détection obtenu pourrait possiblement être augmenté en utilisant la <sup>35</sup>S-cystéine puisque cet acide aminé se retrouve en plus grand nombre que la méthionine dans la séquence d'acides aminés déterminée par Collett *et al* (1988b; 1988c).

Le choix d'un tampon approprié pour l'élution des protéines fixées lors de la chromatographie d'affinité est très important pour préserver la fonction biologique du produit purifié. La dissociation du complexe antigène-anticorps est généralement obtenue à pH acide (Hudson et Hay, 1976) ou en utilisant certains ions chaotropiques comme le thiocyanate, le perchlorate ou l'iodure (Dandlinker *et al.*, 1967). Wensvoort *et al.* (1990) ont rapporté l'utilisation de diéthanolamine dans le tampon d'élution pour la purification de la protéine E1 du HCV. Ce produit a donc été testé, en plus de l'iodure de sodium (qui est un ion moins fort que les perchlorates ou les thiocyanates) en vue d'éluer la protéine gp53 de l'immunoabsorbant. L'utilisation de l'iodure de sodium à une concentration 3 M s'est toutefois avérée plus efficace pour dissocier le complexe antigène-anticorps.

La détection de l'antigène viral dans les fractions récoltées n'a pas été possible en utilisant les protéines marquées radioactivement, puisque le pic obtenu était trop étendu. Il était donc difficile de sélectionner les fractions contenant la protéine purifiée. Même si le radiomarquage n'a pu être utilisé pour retracer la protéine, il a quand même été très utile pour vérifier la spécificité de l'immunoabsorbant.

Dû aux difficultés rencontrées dans l'élution des protéines radiomarquées, un test ELISA a été mis au point pour retracer la protéine après la

chromatographie. Là aussi toutefois, des problèmes sont apparus. Ainsi des réactions non-spécifiques ont rendu nécessaire plusieurs changements afin d'obtenir un test spécifique pour détecter l'antigène viral. Les différences obtenues avec les deux approches, ELISA direct et ELISA indirect, pourraient s'expliquer par le fait que dans le cas du test indirect, l'utilisation de l'antisérum bovin multivalent pour fixer l'antigène viral diminue les réactions non-spécifiques qui peuvent être plus élevées lorsque l'antigène viral semi-purifié est fixé directement au fond du plateau, amenant ainsi une diminution de la densité optique.

Les fractions éluées qui sont apparues positives en ELISA ont également été vérifiées par SDS-PAGE. Ceci a permis de confirmer la présence d'une protéine d'environ 53-55K dans les fractions sélectionnées par ELISA. Cette protéine a migré sous forme de doublet tel qu'il a été rapporté dans la littérature par plusieurs auteurs. Donis et Dubovi (1987b) ont démontré que la déglycosylation d'un polypeptide de 56-58K, correspondant à la gp53 du virus BVD, résulte en l'apparition d'un seul polypeptide de 52K. Ils suggèrent la présence de trois à cinq chaînes polyosidiques attachées au polypeptide. La migration sous forme de doublet, sur gel de polyacrylamide, pourrait donc s'expliquer par la variation du nombre de sucres, d'une protéine à l'autre. Cette hétérogénéité de la masse moléculaire de la glycoprotéine de l'enveloppe a aussi été rapportée par Magar *et al.* (1988) de même que par Bolin *et al.* (1988). Ces derniers auteurs lui ont toutefois attribué une masse moléculaire de 56 Kilodaltons. Wensvoort *et al.* (1990) ont eux aussi conclu suite à leurs travaux de purification de la protéine E1 du HCV, que la protéine de l'enveloppe chez les *Pestivirus* est hétérogène, ayant une masse moléculaire variant entre 51 et 58

Kilodaltons.

L'inoculation des souris avec la protéine gp53 purifiée a démontré l'antigénicité de cette protéine puisque les sérums obtenus possédaient un titre très élevé en ELISA. Malgré cela aucun des deux sérums n'a montré un effet neutralisant sur l'infection virale *in vitro*. Étant donné que la plupart des épitopes impliqués dans la neutralisation virale sont de type conformationnel, un changement structural de la glycoprotéine lors de sa purification pourrait expliquer l'absence d'anticorps neutralisant dans les sérums des souris inoculées. Une présentation différente de l'antigène, par rapport à son état natif ancré dans la membrane, pourrait aussi expliquer en partie les résultats obtenus.

Même si, à partir de la connaissance actuelle de la structure de la glycoprotéine de l'enveloppe des *Pestivirus*, la possibilité de trouver des séquences linéaires ayant une importance immunogénique est peu probable, il est possible que certaines régions contre lesquelles des anticorps non-neutralisants ont été produits (Donis *et al.*, 1988; Moennig *et al.*, 1989) pourraient être impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire pendant l'infection virale. En effet les épitopes n'induisant pas d'anticorps neutralisants *in vitro* peuvent quand même être importants dans la réponse immunitaire cellulaire tel qu'il a été rapporté pour d'autres virus (Schwartz, 1986).

Lorsque le sérum provenant de souris inoculées a été analysé par immuno-empreinte, un polypeptide d'environ 58K a été décelé. Ce résultat confirme que les souris ont bien été inoculées avec l'antigène viral purifié, puisqu'aucun polypeptide n'ait apparu suite à l'incubation en présence des sérums des membranes sur lesquelles les protéines cellulaires ont été

transférées. Les sérums ont aussi été testés par immunoprécipitation, ce qui a démontré la présence d'un doublet au même niveau que celui qui est apparu avec l'antisérum bovin anti-BVDV, soit approximativement 53-55K.

L'utilisation de l'anticorps monoclonal D-89, spécifique pour la gp53, a permis de visualiser cet antigène viral par immunofluorescence dans les cellules infectées. Une fluorescence distribuée principalement dans le cytoplasme a été observée par Magar (1988). Un patron de fluorescence similaire a été obtenu en utilisant le sérum des souris inoculées avec la gp53 purifiée bien que des points fluorescents ont aussi été observés au niveau du noyau. Même si une fluorescence nucléaire a été rapportée précédemment par Fernelius (1969), on a considéré les points observés comme non-spécifiques, puisque des granules de fluorescéine identiques ont été observés à l'extérieur des cellules.

Suite au succès obtenu dans la purification de la glycoprotéine gp53, il serait intéressant de séquencer les extrémités de ce polypeptide afin de trouver sa localisation précise dans le génome viral. De plus dû aux difficultés d'obtenir de grandes quantités de protéine purifiée, l'expression de la gp53 dans un vecteur eucaryotique, représenterait une alternative pour l'obtention de cet antigène viral et son utilisation à des fins de diagnostique ou pour son utilisation dans les études portant sur le pouvoir immunogénique de la protéine *in vivo*. La production de peptides synthétiques utilisables dans un éventuel vaccin sous-unitaire, constitue une autre avenue intéressante à envisager.

## **CONCLUSION**

La glycoprotéine majeure de l'enveloppe du virus BVD, la gp53, a été purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant l'anticorps monoclonal D-89 à partir de virus concentrés par ultracentrifugation et solubilisés. La méthode utilisée pour la purification s'est avérée appropriée bien que seulement une faible quantité de protéine ait été obtenue. Une amélioration de la multiplication virale de même qu'un changement dans les conditions d'élution de la protéine pourraient augmenter le rendement de la purification.

Le titre élevé des sérums de souris inoculées avec la protéine purifiée a confirmé l'antigénicité de cette protéine. Malgré ceci une neutralisation de l'infection virale par les sérums n'a pas été observée. Ceci pourrait s'expliquer par une présentation différente de la protéine seule par rapport à sa forme native ancrée dans la membrane ou encore par des changements conformationnels subis par la protéine lors de sa purification.

Suite aux résultats obtenus, le séquençage des extrémités de la gp53 serait à envisager. Ceci pourrait permettre sa localisation directe dans le génome virale. D'autre part, l'obtention d'antigènes viraux purifiés et de peptides synthétiques pourrait amener le développement de nouveaux outils de diagnostique et la détermination précise du rôle immunitaire de la gp53 pendant l'infection virale *in vivo*.

Pour ce qui est de la multiplication du virus *in vitro*, aucune différence significative entre le deux types de lignées cellulaires utilisés n'a été observée. Les études de croissance virale devront donc se poursuivre afin de trouver des meilleures conditions et/ou des lignées cellulaires supportant mieux la

multiplication virale.

## REMERCIEMENTS

Je veux adresser mes remerciements les plus sincères au docteur Jacqueline Lecomte, pour avoir accepté la direction de mes travaux et je désire lui témoigner ma profonde gratitude pour son intérêt, ses conseils et sa disponibilité.

Je voudrais également remercier le personnel technique du laboratoire, mesdames Denise McSween, Hélène Drolet et Nicole Gagnon, pour leur disponibilité et leur support technique.

Je veux remercier d'un façon particulière mon collègue et ami Joël Heppell pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce mémoire. J'aimerais remercier aussi Esther Tarrab pour ses encouragements et amitié.

Finalement, je tiens à souligner ma gratitude envers tous les membres du personnel et les étudiants du centre de recherche en virologie pour avoir agrémente mon séjour à l'Institut Armand-Frappier.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- AMES, T.R. 1986. The causative agent of BVD: its epidemiology and pathogenesis. *Veterinary Medicine*. **81**: 848-869.
- AKKINA, R.K. 1991. Pestivirus bovine viral diarrhea virus polypeptides: identification of new precursor proteins and alternative cleavage pathways. *Virus Research*. **19**: 67-82.
- BAKER, J.C. 1987. Bovine viral diarrhea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**: 1449-1458.
- BARLOW, R.M., P.F. NETTLETON, A.C. GARDINER, A. GREIG, J.R. CAMPBELL et J.M. BONN. 1986. Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull. *Vet. Rec.* **118**: 321-324.
- BAZAN, J.F. et R.J. FLETTERICK. 1989. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology*. **171**: 637-639.
- BIELEFELDT OHMANN, H. 1990. Electron microscopy of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.* **9**: 61-73.
- BIELEFELDT OHMANN, H. et B. BLOCH. 1982. Electron microscopic studies of bovine viral diarrhea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. *Arch Virol.* **71**: 57-74.
- BLOOD, D.C., O.M. RADOSTITS et J.A. HENDERSON. 1983. *Veterinary Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. London: Bailliere Tindall. 754-761.
- BOLIN, S.R. 1990. Control of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.* **9**: 163-171.
- BOLIN, S.R., A.W. MCCLURKIN et M.F. CORIA. 1985a. Effects of bovine viral diarrhea virus on the 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 et M.F. CORIA. 1985b. Frequency of persistent bovine viral diarrhea virus infection in selected cattle herds. *Am. J. Vet. Res.* **46**: 2385-2387.

- BOLIN, S.R., A.W. MCCLURKIN, R.C. CUTLIP et M.F. CORIA. 1985c. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* **46**: 573-576.
- BOLIN, S.R., V. MOENNIG, N.E. KELSO GOURLEY et J. RIDPATH. 1988. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups. *Arch. Virol.* **99**: 117.
- BROCK, K.V. et L.N.D. POTGIETER. 1990. Detection of bovine viral diarrhea virus in serum from cattle by dot blot hybridization assay. *Vet. Microbiol.* **24**: 297-306.
- BROWN, F. 1986. The classification and nomenclature of viruses: Summary of results of meeting of the international committee on taxonomy of viruses in Sendai, September 1984. *Intervirology* **25**: 141-143.
- BROWNLIE, J., M.C. CLARKE et 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, et D.H. POCOCK. 1987. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rec. Vet.* **18**: 157-166.
- CHASEY, D. et P.L. ROEDER. 1981. Virus-like particles in bovine turbinate cells infected with bovine virus diarrhoea mucosal disease virus. *Arch. Virol.* **67**: 325-332.
- CHERNEFATU, P.P., D.E. TYLER et F.K. RAMSEY. 1967. Characteristics of a condition following vaccination with bovine virus diarrhea vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **150**: 46-52.
- CHONG, P. et S. GILLAM. 1985. Purification of biologically active rubella virus antigens by immunoaffinity chromatography. *J. Virol. Meth.* **10**: 261-268.
- CHU, H.J. et 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 et K. DAI. 1985. Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus specific antibodies using recombinant antigen and monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* **10**: 325-333.
- COLLETT, M.S., D.K. ANDERSON et E. RETZEL. 1988a. Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J. gen. Virol.* **69**: 2637-2643.
- COLLETT, M.S., R. LARSON, C. GOLD, D. STRICK, D.K. ANDERSON, et A.F. PURCHIO. 1988b. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **165**: 191-199.
- COLLETT, M.S., R. LARSON, S.K. BELZER et E. RETZEL. 1988c. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**: 200-208.
- COLLETT, M.S., V. MOENNIG et M.C. HORZINEK. 1989. Recent advances in pestivirus research. *J. gen. Virol.* **70**: 253-266.
- CORIA, M.F. et A.W. McCLURKIN. 1987. Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **172**: 449-451.
- CORIA, M.F., M.J.F. SCHMERR et A.W. McCLURKIN. 1983. Characterization of the major structural proteins of purified bovine viral diarrhea virus. *Arch. Virol.* **76**: 335-339.
- DALE, B., R.T. WHITE et B.L. CORDELL. 1987. Bovine virus diarrhea and hog cholera vaccines. European Patent Application number 87103218.1. 16 september 1987.
- DANDLINKER, W.B., R. ALONSO, V.A. de SAUSSURE, F. KIERZENBAUM, S.A. LEVINSON et H.C. SHAPIRO. 1967. The effect of chaotropic ions on the dissociation of antigen-antibodies complexes. *Biochemistry* **6**: 1460.
- DE MOERLOOZE, L., M. DESPORT, A. RENARD, C. LECOMTE, J. BROWNLIE et 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.

- DIDERHOLM, H. et Z. DINTER. 1966. Interference between strains of bovine virus diarrhea and their capacity to suppress interferon of a heterologous virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**: 976-980.
- DONIS, R.O. et E.J. DUBOVI. 1987a. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhea-mucosal disease virus. *Virology* **158**: 168-173.
- DONIS, R.O. et 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. et E.J. DUBOVI. 1987c. Characterization of bovine viral diarrhoea mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *J. gen. Virol.* **68**: 1597-1605.
- DONIS, R.O., W. COPARI et E.J. DUBOVI. 1988. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhea virus bind to the 56K and 58K glycoprotein. *J. gen. Virol.* **69**: 77-86.
- DUFFELL, S.J. et J.W. HARKNESS. 1985. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* **117**: 240-245.
- DUFFELL, S.J., M.W. SHARP, C.E. WINKLER, S. TERLECKI, C. RICHARDSON, J. T. DONE, P.L. ROEDER et 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., M.W. SHARP et D. BATES. 1986. Financial loss resulting from BVD-MD virus infection in a dairy herd. *Vet. Rec.* **118**: 38-39
- DOYLE, L.G. et H.P. HEUSCHELE. 1983. Bovine viral diarrhea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. med. Assoc.* **183**: 1257-1259.
- EDWARDS, S. et J.J. SANDS. 1990. Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia using monoclonal antibodies. *Dtsch. Tierarztl. Wochenscher.* **97**: 79-81.
- EDWARDS, S., J.J. SANDS et J.W. HARKNESS. 1988. The application of monoclonal antibodies panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Arch. Virol.* **102**: 197-206

- EDWARDS, S., V. MOENING et G. WENSVOORT. 1991. The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for differentiation of a hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microbiol.* **29**: 101-108.
- ERNST, P.B. et D.G. BUTLER. 1983. A BVD calfhood vaccination trial in a persistently infected herd: effects on titres, health, growth. *Can. J. Comp. Med.* **47**: 118-123.
- EY, P.L., S.J. ROWSE et C.R. JENKIN. 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* **15**: 429-436.
- FERNELIUS, A.L. 1969. Characterization of bovine viral diarrhea viruses. IV. Sequential development of BVD viral antigen in cell culture studied by immunofluorescence. *Arch. ges. Virusforsch.* **27**: 1-12.
- FERNELIUS, A.L., W.C. AMTOWER, G. LAMBERT, A.W. McCLURKIN et P.J. MATTHEWS. 1973. Bovine viral diarrhea virus in swine: Characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. *Can. J. Comp. Med.* **37**: 13-20.
- FRANCKI, R.I.D., C.M. FAUGUET, D.L. KNUDSON et F. BROWN. 1991. Classification and nomenclature of viruses, fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Supplementum* **2**: 223-229.
- GARDINER, A.C. et R.M. BARLOW. 1972. Experiments in border disease. III. Some epidemiological consideration with reference to the experimental disease. *J. Comp. Pathol.* **82**: 29-35.
- GARDINER, A.C. et R.C. BARLOW. 1981. Vertical transmission of the border disease infection. *J. Comp. Pathol.* **91**: 467-470.
- GILLESPIE, J.H., J.A. BAKER et K. McENTEE. 1960. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.* **50**: 73-79.
- GILLESPIE, J.H., L. COGGINS, J. THOMPSON et 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 et V.M. BLINOV. 1989. N-terminal domains of putative helicases of flaviviruses and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3889-3897.
- GREISER-WILKE, I., B. LIESS et V. MOENNIG. 1990. "Characterization of the p125/80 nonstructural proteins of different pestiviruses", In: Abstracts of VIII International Congress of Virology. Berlin, Germany: 244.
- HAFEZ, S.M. et B. LIESS. 1972. Studies on bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. II. Stability and some physico-chemical properties. *Acta Virol.* **16**: 399-408.
- HAFEZ, S.M., K. PETZOLDT et E. RECZKO. 1968. Morphology of bovine viral diarrhea virus. *Acta Virol.* **12**: 471-473.
- HAMES, B.D. 1981. "An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis", dans Hames, B.D. et D. Rickwood (ed.): *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. IRL Press. Oxford. p. 1-91.
- HAMILTON, A.F. et P.J. TIMONEY. 1972. BVD virus and "border disease". *Vet. Rec.* **91**: 468.
- HARKNESS, J.W. 1987. The control of bovine viral diarrhoea virus infection. *Ann. Rech. Vet.* **18**: 167-174.
- HARKNESS, J.W., P.L. ROEDER et L. WOOD. 1984. Mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* **115**: 186.
- HERMODSSON, S. et Z. DINTER. 1962. Properties of the bovine virus diarrhea virus. *Nature* **191**: 893-894.
- HERTIG, C., U. PAULI, R. ZANONI et E. PETERHANS. 1991. Detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **26**: 65-76.
- HESS, R.G., C.O. COULIBALY, I. GREISER-WILKE, V. MOENNIG et B. LIESS. 1988. Identification of hog cholera viral isolates by use of monoclonal antibodies to pestiviruses. *Vet. Microbiol.* **16**: 15-21.

- HORZINEK, M.C. 1981. Non-arthropod-borne togaviruses. London: Academic Press.
- HORZINEK, M.C. 1973. The structure of togaviruses. *Prog. Med. Virol.* **16**: 109-156.
- HORZINEK, M.C., J. MAESS et R. LAUFS. 1971. Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of the equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea and hog cholera viruses. *Arch. ges. virusforsch.* **33**: 306-318.
- HOWARD, C.J., J. BROWNLIE et 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, C.J., M.C. CLARKE et 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, T.H., B. BEAN, R. HILLMAN et 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.
- HUDSON, L. et F.C. HAY. 1976. *Practical immunology*. Blackwell Sci. Pub., Oxford.
- JUSTEWICZ, D.M., R. MAGAR, G. MARSOLAIS et 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. Immunol. Immunopathol.* **14**: 377-384.
- KAMER, G. et P. ARGOS. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerase from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research.* **12**: 7269-7282.
- KENDRICK, J.W. 1971. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection in pregnant cows. *Am. J. Vet. Res.* **32**: 533-544.

- KWANG, J., E.T. LITLEDIKE, S. BOLIN ET M.S. COLLETT. 1991. Efficiency of various cloned DNA probes for detection of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* **28**: 279-288.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LAMBERT, G. 1973. Bovine viral diarrhoea: prophylaxis and postvaccinal reactions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **163**: 874-876.
- LAMONTAGNE, L. et R. ROY. 1984. Presence of antibodies to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus (Border disease) in sheep and goat flocks in Quebec. *Can. J. Comp. Med.* **48**: 225-227.
- LECOMTE, C., J.J. PIN, L. DE MOERLOOZE, D. VANDENBERGH, A.F. LAMBERT, P.P. PASTORET et G. CHAPPUIS. 1990. ELISA detection of bovine viral diarrhoea virus specific antibodies using recombinant antigen and monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* **23**: 193-201.
- LECOMTE, J. et D.A.J.TYRRELL. 1976. Isolation of anti-haemagglutinin antibodies with an influenza A virus immunoadsorbent. *J. Immunol. Meth.* **13**: 355-365.
- LEE, K.M. et J.H. GILLESPIE. 1957. Propagation of the virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.* **18**: 952-953.
- LEWIS, T.L., J.F. RIDPATH, S.R. BOLIN et E.S. BERRY. 1991. Detection of BVDV viruses using synthetic oligonucleotides. *Arch. Virol.* **117**: 269-278.
- LITTLEJOHNS, I.R. et G.W. HORNER. 1990. Incidence, epidemiology and control of bovine Pestivirus infections and disease in Australia and New Zealand. *Revue Scientifique et Technique-Office international des Épizooties.* **9**: 195-205.
- LITTLEJOHNS, I.R. et K.H. WALKER. 1985. Aetiology and pathogenesis of mucosal disease of cattle: current concepts, observations and speculation. *Aut. Vet. J.* **62**: 101-103.

- LOBMANN, M., P.CHARLIER, G. FLORENT et N. ZYGRAICH. 1984. Clinical evaluation of a temperature-sensitive bovine viral diarrhoea vaccine strain. *Am. J. Vet. Res.* **45**: 2498-2503.
- LOHR, C.H., J.F. EVERMANN et A.C. WARD. 1983. Investigation of dams and their offspring inoculated with a vaccine contaminated by bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Med. Small anim. Clin.* **78**: 1263-1266.
- MAESS, J. et E. RECZKO. 1970. Electron optical studies of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus (BVDV). *Arch. ges. Virusforsch.* **30**: 39-46.
- MAGAR, R. et J. LECOMTE. 1987. Comparison of methods for concentration and purification of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods* **16**: 271-279.
- MAGAR, R., H.C. MINOCHA et J. LECOMTE. 1988. Bovine viral diarrhoea virus proteins: heterogeneity of cytopathogenic and non-cytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Vet. Microbiol.* **16**: 303-314.
- MARTIN, S.W. 1983. Vaccination: is it effective in preventing respiratory disease or influencing weight gains in feedlot calves? *Can. Vet. J.* **24**: 10-19.
- MATTHAEUS, W. 1979. Differences in reaction behaviour of structural polypeptides of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) with antisera against BVDV and hog cholera virus (HCV). *Zbl. Vet. Med. B.* **28**: 126-132.
- McCLURKIN, A.W., S.R. BOLIN et M.F. CORIA. 1985. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **186**: 568-569.
- McCLURKIN, A.W., M.F. CORIA et R.C. CUTLIP. 1979. Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **174**: 1116-1119.
- McCLURKIN, A.W., E.T. LITTLEDIKE, R.C. CUTLIP, G.H. FRANK, M.F. CORIA et S.R. BOLIN. 1984. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Comp. Med.* **48**: 156-161.

- MEYERS, G., T. RUMENAPF et H.J. THIEL. 1989a. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*. **171**: 555-567.
- MEYERS, G., T. RUMENAPF et H.J. THIEL. 1989b. Ubiquitin in a togavirus. *Nature*. **341**:491.
- MEYLING, A., H. HOUE et A.M. JENSEN. 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev.sci. tech. off. int. Epiz.* **9**: 75-93.
- MOENNIG, V. 1990. Pestiviruses: a review. *Vet. Microbiol.* **23**: 35-54.
- MOENNIG,V., A. MATEO, I. GREISER-WILKE, S.R. BOLIN, N.E. KELSO et B. LIESS. 1989. A topological and functional epitope map of the surface of bovine viral diarrhoea virus. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology New Orleans, Louisiana, 14-18 May p.390.
- MOORMANN, R.J., P.A. WARMERDAM, B. VAN DER MEER, W.M. SCHAAPER, G. WENSVOORT et 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.
- NUTTALL, P.A., P.D. LUTJER et E.J. STOTT. 1977. Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures. *Nature* **266**: 835-837.
- OAKLEY, B.R., D.R. KIRSCH et R. MORRIS. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**: 361-363.
- OLAFSON, P. et C. RICHARD. 1947. Further observations on the virus diarrhoea (new transmitted disease) of cattle. *Cornell Vet.* **37**: 104-106.
- OLAFSON, P., A.D. MacCALLUM et F.H. FOX. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* **36**: 205-213.
- PAYMENT, P. et V. PAVILANIS. 1980. *Techniques virologiques*. Les presses de l'Université du Québec. Québec.

- POCOCK, D.H., C.J. HOWARD, M.C. CLARKE et J. BROWNLIE. 1987. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus. *Arch Virol.* **94**: 43-53.
- PRITCHARD, W.R. 1963. The bovine viral diarrhoea mucosal disease complex. *Adv. Vet. Sci.* **8**: 1-47.
- PRITCHETT, R.F. et Y.C. ZEE. 1975. Structural proteins of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* **36**: 1731-1734.
- PRITCHETT, R.F., J.S. MANNING et Y.C. ZEE. 1975. Characterization of bovine viral diarrhoea virus RNA. *J. Virol.* **15**: 1342-1347.
- POCOCK, D.H., C.J. HOWARD, M.C. CLARKE et J. BROWNLIE. 1987. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus. *Arch. Virol.* **94**: 43-53.
- PURCHIO, A.F., R. LARSON et 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, L.L. TORBORG et M.S. COLLETT. 1984a. Cell-free translation of bovine viral diarrhoea virus RNA. *J. Virol.* **52**: 973-975.
- PURCHIO, A.F., R. LARSON et M.S. COLLETT. 1984b. Characterization of bovine viral diarrhoea virus proteins. *J. Virol.* **50**: 666-669.
- RADOSTITS, O.M. et I.R. LITTLEJOHNS. 1988. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Can. Vet. J.* **29**: 513-528.
- RAMSEY, F.K. et W.H. CHIVERS. 1953. Mucosal disease of cattle. *New Am. Vet.* **34**: 629-633.
- RENARD, A., D. DINA et J.A. MARTIAL. 1987. Complete nucleotide sequence of bovine viral diarrhoea virus genome and its fragment, useful for making antigenic proteins useful in therapy and diagnosis. European Patent Application No. 020872.

- RENARD, A., C. GUIOT, D. SCHMETZ, L. DAGENAIS, P.P. PASTORET, D. DINA et J.A. MARTIAL. 1985. Molecular cloning of bovine viral diarrhoea viral sequences. *DNA*. **4**: 429-438.
- RICE, C.M., E.M. LENCHES, S.R. EDDY, S.J. SHIN, R.L. SHEETS et J.H. STRAUSS. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. **23**: 726-733.
- RITCHIE, A.E. et A.L. FERNELIUS. 1969. Characterization of bovine viral diarrhoea virus. V. morphology of characteristic particles studied by electron microscopy. *Arch. ges. Virusforsch.* **28**: 369-389.
- ROEDER, P.L. et T.W. DREW. 1984. Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. *Vet. Rec.* **114**: 309-313.
- ROEDER, P.L. et J.W. HARKNESS. 1986. BVD virus infection: prospects for control. *Vet. Rec.* **119**: 143-147.
- ROEDER, P.L., M. JEFFREY et M.P. CRANWELL. 1986. Pestivirus fetopathogenicity in cattle: changing sequelae with fetal maturation. *Vet. Rec.* **118**: 44-48.
- ROSNER, S.F. 1968. Complication following vaccination of cattle against bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhoea-mucosal disease and parainfluenza type 3. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **152**: 898-902.
- ROSSI, S.R., C.R. BRIDGMAN et 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. et 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.
- RWEYEMAMU, M.M., A.A. FERNANDEZ, A.M. ESPINOSA, A.A. SCHUDEL, L.A. LAGER et S.B.K. MUELLER. 1990. Incidence, epidemiology and control of bovine viral diarrhoea virus in South America. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.* **9**: 207-221.
- SCHLESINGER, W.S. 1980. *The Togaviruses. Biology, structure, replication.* Academic Press, New York.

- SCHLESINGER, S. et M.J. SCHLESINGER. 1986. The Togaviridae and Flaviviridae. New York: Plenum Press.
- SCHROEDER, B.A. et T.C. BALASSU-CHAN. 1990. Specific sequence amplification of bovine viral diarrhoea virus nucleic acid. Arch Virol. **111**: 239-246.
- SCHWARTZ, R.H. 1986. The value of synthetic peptides as vaccines for eliciting T-cell immunity. *In*: H. Koprowski and F. Melchers (Editor), Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag, Berlin.
- SHIMIZU, M. 1990. Current situation of bovine viral diarrhoea-mucosal disease(BVD-MD) virus infections and their antigenic diversity in Hokkaido, Japon. Rev.sci. tech. off. int. Epiz. **9**: 181-194
- STOTT, E.J., J.D. ALMEIDA et K.J. O'REILLY. 1974. Characterization of mucosal disease virus as a togavirus by electron microscopy. Microbios **11A**: 79-83.
- TAKACS, B. 1979. "Electrophoresis of proteins in polyacrylamide slab gels", dans Lefkovits, I. et B. Pernis (ed.): Immunological Methods. Academic Press. New York. p. 81-105.
- THOMSON, R. G. et M. SAVAN. 1963. Studies on virus diarrhoea and mucosal disease of cattle. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.. **27**: 207-214.
- TOWBIN, H., T. STAHELIN et J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**: 4350-4354.
- VAN OIRSCHOT, J.J. 1983. Congenital infection with non-arbo Togaviruses. Vet. Microbiol. **8**: 321-361.
- WARD, A.C. et 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.
- WENSVOORT, G.C., J. BOONSTRA et G. BODZINGA. 1990. Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of hog cholera virus. J. gen. Virol. **71**: 531-540.

- WENSVOORT, G., C. TERPSTRA, J. BOONSTRA, M. BLOEMRAAD et D. VAN ZAANE. 1986. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.* **12**: 101-108.
- WESTAWAY, E.G., M.A. BRINTON, S.Y. GAIDAMOVICH, M.C. HORZINEK, A. IGARASHI, L. KÄÄRIÄINEN, D.K. LVOV, J.S. PORTERFIELD, P.K. RUSSELL et D.W. TRENT. 1985a. Togaviridae. *Intervirology* **24**: 125-139.
- WESTAWAY, E.G., M.A. BRINTON, S.Y. GAIDAMOVICH, M.C. HORZINEK, A. IGARASHI, L. KÄÄRIÄINEN, D.K. LVOV, J.S. PORTERFIELD, P.K. RUSSELL et D.W. TRENT. 1985b. Flaviviridae. *Intervirology* **24**: 183-192.
- XUE, W., F. BLECHA, AND H. C. MINOCHA. 1990. Antigenic variations in bovine viral diarrhoea viruses detected by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* **28**: 1688-1693.
- ZHIDKOV, S.A. et Y.A. KHALENEV. 1990. Bovine viral diarrhoea-mucosal disease: prevalence, epizootiology and control measures in the USSR. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.* **9**: 173-179.

