

Université de Montréal

DÉTECTION DU VIRUS DE L'ANÉMIE AVIAIRE PAR RÉACTION
DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR) COUPLÉE À UN TEST
ELISA

par
DOMINIC GAGNON

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
option microbiologie

Décembre, 2003

© Dominic Gagnon 2003



SF

607

U54

2004

v.026

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

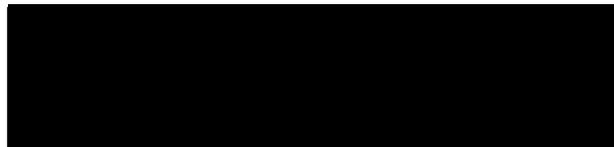
Ce mémoire intitulé

DÉTECTION DU VIRUS DE L'ANÉMIE AVIAIRE PAR RÉACTION DE
POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR) COUPLÉE À UN TEST ELISA

Présenté par :

DOMINIC GAGNON

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes



Daniel Martineau, président-rapporteur

.....
Denis Archambault, directeur de recherche

.....
Lucie Lamontagne, codirectrice

.....
Amer Silim, membre du jury

RÉSUMÉ

Le virus de l'anémie aviaire (VAA) est l'unique représentant de l'ordre des *Gyrovirus*, membres de la famille des *Circoviridae*. Ce petit virus non enveloppé à ADN simple brin circulaire cause une sévère anémie en détruisant les érythroblastes ainsi qu'une immunosuppression en ciblant les lymphocytes T. Le VAA est répandu mondialement et cause des pertes économiques importantes à l'industrie de la volaille. Le besoin d'un test de dépistage rapide, sensible et spécifique du VAA est indéniable. Le présent projet a eu pour objectif de développer un PCR-ELISA pour la détection du VAA. Pour ce faire, des amorces, une sonde biotinylée ainsi que les conditions de réalisation du PCR ont été développées à l'aide de programmes informatiques et optimisées empiriquement. La nature virale des produits d'amplification a été vérifiée par clonage et séquençage. Par la suite, la technique a été comparée à deux autres approches aussi développées dans le cadre de ce projet : la technique du PCR conventionnel et le transfert de type Southern. L'ensemble des résultats de l'étude a démontré une grande sensibilité et spécificité vis-à-vis le VAA. Aucun signal n'a été observé lorsque l'ADN d'autres virus aviaires (un réovirus et un adénovirus) ont été utilisés, ni lorsque des échantillons contenant l'ADN ciblé par la sonde mais non marqué, ont été analysés par PCR-ELISA. Le PCR-ELISA a été le test le plus sensible et est plus rapide que le transfert de type Southern. Toutefois, sa sensibilité et spécificité est dépendante du PCR.

Mots clés : Virus de l'anémie aviaire, *Gyrovirus*, PCR-ELISA, PCR, Transfert de type Southern, Diagnostic

ABSTRACT

The chicken anemia virus (CAV) is the sole member of the *Gyrovirus* gender, and a part of the *Circoviridae* family. The CAV is a small non-enveloped virus with a circular single strand DNA. The CAV causes severe anemia by destroying the erythroblasts and an immunosuppression by attacking the T lymphocytes. This status can favor the co-infections and reduce the vaccination response. On aged chickens, the symptoms can stay sub-clinical, while still reducing the productivity and the net income. The CAV is spread worldwide and inflicts irremediable damage to the economy of chicken industry. Thus, the need for a swift, sensitive and specific test that detects the CAV is enormous. New technologies available today give the opportunity to accomplish this task. The main objective of this project is to develop and evaluate a PCR-ELISA. Also, a comparison was made between PCR-ELISA and two other techniques developed in this project: the conventional PCR and the Southern transfer. The primers, the biotinylated probe, and the PCR conditions have been determined with computer programs and optimized empirically. The viral nature of the amplified products was verified by cloning and sequencing. Globally, the results seem to show a high sensitivity and specificity toward the CAV. No signal was observed when other avian viruses were used, nor when samples containing unlabeled DNA were submitted to the PCR-ELISA test. Furthermore, not only was this technique the most sensitive, it was also faster than the Southern transfer. However, its sensitivity and specificity are PCR dependent.

Key words : Chicken anemia virus, *Gyrovirus*, PCR-ELISA, PCR, Southern blot, Diagnostic

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|--------------|
| RÉSUMÉ | iii |
| ABSTRACT | iv |
| LISTE DES TABLEAUX | ix |
| LISTE DES FIGURES | x |
| LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS | xviii |
| REMERCIEMENTS | xxi |
| INTRODUCTION | 1 |
| CHAPITRE I : RECENSION DE LA LITTÉRATURE | 5 |
| 1.1 Les <i>Circoviridae</i> | 5 |
| 1.1.1 Classification | 5 |
| 1.1.2 <i>Circovirus</i> porcine (CVP 1 et 2) | 6 |
| 1.1.3 Le virus de la maladie du bec et des plumes (BFDV) | 7 |
| 1.1.4 Le virus TT (TTV) | 7 |
| 1.1.5 Le <i>TT-like</i> mini virus (TLMV) | 9 |
| 1.1.6 Autres <i>Circovirus</i> et <i>Circovirus-like</i> | 9 |
| 1.2 Le virus de l'anémie aviaire (VAA) | 10 |
| 1.2.1 Historique | 10 |
| 1.2.2 Caractérisation physico-chimique et morphologique | 10 |
| 1.2.3 Organisation génomique, réplication et transcription | 12 |
| 1.2.4 Organisation protéique | 13 |
| 1.2.5 Culture cellulaire | 16 |
| 1.3 L'anémie aviaire | 18 |
| 1.3.1 Manifestations cliniques, pathogenèse et réponse immunitaire | 18 |
| 1.3.2 Mode de transmission et persistance virale | 20 |
| 1.3.3 Épidémiologie | 20 |
| 1.3.4 Contrôle de l'infection | 21 |
| 1.3.5 Économie | 23 |
| 1.4 Les méthodes de diagnostic | 24 |
| 1.4.1 Vers une détection virale simple et efficace | 24 |
| 1.4.2 Immunofluorescence indirecte (IFI) | 24 |
| 1.4.3 Immunoperoxidase indirecte (IPI) | 25 |
| 1.4.4 Neutralisation de virus (NV) | 25 |
| 1.4.5 <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA) | 26 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.4.6 | Hybridation <i>in situ</i> (His) | 26 |
| 1.4.7 | Transfert de type Southern et Dot-Blot | 27 |
| 1.4.8 | Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) | 27 |
| 1.4.9 | PCR niché | 30 |
| 1.4.10 | PCR multiplex | 30 |
| 1.4.11 | PCR compétitif | 31 |
| 1.4.12 | PCR <i>in situ</i> | 31 |
| 1.4.13 | PCR en temps réel | 32 |
| 1.4.14 | PCR-ELISA et PCR-DEIA (DNA enzyme immunoassay) | 32 |

CHAPITRE II : MÉTHODOLOGIE.....34

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.1 | Matériel biologique | 34 |
| 2.1.1 | Cellules | 34 |
| 2.1.2 | Virus | 34 |
| 2.1.3 | Plasmide | 35 |
| 2.1.4 | Vaccin | 35 |
| 2.1.5 | Organes de poulets | 35 |
| 2.2 | Étude du génome viral | 36 |
| 2.2.1 | Variabilité des souches | 36 |
| 2.2.2 | Développement des amorces et de la sonde | 36 |
| 2.2.3 | Étude de compatibilité des amorces avec des génomes connus | 37 |
| 2.3 | Propagation virale et extraction d'ADN | 38 |
| 2.3.1 | Infection <i>in vitro</i> | 38 |
| 2.3.2 | Collecte du surnageant | 38 |
| 2.3.3 | Dilution | 38 |
| 2.3.4 | Extraction de l'ADN viral au DNazol (surnageant) | 39 |
| 2.3.5 | Extraction de l'ADN viral au DNazol (organes) | 39 |
| 2.4 | PCR conventionnel | 40 |
| 2.4.1 | Conditions | 40 |
| 2.4.2 | Expériences préliminaires | 42 |
| 2.5 | Vérification de la nature virale des produits de PCR | 42 |
| 2.5.1 | Purification des produits de PCR par colonnes GFX | 42 |
| 2.5.2 | Insertion de l'ADN amplifié dans le plasmide pBluescript | 43 |
| 2.5.3 | Transformation bactérienne | 43 |
| 2.5.4 | Extraction d'ADN de plasmides par lyse alcaline (criblage) | 43 |
| 2.5.5 | Digestion enzymatique des plasmides | 44 |
| 2.6 | Séquençage des clones sélectionnés | 45 |
| 2.6.1 | Extraction d'ADN de plasmides par « Miniprep » commerciale | 45 |
| 2.6.2 | Purification des clones | 45 |
| 2.6.3 | Réaction d'élongation | 46 |
| 2.6.4 | Migration | 46 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 2.7 | Transfert de type Southern | 47 |
| 2.7.1 | Transfert par capillarité sur une membrane de nylon | 47 |
| 2.7.2 | Hybridation et révélation de la membrane | 47 |
| 2.8 | Test comparatif des différentes amorces | 48 |
| 2.9 | Test de sensibilité | 48 |
| 2.10 | Test de spécificité | 48 |
| 2.10.1 | Extraction de l'ARN viral au Trizol (surnageant de réovirus) | 49 |
| 2.10.2 | Production d'ADNc de réovirus par rétro-transcriptase (RT) | 49 |
| 2.11 | PCR niché | 50 |
| 2.12 | PCR-ELISA | 50 |
| 2.12.1 | PCR marqué à la digoxigénine | 50 |
| 2.12.2 | ELISA | 51 |
| 2.13 | Expériences de reconstitution | 52 |
| 2.14 | Évaluation d'une infection in vitro | 52 |
| 2.14.1 | Expériences préliminaires | 52 |
| CHAPITRE III : PRÉSENTATION ET ANALYSE DES | | |
| RÉSULTATS | | 53 |
| 3.1 | PCR conventionnel | 53 |
| 3.1.1 | Expériences préliminaires | 53 |
| 3.1.2 | Détermination des conditions optimales | 54 |
| 3.2 | Transfert de Southern | 56 |
| 3.2.1 | Expériences préliminaires | 56 |
| 3.3 | Étude comparative (sélection de la paire d'amorces la plus sensible) .. | 57 |
| 3.4 | Étude comparative impliquant des amorces déjà publiées | 61 |
| 3.5 | Sensibilité du PCR conventionnel et du transfert de type Southern | 62 |
| 3.6 | Évaluation de la spécificité du PCR conventionnel | 65 |
| 3.7 | PCR niché | 66 |
| 3.8 | PCR-ELISA | 67 |
| 3.8.1 | Détermination des conditions optimales | 67 |
| 3.8.2 | Évaluation de la reproductibilité du PCR-ELISA | 68 |
| 3.8.3 | Détermination du seuil de détection du PCR-ELISA | 69 |
| 3.8.4 | Évaluation de la spécificité du PCR-ELISA | 71 |
| 3.8.5 | Sensibilité du PCR-ELISA | 71 |

| | | |
|-------------|--|-------------|
| 3.9 | Résumé des principaux résultats en égard à la sensibilité | 77 |
| 3.10 | Évaluation d'une infection in vitro | 78 |
| | CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE | 79 |
| | CONCLUSION | 93 |
| | BIBLIOGRAPHIE | 94 |
| | ANNEXES | xv |
| 5.1 | Étude du génome viral | xv |
| 5.1.1 | Variabilité des souches | xv |
| 5.2 | Étude des clones | xix |
| 5.2.1 | Représentation schématique de pBluescript | xix |
| 5.2.2 | Représentation schématique des clones produits | xx |
| 5.2.3 | Évaluation de l'intégrité des plasmides par séquençage | xxii |
| 5.3 | Solutions utilisées | xxv |
| 5.3.1 | Culture cellulaire | xxv |
| 5.3.2 | Extraction d'ADN plasmidique par lyse alcaline | xxv |
| 5.3.3 | Transfert de type Southern | xxvi |
| 5.3.4 | Séquençage | xxviii |
| 5.3.5 | Électrophorèse | xxviii |
| 5.4 | Méthodes complémentaires | xxix |
| 5.4.1 | Congélation des cellules | xxix |
| 5.4.2 | Décongélation des cellules | xxix |
| 5.4.3 | Décompte cellulaire | xxix |
| 5.4.4 | Culture bactérienne | xxx |
| 5.4.5 | Congélation bactérienne | xxx |
| 5.4.6 | Digestion de plasmide | xxx |
| 5.4.7 | Précipitation de l'ADN | xxx |
| 5.4.8 | Dosage de l'ADN | xxx |
| 5.4.9 | Conversion de mg d'ADN /mL en molécules d'ADN/mL | xxx |

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I** : La séquence, l'orientation et la position d'appariement sur le génome du VAA ainsi que la température d'amorçage (T_m) selon le programme *pDraw32* pour les différentes amorces créées (VP1, VP2, VP3 et la sonde biotinylée) ou celles déjà publiées par Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) (SH-N5, SH-N3) et Noteborn *et al.* (1992) (CAV-1, CAV-2). 37
- Tableau II** : Détermination du seuil de détection du PCR-ELISA. Densités optiques (D.O.) de la valeur négative moyenne pour les blancs (40) et les échantillons présumés négatifs (405) obtenues avec le test de PCR-ELISA. Les négatifs bruts correspondent à la D.O. lue et les négatifs ajustés correspondent à la D.O. lue – la D.O. du blanc. L'écart type (σ) ainsi que la définition des valeurs négatives, incertaines et positives ont été énumérés. 70
- Tableau III** : Détermination du statut des 405 échantillons présumés négatifs par application du seuil de détection (négatifs, incertains et positifs). Une représentation de la valeur du nombre d'échantillon dans chacune des catégories est présentée en pourcentage. Le statut est représenté par des sigles, + (positif), - (négatif) et \pm (incertain). 70
- Tableau IV** : Évaluation de la spécificité du PCR-ELISA à l'aide d'échantillons possédant l'ADN cible mais n'étant pas marqué. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacun des échantillons non marqués et confirmation du statut d'échantillon négatif par comparaison avec la valeur négative moyenne plus deux écarts types. 71
- Tableau V**. Résumé de la limite de détection des trois tests utilisés (PCR conventionnel, transfert de type Southern et PCR-ELISA) en # plasmides par réaction ou en facteur de dilution de surnageant pour chacun des types d'échantillons utilisés (pCux, Cux-1, CIA-1, vaccin CAV-VAC® et pCux ou Cux-1 en présence d'ADN de rate de poulet). La meilleure sensibilité, pour chaque échantillon, a été identifiée ainsi que le ou les tests ayant cette dite sensibilité. 77

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Organigramme de la classification officielle des *Circoviridae* à ce jour. 5
- Figure 2** : Photographie au microscope électronique du Circovirus porcine (Stewart McNulty, Veterinary Sciences, The Queen's University of Belfast). 6
- Figure 3** : Relation phylogénétique du TTV avec le VAA (CAV) et le CVP (PCV) et le BFDV basé sur le motif de la protéine Rep. Tiré de Bendinelli *et al.* (2001). 8
- Figure 4** : Photographie au microscope électronique du Virus de l'anémie aviaire (Stewart McNulty, Veterinary Sciences, The Queen's University of Belfast). 11
- Figure 5** : Cadres de lecture ouverts sur le génome du VAA selon van Santen *et al.* (2001). 14
- Figure 6** : Inactivation des segments d'ADN par les UV en fonction de leur taille. Tiré de Sarkar et Sommer (1991). 29
- Figure 7** : Principe du PCR-ELISA selon Roche Diagnostics. 33
- Figure 8** : Visualisation du plasmide pCux contenant le génome total du VAA, une représentation des trois cadres de lecture (capside, VP2 et apoptine) par des flèches ainsi qu'une indication des différentes zones d'appariements de chacune des paires d'amorces (VP1, VP2 et VP3) et de la sonde biotinylée utilisées. Le gène codant pour l'ampicilline est aussi représenté (provenant du pBluescript). Créé à l'aide du logiciel *pDraw32*. 36

Figure 9 : Amplification par PCR de la région du génome du VAA ciblé par les amorces VP1, VP2 et VP3 dans le but de cloner et valider les produits de PCR. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés selon les conditions établies théoriquement sur l'ADN du plasmide pCux (10^9 molécules par réaction) et d'un tube témoin ne contenant pas d'ADN (H) a servi de témoin négatif. La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb). 53

Figure 10 : Amplification par PCR de la région du génome du VAA ciblé par les amorces VP3. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits du PCR (15 μ L) amplifiés selon les conditions établies théoriquement sur l'ADN du plasmide pCux (P) (10^9 molécules par réaction) et sur des extractions de surnageants non dilués de Cux-1 (X), de CIA-1 (A), du vaccin CAV-VAC (V) et d'un tube témoin négatif ne contenant pas d'ADN (H) (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb). 54

Figure 11 : Influence de la température d'appariement dans la réaction de PCR. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR amplifiés avec les amorces VP3 à l'aide de 10^5 molécules d'ADN de pCux à trois températures d'appariement différentes (53, 54 et $55^\circ C$). La flèche indique la bande la plus intense et le tube témoin négatif est identifié par la lettre H (H_2O). 55

Figure 12 : Influence du nombre de cycles d'amplification dans la réaction de PCR. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR amplifiés à l'aide de 10^8 molécules d'ADN de pCux (A) et d'ADN de surnageant viral de Cux-1 dilué à 10^{-2} (B) avec la paire d'amorces VP3 à des nombres cycles de différents (25, 30, 32 et 35). La flèche indique la première bande la plus intense et le tube témoin négatif est identifié par la lettre H (H_2O). 55

Figure 13 : Évaluation de la technique de transfert de type Southern et de l'hybridation par la sonde biotinylée sur les produits de PCR. Membrane de nylon révélé au ECL sur film suite au transfert d'ADN de type Southern d'une migration des produits de PCR (15 μ L) sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium. L'ADN a été amplifié par PCR avec la paire d'amorce VP3 en utilisant de 10^3 à 10^6 plasmides de pCux par réaction. Le tube témoin négatif est identifié par la lettre H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb). 56

Figure 14 : Reconnaissance de la séquence cible sur le plasmide pCux (non digéré) par la sonde biotinylée. Membrane de nylon révélé au ECL sur film suite au transfert d'ADN de type Southern d'une migration du plasmide pCux de 5,3 kb (dépôt de 10^9 et 10^{10} molécules) sur gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium. Le tube témoin négatif est identifié par la lettre H (H_2O).

57

Figure 15 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern à l'aide du plasmide pCux. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les paires d'amorces VP1, VP2 et VP3 à l'aide du plasmide pCux ayant de 10^{-1} à 10^7 molécules d'ADN par réaction (section gauche). Produits de PCR de VP2 et VP3 transférés sur membrane de nylon, hybridés avec la sonde biotinylée et révélés au ECL (section droite). Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins sont identifiés par la lettre H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

58

Figure 16 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern à l'aide d'ADN du surnageant de Cux-1. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les paires d'amorces VP1, VP2 et VP3 à l'aide d'une extraction de surnageant de Cux-1 ayant été dilué de 10^{-1} à 10^{-7} (section gauche). Produits de PCR de VP2 et VP3 transférés sur membrane de nylon, hybridés avec la sonde biotinylée et révélés au ECL (section droite). Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre M (milieu de culture DMEM) et H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

59

Figure 17 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern à l'aide d'ADN du vaccin CAV-VAC®. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les paires d'amorces VP1, VP2 et VP3 à l'aide d'une extraction du vaccin CAV-VAC® ayant été dilué de 10^{-1} à 10^{-7} (section gauche). Produits de PCR de VP2 et VP3 transférés sur membrane de nylon, hybridés avec la sonde biotinylée et révélés au ECL (section droite). Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre M (milieu de culture DMEM) et H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

60

Figure 18 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR à l'aide de deux amorces retrouvées dans la littérature sur des dilutions du plasmide pCux. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les amorces de Noteborn *et al.* (1992) et Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) selon leurs recommandations sur le plasmide pCux ayant de 10^{-1} à 10^7 molécules d'ADN par réaction. Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

61

Figure 19 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR à l'aide de deux amorces retrouvées dans la littérature sur des dilutions du vaccin CAV-VAC®. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les amorces de Noteborn *et al.* (1992) et Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) selon leurs recommandations sur le vaccin CAV-VAC® à des dilutions de 10^{-1} à 10^{-7} par réaction. Les flèches indiquent la limite de détection et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et M (milieu de culture DMEM). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

62

Figure 20 : Sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern réalisés avec l'ADN du surnageant de CIA-1 et les amorces VP3. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec la paire d'amorces VP3 à l'aide d'une extraction de surnageant de CIA-1 ayant été dilué de 10^{-1} à 10^{-7} (section gauche). Produits de PCR transférés sur membrane de nylon, hybridés avec la sonde biotinylée et révélés au ECL (section droite). Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre M (milieu de culture DMEM) et H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

63

Figure 21 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern à l'aide du plasmide pCux en présence d'ADN génomique de rate de poulet. Migration des produits du PCR (15 μ L) amplifiés avec les amorces VP3 sur différentes quantités (10^{-1} à 10^7) de plasmide en présence d'ADN génomique (200 ng) provenant de l'extraction d'ADN de rate (en haut). Révélation au ECL du transfert sur membrane de nylon et de l'hybridation par la sonde biotinylée de la migration des produits de PCR (en bas). Les flèches indiquent la limite de détection et les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et O (ADN d'organe).

64

Figure 22 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern réalisés avec l'ADN du surnageant de Cux-1 en présence d'ADN génomique de rate de poulet. Migration des produits du PCR (15 μ L) amplifiés avec les amorces VP3 sur différentes dilutions (10^{-1} à 10^{-7}) de surnageant viral de Cux-1 en présence d'ADN génomique provenant de l'extraction d'ADN de rate (en haut). Révélation au ECL du transfert sur membrane de nylon et de l'hybridation par la sonde biotinylée de la migration des produits de PCR (en bas). Les flèches indiquent la limite de détection et les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O), O (ADN d'organe) et M (milieu de culture DMEM). 65

Figure 23 : Évaluation de la spécificité de la réaction de PCR réalisée avec les amorces VP3 à l'aide d'ADN d'adénovirus et d'ADNc de réovirus. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés à l'aide d'ADNc de réovirus (R) et d'ADN d'adénovirus (A) en présence ou non d'ADN de pCux (+P). Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et les témoins positifs par la lettre P (pCux). 66

Figure 24 : Sensibilité observée lors de la première amplification (amorces VP2F et VP3R) et de la deuxième amplification (amorces VP3F et VP2R) réalisées selon le principe du PCR niché à l'aide du plasmide pCux. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR niché (15 μ L) amplifiés avec les paires d'amorces VP2F-VP3R (1^{ère} amplification) et VP3F-VP2R (2^e amplification) sur le plasmide pCux ayant de 10^{-1} à 10^5 molécules d'ADN lors de la première réaction. La flèche indique la limite de détection et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O). 66

Figure 25 : Évaluation de l'effet du temps d'hybridation avec la sonde biotinylée sur des extractions d'ADN provenant de dilutions du vaccin CAV-VAC® suite au PCR-ELISA. Densité optique (D.O.) obtenue pour certaines dilutions du vaccin (10^{-7} à 10^{-4}) soumises au PCR-ELISA en les incubant à 51 °C pendant une heure trente (barres blanches) ou trois heures (barres hachurées) avec la sonde biotinylée. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et M (milieu de culture cellulaire DMEM). 68

Figure 26 : Évaluation de la reproductibilité du PCR-ELISA. Densités optiques (D.O.) obtenues en fonctions des différentes dilutions (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 et 1/160) de produits de PCR marqués à la digoxigénine amplifiés à l'aide des amorces VP3 sur le plasmide pCux (10^4 molécules par réaction). Les facteurs de dilutions sont représentés en valeurs logarithmiques et l'écart type provient de la lecture de 14 D.O. par dilution. 69

- Figure 27 :** Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide du plasmide pCux. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des quantités de plasmide pCux utilisées (10^7 à 10^{-1}) lors du PCR-ELISA. Le PCR marqué à été réalisé à l'aide des amorces VP3. Le témoin négatif est identifié par la lettre H (H_2O). 72
- Figure 28 :** Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide d'extraction d'ADN de surnageant de Cux-1. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des dilutions du surnageant de Cux-1 utilisées lors du PCR-ELISA. Le PCR marqué à été réalisé à l'aide des amorces VP3. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et M (milieu de culture cellulaire DMEM). 73
- Figure 29:** Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide d'extraction d'ADN de surnageant de CIA-1. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des dilutions du surnageant de CIA-1 utilisées lors du PCR-ELISA. Le PCR marqué à été réalisé à l'aide de VP3. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et M (milieu de culture cellulaire DMEM). 74
- Figure 30 :** Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide d'extraction d'ADN du vaccin CAV-VAC®. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des dilutions du vaccin CAV-VAC® utilisées lors du PCR-ELISA. Le PCR marqué à été réalisé à l'aide de VP3. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et M (milieu de culture cellulaire DMEM). 74
- Figure 31 :** Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide du plasmide pCux en présence d'ADN génomique de rate de poulet. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des quantités de plasmide utilisées (10^7 à 10^{-1}) en présence de 200 ng d'ADN génomique de rate lors du PCR-ELISA. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et Org (ADN d'organe). 75
- Figure 32 :** Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide d'extraction d'ADN de surnageant de Cux-1 en présence d'ADN génomique de rate de poulet. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des dilutions de Cux-1 utilisées (10^{-1} à 10^{-7}) en présence de 200 ng d'ADN génomique de rate lors du PCR-ELISA. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O), M (milieu de culture cellulaire DMEM) et Org (ADN d'organe). 76

- Figure 33 :** Évaluation, par réaction de PCR avec les amorces VP3, d'une infection par le virus de l'anémie aviaire de souche Cux-1 et CIA-1 sur des cellules de moelle osseuse et de thymus mises en culture. Les cellules infectées ont été utilisées de non diluée (ND) jusqu'à l'obtention d'un facteur de dilution 10^{-6} . Les témoins eau (H), milieu de culture cellulaire DMEM (M) et de cellules non infectées (NI) ont aussi été vérifiés. 78
- Figure 34 :** Séquences de 4 clones représentant les souches Cux-1 (M55918 et U66304), CIA-1 (L14767) et TR-20 (AB027470). xix
- Figure 35 :** Schématisation du plasmide pBluescript II KS + ayant servi à cloner le génome complet du VAA (pCux) dans les sites BamHI/EcoRI (Soiné *et al.*, 1993) et les amplifications de PCR (VP1, VP2 et VP3) dans le site EcoRV. xix
- Figure 36 :** Plasmide pBluescript contenant l'insert VP1 (dans le site EcoRV) provenant de l'amplification par PCR de la région bordée par les amorces VP1F et VP1R sur le génome du VAA. Les enzymes généralement employées dans le laboratoire ont été indiquées avec leur position et la composition du site qu'elles reconnaissent. xx
- Figure 37 :** Plasmide pBluescript contenant l'insert VP2 (dans le site EcoRV) provenant de l'amplification par PCR de la région bordée par les amorces VP2F et VP2R sur le génome du VAA. Les enzymes généralement employées dans le laboratoire ont été indiquées avec leur position et la composition du site qu'elles reconnaissent. xx
- Figure 38 :** Plasmide pBluescript contenant l'insert VP3 (dans le site EcoRV) provenant de l'amplification par PCR de la région bordée par les amorces VP3F et VP3R sur le génome du VAA. Les enzymes généralement employées dans le laboratoire ont été indiquées avec leur position et la composition du site qu'elles reconnaissent. xxi
- Figure 39 :** Séquençage du clone 24 de pBlue-VP1 avec amorce sens (F) et anti-sens (R) comparé à la séquence de VP1 (codant pour la capsid) selon Noteborn *et al.*, (1991) dont le numéro d'accès dans *GenBank* est : M55918. xxii

Figure 40 : Séquençage du clone 2 de pBlue-VP2 avec amorce sens (F) et anti-sens (R) comparé à la séquence de VP2 selon Noteborn *et al.*, (1991) dont le numéro d'accèsion dans *GenBank* est : M55918.

xxiii

Figure 41 : Séquençage du clone 5 de pBlue-VP3 avec amorce sens (F) et anti-sens (R) comparé à la séquence de VP3 (codant pour l'apoptine) selon Noteborn *et al.*, (1991) dont le numéro d'accèsion dans *GenBank* est : M55918.

xxiv

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-----------------|---|
| ABTS | <i>2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt crystals</i> |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| AMV | <i>Avian myeloblastosis virus</i> |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BFDV | <i>Beak and feather disease virus</i> |
| BLAST | <i>Basic local alignment tool</i> |
| CITV | Comité international de la taxonomie virale |
| CLO | Cadre de lecture ouvert |
| cm ² | Centimètre carré |
| CsCl | Chlorure de césium |
| CVCa | Circovirus des canaris |
| CVP | Circovirus porcin |
| CVPi | Circovirus de pigeon |
| dd | Distillée, déionisée |
| DEIA | <i>DNA enzyme immunoassay</i> |
| DEPC | Diéthyl pyrocarbonate |
| DIG | Digoxigénine |
| DMEM | <i>Dulbeccos' modified eagle medium</i> |
| DMSO | Dimethyl sulfoxyde |
| dNTP | Désoxynucléotide triphosphate |
| D.O. | Densité optique |
| EDTA | Éthylène diamine tetra acétate |
| ELISA | <i>Enzyme linked immunosorbant assay</i> |
| EtOH | Éthanol |

| | |
|------------------|---|
| fg | Femtogramme |
| fig. | Figure |
| FITC | Fluorescéine isothiocyanate |
| g | Constante de la force gravitationnelle (9,8 m/s) |
| g | Gramme |
| H ₂ O | Eau |
| <i>His</i> | Hybridation <i>in situ</i> |
| IFI | Immunofluorescence indirecte |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IPI | Immunopéroxydase indirecte |
| kb | kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Luria-Bertani |
| LM | Leibovitz-McCoy |
| M | Molaire |
| mg | Milligramme |
| MgCl | Chlorure de magnésium |
| mL | Millilitre |
| mM | Millimolaire |
| NaOH | Hydroxide de sodium |
| NV | Neutralisation de virus |
| nt | Nucléotides |
| pb | Paire de base |
| PCR | Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase chain reaction</i>) |
| Pfu | <i>Pyrococcus furiosus</i> (ADN polymérase thermorésistante) |
| pg | Picogramme |
| pH | Potentiel hydrogène |
| P.I. | Post-infection |
| pM | Picomole |
| POD | Péroxydase |
| p/v | Poids/volume |

| | |
|--------------------|--|
| RNase | Ribonucléase |
| rpm | Révolutions par minute |
| R ² | Indice de la qualité de la corrélation |
| RT | Rétro-transcriptase |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate |
| SPF | Exempt de pathogène (<i>specific pathogen free</i>) |
| SVF | Sérum de veau fœtal |
| TAE | Tris-Acétate-EDTA |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> (ADN polymérase thermorésistante) |
| TBE | Tris-Borate-EDTA |
| TCID ₅₀ | Dose infectieuse médiane en culture de tissus |
| TE | Tris-EDTA |
| TLMV | <i>TTV-like mini virus</i> |
| Tm | Température d'appariement des amorces |
| TTV | Virus TT |
| U | Unités (enzymatiques) |
| UTG | Uracil-N-glycosylase |
| UTP | Uridine triphosphate |
| UV | ultra-violet |
| VAA | Virus de l'anémie aviaire |
| VP1 | Protéine virale 1 |
| v/v | Volume/volume |
| | |
| °C | Degré Celsius |
| % | Pourcentage |
| µg | Microgramme |
| µL | Microlitre |
| µM | Micromolaire |
| σ | Écart-type |

REMERCIEMENTS

Mes plus sincères remerciements à Marie-Claude St-Louis pour sa précieuse aide technique, ses conseils judicieux et ses encouragements. Il en est de même pour Catherine Simard qui de ses commentaires m'a apporté un autre point de vue sur mes problèmes techniques. Je tiens à remercier le Dr Archambault de m'avoir permis de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire et de m'avoir guidé et corrigé lors de ma rédaction. Un grand merci aux membres de mon comité d'évaluation, le Dr Lucie Lamontagne qui est ma codirectrice ainsi que le Dr Amer Silim.

Un merci aussi à Lucianna Poggi, Christian Bleau et Jean-Philippe Laverdure pour les infections virales et les prélèvements d'organes. Merci à Mathieu et Geneviève pour les rates de souris.

Il ne faut pas oublier mes parents, Nicole et Lucien ainsi que mes colocataires qui tous, m'ont supporté et encouragé dans les moments difficiles. La réalisation de ma maîtrise n'aurait pas été aussi facile sans la présence de ma copine, Sara. Un grand merci à Anne et Louis-Félix pour leurs conseils grammaticaux.

Finalement, merci au CORPAQ d'avoir financé et rendu possible ce projet.

INTRODUCTION

Les virus, groupe unique d'agents infectieux, se définissent par leur organisation simple et acellulaire ainsi que leur dépendance envers les cellules ou les bactéries lors de leur réplication (Prescott *et al.*, 1995). Ils ont été responsables de nombreuses maladies et épidémies tout au long de l'histoire. Bien que leur découverte ait été réalisée par Charles Chamberland, un collaborateur de Louis Pasteur, en 1884 et que leur nature moléculaire fut établie par Stanley et l'équipe de Bawden et Pirie à la fin des années 30, de nombreux virus restent encore à être découverts et caractérisés (Prescott *et al.*, 1995).

Découvert par hasard par Yuasa *et al.* en 1979, le virus de l'anémie aviaire (VAA) était probablement l'agent responsable de maladies connues depuis les années 50 tels le syndrome hémorragique, l'anémie aplasique, la dermatite gangreneuse et la maladie des ailes bleues (Pope, 1991). Le VAA est répandu mondialement et affecte autant les poulets de grill que de ponte. Cependant, il n'existe qu'un seul sérotype connu et le poulet est le seul hôte connu à ce jour. Économiquement, le VAA cause des torts importants aux éleveurs en induisant une perte de productivité et de croissance des poulets dans les cas les plus bénins et une prédisposition à la co-infection et une mortalité accrue dans les pires cas (McNulty *et al.*, 1991). En plus d'affecter l'industrie de la volaille, la production de vaccins réalisée dans les embryons de poulets, notamment contre l'influenza, la rougeole et les oreillons, est aussi affectée par la présence du VAA (Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002). Quel que soit le but recherché, la qualité de l'élevage est d'une importance capitale. Une vaccination, un bon contrôle de la qualité de vie et un suivi des poulets est primordial. Le dépistage précoce des cas infectés est une nécessité dans cette industrie représentant la plus grande part de la viande consommée mondialement. L'utilisation de méthodes sérologiques (par immunofluorescence indirecte ou neutralisation de virus) est déjà répandue, mais n'offre pas une grande rapidité dans l'exécution et les résultats sont discutables (Yuasa *et al.*, 1986, Lamichhane *et al.*, 1992 et Todd *et al.*, 1990). Un test immunologique commercial, l'*enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) est d'ailleurs déjà

disponible. Une alternative aux tests existants est requise et l'emploi de différentes techniques moléculaires pourrait offrir de meilleurs résultats. En ce qui concerne la détection du VAA, certains diagnostics moléculaires sont déjà à l'étude depuis quelques années tel les différentes variantes de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), ou le transfert de type Southern (Todd *et al.*, 1991). Les variantes du PCR ayant été étudiées sont le PCR conventionnel (Tham *et al.*, 1992 et Noteborn *et al.*, 1992), le PCR niché (Imai *et al.*, 1998), le PCR *in situ* (Cardonna *et al.*, 2000) et le PCR en temps réel (Markowski-Grimrud *et al.*, 2000).

Depuis sa mise au point en 1985 par Kary Mullis, la technique de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a apporté un nouveau souffle sur la recherche en génétique moléculaire (Watson *et al.*, 1994). Le monde scientifique a d'ailleurs remercié Mullis pour son apport à la science par un prix Nobel en 1993. La découverte et l'utilisation de l'enzyme *Thermus aquaticus* (Taq), stable jusqu'à 94°C, ont permis l'automatisation et assuré l'essor de la technique (Watson *et al.* 1994). Le PCR consiste à amplifier une séquence cible d'ADN de façon spécifique et exponentielle. Sa sensibilité et sa rapidité ont favorisé son utilisation par rapport aux anciennes techniques de diagnostic, de culture, histologiques ou immunologiques, qui sont très longues et peu sensibles. Depuis sa création, bon nombre de variantes du PCR conventionnel ont été proposées ayant tous comme point commun une grande sensibilité et spécificité dans un temps d'exécution très court. La grande sensibilité de la technique de PCR a aussi fait ressortir son problème majeur : la contamination. À ce jour, il existe des moyens et des procédures afin de réduire au maximum ces faux positifs. Il faut donc toujours garder en tête que, bien que performante, cette technique a ses limites.

Une autre technique largement utilisée en laboratoire est celle de l'*enzyme linked immunosorbant assay* (ELISA). Généralement, un antigène est reconnu par un anticorps qui, lui-même, est reconnu par un anti-anticorps couplé à une enzyme. Par ajout d'un substrat, ce complexe est révélé par une réaction colorimétrique observable et quantifiable (Janeway et Travers, 1997). Une variante de ce test, le PCR-ELISA, a été développé au début des années 90 (Landgraf *et al.*, 1991). Elle consiste à reconnaître, à

l'aide d'une sonde liée à un marqueur (biotine) une séquence d'ADN amplifiée et marquée (à la digoxigénine) par PCR. La sonde est fixée aux puits par la liaison streptavidine-biotine. Un anticorps anti-digoxigénine, couplé à une enzyme, reconnaît le marqueur de l'ADN permettant la quantification du complexe par une lecture colorimétrique suite à l'ajout d'un substrat. Selon les compagnies distribuant les ensembles de marquage et de détection, cette technique augmente la sensibilité et la spécificité du PCR conventionnel (Roche Diagnostics, Laval, Canada).

Une autre méthode largement utilisée en laboratoire est le transfert de type Southern. Mise au point par E. M. Southern en 1975, cette technique a permis d'étudier les délétions, les remaniements de gènes et la composition ou organisation de divers génomes (Watson *et al.*, 1994). Suite à une migration par électrophorèse sur gel d'agarose, l'ADN, digéré par des enzymes de restriction ou amplifié par PCR, est transféré sur une membrane. L'ADN est ensuite reconnu par une sonde marquée ou radioactive et est révélé par autoradiographie (Watson *et al.*, 1994). Cette approche a permis à de nombreux chercheurs d'augmenter la sensibilité de leurs expériences. Elle permet aussi de confirmer la nature des bandes visualisées sur gel puisque la sonde ne va s'apparier qu'à une séquence qui lui est complémentaire (Watson *et al.* 1994).

Les détections de type sérologique, immunologique ou moléculaire de différentes maladies ou infections s'effectuent généralement dans des laboratoires spécialisés. Présentement, plusieurs compagnies distribuent des ensembles de détection générale que les chercheurs utilisent afin de mettre au point une technique applicable à des organismes bien précis. Demain, le vétérinaire ou l'éleveur pourront utiliser un simple appareil et détecter la présence d'un pathogène chez leurs animaux sans même qu'ils n'aient présenté de signes cliniques. Cette approche permettra de contrôler le caractère sanitaire des troupeaux tout en permettant de réaliser des économies. La recherche et le développement sont donc importants et nécessaires. La mise au point d'un système permettant de détecter des pathogènes rapidement, spécifiquement et avec une grande sensibilité est donc primordiale. Le PCR couplé à un ELISA devrait être la technique capable de satisfaire ces exigences.

Le présent projet avait pour but de mettre au point un système de détection moléculaire du virus de l'anémie aviaire (VAA) par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) couplé à un ELISA. Pour atteindre ce but, différents objectifs ont dû être atteints. Tout d'abord, à l'aide de la bio-informatique, l'étude du génome du VAA ainsi que le développement d'amorces et de sonde le ciblant ont été effectués. Par la suite, différentes souches du virus de l'anémie aviaire et un plasmide contenant le génome entier du VAA ont été soumis à l'amplification par PCR. La nature des amplifications réalisées a été confirmée par clonage, séquençage et transfert de type Southern. Les échantillons ont par la suite été analysés par le PCR-ELISA et la sensibilité obtenue a été comparée avec celle observée avec le PCR conventionnel et le transfert de type Southern. Finalement, dans l'objectif de recréer l'approche employée lors d'un diagnostic dans le champ, des expériences de reconstitution avec des organes lymphoïdes de poulets ont été effectuées.

CHAPITRE I

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1.1 Les *Circoviridae*

1.1.1 Classification

Selon le Comité International de la Taxonomie Virale (CITV), la famille des *Circoviridae* possède deux genres (Pringle, 1999) (fig. 1). Les *Circovirus* sont composés du circovirus porcin (CVP) et du virus de la maladie du bec et des plumes (BFDV). Les *Gyrovirus* n'ont pour leur part qu'un seul membre, le virus de l'anémie aviaire (VAA). Todd *et al.* (1991) ont démontré que le VAA, le CVP et le BFDV, les uns envers les autres, ne possèdent pas d'antigène ou de séquence d'ADN homologue. D'une autre part, le virus TT (TTV) et le *TT-like mini virus* (TLMV) restent à être classés. D'autres virus, nouvellement découverts, pourraient être classés parmi les *Circoviridae* tel le circovirus du pigeon ou les *circovirus-like* affectant les oies, les cygnes du Sénégal, les canaris, les autruches et les goélands (Todd, 2000).

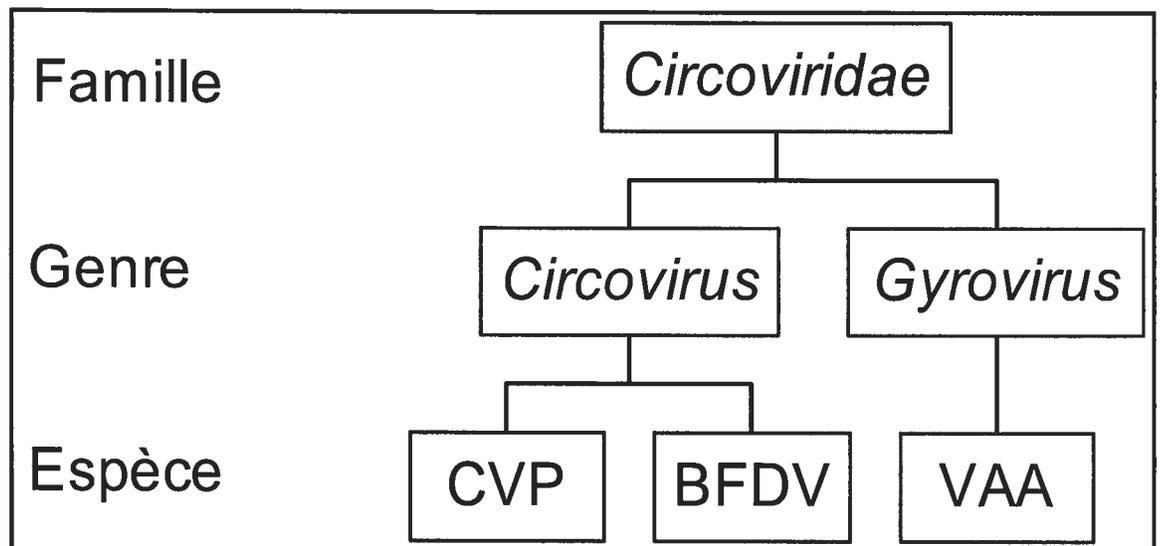


Figure 1 : Organigramme de la classification officielle des *Circoviridae* à ce jour.

1.1.2 Circovirus porcin (CVP 1 et 2)

Le circovirus porcin (CVP) est le plus petit virus à réplication autonome chez les mammifères avec ses 17 nanomètres (nm) de diamètre (fig. 2). Ce virus non-enveloppé, possède une capsidie isométrique, sa densité est de 1.36-1.37 g/mL et son génome circulaire à ADN simple brin est de 1759 nucléotides (nt) (Meehan *et al.*, 1997; Mankertz *et al.*, 1997 et Todd, 2000). Ce virus fut d'abord isolé en 1974 en Allemagne dans une lignée cellulaire de rein porcin (PK/15) infectée de façon persistante et c'est en 1982 que Tischer *et al.* (1982) le caractérisèrent. Le CVP est largement répandu en Europe et au Canada, mais ne semble pas causer de maladie, même expérimentalement (Magar *et al.*, 2000; Todd *et al.*, 1991 et Studdert, 1993). Toutefois, en 1997, le CVP 2 était isolé des lésions provenant d'un cochon atteint du *postweaning multisystemic wasting syndrome*. Cette maladie serait présente dans l'Ouest du Canada depuis 1991 et ce serait le CVP 2 qui serait le type le plus répandu de circovirus porcin (Magar *et al.*, 2000). Le CVP 2 est génétiquement et antigéniquement différent du CVP 1 qui lui, est non pathogénique (Magar *et al.*, 2000 et Ellis *et al.*, 2000). Un fort pourcentage des cochons et des porcs serait séropositif pour le CVP 2 sans toutefois présenter de signes cliniques ou histopathologiques ce qui laisse croire à une variation de virulence (Magar *et al.*, 2000). Le CVP 2 pourrait aussi être un facteur de risque pour ce qui est des travailleurs exposés aux cochons ou un élément clé dans la problématique des xénotransplantations (Ellis *et al.*, 2000).

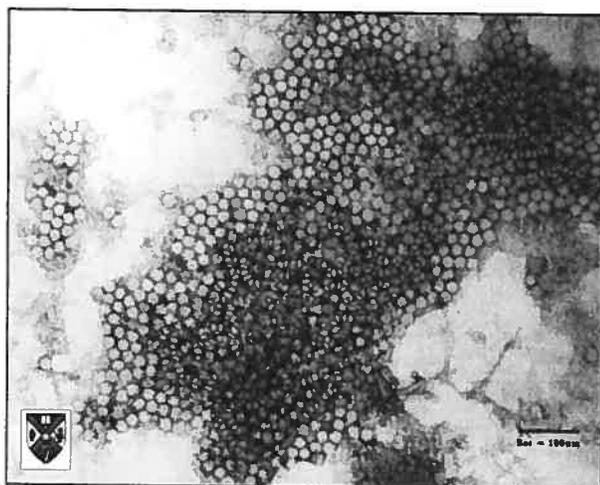


Figure 2 : Photographie au microscope électronique du Circovirus porcin (Stewart McNulty, Veterinary Sciences, The Queen's University of Belfast).

1.1.3 Le virus de la maladie du bec et des plumes (BFDV)

C'est au milieu des années 1970 que la maladie du bec et des plumes (*beak and feather disease*) commence à être observée chez les oiseaux du Pacifique sud. Elle fut par la suite étudiée et décrite par Perry en 1981 et Pass et Perry en 1984. C'est aussi en 1984 que le virus fut cultivé et caractérisé par Ritchie *et al.* (Studdert, 1993). La maladie se caractérise par des plumes nécrotiques et dystrophiques qui sont non-viables et par la présence ou non de difformités au niveau du bec. Les oiseaux peuvent ou non en mourir (Studdert, 1993). Il existe au moins une trentaine d'espèces de psittacidés étant considérées comme susceptibles de développer la maladie (Ritchie *et al.* 1989). Tout comme le VAA, le BFDV favoriserait les infections secondaires bactériennes, virales et fongiques (Latimer *et al.*, 1992). Le virus du BFDV est non-enveloppé et composé d'une capsidie icosaédrique de 14-16 nm de diamètre avec un génome d'ADN circulaire simple brin de 1.7-2.0 kb et une densité de 1.378 g/mL dans le CsCl (Ritchie *et al.* 1989).

1.1.4 Le virus TT (TTV)

Isolé pour la première fois en 1997 du sérum d'un patient japonais aux initiales (T.T.) souffrant d'une hépatite non-A-G post-transfusion, ce virus serait répandu mondialement dans la population et transmissible aux primates (Mushahwar *et al.*, 1999; Abe *et al.*, 1999 et Miyata *et al.*, 1999) Ce virus de 30 à 50 nm de diamètre, possède un génome à ADN circulaire, simple brin négatif de 3852 nt et une densité de 1.31-1.35 g/mL dans le CsCl (Mushahwar *et al.*, 1999; Abe *et al.*, 1999 et Bendinelli *et al.*, 2001). Le TTV, contrairement au VAA et au CVP, démontre une plus grande variabilité génétique (Mushahwar *et al.*, 1999). Son organisation génomique serait cependant plus apparentée au VAA qu'aux autres circovirus (fig.3) (Bendinelli *et al.*, 2001 et Miyata *et al.*, 1999). C'est pour cette raison que Mushahwar *et al.* (1999) ont proposé d'inclure le TTV et le VAA dans une nouvelle famille, les *Circinoviridae* provenant du latin *circinatio* qui signifie "la description d'un cercle".

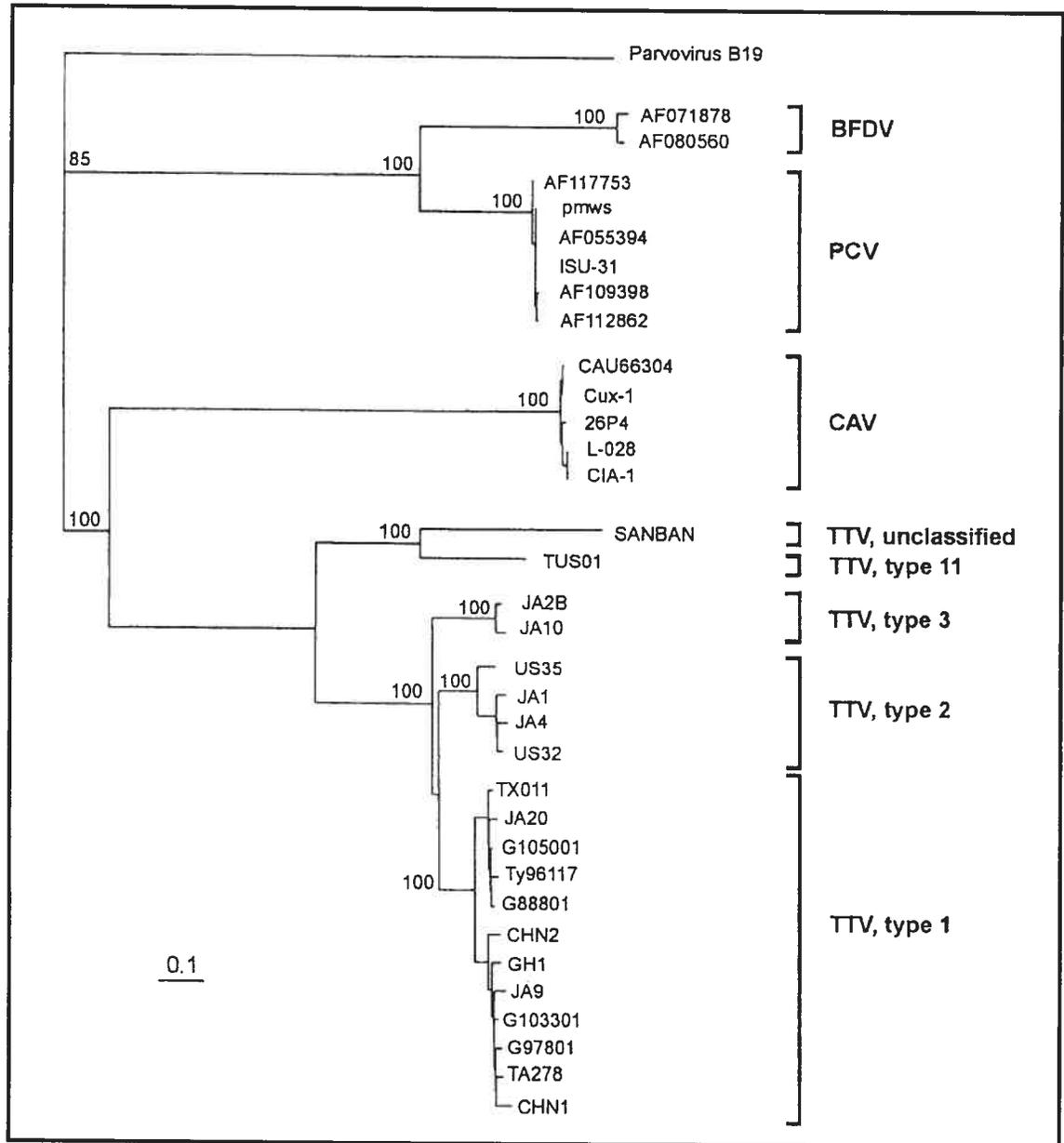


Figure 3 : Relation phylogénétique du TTV avec le VAA (CAV) et le CVP (PCV) et le BFDV basé sur le motif de la protéine Rep. Tiré de Bendinelli *et al.* (2001).

1.1.5 Le *TT-like mini virus* (TLMV)

Découvert par hasard par l'équipe de Takahashi *et al.* (2000) dans un plasma co-infecté par le TTV, le TLMV (*TTV-like mini virus*) s'est avéré être un virus humain ressemblant au virus TTV et au VAA. Ce virus, non-enveloppé, d'un diamètre plus petit que 30 nm et d'une densité de 1.31-1.34 g/mL dans le CsCl possède aussi un génome à ADN circulaire simple brin de polarité négative de 2860 nt (Takahashi *et al.*, 2000). De plus, l'organisation génomique du TLMV est similaire à celle du TTV et du VAA. Selon Takahashi *et al.* (2000), le TLMV serait donc un intermédiaire entre ces deux virus et les trois ensembles seraient classés dans une nouvelle famille, les *Paracircoviridae* contrairement à la classification proposée de Mushahwar *et al.* (1999).

1.1.6 Autres Circovirus et *Circovirus-like*

Le premier rapport d'infection des pigeons par un virus *circovirus-like* date de 1993 (Smyth *et al.*, 2001). Le CITV a reconnu le circovirus du pigeon (CVPi) comme un membre potentiel de la famille des *Circoviridae* dû à son homologie d'ADN avec le BFDV (Todd *et al.*, 2001). D'autres infections par des *Circovirus-like* ont été reconnues chez plusieurs espèces aviaires tel les cygnes, les oies, les canaris et les goélands (Hatterman *et al.*, 2002 et Todd *et al.*, 2001). Les continents touchés de façon significative sont l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Australie. Les signes cliniques sont généralement l'anorexie, la léthargie et de piètres performances de course (Todd *et al.*, 2001). Une analyse des génomes des circovirus de pigeon et d'oie démontre qu'ils ont un génome de 2037 et 1821 nt respectivement et partagent une similarité génétique avec le PCV et le BFDV d'environ 50 % (Todd *et al.*, 2001), tandis que le circovirus des canaris (CVCa) partage 58 % de similarité avec le CVPi et 50 % avec celui des oies et le BFDV (Phenix *et al.*, 2001).

1.2 Le virus de l'anémie aviaire (VAA)

1.2.1 Historique

Le VAA a été découvert par Yuasa et son équipe en 1979 en étudiant deux accidents, un impliquant le vaccin de la maladie de Marek contaminé et un ayant lieu dans un élevage impliquant le virus de la réticulo-endothéliose (REV) qui tua des poussins par une anémie aplasique (Yuasa *et al.*, 1979). Cet agent transmissible et filtrable fut nommé agent de l'anémie du poulet (AAP). Cet agent fut par la suite caractérisé et défini comme étant un virus (Todd *et al.*, 1990 et Gelderblom *et al.*, 1989). Ce n'était cependant pas un nouveau pathogène. En effet, il était probablement la cause des maladies suivantes dont certaines étaient connues depuis les années 50 tel le syndrome hémorragique, l'anémie aplasique, la dermatite gangreneuse, le syndrome de l'anémie hémorragique, le syndrome de l'anémie aplasique hémorragique, la dermatite anémique et la maladie des ailes bleues (Pope, 1991).

Le VAA est retrouvé à travers le monde tant dans les poulets de grill que les poulets de ponte. Malgré sa distribution mondiale et la découverte de nombreux isolats, un seul sérotype a été identifié. Toutefois, en 2002, un second sérotype, le CIAV-7, pourrait avoir été découvert (Spackman *et al.*, 2002b) et ne serait pas reconnu par l'ELISA, le transfert de type Western ou Southern, ni amplifié par PCR ciblant le VAA (Spackman *et al.*, 2002a). Depuis les dix dernières années, de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux caractériser ce virus et définir son implication au niveau histologique et immunologique chez le poulet.

1.2.2 Caractérisation physico-chimique et morphologique

Le VAA résiste à l'acétone, le chloroforme, l'éther et à un pH de 3. Il peut passer au travers d'une membrane filtrante ayant des pores de 25 nm. Il n'est pas inactivé à 70°C durant une heure, il est partiellement inactivé à 80°C durant 30 minutes et complètement à 95°C pour 30 minutes ou 100°C durant 10 minutes. Il résiste aussi aux désinfectants commerciaux tel les composés d'ammonium quaternaire, les savons

amphotériques et les orthodichlorobenzènes. La formaline et les iodophores réduisent son activité et l'hypochlorite la détruit. Son infectivité est légèrement augmentée par une heure d'incubation à 37°C avec 10% de sodium dodecyl sulphate (SDS) ou 10% de nonidet P-40. (Yuasa *et al.*, 1979; Goryo *et al.*, 1987; McNulty, 1991; Classens *et al.*, 1991 et Urling *et al.*, 1993)

Le VAA est donc un virus très résistant à toute forme d'attaque. Il est l'un des plus petits virus animaux et est non-enveloppé (fig. 4). Il possède une capsidie icosaédrale de 19.1-26.5 nm de diamètre qui sera décrite plus loin, sa densité est de 1.33-1.37 g/mL sur gradient de CsCl et son coefficient de sédimentation est de 91S (Goryo *et al.*, 1987; Gelderblom *et al.*, 1989; Todd *et al.*, 1990; McNulty *et al.*, 1990 et Todd *et al.*, 1991)

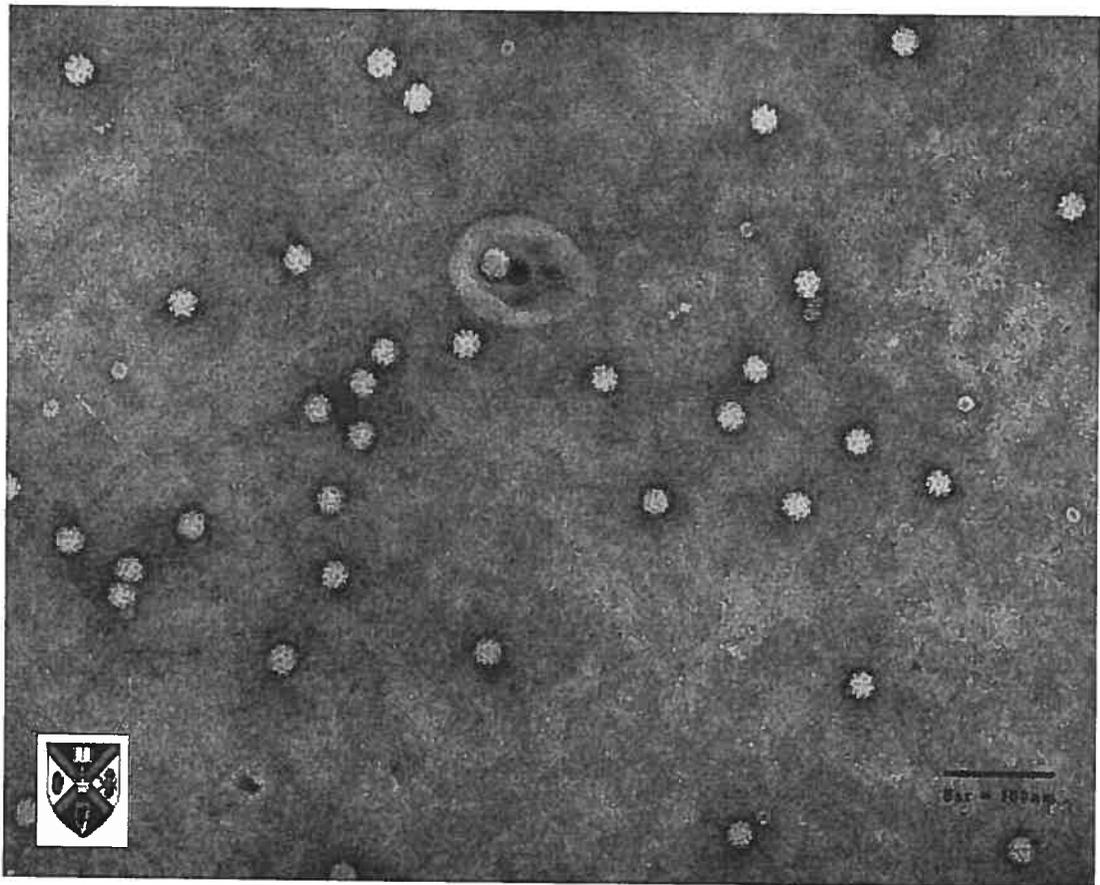


Figure 4 : Photographie au microscope électronique du Virus de l'anémie aviaire (Stewart McNulty, Veterinary Sciences, The Queen's University of Belfast).

1.2.3 Organisation génomique, réplication et transcription

Dans la famille des Circoviridae, le VAA possède le plus gros génome. Ce virus à ADN circulaire simple brin de polarité négative ne démontre qu'une très faible variabilité. Il a cependant été noté que sa taille varie de 2298 nt (Classens *et al.*, 1991) ou 2319 nt (Noteborn *et al.*, 1991) selon les isolats étudiés. En effet, les clones provenant de Cuxheaven en Allemagne (Cux-1) étudié par Noteborn *et al.* (1991), le clone 10 (Cux-1) de Meehan *et al.* (1997) et le clone japonais CAA 82-2 de Kato *et al.* (1995) possèdent un génome de 2319 nucléotides, tandis que le clone japonais TK-5803 de Farkas *et al.* (1996), les clones américains CIA-1 de Soigné *et al.* (1994) et 26P4 de Classen *et al.* (1991) ont un génome de 2298 nucléotides. La version de 2298 nucléotides serait celle retrouvée dans la nature, tandis que celle de 2319 nt serait due aux passages successifs en culture cellulaire (Renshaw *et al.*, 1996 et Islam *et al.*, 2002). La différence se situe au niveau de l'insertion d'une cinquième répétition directe située dans la région non-codante du génome (Kato *et al.*, 1995). La région non-codante du génome s'étend de la position 2190 à 386 sur l'ADN circulaire (Phenix *et al.*, 1994). Cette zone serait riche en séquence d'initiation, de régulation et d'amplification de signal de transcription (Meehan *et al.*, 1992; Phenix *et al.*, 1994 et Noteborn *et al.*, 1994).

Le génome du VAA ne contient qu'un seul signal de polyadénylation (Noteborn et Koch, 1995). À la fin des trois cadres de lecture ouverts (CLO), se trouve ce signal d'addition de poly(A) (AATAAA) aux nucléotides 2293 à 2298, le site de polyadénylation se situant 21 nt avant ce site. La boîte TATA est située aux nt 329 à 335, 25 nt avant l'extrémité 5' du transcrit et à 50 nt du codon d'initiation du premier CLO (VP2) (Phenix *et al.*, 1994; Noteborn *et al.*, 1991 et Meehan *et al.*, 1992). Le codon d'initiation de la première protéine virale (*viral protein 1* : VP1) serait le seul à avoir un consensus de Kosack soit : un résidu A à -3 et un G à 4+ (Meehan *et al.*, 1992, et Noteborn et Koch, 1995). La région non-codante contient des sites additionnels d'initiation de la transcription tel le site (SP1) : GGGCGG (305-310) et boîte CCAAT (260-266) (Noteborn *et al.*, 1991; Meehan *et al.*, 1992 et Noteborn *et al.*, 1994). Les séquences consensus des sites de liaison des facteurs de transcription des adénovirus

(ATF) et du « *cyclic AMP responsive element binding protein* » (CREB) se retrouvent dans les quatre répétitions de 19 nt (Noteborn *et al.*, 1991 et Meehan *et al.*, 1992). D'autres sites intéressants ayant un potentiel de liaison aux facteurs de transcription lymphoïdes se retrouvent aussi dans cette région non-codante (Meehan *et al.*, 1992).

En culture cellulaire, les cellules infectées contiennent autant d'ADN simple brin que d'ADN double brin. Ce dernier permet la création d'un ARNm et de nouveaux génomes à ADN simple brin négatif (Noteborn *et al.*, 1991; Noteborn et Koch, 1995 et Farkas *et al.*, 1996). L'ARN messager de 2,1 kb est faiblement détectable 8 à 12 heures après infection cellulaire pour atteindre un pic après 32 à 48 hrs (Phenix *et al.*, 1994 et Noteborn et Koch, 1995). Il est possible que le VAA se réplique par le mécanisme des cercles roulants utilisé chez le phage ϕ x174 (Meehan *et al.*, 1992 et Noteborn et Koch, 1995). Gilbert et Dressler, tel que cité par Bendinelli *et al.* (2001), décrivent ce mécanisme comme étant bien adapté pour les génomes à ADN simple brin. D'autres auteurs considèrent plutôt que la répllication du VAA est différente des autres circovirus (Bassami *et al.*, 1998) et que la recombinaison homologue pourrait être le mécanisme impliqué (Todd *et al.*, 1996).

1.2.4 Organisation protéique

Comme décrit précédemment, l'ADN viral est transcrit en un seul ARN messager polycistronique de 2,1 kb possédant trois cadres de lecture ouverts (fig. 5) (Noteborn *et al.*, 1991). Ces CLO codent pour une protéine structurale et deux non-structurales. La première protéine, VP1, est codée par le dernier CLO. Cette protéine structurale de 51,6 kDa forme la capsidie qui démontre trois et cinq axes de symétrie. La capsidie est icosaédrale (classe P = 3) avec un nombre de triangulation de trois (T=3). Elle est composée de 32 sous-unités constituées de 12 pentons apicaux et 20 hexons centrés. (Gelderblom *et al.*, 1989 et McNulty *et al.*, 1990)

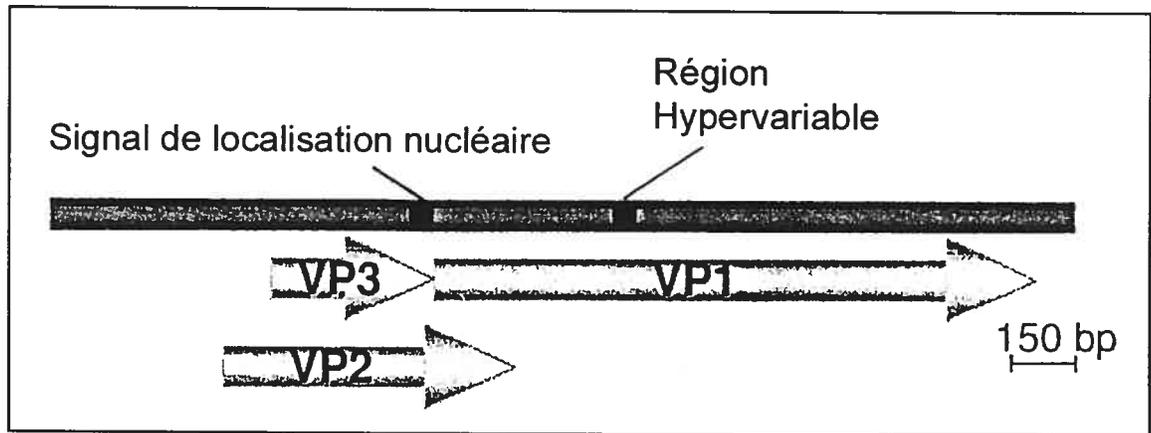


Figure 5 : Cadres de lecture ouverts sur le génome du VAA selon van Santen *et al.* (2001).

La VP1 pourrait être impliquée dans la réplication dûe aux motifs associés à la réplication par cercle roulant retrouvés sur celle-ci (Niagro *et al.*, 1998). Sa région N-terminale très basique aurait une fonction de liaison à l'ADN (Todd *et al.*, 1992). Une région hypervariable se situant de l'acide aminé 139 à 151 a été identifiée par Renshaw *et al.* (1996). Cette région influencerait la vitesse de réplication du virus ainsi que sa dispersion dans les cultures cellulaires.

La deuxième protéine (VP2) est codée par le premier CLO et est produite au début de l'infection (Douglas *et al.*, 1995). Cette protéine non-structurale de 24 kDa est impliquée dans le repliement de VP1 durant l'assemblage de la capsid sans toutefois y rester associée (Noteborn et Koch, 1995 et Noteborn *et al.*, 1998). Il a été démontré que sa co-expression avec VP1 est nécessaire pour l'obtention d'anticorps neutralisants (Renshaw *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1997 et Noteborn *et al.*, 1998), ce qui n'est pas le cas lorsqu'elle est exprimée seule. Récemment, la VP2 aurait été reconnue comme étant une phosphatase à double spécificité (*dual specificity protein phosphatase*) (Peters *et al.*, 2002). La VP2 posséderait donc une activité tyrosine-phosphatase, activité impliquée dans la régulation cellulaire. Puisque le VAA dépend de son hôte pour compléter son cycle de réplication, cette capacité serait donc cruciale (Peters *et al.*, 2002). Cependant, jamais auparavant une telle protéine régulatrice n'avait été détectée dans des virus à petits génomes.

La deuxième protéine non-structurale de 13,6 kDa nommé apoptine (VP3) provient du deuxième CLO. Cette protéine induit l'apoptose dans les cellules mononuclées de poulet (Jeurissen *et al.*, 1992 et Zhuang *et al.*, 1995). Il a aussi été démontré que cette protéine induit l'apoptose dans les lignées cellulaires transformées ou dérivées de tumeurs humaines ou de rongeurs, mais pas dans les cellules primaires ou normales (Zhuang *et al.*, 1995; Danen-Van Oorschot *et al.*, 1997; Danen-Van Oorschot *et al.*, 1999; Murphy, 1999; Pieterse *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999 et Danen-Van Oorschot *et al.*, 2000). De plus, elle serait localisée dans le noyau des cellules transformées et resterait dans le cytoplasme des cellules normales (Zhuang *et al.*, 1995). Cependant, la localisation nucléaire ne serait à elle seule pas suffisante pour rendre l'apoptine active (Danen-Van Oorschot *et al.*, 2003). De surcroît, la phosphorylation de la thréonine 108 permettrait à l'apoptine d'induire l'apoptose dans des cellules normales (Rohn *et al.*, 2002).

L'apoptine est composée de deux régions riches en proline et de 2 régions chargées positivement (Noteborn *et al.*, 1991 et Zhuang *et al.*, 1995). Elle possède un signal de localisation nucléaire (deux zones basiques) et un d'exportation nucléaire (alternance d'isoleucines et de leucines) (Danen-Van Oorschot *et al.*, 1997; Danen-Van Oorschot *et al.*, 1999 et Danen-Van Oorschot *et al.*, 2003). L'apoptine est indépendante de la p53 et pourrait suivre la voie du Fas-ligand Fas (Murphy, 1999). Bien que le complexe Hip-1-Hippi induit l'apoptose par le recrutement des caspases 8, de récentes recherches ont démontré que la liaison de la protéine Hippi avec l'apoptine réduirait l'effet apoptotique de celle-ci (Cheng *et al.*, 2003). Il a aussi été découvert que l'apoptine formerait des agrégats globulaires non-covalents de 30 à 40 sous-unités stables et irréversibles (Leliveld *et al.*, 2003). Cette protéine n'aurait pas de structure tertiaire ou quaternaire bien définie et l'agrégation serait suffisante à son activité (Leliveld *et al.*, 2003). Son caractère basique lui permettrait d'interagir avec les histones et les protéines non-histones au niveau de la chromatine ce qui résulterait en un bris de l'organisation super-enroulée (Noteborn *et al.*, 1994; Noteborn et Koch, 1995; Danen-Van Oorschot *et al.*, 1997 et Murphy, 1999). Une déplétion de l'histone H1 aurait été observée favorisant la digestion intranucléosomale de l'ADN. Une autre

possibilité serait qu'elle servirait de régulateur de transcription pour l'induction des gènes impliqués dans l'apoptose. La protéine Bcl-2, une protéine cellulaire inhibant l'apoptose, n'empêcherait pas VP3 d'agir, mais pourrait même favoriser son action (Danen-Van Oorschot *et al.*, 1997; Pieterse *et al.*, 1999 et Danen-Van Oorschot *et al.*, 2000). D'un autre côté, l'inhibiteur viral de l'apoptose p35 du Baculovirus, inhibant les caspases « *downstream* » 3, 6 et 7 aurait un effet de ralentissement sur l'apoptose médiée par l'apoptine, mais n'empêcherait pas la relâche de cytochrome c par la mitochondrie ce qui conduit inévitablement à la mort cellulaire (Danen-Van Oorschot *et al.*, 2000).

La non-dépendance à la p53, la non inhibition par Bcl-2 et le choix exclusif des cellules tumorales ou transformées par l'apoptine en font une candidate idéale aux thérapies anti-tumorales. Déjà, chez la souris, l'utilisation d'un adénovirus contenant l'apoptine a été étudiée *in vitro* (Pieterse *et al.*, 1999) et *in vivo* (Murphy, 1999) sur sa capacité à détruire les tumeurs. Elle ne semblerait pas avoir de problème de toxicité. L'apoptine pourrait aussi être utilisée comme outil de détection des individus susceptibles de développer un cancer dû à leur bagage génétique (Zhang *et al.*, 1999). De nombreuses choses restent à découvrir sur cette protéine et son implication dans la mort programmée.

1.2.5 Culture cellulaire

Le VAA, de par sa nature, est très spécifique à la moelle osseuse et au thymus. Il ne peut être cultivé que dans des lignées cellulaires lymphoïdes ou hématopoïétiques proliférant activement. Ces cellules ont en commun leur capacité de tomber en apoptose. Les premières lignées cellulaires à avoir été utilisées par Yuasa (1983) sur la souche Gifu-1 ont été les MDCC-MSB1 et les MDCC-JP2. Ces cellules lymphoblastiques de poulet ont été transformées par le virus de la maladie de Marek. La troisième lignée, la LSCC-1104X5 provient de cellules lymphoblastiques transformées par le virus de la leucose aviaire (Yuasa et Yoshida, 1983; Yuasa *et al.*, 1983a et Calnek *et al.*, 2000).

Les MDCC-MSB1 ont été les cellules les plus utilisées dans l'isolation *in vitro*, la propagation et la titration. Yuasa et Imai ont cependant noté en 1986 que la croissance de ces cellules variait d'une culture à l'autre et que la réplication du VAA dépend de cette croissance (Yuasa et Imai, 1986). Les MSB1 se caractérisent comme étant des lymphocytes T *helper* matures (CD3+, CD4+, CD8- et TCR2+). Les MSB1 ont cependant une limite, certaines souches du VAA ne se cultivent pas, peu ou très lentement sur celles-ci (Renshaw *et al.*, 1996 et Calnek *et al.*, 2000.). À ce sujet, Calnek *et al.* (2000) ont démontré que les MDCC-CU147 sont excellentes pour les souches CIA-1 et Cux-1. Les CU147 sont CD4-, CD8+ et TCR3+. La susceptibilité des cellules ne serait cependant pas différente en considérant les TCR, ni significative en ce qui a trait au CD4+/-, CD8+/- (Calnek *et al.*, 2000). Lors des nombreux passages cellulaires, le VAA subirait des mutations réduisant sa pathogénicité (Renshaw *et al.*, 1996 et Scott *et al.*, 1999). Ces mutations seraient concentrées au niveau de la région hypervariable de VP1 tel qu'il a été décrit à la section 1.2.4. Ce phénomène a été utilisé dans la recherche vaccinale tel qu'il sera décrit dans la section 1.3.4. Ceci expliquerait aussi la différence de taille des différents clones (2298 vs 2319 nt) où une répétition se serait ajoutée (Islam *et al.*, 2000).

1.3 L'anémie aviaire

1.3.1 Manifestations cliniques, pathogenèse et réponse immunitaire

Le poulet serait le seul hôte reconnu du VAA. Les symptômes courants sont la dépression, la perte de poids, la pâleur, l'anémie, l'aplasie de la moelle osseuse et la dermatite gangreneuse (Yuasa *et al.*, 1979; Goryo *et al.*, 1989; McNulty *et al.*, 1990 et Zhou *et al.*, 1997). D'autres symptômes ou lésions peuvent aussi être associés à une infection au VAA soit : une décoloration et suintement du foie et des reins et une possibilité d'hémorragies ou d'ecchymoses sur la surface du cœur (Yuasa *et al.*, 1979; Goryo *et al.*, 1989 et McNulty *et al.*, 1990).

Le VAA cause chez les poussins naissants une anémie sévère causée par la destruction des érythroblastes et une immunosuppression due à une déplétion des thymocytes corticaux. La déplétion corticale est maximale à deux semaines post-infection (p.i.) et serait due à l'apoptose de ces cellules (Noteborn et Koch, 1995 et Adair, 2000). La déplétion des lymphocytes T précurseurs conduit à une perte de lymphocytes T cytotoxiques et une plus grande susceptibilité aux infections à médiation cellulaire (Cloud *et al.*, 1992; Adair, 2000 et Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002). Les lymphocytes possédant les marqueurs CD4+/CD8+ seraient les plus visés par le virus (Hu *et al.*, 1993). Les lymphocytes B ne seraient pas susceptibles ni touchés par le virus (Adair, 2000), tandis que les cellules NK (*natural killer*) le seraient (Bounous *et al.*, 1995). Ragland *et al.* (2002) ont démontré, sans en expliquer le mécanisme, que le VAA interfère dans la transcription d'ARNm d'interféron alpha et gamma de poulet (ChIFN- α) et (ChIFN- γ). Une infection au VAA induirait aussi une diminution de la production de facteurs de croissance par les lymphocytes T et une réponse moindre aux mitogènes (Adair *et al.*, 1991; McConnel *et al.*, 1993 et McConnel *et al.*, 1995). Les macrophages ont une activité phagocytaire, une production d'interleukine-1 (IL-1) et une expression des récepteurs Fc diminuées (McConnel *et al.*, 1993 et McConnel *et al.*, 1995). Une augmentation du rapport poids du thymus - poids du poulet a été observée

et serait une compensation de la perte lymphocytaire subie lors de la phase aiguë de la maladie (Cloud *et al.*, 1992).

Au niveau sanguin, le pourcentage d'hématocrite de poulets sains se situe entre 30-39 % selon les auteurs (Yuasa *et al.*, 1979; Rosenberger et Cloud, 1989; Adair *et al.*, 1991; Hornok *et al.*, 1998 et Toro *et al.*, 2001). Pour ce qui est des valeurs d'hématocrite pour les oiseaux infectés expérimentalement, elles se situent entre 25 et 27 % et même moins (Yuasa *et al.*, 1979 et McNulty *et al.*, 1990). Ledesma *et al.* (2001), ont noté une valeur de d'hématocrite de 8 % chez leurs oiseaux infectés. En diagnostic, le sang des poulets malades se distingue par la présence de 30 % ou plus de globules rouges immatures. La composition sanguine va revenir à la normale au plus tard 30 jours post-inoculation (Taniguchi *et al.*, 1983 et McNulty *et al.*, 1990).

Les poulets de trois semaines et plus sont susceptibles au virus, mais ne développeront pas la maladie (Noteborn et Koch, 1995). Le VAA cause l'anémie dans 100% des cas avec un taux de mortalité de 20 à 90 % lorsqu'il est inoculé à des poussins de un à quatre jours d'âge. À ceux de sept jours, l'incidence varie de 0 à 87,5% sans causer la mortalité et à 14 jours, la maladie ne se manifeste pas (Yuasa et Imai, 1983). Lorsque le VAA est inoculé à des poussins âgés de un jour, il se retrouve dans tous les organes (thymus, foie, rate, rein, bourse de Fabricius, moelle osseuse, cerveau, sérum ainsi que dans le contenu rectal (Yuasa *et al.*, 1983b). Si les poussins ne succombent pas, ils vont récupérer vers la quatrième semaine (Rozypal *et al.*, 1997).

La pathogénicité serait influencée par la dose virale, l'âge à l'infection, les anticorps maternels et la route d'infection (McNulty *et al.*, 1990; Pope, 1991 et Noteborn et Koch, 1995). La réponse immunitaire rapide des poulets plus âgés permettrait de réduire la dose, donc la sévérité. Cependant, l'activité des macrophages et des lymphocytes est réduite même si l'infection survient à 3 semaines d'âge. Les oiseaux dont la bourse a été prélevée sont susceptibles plus longtemps à l'infection. (Noteborn et Koch, 1995). Le pic du titre viral se situant entre 7 et 14 jours p.i. Les anticorps neutralisants apparaissent vers le 14^e jour pour atteindre leur maximum vers le

28^e jour (Yuasa *et al.*, 1983b). Au 49^e jour P.I., seul le cerveau et le contenu rectal contiennent du virus. D'un autre côté, les poulets infectés à trois et six semaines d'âge, ont aussi leur pic viral à sept jours P.I. tout en commençant à produire des anticorps neutralisants de façon beaucoup plus intensive. Une autre particularité est que le virus n'est pas détecté dans le cerveau de ces poulets (Yuasa *et al.*, 1983b). Les poulets infectés avec le VAA et d'autres virus tels le virus de la maladie de Marek, le virus de la réticulo-endothéliose, les adénovirus et les réovirus peuvent développer des signes plus graves comme des hémorragies musculaires ou du derme (McNulty *et al.*, 1990, McNeilly *et al.*, 1995; Noteborn et Koch, 1995; Toro *et al.*, 2000 et Toro *et al.*, 2001).

1.3.2 Mode de transmission et persistance virale

La transmission verticale du VAA et les contacts à l'éclosion des œufs causeraient la maladie chez les poussins de 3 semaines et moins (Rosenberger et Cloud, 1998). Chez les poulets de tout âge, les voies orales et respiratoires seraient des voies d'entrées dans les infections (Rosenberger et Cloud, 1998). L'infection par des vaccins contaminés serait aussi possible (Pope, 1991) tout comme par la semence de coqs, infectés de façon sous-clinique (Hoop, 1993). Ces derniers seraient donc impliqués dans la transmission verticale sans démontrer de symptômes. D'ailleurs, des oiseaux séronégatifs ont démontré une présence virale sans réplication active. Le virus serait donc persistant de façon latente et ce, dans les gonades (Cardona *et al.*, 2000b et Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002). Les organes impliqués dans cette échappatoire à l'élimination virale, suite à une séroconversion, seraient aussi impliqués dans la transmission verticale (Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002). L'état de l'ADN viral (épisomal, particule virale ou insertion dans l'ADN cellulaire) n'est cependant pas connu (Cardona *et al.*, 2000b et Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002).

1.3.3 Épidémiologie

Les épidémies de VAA causant des symptômes cliniques sont plutôt rares. Ils surviennent lorsque des poules en ponte séronégatives sont touchées. Le virus est donc transmis verticalement à la progéniture qui développe une maladie similaire à celle

obtenue expérimentalement (McNulty, 1997). Normalement, des oiseaux de différentes générations et d'âge variable seront en contact favorisant l'exposition aux virus. Les jeunes vont recevoir la protection des anticorps maternels et les plus vieux vont résister. La transmission verticale est alors presque inexistante. La transmission horizontale peut toutefois survenir lorsque les anticorps maternels auront décru (McNulty, 1997). Ceux-ci peuvent persister jusqu'à la troisième semaine (Otaki *et al.*, 1992) sans toutefois être détectables à l'ELISA (Markowski-Grimsrud et Schat, 2003). Dans des conditions naturelles, le VAA va se disperser en plusieurs semaines dans une volée selon Vielitz et Landgraf (1988) et Chettle *et al.* (1989). Selon Hoop (1992), les oiseaux seront continuellement réinfectés par leurs voisins de cage et leur environnement, dû à la présence de VAA dans les fientes (Dren *et al.*, 1996), l'eau, l'air et la nourriture (Rosenberger et Cloud, 1989).

Toutefois, la maladie et la mortalité dues au VAA seront plus susceptibles d'être causées par une transmission verticale qu'horizontale (McNulty *et al.*, 1988). La mortalité dans une volée est généralement faible, mais peut atteindre jusqu'à 30 % (Soiné *et al.*, 1993). Dans ces cas, une co-infection par des virus, des bactéries ou des mycoses serait probablement la cause d'un si fort pourcentage (McNulty, 1997), le VAA agissant en synergie avec des virus tels celui de la réticulo-endothéliose et celui de la maladie de Marek (Jeurissen et Boer, 1993; Dren *et al.*, 1996 et Miles *et al.*, 2001). Donc, dû à son impact immunosuppresseur, le VAA peut entraîner des épidémies multi-factorielles et une absence de réponse à certains vaccins ce qui engendre des pertes énormes pour les éleveurs (Soiné *et al.*, 1993 et Noteborn et Koch, 1995). De plus, nombres d'infections vont rester sous-cliniques et passer inaperçues en industrie (Rosenberger et Cloud, 1989). Il existe cependant certaines mesures préventives qui seront décrites dans la prochaine section.

1.3.4 Contrôle de l'infection

Lors de l'élevage du poulet, il existe plusieurs facteurs favorisant l'émergence de maladies. Une mauvaise ventilation, des températures trop froides et un mauvais

contrôle sanitaire sont quelques-unes des conditions à gérer (Fussell, 1998). Il existe plusieurs façons de contrôler le VAA clinique. Aux États-Unis, l'industrie du poulet de grill laisse l'infection naturelle se produire avant le début de la production des œufs (Fussell, 1998). Cependant, ils tendent à utiliser le vaccin vivant de plus en plus tout comme le fait l'Europe depuis un certain temps. Cette procédure s'est avérée être efficace dans la prévention de la transmission verticale (Fussell, 1998). En 1988, Vielitz et Landgraf ont développé un vaccin vivant par propagation dans des embryons de poulets (Noteborn et Koch, 1995). Le vaccin doit être administré entre la treizième et quinzième semaine afin d'obtenir une séroconversion rapide (Vielitz *et al.*, 1991) et il est distribué dans l'eau abreuvent les poulets reproducteurs (Todd, 2000). Une séroconversion de 75 à 100 % a été obtenue par la vaccination (Nobilis CAV P4, Intervet, Millsboro, DE) à 44 et 74 jours (Cardona *et al.*, 2000a). L'utilisation du vaccin à la cinquième semaine ou l'exposition naturelle au VAA des reproducteurs donnerait aux poussins une immunité similaire (Barbour *et al.*, 2002).

Une autre démarche, complémentaire à l'utilisation du vaccin serait de stimuler la production d'anticorps maternels et d'étirer le temps pendant lequel ceux-ci protègent les poussins (McNulty *et al.*, 1991). D'autre part, la contamination de la nourriture par des mycotoxines réduirait les niveaux d'IgG protecteurs et par conséquent, les poussins seraient moins bien protégés de l'infection (Pope, 1991). Un bon contrôle de la propreté et de la qualité est donc tout indiqué afin de réduire les risques d'infection. Cependant, une plus grande attention à la propreté peut retarder l'infection par le VAA jusqu'à la période de ponte et conduire à une épidémie chez la prochaine génération (McIlroy *et al.*, 1992) d'où l'importance de la gestion de l'exposition virale des poulets.

L'utilisation de vaccins non-atténués implique cependant des risques au niveau immunitaire favorisant la co-infection (Zhou *et al.*, 2000). Puisque l'infection au VAA est plus dangereuse pour les jeunes poussins, le vaccin devrait être très peu pathogène (Yamaguchi *et al.*, 2001). C'est ce que propose l'équipe de Yamaguchi *et al.* (2001) par l'utilisation d'un clone peu pathogène dans le développement d'un vaccin vivant. En effet, les clones ayant un résidu histidine à la position 394 de VP1 sont moins

pathogéniques que ceux ayant une glutamine. Todd *et al.* (2002) ont quant à eux étudié la faible pathogénicité des clones ayant les acides aminés modifiés aux positions 75, 89, 125, 141 et 144 de VP1. La production d'un vaccin inactivé est réduite puisqu'il est difficile d'obtenir de forts titres viraux en culture cellulaire ou embryonnaire (Noteborn et Koch, 1995). Une alternative a été proposée par Koch *et al.* en 1995 en produisant un vaccin de sous-unités recombinantes basé sur l'ADN viral. La coproduction des protéines VP1 et VP2 dans un baculovirus recombinant permettrait la production d'anticorps neutralisants lorsque injecté aux poulets. Takase *et al.* (2000) proposent une surveillance des volées par l'utilisation de poulets sans pathogènes spécifiques (SPF) et ainsi vérifier leur séroconversion. Cette approche serait utile lorsque les poulets possèdent déjà ces anticorps, mais pourrait aussi nuire en amplifiant les pathogènes présents (Takase *et al.*, 2000).

1.3.5 Économie

Peu d'études ont été réalisées sur l'impact économique du VAA sur l'industrie de la volaille. En 1991, McNulty *et al.* ont évalué l'impact des infections sous-cliniques par le VAA. En comparant deux volées, une sans anticorps dirigé contre le VAA et une avec, ils ont démontré que les poulets sains rapportaient 13 % de plus en revenus nets par 1000 oiseaux. De plus, ils obtiennent une conversion de la nourriture de 2% plus élevée que chez ceux atteints et gagnent en moyenne 2,5% plus de poids (McNulty *et al.*, 1991). L'équipe n'a cependant pas noté de différence au niveau de la mortalité. Fusell (1998) appuie aussi le fait qu'une volée de poulets vaccinés ait de meilleurs rendements au niveau du gain de poids, de la conversion de la nourriture et de la viabilité. D'un autre côté, McIlroy *et al.* en 1992, n'ont pas constaté d'effet au niveau de la conversion de nourriture, mais ont toutefois noté un taux de mortalité supérieur de 2.0 à 2.3% comparé à une volée en santé. Ils vont dans le même sens que les autres études avec un gain de poids qui est de 3.3 à 3.5 % plus faible et un revenu net de 17.3 à 19.6% plus faible chez les poulets infectés (McIlroy *et al.*, 1992). Il est à noter que dans cette étude, ils ont traité les animaux malades et considéré le coût dans leur évaluation. Finalement, une étude récente effectuée par Hagwood *et al.* (2000)

démontre une perte de production par une viabilité de 5 % inférieure et une condamnation des lieux 2,1 % plus élevée comparées aux témoins en santé.

1.4 Les méthodes de diagnostic

1.4.1 Vers une détection virale simple et efficace

Depuis plus de 20 ans, plusieurs équipes de recherches ont utilisé et optimisé une ou plusieurs techniques permettant la mise en évidence du VAA dans les cultures cellulaires ou dans les échantillons prélevés à même les poulets. Cette section est une énumération et explication de la majorité des tests utilisés dans la détection du VAA ou d'autres virus similaires ainsi que les points forts et faibles notés par les différents chercheurs.

1.4.2 Immunofluorescence indirecte (IFI)

Les premiers moyens de détection du VAA ont été l'immunofluorescence indirecte (IFI) et la neutralisation de virus (NV). Yuasa *et al.* (1986) ont été les premiers à vérifier l'antigénicité du VAA par ces deux tests. Par la suite, l'IFI devint le test de référence. L'IFI consiste de manière générale à déposer des cellules dans les puits des lames multitest. Les puits sont séchés par incubation puis fixés à l'acétone. Les lames sont exposées au sérum de poulet puis à l'antisérum de lapin anti-IgG de poulet couplé à l'isothiocyanate fluorescéine (FITC). Par la suite, les lames sont observées sous microscope à fluorescence ce qui permet de détecter la présence d'anticorps anti-VAA dans les sérums testés. L'IFI et le test de NV sont tous deux très spécifiques et ont une bonne concordance entre eux (Dren *et al.*, 1996), mais l'avantage principal de l'IFI réside dans sa simplicité, sa rapidité, son coût et son labour moindre comparativement à la NV (Dren *et al.*, 1996 et Zhou *et al.*, 1996). Toutefois, certains inconvénients de ce test ont été mentionnés dans la littérature. Rozypal *et al.* (1997) ont trouvé l'interprétation difficile due à la fluorescence non spécifique causée par les cellules négatives agglutinées en amas ou à la perte de signal due à la destruction cellulaire faite par le virus lors d'incubations plus longues. Cette équipe a compensé ce

problème en utilisant la technique du PCR qui sera décrite plus loin. Zhou *et al.* (1996) ont aussi eu une perte de spécificité due à la présence d'autres antigènes tels ceux du virus de la maladie de Marek. L'IFI ne peut cependant être réalisée que par l'utilisation de microscopes spécialisés, l'expérience des manipulateurs est primordiale pour discriminer les faux positifs et la sensibilité est dépendante de la capacité du VAA d'infecter les cellules MDCC-MSB1 (Novak et Ragland, 1997; Lamichhane *et al.*, 1992 et Sander *et al.*, 1997). Des réactions non-spécifiques avec les anticorps polyclonaux de poulet dirigés contre le VAA ou de faux-positifs créé par de l'immunoglobuline conjuguée à la FITC seraient aussi problématiques.

1.4.3 Immunoperoxidase indirecte (IPI)

Le principe de ce test est le même que celui de l'immunofluorescence indirecte sauf que l'anticorps révélateur est couplé à une peroxydase au lieu de la fluorescéine. L'IPI serait moins sensible que l'IFI, mais l'intensité de son signal serait plus facile à lire et ne nécessiterait pas l'utilisation d'un microscope à fluorescence (Lamichhane *et al.*, 1992).

1.4.4 Neutralisation de virus (NV)

Le test par neutralisation de virus débute par la dilution du virus dans un sérum immun ou dans des anticorps monoclonaux. Le tout est par la suite exposé aux cellules et après quelques passages en culture cellulaire, la plus forte dilution d'anti-sérum inhibant le développement d'effets cytopathiques indique le titre viral. Drén *et al.* (1996) proposent de combiner l'IFI à la NV dans l'examen sérologique des poulets. En effet, selon leurs recherches, bien que la NV soit plus sensible, elle donnerait 10 à 20 % de plus de positifs qui sont soit des non-spécifiques ou des faux positifs. Cette technique serait aussi susceptible de donner de faux négatifs (Drén *et al.*, 1996). Leur solution est donc de tester les sérums positifs à l'IFI avec le test de NV pour confirmer leurs hypothèses. Otaki *et al.* (1992) considèrent eux aussi le test de NV comme étant le plus sensible. Cependant, le test de NV nécessite des passages continus du virus ce qui rend ce test trop accapant pour l'évaluation d'une large quantité d'échantillons

(Lamichhane *et al.*, 1992 et Kato *et al.*, 1995). De plus, le temps requis par les manipulateurs avant de pouvoir fournir des résultats est un point important à considérer lorsque l'on effectue un diagnostic à vocation commerciale (Novak et Ragland, 1997).

1.4.5 Enzyme link immunosorbent assay (ELISA)

La difficulté d'adapter l'IFI et la NV à de grandes quantités d'échantillons à tester ont conduit au développement d'un autre test, l'ELISA (Todd *et al.*, 1999). L'ELISA et l'IFI sont en accord à 84% du temps (Lamichhane *et al.*, 1992). L'ELISA indirect consiste à enduire des puits de l'antigène recherché (protéines virales du VAA) et à l'exposer à un sérum immun de poulet. Par la suite, un anticorps anti-poulet couplé à une peroxydase détecte celui-ci et le tout est révélé par l'ajout d'un substrat. La technique de l'ELISA est facilement automatisable et ne nécessite pas l'utilisation de microscope. Cependant, la quantité requise de virus et d'anticorps monoclonaux font que ce test est coûteux (Lamichhane *et al.*, 1992). Afin de réduire le coût et le temps, Todd *et al.* (1990) ont mis au point un test ELISA de capture et un de type bloquant ayant un temps d'incubation plus court et un coût moindre des réactifs (Todd *et al.*, 1999). Ce test serait à 98,5% en accord avec le test ELISA indirect. Il existe aujourd'hui des ensembles commerciaux de détection du virus de l'anémie du poulet par la méthode de l'ELISA. Il y a, entre autre, ceux distribués aux États-Unis (Idexx Laboratories Inc., Westbrook, ME) (Cardona *et al.*, 2000a ; De Herdt *et al.*, 2001 et Barbour *et al.*, 2002) et ceux distribués en Angleterre (tel le Flockscreen CAV antibodytest de Guilday Ltd) (Engstrom, 1999).

1.4.6 Hybridation *in situ* (His)

L'hybridation *in situ* (His) est une technique utilisée en sciences biomédicales afin d'évaluer l'expression des gènes au niveau des tissus et des cellules (Novak et Ragland, 1997 et Kim et Chae, 2001a). Cette méthode ne nécessite pas la préparation des échantillons et l'extraction d'ADN tout en permettant de localiser au niveau cellulaire la séquence recherchée (Novak et Ragland, 1997), mais des conditions strictes pour éviter l'hybridation non spécifique sont requises (Kim et Chae, 2001a). L'His débute par la fixation et l'enrobage de paraffine d'un échantillon d'organe. Celui-ci est

ensuite tranché au μm près. La tranche d'organe, après avoir été déparaffinée, peut ensuite être exposée à une sonde marquée, au PCR *in situ* (décrit au point 1.4.12) ou à l'IFI. L'*His* corrèle à 100 % avec l'IFI bien que ce test permette de détecter la présence virale une semaine avant la séroconversion des poulets. De plus, les poulets peuvent contenir des anticorps neutralisants après avoir éliminé le virus ce qui créerait une variation des résultats entre les différents types de tests (Novak et Ragland, 1997 et Sander *et al.*, 1997). La capacité de détection par l'*His* diminuerait graduellement après six heures de fixation dans la formaline et serait considérablement réduite après 24 heures. Cependant, l'utilisation d'une sonde biotinylée contournerait ce problème (Sander *et al.*, 1997).

1.4.7 Transfert de type Southern et *Dot-Blot*

La méthode de *Dot-Blot* tout comme la méthode de transfert de type Southern consistent à déposer de l'ADN, amplifié ou non sur une membrane de nylon ou de cellulose puis d'exposer cette membrane à une sonde marquée à la digoxigénine, radioactivement ou à un fluorochrome. Le tout est révélé par autoradiographie ou ajout du substrat approprié. Bien que la méthode de *Dot-Blot* soit rapide et simple, elle manque de sensibilité (Tham et Stanislawek, 1992). Celle-ci se situe entre 1 à 10 pg d'ADN du VAA (10^5 à 10^6 copies du génome) (Todd *et al.*, 1991). L'emploi d'un clone du génome viral pour la préparation de la sonde utilisée dans cette technique serait préférable à l'utilisation d'ADN provenant de l'extraction de virus purifié (Todd *et al.*, 1991). L'usage d'une sonde marquée à la digoxigénine remplaçant le marquage radioactif et par utilisation de la chemiluminescence au lieu de la colorimétrie augmenteraient la sensibilité et la sécurité de cette technique (Zerbini *et al.*, 2001).

1.4.8 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique du PCR consiste à amplifier une séquence déterminée par utilisation d'amorces spécifiques à cette séquence. L'échantillon est dénaturé, les amorces s'apparient à la matrice et l'enzyme thermo-résistante allonge le brin complémentaire. Ces étapes sont répétées de 25 à 35 fois pour donner une amplification exponentielle du

matériel de base. Cette technique ne peut cependant pas être utilisée efficacement tant que le génome du virus n'est pas au moins connu en partie. La séquence du VAA étant connue et la faible variation génétique de ses différentes souches ont rendu l'utilisation du PCR plus facile. Cette technique a été utilisée avec des échantillons de sérum, d'urine, de fiente et d'ADN extrait d'organes frais ou fixés à la formaline et enrobé de paraffine (Tham et Stanislawek, 1992). Tham et Stanislawek (1992) considèrent la technique de PCR comme étant la plus sensible des méthodes en réussissant à détecter 1 fg d'ADN de VAA, tandis que Todd *et al.* (1992) ont obtenu une sensibilité de l'ordre de 0.1 fg (100 à 200 molécules) lorsque combiné au Dot-Blot.

Le PCR serait la méthode de détection du virus la plus fiable, rapide et spécifique (Noteborn *et al.*, 1992 et Kato *et al.*, 1995). Cependant, le PCR serait susceptible aux contaminations et aux inhibiteurs enzymatiques, surtout lorsque de grandes quantités d'échantillons sont manipulés (Todd *et al.*, 1992 et Zerbini *et al.*, 2001). Les polysaccharides, l'urée et l'hémoglobine possèdent une solubilité comparable à celle de l'ADN et peuvent donc rester comme contaminant lors d'extractions (Moreira, 1998). Le choix de la technique employée est donc importante. Todd *et al.* (1992) ont obtenu de meilleurs résultats en extrayant l'ADN du VAA à partir du thymus de poulet par la méthode de la guanidine isothiocyanate plutôt que par la méthode au phénol ou par ébullition. Une attention particulière devrait être portée à chacune des étapes (extraction, amplification et analyse) dans le but d'empêcher la contamination et l'ajout de témoins négatifs et positifs afin de discriminer les faux positifs et faux négatifs (Kim et Chae, 2001b).

Certaines précautions doivent donc être prises afin de contrôler l'ADN indésirable provenant soit de l'extraction, soit des amplifications d'ADN post-PCR. La séparation physique des lieux d'extraction d'ADN, de PCR et d'analyse de PCR est primordiale (Dwyer et Saksena, 1992; Prince et Andrus, 1992 et Watson *et al.*, 1994) ainsi que l'utilisation d'une hotte (Padua *et al.*, 1999). Les rayons UV employés dans la décontamination des lieux, des solutions et des outils de travail sembleraient efficaces lorsque deux longueurs d'onde sont utilisées (254 et 300 nm) (Sarkar et Sommer,

1990a), mais leur efficacité générale reste discutable. En effet, si l'ADN à éliminer/dénaturer est de trop petite taille (fig. 6), trop sec ou des dNTP sont présents, les rayons UV n'auront pas l'effet escompté (Sarkar et Sommer, 1990b; Cimino *et al.*, 1991; Fox, 1991; Sarkar et Sommer, 1991; Frothingham *et al.*, 1992; Dwyer et Saksena, 1992 et Padua *et al.*, 1999).

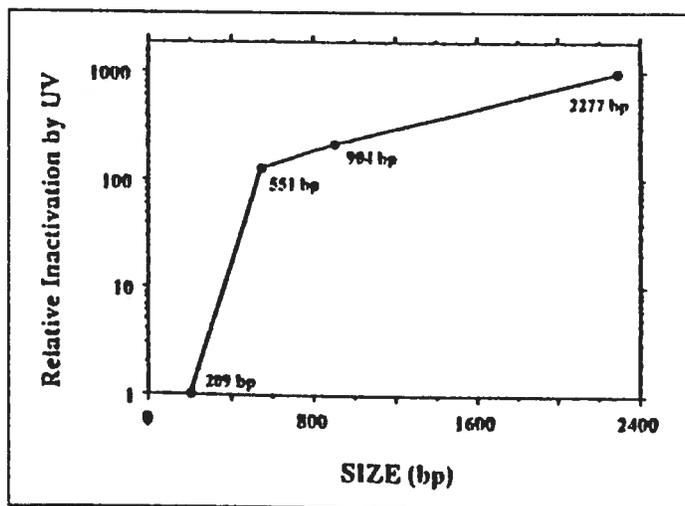


Figure 6 : Inactivation des segments d'ADN par les UV en fonction de leur taille. Tiré de Sarkar et Sommer (1991).

De plus, les rayons UV pourraient nuire à la sensibilité du PCR lorsque l'huile ou les tubes sont irradiés car ceux-ci relâchent dans les solutions des produits ayant un effet inhibiteur (Pao *et al.*, 1993; Dohner *et al.*, 1995 et Burgess et Hall, 1999). La méthode par traitement post-PCR des tubes serait aussi une solution. Que ce soit par l'utilisation de Psoralène, d'Hydroxylamine, d'endonucléase de restriction, d'UTP (uridine triphosphate), de UNG (uracil-N-glycosylase), d'UTG ou une combinaison de plusieurs approches incluant les UV le but est de rendre les amplicons non réutilisables c'est-à-dire non amplifiables de nouveau (Cimino *et al.*, 1991; Thornton *et al.*, 1992; Aslanzadeh, 1993; Watson *et al.*, 1994 et Sharma *et al.*, 2002). Une autre mesure de décontamination proposée est celle de l'utilisation des rayons gamma. Cependant, cette technique serait aussi dépendante de la taille et de la composition de l'ADN tout en étant réalisable que dans les centres possédant ce genre d'équipement (Deragon *et al.*, 1990).

Le choix du type d'échantillon à analyser et son traitement influence aussi la qualité du PCR. Par exemple, lorsqu'un échantillon de sang est soumis à un laboratoire, la température d'entreposage et le temps influencent beaucoup les résultats (Novak et Ragland, 1997). L'hème, relâché par la lyse des globules rouges, inhiberait la Taq ADN polymérase (l'enzyme thermo-résistante) et causerait la destruction de l'ADN à haute température par sa liaison avec celui-ci. Cependant, l'utilisation du sang comme échantillon de diagnostic couplé à un PCR dirigé sur les régions hautement conservées du VAA permettrait d'obtenir une méthode efficace et rapide de détection (Rozypal *et al.*, 1997).

1.4.9 PCR niché

La technique du PCR niché se caractérise par l'emploi d'amorces se situant dans la séquence amplifiée par un premier PCR pour en réaliser un deuxième. Cette double amplification permet de voir sur gel ce qui ne serait pas ou peu visible avec une seule amplification. Cette technique permet aussi de faire ressortir une bande d'une amplification non spécifique, contenant plusieurs séquences amplifiées différentes, en n'amplifiant à partir de celles-ci que l'ADN choisi. Le PCR niché serait capable de détecter une molécule de VAA ou 0,1 à 0,01 cellules infectées (équivalent à une dose infectieuse médiane en culture de tissus (TCID₅₀) de 10^{0,5}) (Imai *et al.*, 1998) dépassant en sensibilité le PCR conventionnel. Le PCR niché serait très sensible aux contaminations par l'ADN déjà amplifié puisque celui-ci est réutilisé.

1.4.10 PCR multiplex

Le PCR multiplex est une autre variante du PCR qui se distingue par l'emploi de deux ou plusieurs paires d'amorces dans une même réaction. L'équipe de Larochelle *et al.* (1999) l'a utilisé sur des échantillons provenant de cochons du Québec afin de détecter et différencier le CVP 1 et le CVP 2, tandis que Kim *et al.* (2001) l'ont employé pour la semence des sangliers. L'avantage de cette technique réside dans le fait qu'elle est plus rapide et fiable dans la discrimination de deux virus tout en étant soumis aux mêmes inconvénients que le PCR conventionnel (Kim *et al.*, 2001).

L'efficacité de cette technique serait très dépendante de l'optimisation des concentrations des amorces, des sondes, de l'enzyme et de l'ADN utilisé (Exner et Lewinski, 2002).

1.4.11 PCR compétitif

Le PCR compétitif a la particularité de permettre la quantification de l'ADN. Par une amplification simultanée de la séquence cible et d'une séquence ayant les mêmes sites d'amorçages, mais de taille différente, il est possible de différencier sur gel ou par digestion enzymatique les deux amplifications et même de les quantifier. Liu *et al.* (2000) ont quantifié par cette technique le CVP 1 et 2 chez les cochons atteints du *postweaning multisystemic wasting syndrome*. Le VAA a été titré par PCR compétitif, par l'équipe de Yamaguchi *et al.* (2000), en seulement une journée comparé aux trois semaines requise par la méthode de neutralisation de virus. Cette technologie permet de détecter le ou les génomes recherchés se trouvant en faibles quantités dans des échantillons biologiques tout en étant capable de les discriminer des échantillons négatifs (Young *et al.*, 2002). Cette technique nécessite au moins 4 réactions de PCR simultanées contenant chacun une concentration différente d'ADN compétitif la rendant très laborieuse et ne serait pas aussi précise que le PCR en temps réel (Markowski-Grimrud *et al.*, 2002) qui sera discuté au point 1.4.13.

1.4.12 PCR *in situ*

Un autre type de diagnostic combinant l'amplification et la sensibilité du PCR et la possibilité de localiser au niveau cellulaire le virus se nomme le PCR *in situ*. Les tissus, fixés à la formaline et recouverts de paraffine sont déparaffinés, perméabilisés à la protéinase K puis après ajout des réactifs, un PCR est réalisé sur la lame. Par la suite, une sonde marquée à la digoxigénine s'y hybride et est détectée par un anticorps anti-DIG couplé à une phosphatase. Par addition d'un substrat, la présence et la localisation du virus sont révélées. Sander *et al.* (1997) ont observé à l'aide de cette technique une différence entre la détection du génome viral (poulets infectés) et la présence d'anticorps anti-VAA (poulets ayant été infectés). Cardona *et al.* (2000b) ont eux aussi

utilisé cette technique dans leur étude de la présence du VAA dans un état latent dans les tissus reproducteurs.

1.4.13 PCR en temps réel

Le PCR en temps réel utilise des sondes marquées qui, lorsque hybridées, deviennent fluorescentes et permettent une quantification à chacun des cycles. Puisque l'amplification, la détection et la quantification sont effectués simultanément, cette technique est plus rapide et moins laborieuse que le PCR conventionnel (Kearns *et al.*, 2001). Cependant, la concentration en magnésium utilisée dans cette technique influencerait la fluorescence tout comme l'efficacité de l'activité 5'-exonucléase de l'ADN polymérase utilisée (Kreuser *et al.*, 2000). Cette activité varierait grandement d'une compagnie à l'autre. Les sondes fluorogéniques généralement utilisées sont le SYBR® Green et le TaqMan®. Ces sondes permettent une quantification et une standardisation plus rapide et plus sensible (Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002). L'utilisation de TaqMan permet de mesurer deux colorants liés à deux sondes différentes dans une seule réaction ciblant l'ADN à étudier et l'ADN témoin (Aberham *et al.*, 2001). L'utilisation d'un ADN témoin dans chacune des réactions permet d'exclure les faux positifs. La limite de détection se situerait à moins de 10 copies d'ADN (Kearns *et al.*, 2001). Aberham *et al.* (2001) ont déterminé pour leur part que 10 Baxter-Units/mL (10 équivalents de génome/mL) pouvaient être quantifiés précisément par cette technique, tandis que Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) démontrent que le PCR en temps réel est au moins aussi sensible que le PCR niché détectant de 1,7 à 4,2 molécules. Cette technique offre aussi l'avantage d'estimer le titre viral de nombreux échantillons rapidement (Ma *et al.*, 2001).

1.4.14 PCR-ELISA et PCR-DEIA (DNA enzyme immunoassay)

Le PCR-ELISA est un PCR marqué, généralement à la digoxigénine, qui est hybridé à une sonde biotinylée. Cet hybride est par la suite immobilisé sur une microplaque recouverte de streptavidine. Le tout est reconnu par un anticorps anti-DIG couplé à une peroxydase pour être révélé par l'ajout d'un substrat (fig. 7). Cette

technique est sensible comparée à l'isolement viral et sa rapidité la rend utilisable au niveau du diagnostic de routine (Ramina *et al.*, 1999). Le PCR-DEIA est une alternative au PCR-ELISA où l'ADN n'est pas marqué à la digoxigénine et que l'anticorps utilisé est dirigé contre l'ADN double brin. En comparant à la technique de Southern par autoradiographie au ^{32}P , au DIG ou à la chemiluminescence, la technique de PCR-DEIA est 95 % sensible et 100 % spécifique et de plus, elle est plus rapide (Feucht *et al.*, 1995).

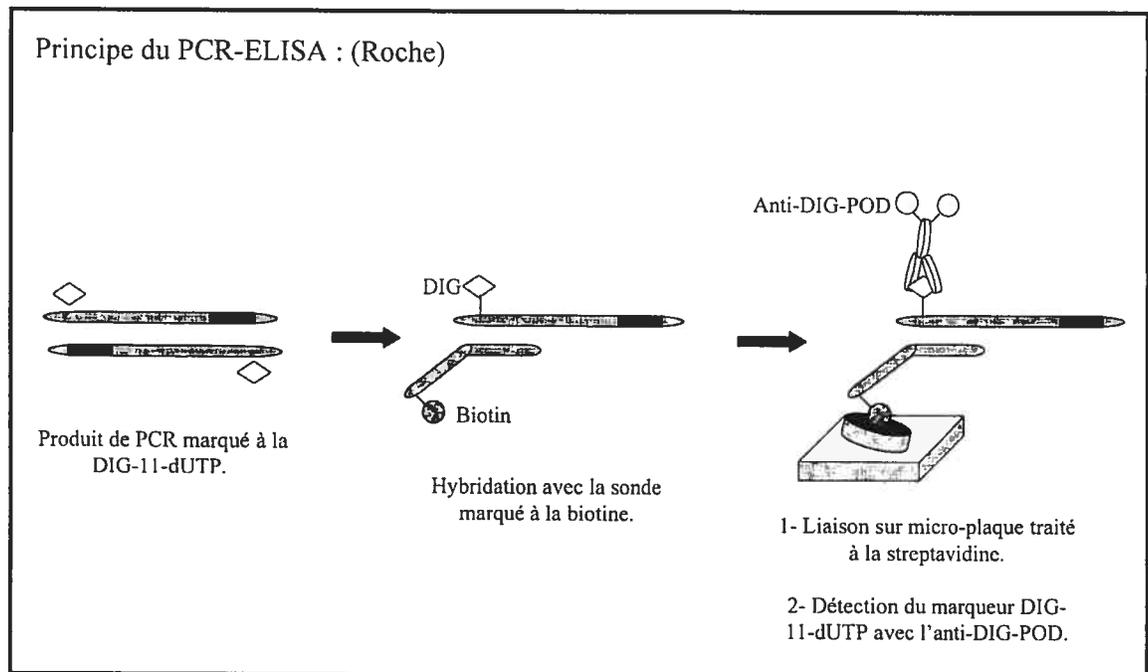


Figure 7 : Principe du PCR-ELISA selon Roche Diagnostics.

CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE

2.1 Matériel biologique

2.1.1 Cellules

La lignée cellulaire lymphoblastoïde MDCC-CU147, non-adhérente et transformée par le virus de la maladie de Marek (Yuasa *et al.*, 1983a; Goryo *et al.*, 1987 et Calnek *et al.*, 2000) a été fournie par le docteur Karel A. Schat (Université de Cornell, Ithaca, New-York). Le nombre de passages cellulaires à la réception n'était pas déterminé. Les cellules ont été incubées entre 39 et 41°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ dans des flacons de 75 cm² (Sarsted, Montréal, Canada) contenant 40 mL de milieu Leibovitz-McCoy (LM) (Gibco, Burlington, Ontario) en présence de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco) contenant un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (Difco, Détroit, Michigan) : de la pénicilline (1,1 U/mL), de la streptomycine (1,1 µg/mL) et de l'amphotéricine B (0,003 µg/mL). Les passages cellulaires ont été effectués de façon à garder les cellules à une confluence d'environ 75% (0,5 à 1 x 10⁶ cellules/mL) atteinte aux deux à trois jours. Les manipulations concernant la congélation (5.4.1), la décongélation (5.4.2) ainsi que le décompte cellulaire (5.4.3) sont expliqués en détails en annexe.

2.1.2 Virus

Les souches du virus de l'anémie aviaire Cux-1 (Noteborn *et al.*, 1991) et CIA-1 (Lucio *et al.*, 1990) ont été fournies par le docteur Karel A. Schat (Université de Cornell). Des surnageants de culture contenant le réovirus aviaire S-1133 (souche vaccinale) et l'adénovirus aviaire (souche vaccinale FAdV-9 (90)) ont été fournis par le Dr Amer Silim (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec).

2.1.3 Plasmide

Le plasmide pCux-1 AB (5.2 kb), contenant le génome total de la souche Cuxheaven-1 inséré dans pBluescript KS II au site BamHI/EcoRI par Soiné *et al.* (1993), a été fourni par le docteur Karel A. Schat (Université de Cornell) sous forme de bactéries transformées *E. coli* DH5 α . Afin de faciliter la lecture, les références futures à ce plasmide se feront sous le nom de pCux.

2.1.4 Vaccin

Le vaccin CAV-VAC[®], provenant d'un isolat de champ atténué des États-Unis, est un vaccin vivant distribué par InterVet (Whitby, Ontario) et de titre inconnu.

2.1.5 Organes de poulets

Les organes de poulets exempts d'agents pathogènes (SPF) ont été fournis par le laboratoire du Dr Lucie Lamontagne. Les organes étaient la rate, le thymus et la bourse de Fabricius. Les organes ont été coupés, hachés et pesés. Ils ont été déposés dans des tubes et congelés à - 80°C jusqu'à leur utilisation.

2.2 Étude du génome viral

2.2.1 Variabilité des souches

À l'aide du programme *Bioedit Sequence Alignment Editor* (by Tom Hall, version 5.0.9), les différentes séquences des multiples clones des souches connues du VAA enregistrées dans la *GeneBank* ont été jumelées et comparées. Un résumé de la comparaison a été consigné en annexe (5.1.1).

2.2.2 Développement des amorces et de la sonde

Par l'utilisation du programme *Oligo* (*Primer Analysis Software Version 5.0*) et du programme *pDraw32* (by Kjeld Olesen, *Acaclone software version 1.1.51*), une sonde biotinylée et différentes amorces ont été créées. Leur position sur le génome viral (fig. 8), leur composition, la température d'appariement des amorces (T_m) (tableau I), leur repliement sur elles-mêmes ou entre elles ainsi que la formation de tête d'épingle ont été calculés à l'aide de ces deux programmes. Les amorces et la sonde biotinylée ont été préparées par la compagnie Invitrogen (Burlington, Ontario) selon les séquences fournies. La sonde a une biotine attachée en 5' et cible une région dans le CLO de l'apoptine pouvant être amplifiée par les paires d'amorces VP2 et VP3, mais pas par VP1.

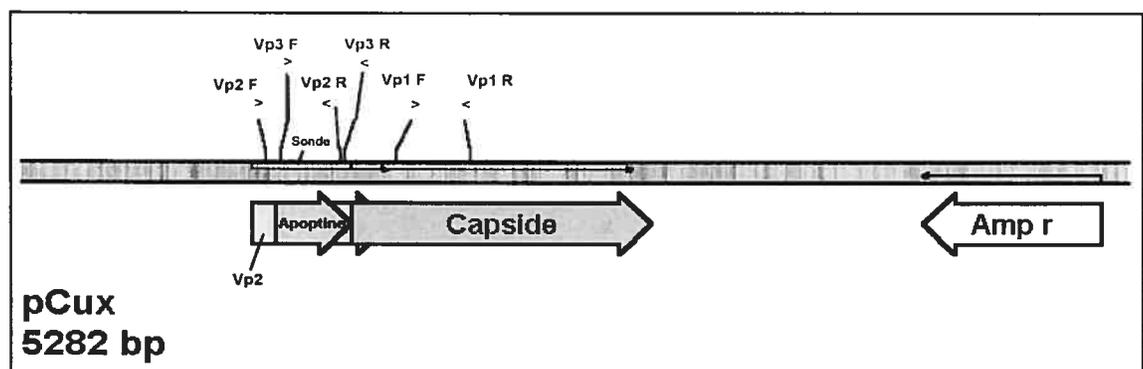


Figure 8: Visualisation du plasmide pCux contenant le génome total du VAA, une représentation des trois cadres de lecture (capside, VP2 et apoptine) par des flèches ainsi qu'une indication des différentes zones d'appariements de chacune des paires d'amorces (VP1, VP2 et VP3) et de la sonde biotinylée utilisées. Le gène codant pour l'ampicilline est aussi représenté (provenant du pBluescript). Créé à l'aide du logiciel *pDraw32*.

Tableau I: La séquence, l'orientation et la position d'appariement sur le génome du VAA ainsi que la température d'amorçage (T_m) selon le programme *pDraw32* pour les différentes amorces créées (VP1, VP2, VP3 et la sonde biotinylée) ou celles déjà publiées par Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) (SH-N5, SH-N3) et Noteborn *et al.* (1992) (CAV-1, CAV-2).

| Nom | Séquence | Position et orientation sur le VAA ¹ (en nucléotides) | T_m de PCR (en °C) |
|-------|-----------------------------------|--|----------------------|
| VP1F | 5'-CCCCAATCTACTATGACTATCCGC-3' | 1065 sens | 52,5 |
| VP1R | 5'-CATGCGACCCATGTCTTGCAG-3' | 1420 anti-sens | 53,1 |
| VP2F | 5'-GCTTAGCCGAGAGGGGCA-3' | 444 sens | 53,1 |
| VP2R | 5'-GTCGGCTGGGAGTAGTGGTAA-3' | 799 anti-sens | 52,9 |
| VP3F | 5'-CGCTCTCCAAGAAGATACTCCAC-3' | 513 sens | 52,6 |
| VP3R | 5'-TATACGCCTTTTTGCGGTTCG-3' | 822 anti-sens | 52,3 |
| Sonde | 5'Biotine-CGCTGGAATTACAATCACTC-3' | 615 anti-sens | 50,8 |
| SH-N5 | 5'-GCGGTATCGTAGACGAGCTT-3' | 985 sens | 52,4 |
| SH-N3 | 5'-AGAGATCTTGGCGACTCTCG-3' | 1151 anti-sens | 52,2 |
| CAV-1 | 5'-GCAGTAGGTATACGCAAGG-3' | 367 sens | 51,0 |
| CAV-2 | 5'-CTGAACACCGTTGATGGTC-3' | 517 anti-sens | 51,4 |

¹ Selon la séquence du génome du VAA publiée par Noteborn *et al.* (1991), dont le numéro d'accèsion dans *GenBank* est : M55918.

2.2.3 Étude de compatibilité des amorces avec des génomes connus

À l'aide du programme *BLAST* (*Basic Local Alignment Tool*) de la *National Resource for molecular biology information* (NCBI) sur le réseau Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), les séquences des amorces ont été inscrites et les génomes où elles pouvaient se lier ont été analysées. Malgré la reconnaissance de certains organismes, aucun appariement n'a été significatif (incomplet ou T_m non réalisable). Ni des séquences de poulet ou d'autres virus aviaires n'ont été reconnus.

2.3 Propagation virale et extraction d'ADN

2.3.1 Infection *in vitro*

Les manipulations ont été réalisées selon la méthode décrite par Markowski-Grimsrud *et al.* (2002). Dans un tube conique de 15 mL (Sarsted), un mL de suspension cellulaire de MDCC-CU147 ajustée à une concentration de 1×10^6 cellules/mL a été déposé. Un volume de 0,5 mL de suspension virale Cux-1 (titre inconnu) ou CIA-1 (titre inconnu) a été ajouté, mélangé et incubé à 41°C pendant 90 minutes. Les cellules ont été transférées dans un flacon à culture cellulaire de 75 cm² (Sarsted) contenant 18,5 mL de milieu LM à 10% SVF et pré-incubé à 41°C. Le flacon contenant les cellules infectées a été incubé pendant quatre jours à 41°C avec 5% CO₂. Suite à cette incubation, le surnageant a été prélevé et congelé à -80°C jusqu'à son utilisation.

2.3.2 Collecte du surnageant

À partir des flacons ayant servi à la production de virus, deux cycles de gel/dégel (-80°C / 37°C) ont été effectués afin de lyser les cellules résiduelles et libérer les particules virales. Le contenu a été centrifugé à 1 340 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et aliquoté dans des tubes à cryopréservation.

2.3.3 Dilution

Le surnageant viral et le vaccin ont été dilués dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco) afin de procéder aux différents tests impliquant le PCR. En déposant 200 µL de surnageant viral dans 1,8 mL de ce milieu, des dilutions 1 pour 10 en séries ont été réalisées jusqu'à l'obtention d'une dilution de l'ordre de 10⁻⁷. Un tube ne contenant que du milieu a toujours été conservé comme témoin négatif. Pour le plasmide pCux, un dosage d'ADN (annexe 5.4.8) a été effectué et la concentration de plasmide a été évaluée selon la conversion standard (annexe 5.4.9) (Sambrook *et al.*, 1989). Des dilutions 1 pour 10 en séries (100 µL dans 900 µL de tris-éthylène diamine tétra acétate [TE] pH 8) ont été réalisées afin d'obtenir des

concentrations variant de 10^{-2} à 10^{10} molécules / μL . La majorité des dilutions et des extractions ont été réalisées le jour même des expériences afin de minimiser la dégradation d'ADN se trouvant en solution à faible concentration. Cependant, la réalisation de tous les tests le jour même étant impossible, les expériences ont été étalées sur deux à trois jours. Les échantillons n'ont toutefois jamais été utilisés s'ils avaient été préparés plus de quatre jours auparavant.

2.3.4 Extraction de l'ADN viral au DNAzol (surnageant)

Les différentes manipulations du protocole d'extraction au DNAzol (InVitrogen) ont été effectuées selon les recommandations du fabricant avec seulement quelques modifications. Ces manipulations ont été utilisées pour extraire l'ADN des surnageants viraux de Cux-1, de CIA-1, d'adénovirus aviaire et du vaccin CAV-VAC®. Sous la hotte, 500 μL de DNAzol ont été déposés par tube. A ces tubes, 200 μL de surnageant viral (ou de vaccin) dilué ou non dans un tube Eppendorf ont été ajoutés et mélangés par inversion six fois. Par la suite, 500 μL d'éthanol (EtOH) 100 % (v/v) ont été ajoutés et mélangés par inversion six fois. Après une attente de deux à trois minutes, les tubes ont été centrifugés 15 minutes à 11 000 g à 4°C. Le surnageant a été jeté et 500 μL d'EtOH 75% (v/v) ont été ajoutés, mélangés par inversion et centrifugés cinq minutes à 11 000 g à 4°C. Les culots ont été séchés sous la hotte à flux laminaire puis resuspendus dans 50 μL de NaOH 8 mM DEPC (eau traitée au diéthyl pyrocarbonate).

2.3.5 Extraction de l'ADN viral au DNAzol (organes)

Les organes, gardés à -80°C, ont été dégelés puis, du DNAzol a été ajouté (1 mL / 20 mg d'organe). Après avoir resuspendu avec une pipette, un mL de l'homogénat a été déposé dans des tubes coniques de 15 mL. Les tubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 4°C et 16 000 g. Après avoir transféré le surnageant dans un autre tube, 500 μL d'EtOH 100 % ont été ajoutés et les tubes furent mélangés par inversion six fois. Après une attente de deux à trois minutes, les tubes ont été centrifugés deux minutes à 10 000 g à 4°C. Le surnageant a été jeté et 1 mL d'EtOH 70 % (v/v) ont été ajoutés,

mélangés par inversion et centrifugés deux minutes à 11 000 g à 4°C. Le surnageant a été jeté et le lavage à l'EtOH 70 % (v/v) a été effectué une seconde fois. Le culot d'ADN a été séché sous la hotte à flux laminaire et ressuspendu dans 200 µL de NaOH 8 mM. Pour terminer, les tubes ont été incubés à 65°C pendant 30 minutes afin de faciliter la réhydratation de l'ADN.

2.4 PCR conventionnel

2.4.1 Conditions

Afin de réduire au maximum les contaminations, certaines précautions ont été prises avant, pendant et après chacune des réactions de PCR. Les pipettes, les plaques supportant les tubes à PCR ainsi que le support à aliquots ont été irradiés aux UV (sous la hotte à flot laminaire avec ventilation) durant un minimum de 30 à 45 minutes (tout le matériel a été aspergé d'éthanol 70% au début de l'irradiation afin de faciliter sa dénaturation). Le tampon Taq 10 X (Qiagen, Mississauga, Ontario), les désoxynucléotides triphosphates (dNTP) (Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey), les amorces sens et anti-sens ainsi que l'eau DEPC ont été aliquotés sous la hotte après avoir irradié le matériel, l'eau et les tubes. Les aliquots permettant de réaliser de 10 à 15 tubes ont été jetés à la fin d'une série de réaction. À l'aide d'éthanol 70% (v/v), la zone réservée aux PCR, les boîtes d'embouts avec filtres, les tubes à PCR, les supports ainsi que les pipettes ont été nettoyés. Une fois par mois, la zone de PCR a été nettoyée à l'eau de javel. Dans le même ordre d'idées, un sarrau, une boîte de gants, des embouts avec filtres, des pipettes et une zone de travail ne furent réservés qu'à la réalisation de PCR. Pas plus d'une dizaine de tubes ont été préparés à la fois (Kim *et al.*, 2001). De plus, les tubes ont toujours été espacés d'au moins un emplacement sur le support (pour les aliquots comme pour les tubes à PCR). Ces tubes ont été préparés simultanément dans cet ordre: H₂O, tampon, dNTP, amorces sens et anti-sens et finalement, l'enzyme ADN polymérase thermorésistante a été ajoutée en dernier. Le tube témoin H₂O a été fermé dès que celle-ci fut ajoutée. Les tubes d'ADN (échantillons) ont été amenés et déposés à côté de la zone réservée. Dans les situations

s'y prêtant, la distribution a été réalisée de l'échantillon le moins concentré vers le plus concentré en fermant les tubes de PCR au fur et à mesure. Lorsqu'une série de tubes a été terminée, les gants ont été remplacés, la pipette et la zone où l'ADN a été manipulé nettoyées.

La réaction de PCR a été préparée sur glace. De l'eau DEPC a été déposée (afin d'obtenir 50 μL final) puis 5 μL de tampon Taq 10 X (1 X final), 2 μL dNTP 10 mM (0,4 mM final), 1 μl de chacune des amorces à 20 pM/ μL (0,4 pM final), 0,5 μL de Taq (*Thermus aquaticus*) (Invitrogen) à 5 U/ μL (2,5 U final) et du plasmide ou de l'ADN extrait à des concentration variables (5 ou 10 μL). Les tests ont été confirmés par la présence d'un tube ne contenant aucun ADN (témoin négatif) et un contenant de l'ADN (témoin positif). Par la suite, les produits de PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 1,5 %, coloré au bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1 X et migrés 30 minutes à 110 volts. L'appareil utilisé dans ce projet a été le GeneAmp® PCR system 2400 de Perkin Elmer (Woodbridge, Ontario) sur lequel trois différents programmes ont été utilisés. Le premier, utilisant n'importe quel des nouvelles amorces, a été réalisé d'après les recommandations du programme *pDraw32* et ajusté de façon empirique afin de déterminer les conditions optimales (la température d'appariement des amorces et le nombre de cycles). le

Ainsi, le PCR avec l'enzyme Taq a été réalisé comme suit : cinq minutes à 95°C puis 35 cycles composés d'une minute à 94°C (dénaturation), une minute à 54°C (appariement) et 40 secondes à 72°C (élongation). Une élongation finale à 72°C de trois minutes a ensuite été réalisée, suivie d'une conservation des échantillons à 4°C avant leur cueillette. Le deuxième type de PCR, a été réalisé avec les amorces CAV-1 et CAV-2 , et a été fait selon la méthode décrite par Noteborn *et al.* (1992). Les 30 cycles de PCR avec la Taq ont été réalisés comme suit : une minute à 94°C, une minute à 55°C et trois minutes à 72°C. Le troisième, réalisé avec les amorces SH-N5 et SH-N3, a été accompli selon la méthode décrite par Markowski-Grimsrud *et al.* (2002). Le tout a débuté par cinq minutes à 94°C puis 10 cycles de PCR avec la Taq ont été

réalisés : 94°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 30 secondes avec une diminution d'un degré par deux cycles de la température d'appariement jusqu'à l'atteinte de 56°C et 72°C durant 30 secondes. Par la suite, vingt cycles ont été réalisés de la même façon, mais où la température d'appariement se situait à 55°C. Le tout a été terminé par une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Pour le clonage, l'enzyme *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (Stratagene, Cedar Creek, Ontario) a été utilisée (10 U d'enzyme et une minute d'élongation à 72°C au lieu de 40 secondes) afin d'avoir des bouts francs et faciliter la ligation.

2.4.2 Expériences préliminaires

Un PCR a été réalisé selon la méthode mentionnée précédemment en utilisant l'ADN de pCux, de Cux-1, de CIA-1 et du vaccin CAV-VAC®. La visualisation des amplifications a été réalisée par migration sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) dans du tampon TAE 1X. Un tube témoin négatif (ne contenant pas d'ADN) a été utilisé. La confirmation de la nature des amplifications a été réalisée par clonage, séquençage et par hybridation avec une sonde spécifique (la sonde biotinylée précédemment mentionnée).

2.5 Vérification de la nature virale des produits de PCR

2.5.1 Purification des produits de PCR par colonnes GFX

Les trois différents produits de PCR (avec la Pfu) réalisés avec les paires d'amorces (VP1, VP2 et VP3) ont été déposés dans des colonnes GFX (Amersham Pharmacia). Dans chacune des colonnes, 500 µL de tampon de capture ont été ajoutés puis centrifugés pendant 30 secondes. Par la suite, 500 µL de tampon de lavage ont été ajoutés et centrifugés pendant 30 secondes. Après la centrifugation, la colonne a été déposée dans un Eppendorf et 50 µL de TE ont été ajoutés. Suite à une minute d'attente et une minute de centrifugation, les tubes ont été mis à - 20°C pour une conservation à long terme.

2.5.2 Insertion de l'ADN amplifié dans le plasmide pBluescript

Afin de réaliser une ligation, 1 μL d'ATP (Amersham Pharmacia) à 10 mM (1 mM final) a été déposé dans un tube Eppendorf. Puis, un μl de tampon polyvalent (OPA) 10X (1 X final), 5 U de T_4 ADN ligase (Amersham Pharmacia), 300 ng du plasmide pBluescript (Stratagene) (annexe 5.2.1) digéré par EcoRV (5.4.6) et 292 ng de la séquence amplifiée par les amorces VP3 ont été ajoutés. Le tout a formé un volume final de 10 μL . Les tubes ont été incubés à la température de la pièce de 24 à 48 heures et par la suite, une transformation a été réalisée.

2.5.3 Transformation bactérienne

Selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989), des bactéries *E. coli* DH5 α Ultra Max (50 μL) ont été décongelées sur glace et 100 ng de produit de ligation ont été ajoutés. Le tube a été incubé pendant 30 minutes sur la glace suivi d'un choc thermique à 42°C durant 60 secondes. Par la suite, le tube a été incubé pendant deux minutes sur la glace. À ce tube, 450 μL de milieu Luria-Bertani (LB) ont été ajoutés et le tout a été incubé à 37°C avec agitation pendant 45 minutes à 1 heure. La culture bactérienne a été étalée, à raison de 100, 150 ou 200 μL , sur deux Pétris contenant de l'ampicilline (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fisher, Montréal, Canada) et 800 μg de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (Fisher) le plasmide à cribler étant le pBluescript. Les Pétris ont été incubés inversés à 37°C de 12 à 16 heures.

2.5.4 Extraction d'ADN de plasmides par lyse alcaline (criblage)

Afin de trouver les clones ayant intégré l'insert d'ADN provenant de l'amplification par PCR (VP1, VP2 et VP3), une extraction de plasmides a été effectuée. À l'aide d'un clone bactérien (colonie blanche) choisi sur un Pétri, 3 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont été ensemencés puis incubés à 37°C de 12 à 16 heures avec une agitation de 200 révolutions par minute (rpm). De ce milieu, 1,5 mL a été centrifugé pendant deux minutes à 11 000 g à la température de la

pièce. Le culot a été ressuspendu avec 100 μL de solution I (annexe 5.3.2) et 200 μL de solution II (5.3.2) ont été ajoutés. Après avoir mélangé par inversion plusieurs fois, la lyse a été observée lorsque la solution est devenue claire. À ce moment, 150 μL de solution III ont été ajoutés et le tube a été mélangé par inversion plusieurs fois. Il a été incubé sur la glace pendant trois minutes puis centrifugé à 11 000 g durant 10 minutes à la température de la pièce. Après avoir transféré le surnageant dans un autre tube Eppendorf, le volume restant du tube a été complété avec de l'isopropanol et mélangé par inversion. Il a été centrifugé à 11 000 g pendant 10 minutes à la température de la pièce. Le surnageant a été jeté puis 500 μL d'EtOH 70 % (v/v) ont été ajoutés et mélangés par inversion. Encore une fois, le tube a été centrifugé à 10 000 g pendant deux minutes à la température de la pièce. Le surnageant a été jeté et le culot séché à 37°C. Le culot a par la suite été resuspendu dans 20 μL de TE pH 8.0 et 1 μL de RNase A (1 mg/mL). Pour terminer, le tube a été incubé à 37°C durant 15 minutes puis placé à -20°C pour conservation à long terme. Les clones ont par la suite été criblés par différentes digestions enzymatiques.

2.5.5 Digestion enzymatique des plasmides

La digestion enzymatique (Sambrook *et al.*, 1989) a été utilisée afin de confirmer l'insertion des produits d'amplification dans les clones. Les fragments attendus par une digestion du mélange enzymatique de XhoI/EcoRI (Amersham Pharmacia) étaient de 389 pb (VP1), 353 pb (VP2) ou 343 pb (VP3) ainsi que de 2930 pb pour tous. Une deuxième digestion a aussi été employée. Les fragments attendus par l'utilisation du mélange BglII/XhoI étaient de 3037 et 282 pb (VP1), 3116 et 167 pb (VP2) ainsi que 3083 et 190 pb (VP3). Le protocole plus détaillé est situé en annexe 5.4.6. Les clones retenus ont été cultivés (5.4.4) et conservés à -80°C (5.4.5) jusqu'à leur utilisation lors du séquençage.

2.6 Séquençage des clones sélectionnés

2.6.1 Extraction d'ADN de plasmides par « Miniprep » commerciale

Dans le but de séquencer les clones positifs aux différentes digestions enzymatiques, une extraction de plasmides a été effectuée avec un ensemble commercial (Promega, Mississauga, Ontario). Les différentes manipulations ont été effectuées selon les recommandations du fabricant. Pour débiter, 10 mL de LB contenant de l'ampicilline (200 µg/mL) ont étéensemencés avec un clone bactérien puis incubés à 37°C de 12 à 16 heures avec agitation à 200 rpm. De ce tube, 8 mL ont été centrifugés pendant 15 minutes à 2 000 g à la température de la pièce. Le culot a été ressuspendu dans 250 µL de solution de ressuspension cellulaire. Après avoir mélangé et ajouté 250 µL de solution de lyse cellulaire, la solution a été de nouveau mélangée par inversion et mise de côté de deux à trois minutes. À cette réaction, 10 µL de protéase alcaline ont été ajoutés et mélangés par inversion. Afin d'arrêter la réaction, 350 µL de solution de neutralisation ont été ajoutés et mélangés par inversion. Le tube a été centrifugé à la température de la pièce pendant 10 minutes à 11 000 g et le surnageant a été transféré dans une colonne *wizard® plus SV miniprep spin*. La colonne a été centrifugée pendant une minute à 11 000 g puis 750 µL de solution de lavage ont été ajoutés. Encore une fois, la colonne a été centrifugée durant une minute à 11 000 g puis celle-ci a été transférée dans un tube Eppendorf neuf. L'ADN a été élué avec 50 µL d'eau sans nucléase par une centrifugation d'une minute à 11 000 g. Le tube a été placé à – 20°C pour une conservation à long terme.

2.6.2 Purification des clones

Pour chacun des clones ayant été sélectionné et préparé par « miniprep », deux tubes ont été préparés (un pour l'amorce sens et un pour celle anti-sens). Environ 2 µg d'ADN ont été déposés puis 24 µL d'H₂O stérile et 8 µL de NaOH 2 M (0,4 M final). Les tubes ont été incubés 20 minutes à 37°C puis 7 µL d'acétate de sodium 3 M (0,1 M final), 4 µL d'H₂O stérile et 120 µL EtOH 100 % (v/v) ont été ajoutés. Après avoir incubé les tubes à – 80°C durant 15 minutes, ils ont été centrifugés à 11 000 g à la

température de la pièce pendant 25 minutes. Le culot a été lavé par 100 μL EtOH 70 % (v/v). Une dernière centrifugation de 10 000 g de 10 minutes à la température de la pièce a été effectuée et le culot a été séché à 37°C pendant 10 minutes puis ressuspendu dans 9 μL d' H_2O stérile. Les tubes ont été placés à -20°C pour une conservation à long terme.

2.6.3 Réaction d'élongation

À l'ADN purifié, 2 μL d'amorces (T7 sens ou M13 anti-sens selon le tube), 2 μL de tampon d'appariement (à 37°C) et 2 μL de Dimethyl sulfoxyde (DMSO) (Fisher) ont été ajoutés. La solution a été mélangée et incubée à 65°C pendant cinq minutes puis 15 minutes à 37°C et finalement cinq minutes à la température de la pièce. Durant l'incubation, 4 tubes/clone/amorce ont été préparés en déposant 2,5 μL de « mélange court » respectif (A, C, G, T). La T₇ ADN polymérase (Amersham Pharmacia) a été diluée (1/5) avec le tampon de dilution et un tube de mélange d'élongation a aussi été préparé en ajoutant par clone 6 μL de mélange de marquage A, 2 μL d'ATP ³⁵S (Amersham Pharmacia) et 4 μL de T₇ dilué 1/5. Aux tubes d'ADN, 6 μL du mélange d'élongation a été ajouté et les tubes (A, C, G, T) ont été incubés à 37°C pour une minute. Dans chacun des quatre tubes (A, C, G, T), 4,5 μL des échantillons (tubes d'ADN) ont été transférés, mélangés et incubés pendant cinq minutes à 37°C. À ces tubes, 5 μL de solution d'arrêt ont été ajoutés. Les tubes ont été conservés à -20°C jusqu'au dépôt sur gel.

2.6.4 Migration

Un gel de polyacrylamide de 6% et d'urée 8 M a été préparé (annexe 5.3.4) et a été chauffé pendant une heure à 85 watts avec du Tris-Borate-EDTA (TBE) 1 X dans les deux chambres à électrode. Les échantillons ont été chauffés de une à cinq minutes à 85°C. Ils ont été déposés et migrés pendant environ deux heures à 85 watts (migration courte) ou quatre heures (migration longue). Après la migration, une feuille cartonnée a été déposée sur le gel et le tout a été séché deux heures puis exposé sur un film (BioMax

MR film) (Amersham Pharmacia) pendant deux jours. Le gel fut révélé, lu et comparé avec les séquences publiées (annexe 5.2.3).

2.7 Transfert de type Southern

2.7.1 Transfert par capillarité sur une membrane de nylon

Le transfert de type Southern a été utilisé afin d'augmenter la sensibilité du PCR et de confirmer la nature des produits de PCR. Suite au PCR conventionnel et à la migration des produits de PCR sur un gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) dans du tampon TAE 1X, une photo de cette migration a été prise. Les puits et l'excédent de gel ont été enlevés puis celui-ci a été dénaturé par une incubation avec agitation dans la solution de dénaturation (annexe 5.3.3.) pendant 20 minutes à la température de la pièce. Après un lavage à l'eau distillée déionisée (dd) de 30 secondes, le gel a été immergé dans la solution de neutralisation deux fois 20 minutes. Le gel a été lavé à l'eau dd pendant 30 secondes. Dans un contenant, des éponges ont été placées et saturées de solution de sodium citrate 20X (SSC) (5.3.3.). Sur les éponges, un papier Whatmann déjà imbibé de SSC 20X a été déposé puis le gel (les puits vers le haut), une membrane de nylon et finalement un second papier Whatmann. Du papier brun a été déposé sur le montage avec au sommet, un poids et le tout a transféré de 12 à 16 heures. Après le transfert, l'ADN a été fixé sur la membrane en l'exposant aux rayons UV deux minutes. La membrane fut ensuite séchée à l'air et entreposée à 4°C.

2.7.2 Hybridation et révélation de la membrane

La membrane a été réhydratée avec de l'eau dd puis imbibée de SSC 6X. La membrane a été incubée avec le tampon de pré-hybridation (annexe 5.3.3) pendant 30 minutes à 51°C puis hybridée de 12 à 16 heures avec le tampon d'hybridation contenant 7,5 pM/mL de la sonde biotinyllée (5.3.3) à 51°C. Deux lavages de cinq minutes ont été réalisés avec la solution de lavage rigoureux (5.3.3.) (50 mL à chaque fois). La membrane a ensuite été incubée pendant 30 minutes avec 100 mL de solution de blocage 1X (Boehringer, Burlington, Ontario) puis 30 minutes avec 20 mL de solution

de blocage contenant de la streptavidine couplée à une peroxydase (dilution 1/1000) (5.3.3). Après avoir lavé deux fois 15 minutes avec 100 mL de solution de lavage, la membrane a été égouttée et révélée par chemiluminescence rehaussée « *enhanced chemiluminescence* » (ECL) selon les recommandations du fabricant avec l'ensemble *Western lightning* (Perkin Elmer) Un film (BioMax Light film) (Amersham Pharmacia) a été exposé une minute et plus ou moins longtemps selon l'intensité des bandes.

2.8 Test comparatif des différentes amorces

Un PCR a été réalisé sur les différentes dilutions, préparées le jour des expériences, du plasmide ou des surnageants avec les différentes paires d'amorces (VP1, VP2 et VP3). La sensibilité a été observée par migration sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) dans du tampon TAE 1X et la paire d'amorce la plus sensible a été retenue pour les expériences subséquentes. Un autre test comparatif a été réalisé à l'aide d'amorces déjà publiées (Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002 et Noteborn *et al.*, 1992).

2.9 Test de sensibilité

Par utilisation des différentes dilutions des surnageants et du plasmide (préparées le jour des expériences), un PCR a été réalisé avec la paire d'amorces VP3 et la sensibilité a été observée sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) dans du tampon TAE 1X. Un transfert de type Southern a été réalisé à l'aide de ces gels. La sensibilité a été comparée entre ces deux approches.

2.10 Test de spécificité

Un PCR a été réalisé sur les extractions de deux différents virus aviaires, soit un réovirus et un adénovirus. Deux témoins négatifs ont été créés (ADN d'adénovirus ou de réovirus) puis deux positifs soit un tube contenant de l'ADN d'adénovirus (ou de réovirus) avec le plasmide pCux (contenant le génome du VAA) et un tube contenant le

pCux seul. Le réovirus étant un virus à ARN, une extraction d'ARN suivi d'une rétro-transcriptase a été effectuée avant de la soumettre au test.

2.10.1 Extraction de l'ARN viral au Trizol (surnageant de réovirus)

Les différentes manipulations ont été effectuées selon les recommandations du fabricant avec seulement quelques modifications. Sous la hotte, 750 μL de Trizol (InVitrogen) ont été déposés stérilement dans un tube préalablement traité contre la ribonucléase (RNase). A ce tube, 250 μL de surnageant de réovirus aviaire ont été ajoutés et mélangés par inversion puis incubés cinq minutes à la température de la pièce. Par la suite, 200 μL de chloroforme ont été ajoutés, mélangés et de nouveau incubés à la température de la pièce pendant 15 minutes. Les tubes ont été centrifugés 15 minutes à 12 000 g à 4°C. La première phase (aqueuse) a été prélevée et transférée dans un autre tube. Afin de précipiter l'ARN, 500 μL d'isopropanol ont été ajoutés. Après une incubation de 10 minutes à la température de la pièce, une centrifugation de 10 minutes a été effectuée à 10 000 g et à 4°C. Le surnageant a été jeté et un mL d'EtOH 75% (v/v) ont été ajoutés, mélangés par inversion et centrifugés cinq minutes à 4 600 g à 4°C. Les culots ont été séchés puis ressuspendus dans 20 μL d'eau DEPC et 50 U d'inhibiteur de RNase RNAGuard (Amersham Pharmacia). Un dosage d'ARN (5.4.8) a été effectué afin de vérifier la qualité de l'extraction.

2.10.2 Production d'ADNc de réovirus par rétro-transcriptase (RT)

Dans un tube traité contre la RNase, 6 μL de tampon 10X (1X final), 15 μL de dNTP (10 mM) (2,5 mM final), 6 μL d'hexanucléotides aléatoires (p(dN)₆ à 50 unités A₂₆₀) (Amersham Pharmacia) et 150 U de RNAGuard ont été ajoutés. L'ARN a été déposé pour un volume de 27 μL et 45 U de l'enzyme AMV (*avian myeloblastosis virus*) (Amersham Pharmacia) ont complété la solution. Après une incubation d'une heure à 42°C, la qualité de la RT a été vérifiée par dosage de l'ADN. Le tout fut suivi de la réaction de PCR (test de spécificité) tel que mentionné précédemment.

2.11 PCR niché

Le PCR niché se caractérise par une seconde amplification des produits d'une première réaction de PCR. Les deux paires d'amorces employées dans ce but ont été VP2F-VP3R (première amplification d'un fragment de 378 pb) et VP3F-VP2R (deuxième amplification de 286 pb). La première amplification a été réalisée de la manière décrite à la section du PCR conventionnel. La deuxième a elle, été réalisée en employant 1 µl de produit de PCR de la première amplification. Dans les deux cas, des tubes témoins négatifs ont été employés.

2.12 PCR-ELISA

2.12.1 PCR marqué à la digoxigénine

La préparation des réactions de PCR avec marquage à la digoxigénine (DIG) a été réalisée selon les recommandations du fabricant du PCR-ELISA DIG Labelling^{PLUS} (Roche Diagnostics) et dans l'ordre recommandé. De l'eau DEPC a été déposé dans des tubes Eppendorfs (afin d'obtenir 50 µL final) puis 5 µL de PCR DIG Labelling Mix^{PLUS} (20 µM final), 1 µL de chacune des amorces à 20 pM/µL (0,4 pM final), 2 µL d'uracile (2 U final), 0,5 µL de Taq (2,5 U final), 5 µL de tampon Taq 10 X (1 X, 0,5 mM MgCl₂ final) et de 5 ou 10 µL d'ADN extrait ou de plasmide. Les tubes ont été incubés à la température de la pièce de 5 à 10 minutes avant de les déposer dans l'appareil à PCR. Par la suite, 35 cycles ont été réalisés comme décrit à la section des conditions de PCR. L'efficacité du PCR a été vérifiée sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) et comparée aux résultats obtenus sans marquage. La suite du PCR-ELISA est décrite dans la prochaine section.

2.12.2 ELISA

Les solutions et conditions ont été préparées selon les recommandations du fabricant du PCR-ELISA DIG detection^{PLUS} (Roche Diagnostics). Après avoir marqué les produits de PCR à la digoxigénine, 5 µL de chacun des produits ont été déposés dans les puits d'une plaque de 96 puits. Un tube contenant seulement les réactifs (blanc) et de l'eau (témoin négatif) ont aussi été préparés. De la solution de dénaturation, 20 µL ont été ajoutés puis la plaque a été incubée à la température de la pièce pendant 10 minutes. Par la suite, la solution d'hybridation contenant la sonde biotinyllée (ciblant une région dans le gène de l'apoptine, zone amplifiée par les paires d'amorces VP2 ou VP3) a été ajoutée à raison de 225 µL par puits (7,5 pM/mL final) et ceux-ci ont été mélangés. Dans les puits pré-enduits de streptavidine, 200 µL provenant des puits préalablement préparés ont été déposés et la plaque a été incubée à 51°C durant une heure et demie. À l'aide de la solution de lavage, 4 lavages ont été réalisés avec 250 µL. Lorsque les puits furent bien vidés, 200 µL de solution anti-DIG couplé à une peroxydase (POD) diluée 1/100 ont été déposés. La plaque a été incubée avec une légère agitation à 37°C pendant 30 minutes. De nouveau, quatre lavages ont été réalisés tel que décrit ci-haut. Le substrat ABTS (*2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt crystals*) a été ajouté (200 µL) et la plaque a été incubée de 10 minutes à une heure dans le noir et à 37°C. La lecture des puits a été réalisée à une longueur d'onde de 405 nm (492 nm comme référence de l'appareil) à l'aide d'un lecteur de plaques modèle 550 (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) et notée. Le test a été réalisé en duplicata pour chaque échantillon et les résultats ont été ajustés en fonction de la densité optique (D.O.) obtenue avec les réactifs seuls (blancs). L'effet du temps d'hybridation à 51°C, de la durée d'incubation avec le substrat, de la quantité de produit de PCR utilisée ainsi que la reproductibilité des résultats, le seuil de détection et la spécificité du PCR-ELISA ont été évalués et optimisés.

2.13 Expériences de reconstitution

Dans le but de recréer des conditions similaires au diagnostic réalisé sur des échantillons provenant d'abattoirs ou d'élevages, des expériences de reconstitution ont été effectuées. L'extraction d'ADN d'organes non infectés du système immunitaire de poulet (rate, thymus et bourse de Fabricius) ou d'œufs (non fertilisés) a été effectuée et sa qualité et pureté ont été vérifiées par un dosage d'ADN (annexe 5.4.8). Un PCR a été réalisé afin de confirmer l'absence de virus ou de contamination des organes employés. Par la suite, un autre PCR a été réalisé en présence d'ADN génomique des différents organes et d'ADN des différentes dilutions du plasmide ou des surnageants viraux. L'utilisation des témoins négatifs eau, milieu et organes non infectés a été respectée. La sensibilité obtenue avec chacun des échantillons en présence des différents organes a été vérifiée par PCR conventionnel, par transfert de Southern et par PCR-ELISA.

2.14 Évaluation d'une infection *in vitro*

2.14.1 Expériences préliminaires

Des cellules de thymus et de moelle osseuse extraites de poussins naissants ont été mises en culture. Ces cellules ont été infectées (2.3.1), récoltées et dilués selon le protocole au point 2.3.3. Des surnageants témoins négatifs de cellules non infectées ont aussi été recueillis. La technique du PCR conventionnel a été employée avec les amorces VP3 afin de vérifier la qualité de l'infection dans chaque type cellulaire et avec chacune des souches employée soit Cux-1 et CIA-1.

CHAPITRE III

PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS

3.1 PCR conventionnel

3.1.1 Expériences préliminaires

Les amorces obtenues et les conditions théoriques établies, un premier PCR a été réalisé avec l'ADN de pCux (10^9 molécules par réaction) selon les conditions établies théoriquement. La présence de bandes situées à 355 paires de bases (pb) (VP1 et VP2) ou 309 pb (VP3) représentant l'amplification d'ADN réalisée par PCR a été observée après migration sur gel d'agarose de 1,5% coloré au bromure d'éthidium ($0,5 \mu\text{g/mL}$) dans du tampon TAE 1X (fig. 9). Aucune amplification n'a été observée avec le tube témoin ne contenant pas d'ADN. Les différents produits de PCR (VP1, VP2 et VP3) ont été clonés dans le plasmide pBluescript, criblés et séquencés. Il a été confirmé par séquençage que les produits amplifiés par PCR par les trois paires d'amorces étaient effectivement ceux recherchés (annexes 5.2.2 et 5.2.3).

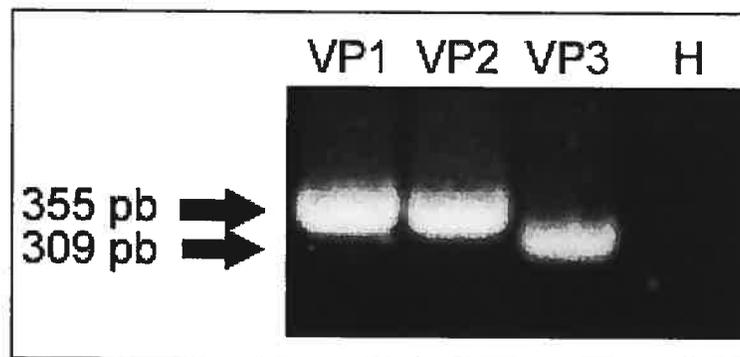


Figure 9 : Amplification par PCR de la région du génome du VAA ciblé par les amorces VP1, VP2 et VP3 dans le but de cloner et valider les produits de PCR. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR ($15 \mu\text{L}$) amplifiés selon les conditions établies théoriquement sur l'ADN du plasmide pCux (10^9 molécules par réaction). Un tube témoin ne contenant pas d'ADN (H) a servi de témoin négatif. La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

Une nouvelle réaction de PCR a été réalisée en utilisant les amorces VP3 et les mêmes conditions, mais sur différents échantillons. L'ADN provenant du surnageant viral non dilué (titre inconnu) de Cux-1 (X), de CIA-1 (A) et du vaccin CAV-VAC® (V) ainsi que celui du plasmide pCux (10^9 molécules par réaction) (P), ont été employés. La présence de bandes de faible intensité et de faible poids moléculaire (20 pb) représentant les amorces ont été observées ainsi que d'autres, plus intenses et situées à 309 pb (VP3) représentant l'amplification d'ADN réalisé par PCR pour chacun des échantillons analysés (fig. 10). Aucune amplification n'a été observée avec le tube témoin ne contenant pas d'ADN (H).

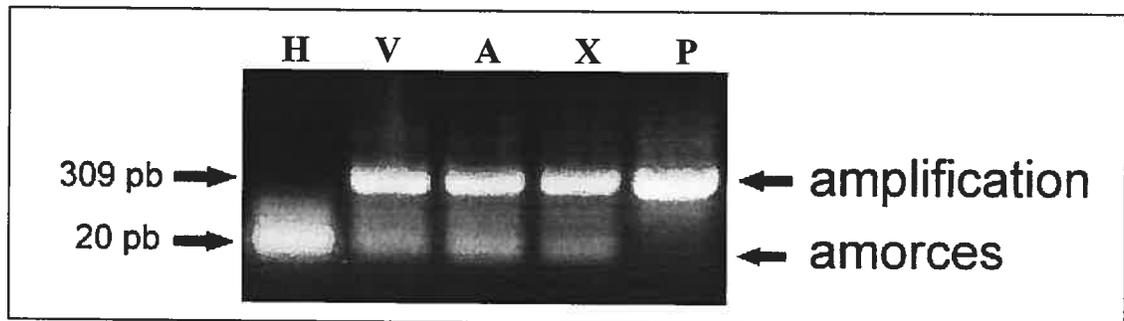


Figure 10 : Amplification par PCR de la région du génome du VAA ciblé par les amorces VP3. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés selon les conditions établies théoriquement sur l'ADN du plasmide pCux (P) (10^9 molécules par réaction) et sur des extractions de surnageants non dilués de Cux-1 (X), de CIA-1 (A), du vaccin CAV-VAC (V) et d'un tube témoin négatif ne contenant pas d'ADN (H). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

3.1.2 Détermination des conditions optimales

La réaction de PCR ayant donné des résultats observables, les conditions de sa réalisation ont été légèrement modifiées afin de déterminer les paramètres optimaux. Premièrement, la température d'appariement des amorces (T_m) a été modifiée d'un degré centigrade, de plus ou de moins que celle ayant été choisie théoriquement. Trois PCR ont été réalisés à l'aide de 10^5 molécules de pCux à trois T_m différentes (53, 54 et 55°C) en utilisant les amorces VP3 (fig. 11). Il a été observé que la bande d'ADN amplifié (309 pb) lors de la réaction réalisée à 54°C était la plus intense.

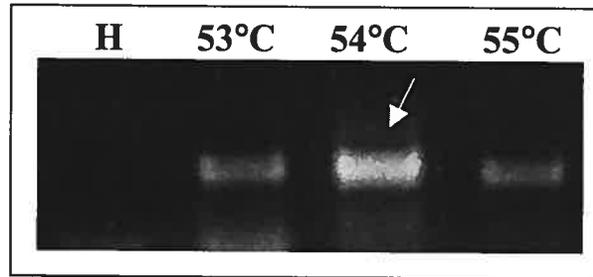


Figure 11 : Influence de la température d'appariement dans la réaction de PCR. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR amplifiés avec les amorces VP3 à l'aide de 10^5 molécules d'ADN de pCux à trois températures d'appariement différentes (53, 54 et 55°C). La flèche indique la bande la plus intense et le tube témoin négatif est identifié par la lettre H (H_2O).

La T_m optimale ayant été déterminée (54°C), le nombre optimal de cycles a ensuite été évalué. Plusieurs réactions de PCR ont été réalisées à l'aide des amorces VP3 en variant le nombre de cycle de 25 à 35. Il a été observé sur gel que lorsqu'une forte concentration d'ADN était employée, le plus fort signal était visible dès l'atteinte des 32 cycles (fig. 12 A), mais que lorsque soumis à une faible quantité d'ADN, 35 cycles ont démontré le signal le plus intense (fig. 12 B). Ce nombre de cycles a été conservé pour le reste des expériences.

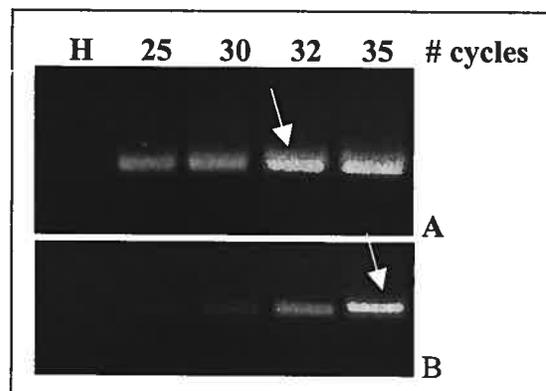


Figure 12 : Influence du nombre de cycles d'amplification dans la réaction de PCR. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR amplifiés à l'aide de 10^8 molécules d'ADN de pCux (A) et d'ADN de surnageant viral de Cux-1 dilué à 10^{-2} (B) avec la paire d'amorces VP3 à des nombres cycles de différents (25, 30, 32 et 35). La flèche indique la première bande la plus intense et le tube témoin négatif est identifié par la lettre H (H_2O).

3.2 Transfert de Southern

3.2.1 Expériences préliminaires

L'optimisation de la technique de PCR conventionnel ayant été effectuée, le transfert de type Southern a lui aussi été mis au point. L'ADN du plasmide pCux a été amplifié par PCR en utilisant les amorces VP3 et les produits furent migrés sur gel d'agarose 1,5% puis transférés sur membrane de nylon. Après révélation du film il a été observé qu'une seule bande localisée à 309 pb (l'ADN amplifié par PCR) avait été reconnue par la sonde d'ADN biotinylée (fig. 13). Celle-ci s'hybride à une région située sur le CLO de l'apoptine, région amplifiée par les amorces VP2 et VP3. Aucune autre bande n'a été révélée. Il a été confirmé que l'ADN amplifié par VP2 (résultats présentés dans la prochaine section) ou VP3 était celui recherché par la reconnaissance de la sonde à sa séquence cible. La nature des amplifications, validée par le séquençage, a donc été de nouveau appuyée par cette expérience.

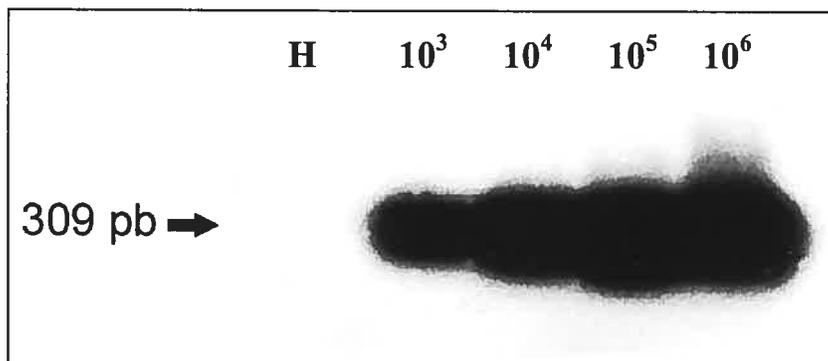


Figure 13 : Évaluation de la technique de transfert de type Southern et de l'hybridation par la sonde biotinylée sur les produits de PCR. Membrane de nylon révélé au ECL sur film suite au transfert d'ADN de type Southern d'une migration des produits de PCR (15 μ L) sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium. L'ADN a été amplifié par PCR avec la paire d'amorce VP3 en utilisant de 10³ à 10⁶ plasmides de pCux par réaction. Le tube témoin négatif est identifié par la lettre H (H₂O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

La reconnaissance des séquences ciblées par la sonde a été vérifiée par utilisation du plasmide pCux contenant le génome complet du VAA. Le plasmide non digéré (10^9 et 10^{10} molécules) a été déposé sur gel, migré puis transféré. L'observation de la révélation a démontré une reconnaissance par la sonde du plasmide, tant dans sa forme relâchée que dans sa forme surenroulée (fig. 14). Ces bandes ont aussi été observées lorsque des réactions de PCR étaient réalisées avec du plasmide en quantité supérieure à 10^7 molécules par réaction.

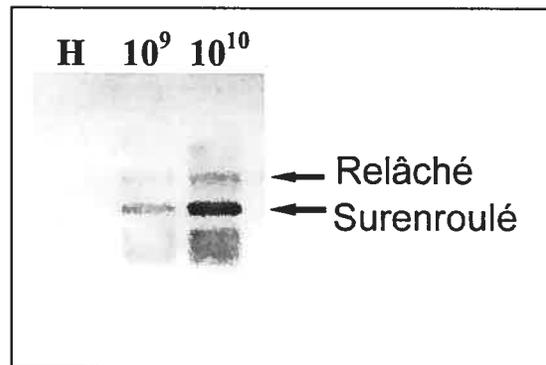


Figure 14 : Reconnaissance de la séquence cible sur le plasmide pCux (non digéré) par la sonde biotinylée. Membrane de nylon révélé au ECL sur film suite au transfert d'ADN de type Southern d'une migration du plasmide pCux de 5,3 kb (dépôt de 10^9 et 10^{10} molécules) sur gel d'agarose 1% coloré au bromure d'éthidium. Le tube témoin négatif est identifié par la lettre H (H_2O).

3.3 Étude comparative permettant la sélection de la paire d'amorces la plus sensible

La section théorique du projet a permis de créer trois différentes paires d'amorces. La présente section a été réalisée dans le but de trouver la paire d'amorces offrant la meilleure sensibilité tant pour la réaction de PCR que pour le transfert de type Southern. La comparaison simultanée de ces trois paires a été réalisée à l'aide de différents matériels biologiques. Les différentes expériences ont été réalisées à plusieurs reprises sur diverses extractions et dilutions d'ADN. La première expérience a été réalisée à l'aide du plasmide pCux de 10^{-1} à 10^7 molécules par tube (fig. 15). En

ce qui concerne le PCR conventionnel (section gauche de la figure 15), il a été observé pour les trois paires d'amorces que le signal sur le gel diminuait à partir des tubes contenant 10^4 molécules de plasmides et qu'une limite de détection était observable aux tubes en contenant 10^2 (100 molécules). L'intensité des signaux qui a été observée, pour une même quantité de plasmide utilisé, est similaire entre les trois paires d'amorces. Le transfert a seulement été effectué avec les amplifications réalisées à l'aide des amorces VP2 et VP3 (VP1 n'amplifiant pas une séquence reconnue par la sonde biotinylée). Par observation des films, il a été constaté une augmentation de la sensibilité d'un log pour les amorces VP2 (10 molécules détectées au lieu de 100) et de deux log pour VP3 (1 molécule détectée) (section droite de la figure 15). La révélation d'amplifications réalisées avec la paire VP2 a toutefois démontré la même spécificité que celle obtenue avec VP3 (une seule bande visible). Aucune réaction ou hybridation n'a été observée au niveau des témoins négatifs (H_2O).

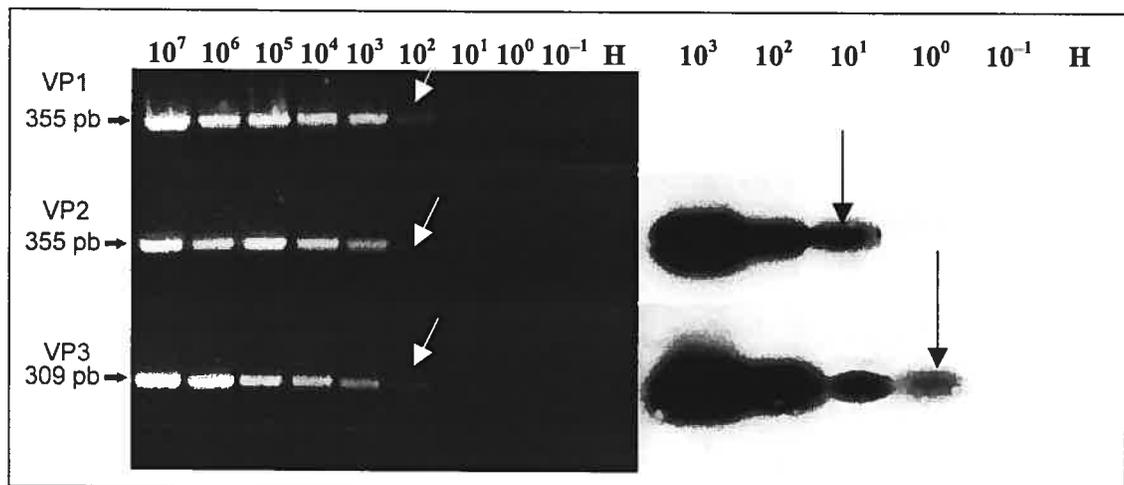


Figure 15 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern à l'aide du plasmide pCux. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les paires d'amorces VP1, VP2 et VP3 à l'aide du plasmide pCux ayant de 10^{-1} à 10^7 molécules d'ADN par réaction (section gauche). Produits de PCR de VP2 et VP3 transférés sur membrane de nylon, hybridés avec la sonde biotinylée et révélés au ECL (section droite). Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

La deuxième expérience a été réalisée à l'aide d'ADN extrait et dilué de 10^{-1} à 10^{-7} provenant d'un surnageant de cellules MDCC-CU147 infectées par la souche Cux-1 (titre inconnu). Il a été observé pour les trois paires d'amorces que le signal sur le gel diminuait à partir des tubes contenant la dilution 10^{-3} (fig. 16). Une limite de détection était observable aux tubes contenant la dilution 10^{-4} pour les paires d'amorces VP1 et VP2, tandis que la limite de détection visuelle se situait à la dilution 10^{-5} pour VP3 (section gauche de la figure 16). Suite au transfert, il a été constaté qu'aucune augmentation de la sensibilité n'était détectable pour les amorces de la paire VP2 (10^{-4}) ou VP3 (10^{-5}) (section droite de la figure 16). De façon générale, l'intensité et la limite de détection des signaux qui ont été observées étaient plus élevées pour la paire d'amorces VP3 et légèrement moindre pour VP2 et VP1. Aucune réaction ou hybridation n'ont été observées au niveau des témoins négatifs eau (H) ou milieu de culture cellulaire DMEM (M).

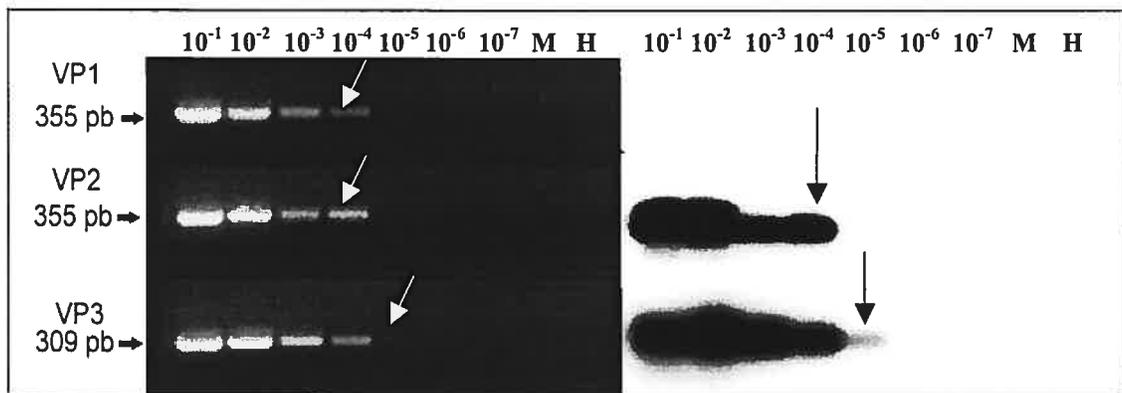


Figure 16 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern à l'aide d'ADN du surnageant de Cux-1. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les paires d'amorces VP1, VP2 et VP3 à l'aide d'une extraction de surnageant de Cux-1 ayant été dilué de 10^{-1} à 10^{-7} (section gauche). Produits de PCR de VP2 et VP3 transférés sur membrane de nylon, hybridés avec la sonde biotinylée et révélés au ECL (section droite). Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre M (milieu de culture DMEM) et H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

La troisième expérience a été réalisée à l'aide d'ADN extrait et dilué de 10^{-1} à 10^{-7} du vaccin CAV-VAC® (titre inconnu). La migration des produits de PCR a démontré une plus grande variabilité dans les résultats que précédemment (fig. 17). En effet, la limite de détection se situe à la dilution 10^{-4} pour VP2 et VP3, tandis qu'elle se situe à la dilution 10^{-3} pour la paire VP1 (section gauche de la figure 17). De plus, une perte d'intensité dans la bande observée de l'amplification d'ADN de vaccin par VP2 n'a été observée qu'à la dilution 10^{-3} , tandis que cette diminution a été notée dès la dilution 10^{-2} pour les deux autres paires d'amorces. Quant au transfert, une augmentation de la sensibilité d'un log a été observée pour les deux paires d'amorces, VP2 et VP3 (section droite de la figure 17). Il a été noté que l'intensité des signaux obtenue aux dilutions 10^{-4} et 10^{-5} avec VP3 était supérieure à celle observée chez VP2 pour ces mêmes dilutions. Aucune réaction ou hybridation n'a été observée au niveau des témoins négatifs (H_2O). En considérant les trois expériences, la paire d'amorces VP3 a été celle retenue pour les tests subséquents due à la plus grande sensibilité obtenue avec celle-ci.

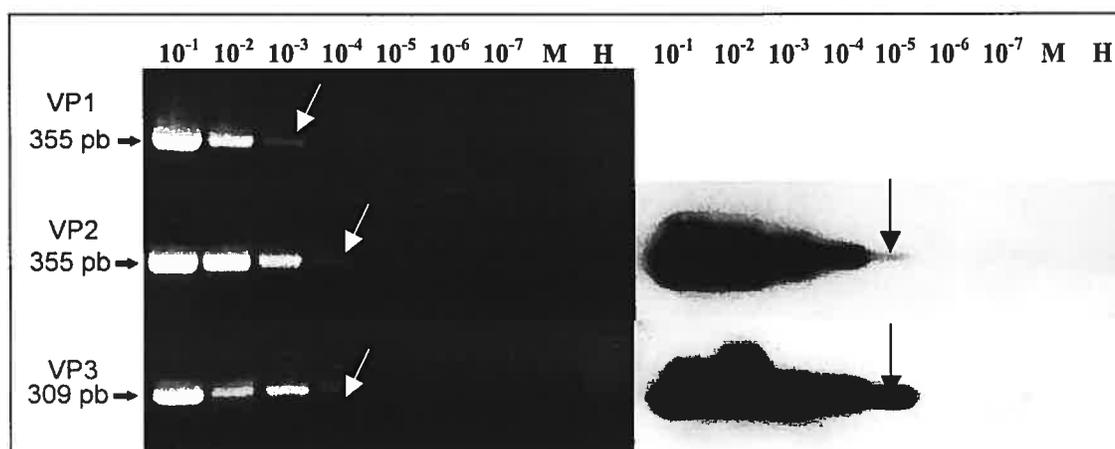


Figure 17 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern à l'aide d'ADN du vaccin CAV-VAC®. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les paires d'amorces VP1, VP2 et VP3 à l'aide d'une extraction du vaccin CAV-VAC® ayant été dilué de 10^{-1} à 10^{-7} (section gauche). Produits de PCR de VP2 et VP3 transférés sur membrane de nylon, hybridés avec la sonde biotinylée et révélés au ECL (section droite). Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre M (milieu de culture DMEM) et H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

3.4 Étude comparative impliquant des amorces déjà publiées

Une autre approche, au niveau des tests comparatifs, a été réalisée par l'utilisation des amorces déjà publiées par les chercheurs Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) et Noteborn *et al.* (1992) en respectant leurs conditions d'amplification. Les réactions de PCR réalisées avec ces deux paires d'amorces ont été soumises à deux types d'ADN différents, celui du plasmide pCux (10^{-1} à 10^7 molécules/réaction) et celui extrait du vaccin CAV-VAC® (dilutions 10^{-1} à 10^{-7}). Lorsque les deux paires ont été soumises au plasmide, elles ont démontré par PCR conventionnel une même limite de détection se situant à 10^4 plasmides (fig. 18). Il a été observé que les signaux étaient similaires dans leur intensité et leur décroissance en fonction de l'augmentation des dilutions. Aucune réaction n'a été observée au niveau des témoins négatifs (H_2O).

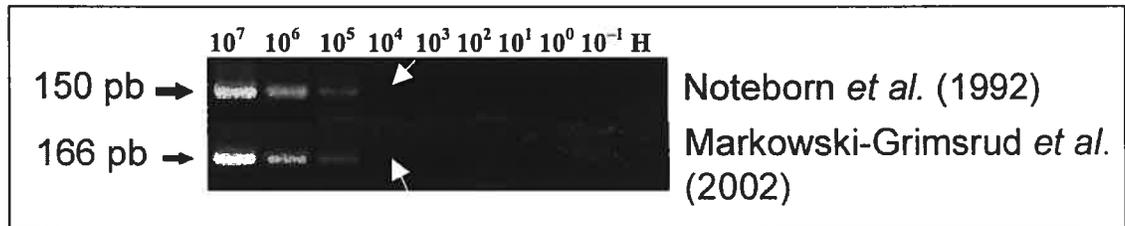


Figure 18 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR à l'aide de deux amorces retrouvées dans la littérature sur des dilutions du plasmide pCux. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les amorces de Noteborn *et al.* (1992) et Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) selon leurs recommandations sur le plasmide pCux ayant de 10^{-1} à 10^7 molécules d'ADN par réaction. Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

L'utilisation d'extractions d'ADN de vaccin a démontré une limite de détection visible aux dilutions 10^{-3} lorsque soumis aux PCR conventionnel avec les deux types d'amorces (fig. 19). La décroissance du signal s'est effectuée de la même façon pour les deux. Aucune réaction n'a été observée au niveau des témoins négatifs (H_2O).

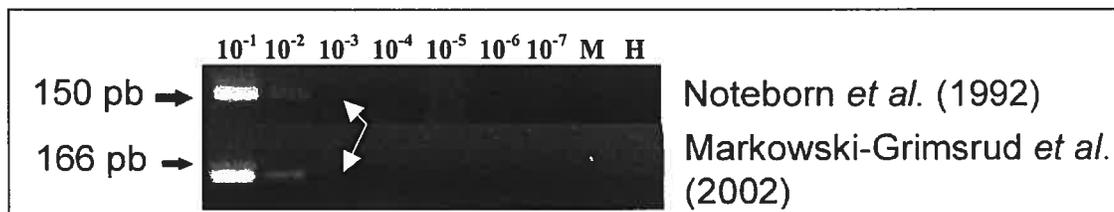


Figure 19 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR à l'aide de deux amorces retrouvées dans la littérature sur des dilutions du vaccin CAV-VAC®. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec les amorces de Noteborn *et al.* (1992) et Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) selon leurs recommandations sur le vaccin CAV-VAC ® à des dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁷ par réaction. Les flèches indiquent la limite de détection et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H₂O) et M (milieu de culture DMEM). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

3.5 Sensibilité du PCR conventionnel et du transfert de type Southern

Les conditions optimales et la sélection d'amorces ayant été effectuées, un PCR conventionnel a été réalisé à l'aide d'ADN extrait et dilué de 10⁻¹ à 10⁻⁷ provenant d'un surnageant de cellules MDCC-CU147 infectées par la souche CIA-1 (titre inconnu). Seule la paire d'amorces VP3 a été employée. La migration des produits de PCR par VP3 a démontrée une limite de détection se situant à la dilution 10⁻⁴ (section gauche de la figure 20). Une perte d'intensité a été observée à la dilution 10⁻³. Il a été noté que la sensibilité du transfert était supérieure d'un log (dilution 10⁻⁵) (section droite de la figure 20). L'augmentation de sensibilité du transfert de Southern par rapport au PCR conventionnel a été similaire à celle observée avec les autres échantillons. Aucune réaction ou hybridation n'a été observée au niveau des témoins négatifs (H₂O).

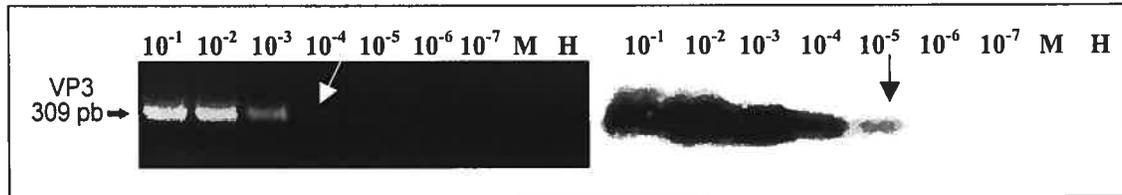


Figure 20 : Sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern réalisés avec l'ADN du surnageant de CIA-1 et les amorces VP3. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés avec la paire d'amorces VP3 à l'aide d'une extraction de surnageant de CIA-1 ayant été dilué de 10^{-1} à 10^{-7} (section gauche). Produits de PCR transférés sur membrane de nylon, hybridés avec la sonde biotinylée et révélés au ECL (section droite). Les flèches indiquent la limite de détection des bandes et les tubes témoins sont identifiés par la lettre M (milieu de culture DMEM) et H (H_2O). La taille des fragments est indiquée en paires de bases (pb).

La sensibilité du PCR conventionnel et du transfert de Southern a finalement été évaluée en présence d'ADN génomique d'organes de poulets. Comme mentionné précédemment, les amorces VP3 ont été utilisées. L'ADN d'une rate de 20 mg a été extrait au DNAzol et l'absence de virus dans l'échantillon a été confirmée par PCR. Dans une première expérience, à chacun des tubes de PCR (sauf le témoin négatif eau), 200 ng d'ADN génomique ont été déposés ainsi que les différentes dilutions de plasmide (10^7 à 10^{-1}). Il a été observé après migration sur gel d'agarose que l'intensité des bandes était plus faible pour l'ensemble des tubes qu'en absence d'ADN génomique, mais que la limite de détection se situait tout de même à 10^2 plasmides par réaction (fig. 21, haut). D'autre part, une sensibilité de 10^1 a été évaluée par l'observation de la membrane (fig. 21, bas), ce qui est un log de moins que la sensibilité du plasmide en absence d'ADN génomique. Aucune réaction n'a été observée au niveau des témoins négatifs (H_2O) et organes (O).

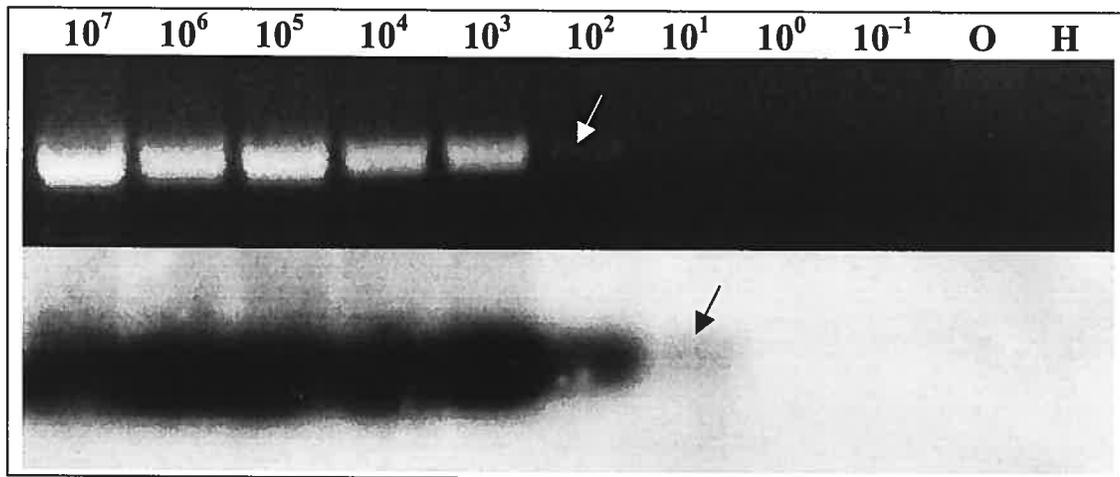


Figure 21 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern à l'aide du plasmide pCux en présence d'ADN génomique de rate de poulet. Migration des produits du PCR (15 μ L) amplifiés avec les amorces VP3 sur différentes quantités (10^{-1} à 10^7) de plasmide en présence d'ADN génomique (200 ng) provenant de l'extraction d'ADN de rate (en haut). Révélation au ECL du transfert sur membrane de nylon et de l'hybridation par la sonde biotinylée de la migration des produits de PCR (en bas). Les flèches indiquent la limite de détection et les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et O (ADN d'organe).

Une deuxième approche a été l'utilisation du surnageant viral Cux-1 en présence d'ADN génomique de rate. De la même manière que précédemment, les tubes ont été préparés en présence de 200 ng d'ADN de rate et des diverses dilutions d'ADN de Cux-1 (10^{-1} à 10^{-7}). Il a été observé que la sensibilité était de 10^{-4} et l'amplification en général a été de moindre importance qu'en l'absence d'ADN génomique (fig. 22, haut). La limite de détection a été la même après le transfert (fig. 22, bas). Dans cette expérience, et pour les deux approches, la détection a été d'un log moins sensible par rapport aux même échantillons, mais sans la présence d'ADN génomique de poulet.

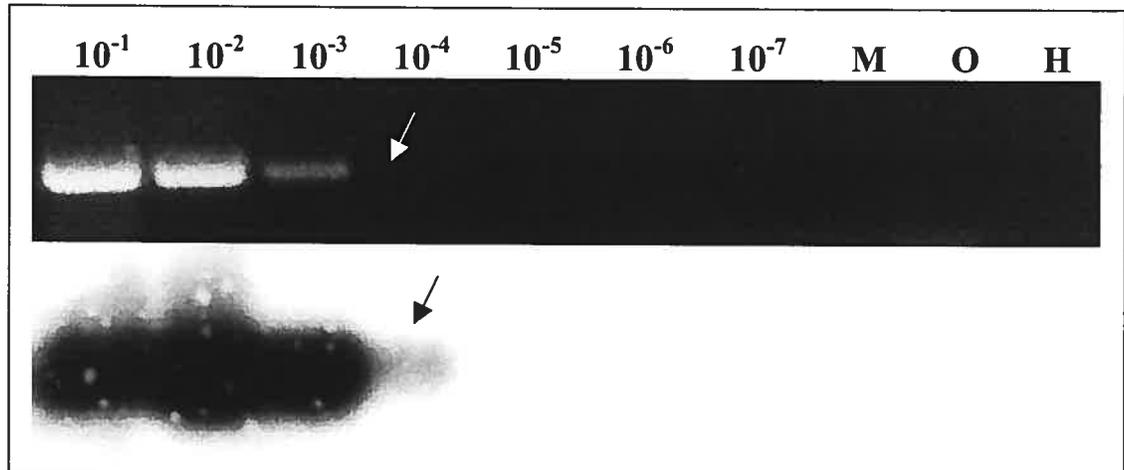


Figure 22 : Comparaison de la sensibilité de la réaction de PCR et du transfert de Southern réalisés avec l'ADN du surnageant de Cux-1 en présence d'ADN génomique de rate de poulet. Migration des produits du PCR (15 μ L) amplifiés avec les amorces VP3 sur différentes dilutions (10^{-1} à 10^{-7}) de surnageant viral de Cux-1 en présence d'ADN génomique provenant de l'extraction d'ADN de rate (en haut). Révélation au ECL du transfert sur membrane de nylon et de l'hybridation par la sonde biotinylée de la migration des produits de PCR (en bas). Les flèches indiquent la limite de détection et les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O), O (ADN d'organe) et M (milieu de culture DMEM).

D'autres expériences ont été réalisées sur des extraits d'œufs. Cependant, une inhibition majeure a été relevée. D'autres organes (non spf) tel le thymus et la bourse de Fabricius ont été utilisés, mais la présence de virus (ou de contaminations) dans ces échantillons avait empêché la poursuite des expériences.

3.6 Évaluation de la spécificité du PCR conventionnel

Les conditions optimales ayant été trouvées et la sensibilité évaluée, la spécificité du PCR conventionnel a été vérifiée. L'appariement possible des amorces avec des génomes connus ayant été évalué de façon théorique, deux virus aviaires ont été choisis afin de vérifier expérimentalement la spécificité du test. L'ADN d'adénovirus (A) ainsi que l'ADNc de réovirus (R) ont été soumis au PCR en présence ou non de l'ADN de pCux (+P). Des tubes témoins positifs, ne contenant que de l'ADN plasmidique (P), et des tubes témoins négatifs, ne contenant aucun ADN (H), ont été employés (fig. 23). Il a été observé qu'aucune réaction ne s'était produite dans les tubes sans ADN

plasmidique (H, R et A), mais que le signal a été observé pour les tubes en contenant (R+P, A+P et P).

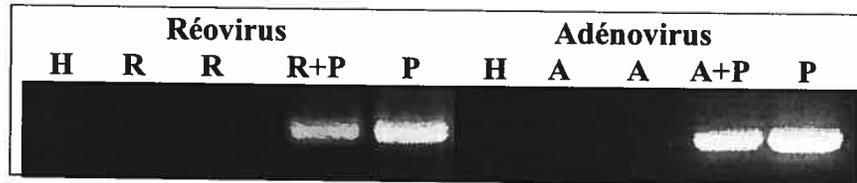


Figure 23 : Évaluation de la spécificité de la réaction de PCR réalisée avec les amorces VP3 à l'aide d'ADN d'adénovirus et d'ADNc de réovirus. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR (15 μ L) amplifiés à l'aide d'ADNc de réovirus (R) et d'ADN d'adénovirus (A) en présence ou non d'ADN de pCux (+P). Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et les témoins positifs par la lettre P (pCux).

3.7 PCR niché

Il a été observé avec l'amplification par la paire d'amorces VP2F-VP3R, une sensibilité similaire à celle observée avec les autres paires d'amorces (VP1, VP2 et VP3) soit 10^2 plasmides par réaction (fig. 24, à gauche). D'autre part, la seconde amplification par les amorces VP3F-VP2R n'a donné qu'une forte amplification dans tous les tubes y compris le tube témoin négatif (H_2O) (fig. 24, à droite). L'utilisation du PCR Niché a occasionné plusieurs problèmes de contamination par les produits précédemment amplifiés. Son utilisation a été abandonnée pour le reste du projet.

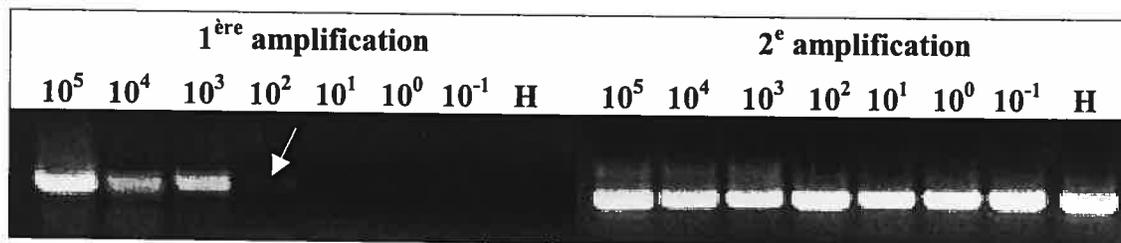


Figure 24 : Sensibilité observée lors de la première amplification (amorces VP2F et VP3R) et de la deuxième amplification (amorces VP3F et VP2R) réalisées selon le principe du PCR niché à l'aide du plasmide pCux. Migration, sur gel d'agarose 1,5% coloré au bromure d'éthidium, des produits de PCR niché (15 μ L) amplifiés avec les paires d'amorces VP2F-VP3R (1^{ère} amplification) et VP3F-VP2R (2^e amplification) sur le plasmide pCux ayant de 10^{-1} à 10^5 molécules d'ADN lors de la première réaction. La flèche indique la limite de détection et les tubes témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O).

3.8 PCR-ELISA

3.8.1 Détermination des conditions optimales

Le marquage de l'ADN à la digoxigénine par PCR (VP3) a été effectué et comparé aux résultats obtenus avec le PCR conventionnel afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de perte de sensibilité due au changement de l'approche. Aucune différence significative n'a été observée au niveau de la sensibilité visible sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium. Ces échantillons ont par la suite été soumis à l'ELISA et une densité optique (D.O.) a été notée pour chacun des tubes. Dans le but d'obtenir le meilleur signal, la meilleure sensibilité et spécificité, plusieurs conditions ont été évaluées.

Tout d'abord, le temps d'incubation lors de l'hybridation à 51°C avec la sonde biotinylée a été examiné. Des temps d'incubation d'une heure trente et de trois heures ont été évalués. Il a été noté qu'avec l'incubation de trois heures, un gain de 10 à 30% de densité optique était obtenu pour la majorité des échantillons étudiés (ADN de pCux, de Cux-1, de CIA-1). La détection d'ADN dans des tubes contenant des dilutions ne donnant aucune D.O. à une heure trente n'a pas été observée lors d'une incubation plus longue. L'exception à cette observation a été les expériences réalisées avec le vaccin. En effet, il a été constaté par détermination de la D.O. lors du PCR-ELISA réalisé sur l'ADN de vaccin que la dilution 10^{-6} était positive lorsque qu'elle avait été incubée trois heures, mais négative lors d'une incubation d'une heure trente (fig. 25). Les statuts de positif (D.O. > 0,085) et négatif (D.O. < 0,045) ont été déterminés et ils seront expliqués à la section 3.8.3.

Suite à cette première expérience, différents temps d'incubation avec le substrat ABTS ont été analysés. Des temps de 10, 20, 30 minutes et une heure d'incubation ont donc été choisis. Tout au long du projet, la majorité des expériences réalisées avec le PCR-ELISA a été soumises à cette lecture de D.O. à des temps multiples. Il a finalement été observé que les négatifs à 10 minutes, restaient négatifs après une heure d'incubation. Une autre condition qui a été testée a été le volume de produit de PCR déposé dans les puits à PCR-ELISA. Les réactions de PCR étaient réalisées dans un

volume de 50 μL et le dépôt dans les puits de l'ELISA effectué en duplicata, le volume utilisé devait être minimal pour permettre la réalisation de plus d'une expérience. Deux volumes ont été utilisés, 5 et 10 μL . Aucune différence significative au niveau des lectures de D.O. n'a été notée lors de cette expérience.

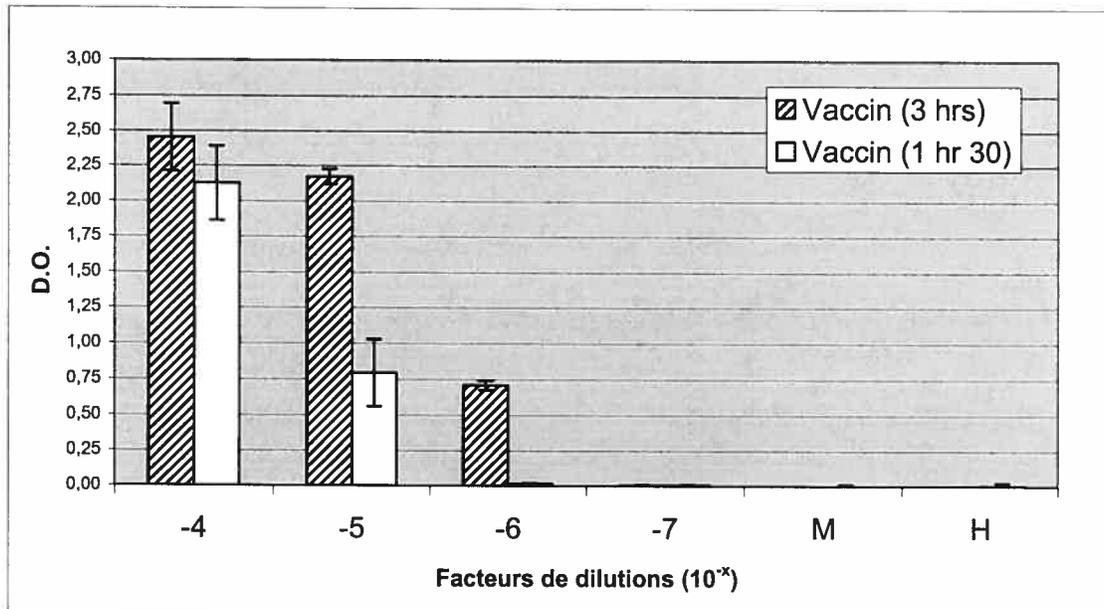


Figure 25 : Évaluation de l'effet du temps d'hybridation avec la sonde biotinylée sur des extractions d'ADN provenant de dilutions du vaccin CAV-VAC® suite au PCR-ELISA. Densité optique (D.O.) obtenue pour certaines dilutions du vaccin (10^{-7} à 10^{-4}) soumises au PCR-ELISA en les incubant à 51 °C pendant une heure trente (barres blanches) ou trois heures (barres hachurées) avec la sonde biotinylée. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et M (milieu de culture cellulaire DMEM).

3.8.2 Évaluation de la reproductibilité du PCR-ELISA

Les conditions optimales ayant été établies, la constance des résultats obtenus avec le PCR-ELISA a été évaluée. Des produits de PCR marqués provenant de l'amplification de pCux (10^4 plasmides) ont été dilués en série (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 et 1/160). À l'aide de toutes ces dilutions, sept différents PCR-ELISA ont été réalisés (chaque échantillon en duplicata). Les résultats ont été analysés par régression linéaire de la densité optique (D.O.) en fonction du log des dilutions utilisées (fig. 26), un résultat de 1 étant une corrélation parfaite et 0 une absence de corrélation. La

moyenne de l'indice de la qualité de la corrélation (R^2) pour les différents tests a été de 0,9924 et l'écart type moyen observé pour les différentes dilutions a été de 0,257, celui-ci variant de 0,133 à 0,356.

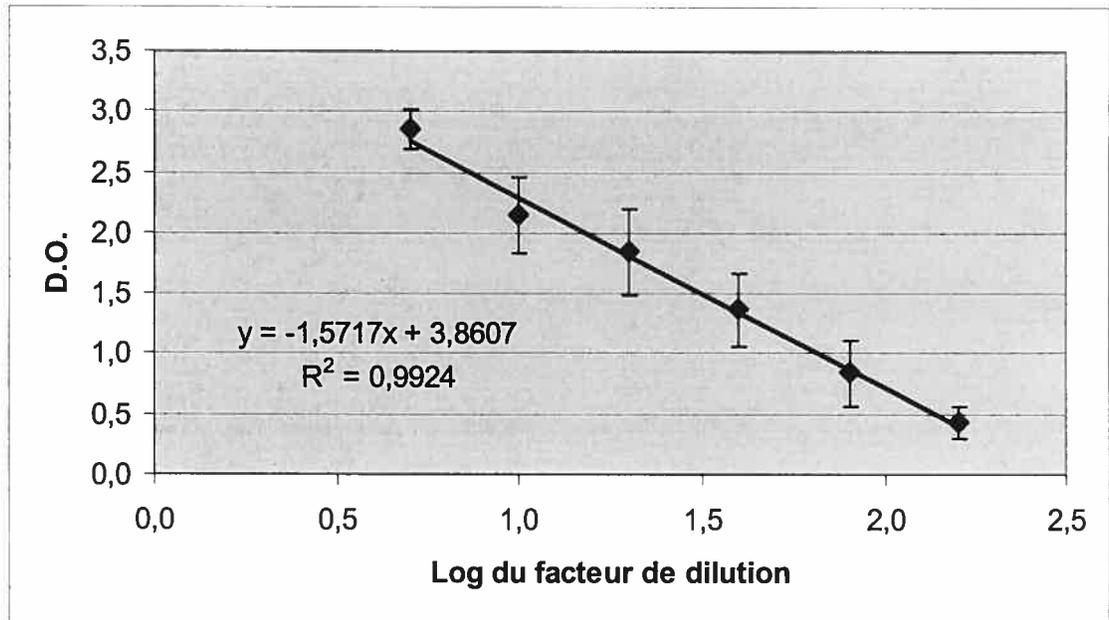


Figure 26 : Évaluation de la reproductibilité du PCR-ELISA. Densités optiques (D.O.) obtenues en fonctions des différentes dilutions (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 et 1/160) de produits de PCR marqués à la digoxigénine amplifiés à l'aide des amorces VP3 sur le plasmide pCux (10^4 molécules par réaction). Les facteurs de dilutions sont représentés en valeurs logarithmiques et l'écart type provient de la lecture de 14 D.O. par dilution.

3.8.3 Détermination du seuil de détection du PCR-ELISA

Un élément primordial dans un test diagnostique est la capacité de discriminer les positifs des négatifs avec certitude. Pour ce faire, la D.O. de 405 échantillons présumés négatifs (ne possédant pas d'ADN cible) a été comptabilisée. Ceux-ci étaient constitués des témoins eau et milieu de culture cellulaire (DMEM), d'ADN d'organes de poulet et de plasmides ne possédant pas le génome viral du VAA). De ce calcul, la D.O. moyenne des négatifs ($0,005 \pm 0,02$) a été obtenue (tableau II). Les négatifs bruts représentent les valeurs de la lecture de la D.O. tels quels, tandis que les négatifs ajustés représentent les D.O. lues pour chacun des échantillons moins la D.O. des réactifs seuls (blanc). Ces deux valeurs ont été représentées dans le tableau II, mais il est d'usage

d'employer la D.O. ajustée. En effet, un changement de couleur (augmentation de la D.O.) peut être observé dans les réactifs ayant de l'âge. La détermination de l'état négatif pour un échantillon a été évaluée à la valeur négative moyenne plus deux fois l'écart type (σ) correspondant à une D.O. de 0,045 (95,45% d'une distribution normale), tandis que pour être positifs, des valeurs supérieures à quatre fois l'écart type correspondant à une D.O. de 0,085 (99,994% d'une distribution normale) ont dû être obtenues. Entre les deux états, une zone d'incertitude a été définie. Le seuil ayant été établi, les échantillons présumés négatifs ont été soumis à cette sélection afin de valider les barèmes choisis. Des 405 échantillons, 11 (2,7%) ont obtenu un statut d'incertain et aucun n'a été qualifié de positif (tableau III) confirmant ainsi le choix des limites. La valeur maximale retrouvée dans les 405 échantillons a été de 0,062. Cette valeur se retrouvait dans les valeurs incertaines. D'ailleurs, les échantillons ayant ce statut ont été testés de nouveau par PCR-ELISA et le statut de négatif leur a tous été attribué. Les nouvelles D.O. variaient de 0,008 à 0,038 (D.O. < 0,045).

Tableau II : Détermination du seuil de détection du PCR-ELISA. Densités optiques (D.O.) de la valeur négative moyenne pour les blancs (40) et les échantillons présumés négatifs (405) obtenues avec le test de PCR-ELISA. Les négatifs bruts correspondent à la D.O. lue et les négatifs ajustés correspondent à la D.O. lue – la D.O. du blanc. L'écart type (σ) ainsi que la définition des valeurs négatives, incertaines et positives ont été énumérés.

| | # échantillons | Moyenne | Écart type | Négatifs | Zone d'incertitude | Positifs |
|-------------------------|----------------|---------|------------|--------------|------------------------------------|--------------|
| Blancs | 40 | 0,108 | 0,016 | < 2 σ | $\geq 2 \sigma$ et $\leq 4 \sigma$ | > 4 σ |
| Négatifs bruts | 405 | 0,114 | 0,020 | < 0,154 | $\geq 0,154$ et $\leq 0,194$ | > 0,194 |
| Négatifs ajustés | | 0,005 | 0,020 | < 0,045 | $\geq 0,045$ et $\leq 0,085$ | > 0,085 |

Tableau III : Détermination du statut des 405 échantillons présumés négatifs par application du seuil de détection (négatifs, incertains et positifs). Une représentation de la valeur du nombre d'échantillon dans chacune des catégories est présentée en pourcentage. Le statut est représenté par des sigles, + (positif), - (négatif) et \pm (incertain).

| # échantillons | Statut |
|----------------|--------|
| 11 (2,7 %) | \pm |
| 394 (97,3 %) | - |
| 0 (0 %) | + |

3.8.4 Évaluation de la spécificité du PCR-ELISA

La dernière épreuve du PCR-ELISA a été de s'assurer que celui-ci ne réagissait pas à l'ADN cible n'étant pas marqué. À l'aide d'ADN de pBluescript (pas d'ADN cible), de pCux, de pBlue-VP3, de pBlue-VP2 et d'amplification du plasmide pCux à 10^7 par les amorces VP3, la spécificité du PCR-ELISA a été vérifiée. Aucun des échantillons n'a donné de résultat positif (tableau IV). De plus, aucun échantillon n'a obtenu le statut d'incertain ($D.O. \geq 0,045$ et $\leq 0,085$).

Tableau IV : Évaluation de la spécificité du PCR-ELISA à l'aide d'échantillons possédant l'ADN cible, mais n'étant pas marqué. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacun des échantillons non marqués et confirmation du statut d'échantillon négatif par comparaison avec la valeur négative moyenne plus deux écarts types.

| Échantillons | D.O. ajustées | Négatif (si D.O. < 0,045) |
|--|---------------|------------------------------|
| pCux-1 clone 8 | 0,000 | Oui |
| PBlue-VP3 clone 5 | 0,004 | Oui |
| PBlue-VP2 clone 2 | 0,000 | Oui |
| Réactifs de PCR | 0,000 | Oui |
| Amplification par VP3 sur 10^7 plasmides de pCux | 0,028 | Oui |

3.8.5 Sensibilité du PCR-ELISA

Tout comme pour les expériences réalisées avec le PCR conventionnel et le transfert de type Southern, des dilutions d'ADN de plasmide pCux ou de surnageant de Cux-1, de CIA-1 et de vaccin CAV-VAC® ont été soumises au PCR marqué à la digoxigénine avec les amorces VP3. Après confirmation de la bonne démarche des réactions par une migration sur gel d'agarose 1,5 % coloré au bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g/mL}$), les échantillons ont été soumis au PCR-ELISA. Dans tous les cas, la meilleure expérience a été représentée par les graphiques respectifs et les écarts types observés ont été calculés à partir des duplicata.

Premièrement, il a été observé pour le PCR-ELISA réalisé sur le plasmide que la D.O. variait de 2,709 à 2,205 jusqu'au tube contenant 10^2 plasmides et que le dernier tube positif (0,648) était celui contenant 10^1 plasmides (fig. 27). Les écarts types variaient de 0,003 à 0,350. Aucune réaction n'a été observée au niveau du témoin négatif (H_2O). Aucune D.O. incertaine (D.O. située entre 0,045 et 0,085) parmi les échantillons n'a été observée.

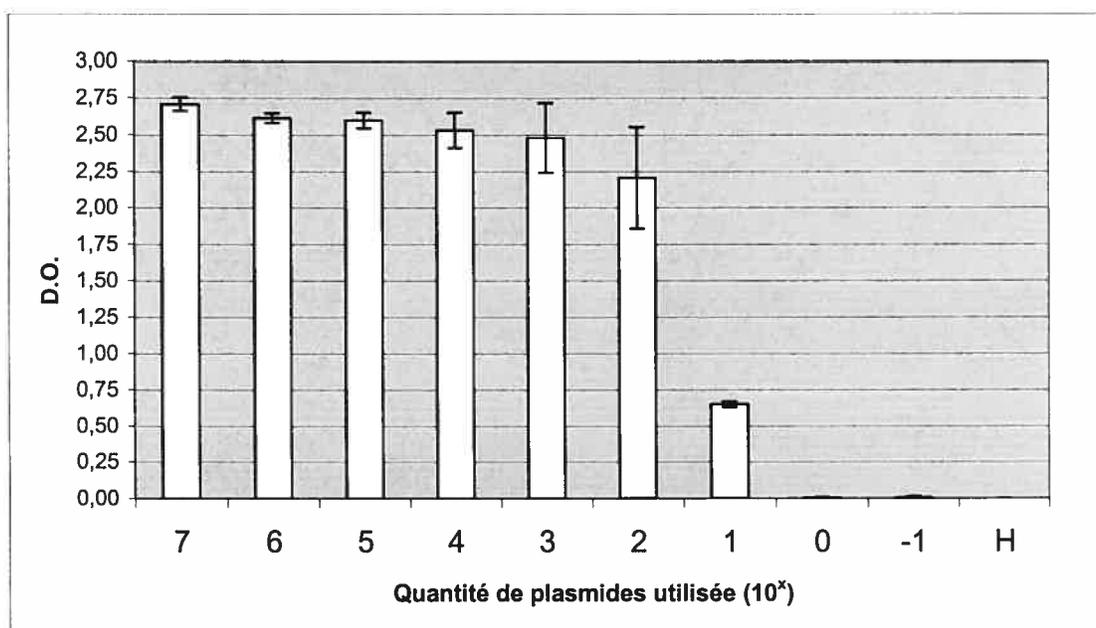


Figure 27 : Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide du plasmide pCux. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des quantités de plasmide pCux utilisées (10^7 à 10^1) lors du PCR-ELISA. Le PCR marqué à été réalisé à l'aide des amorces VP3. Le témoin négatif est identifié par la lettre H (H_2O).

En second lieu, l'ADN de surnageant de la souche Cux-1 a été analysé. Le PCR-ELISA a démontré une limite de détection à la dilution 10^5 (D.O. de 0,518) après avoir eu une diminution de signal à 10^4 (1,711) (fig. 28). Les premières dilutions (10^1 à 10^3) ont donné un signal variant de 2,625 à 2,502. Dans l'ensemble, les écarts types variaient de 0,003 à 0,419. Aucune réaction n'a été observée au niveau des témoins négatifs contenant de l'eau (H) ou du milieu de culture cellulaire DMEM (M). Encore une fois, aucun signal incertain n'a été observé.

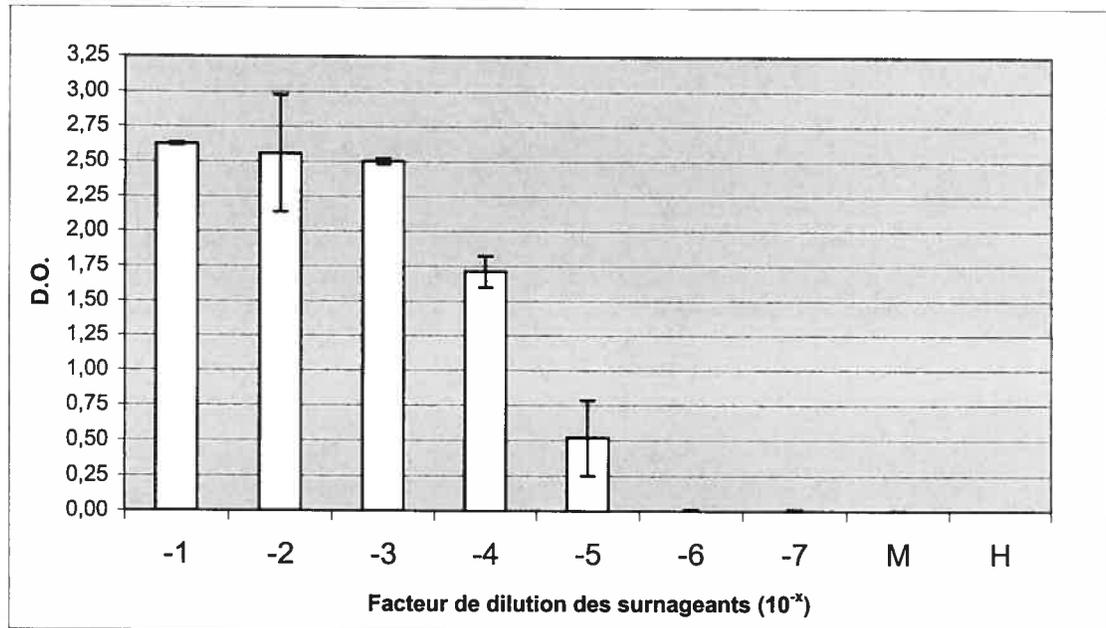


Figure 28 : Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide d'extraction d'ADN de surnageant de Cux-1. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des dilutions du surnageant de Cux-1 utilisées lors du PCR-ELISA. Le PCR marqué a été réalisé à l'aide des amorces VP3. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et M (milieu de culture cellulaire DMEM).

Dans le même ordre d'idées, l'ADN de surnageant de la souche CIA-1 a été vérifié. Le PCR-ELISA a démontré une limite de détection à la dilution 10^{-5} (D.O. de 1,874) après avoir eu une légère diminution du signal à partir de 10^{-3} (2,338 et 2,278 pour 10^{-4}) (fig. 29). Les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} ont donné respectivement un signal de 3,047 et 3,031. Aucun tube n'avait donné de résultat incertain et les écarts type observés variaient de 0,001 à 0,194). Aucune réaction n'a été observée au niveau des témoins négatifs H_2O (H) ou avec du milieu de culture cellulaire DMEM (M).

Par la suite, la qualité du PCR-ELISA sur le vaccin CAV-VAC® a été étudiée. Une légère décroissance du signal (D.O. de 2,661 à 2,173) a été observée de la dilution 10^{-1} à 10^{-5} puis la limite de détection a été établie à 10^{-6} (D.O. de 0,706) (fig. 30). Les écarts types ont été évalués à des valeurs se situant entre 0,000 et 0,241. Aucune réaction n'a été observée au niveau des témoins négatifs H_2O (H) ou avec du milieu de culture cellulaire DMEM (M). Tel que mentionné précédemment, aucun signal incertain n'a été observé.

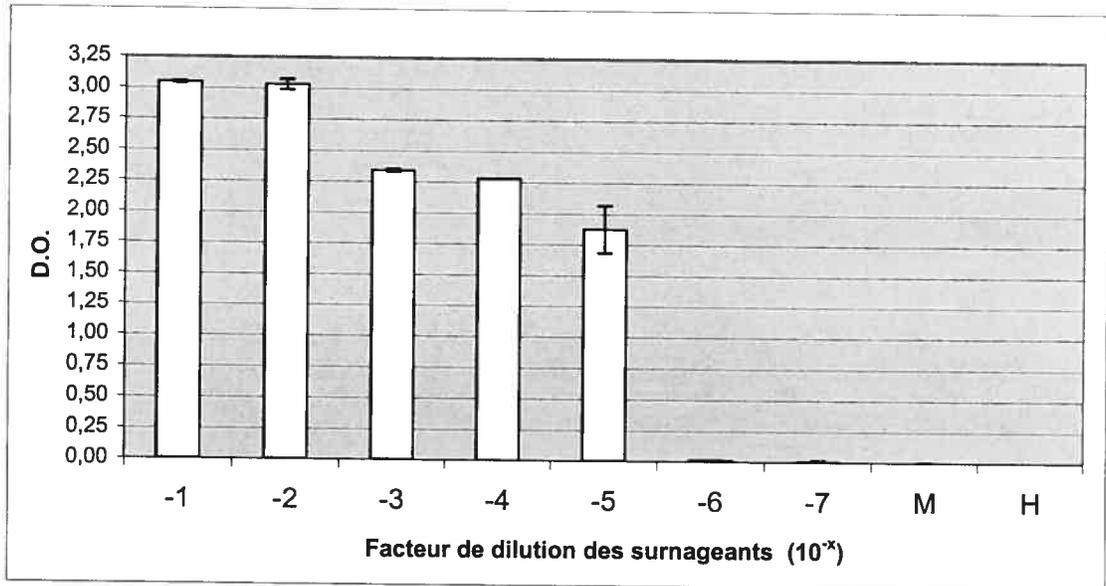


Figure 29 : Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide d'extraction d'ADN de surnageant de CIA-1. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des dilutions du surnageant de CIA-1 utilisées lors du PCR-ELISA. Le PCR marqué à été réalisé à l'aide de VP3. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et M (milieu de culture cellulaire DMEM).

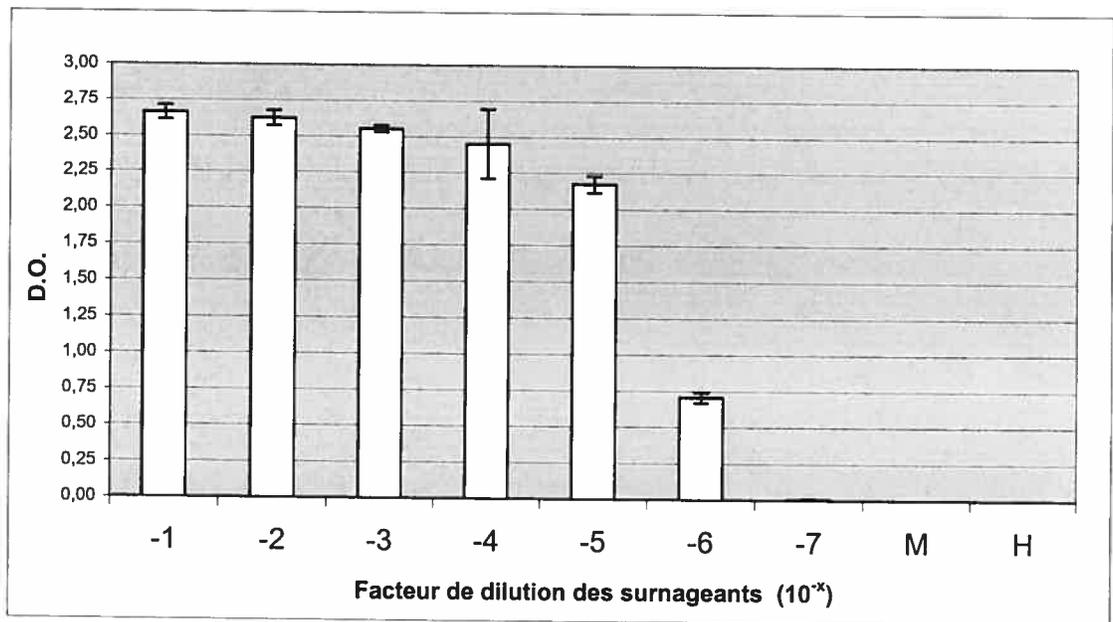


Figure 30 : Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide d'extraction d'ADN du vaccin CAV-VAC®. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des dilutions du vaccin CAV-VAC® utilisées lors du PCR-ELISA. Le PCR marqué à été réalisé à l'aide de VP3. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H_2O) et M (milieu de culture cellulaire DMEM).

En ce qui concerne les expériences avec les organes, les résultats obtenus avec PCR-ELISA sur les dilutions de plasmides (10^{-1} à 10^7) en présence d'ADN génomique de rate (200 ng) ont démontré une sensibilité se situant à 10^1 plasmides (D.O. de 0,521) (fig. 31). Les D.O. observées pour les puits contenant de 10^7 à 10^2 plasmides par réaction de PCR marqué ont pour leur part décreues de 2,677 à 2,366. Les écarts types des échantillons ont varié de 0,007 à 0,090. Aucune réaction n'a été observée au niveau des témoins négatifs H₂O (H) ou ADN d'organes (Org). Aucun signal incertain n'a été détecté dans les échantillons. La sensibilité obtenue dans cette expérience a été évaluée comme étant identique à celle obtenue sans la présence d'ADN génomique, test précédemment mentionné (fig. 27).

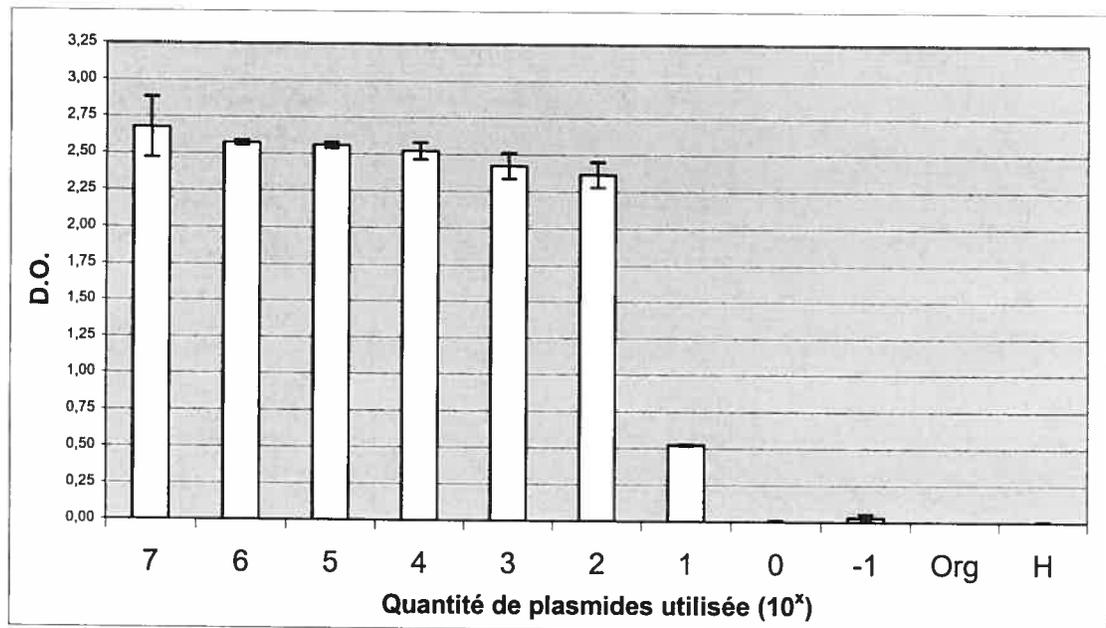


Figure 31 : Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide du plasmide pCux en présence d'ADN génomique de rate de poulet. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des quantités de plasmide utilisées (10^7 à 10^{-1}) en présence de 200 ng d'ADN génomique de rate lors du PCR-ELISA. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H₂O) et Org (ADN d'organe).

Finalement, le PCR-ELISA qui a été effectué à l'aide de dilutions de surnageant viral de Cux-1 en présence d'ADN génomique de rate de poulet (200 ng) a donné une sensibilité qui s'est avérée être inférieure à celle précédemment obtenue sans ADN génomique (fig. 28). En effet, la limite de détection a été située à la dilution 10^{-4} (D.O. de 1,087) (fig. 32). Les signaux ont diminué de 3,132 à 2,661 de la dilution 10^{-1} à 10^{-3} et les écarts types ont varié entre 0,001 à 0,152. Aucune réaction n'a été observée au niveau des témoins négatifs H₂O (H), milieu de culture cellulaire DMEM ou de l'ADN d'organes (Org).

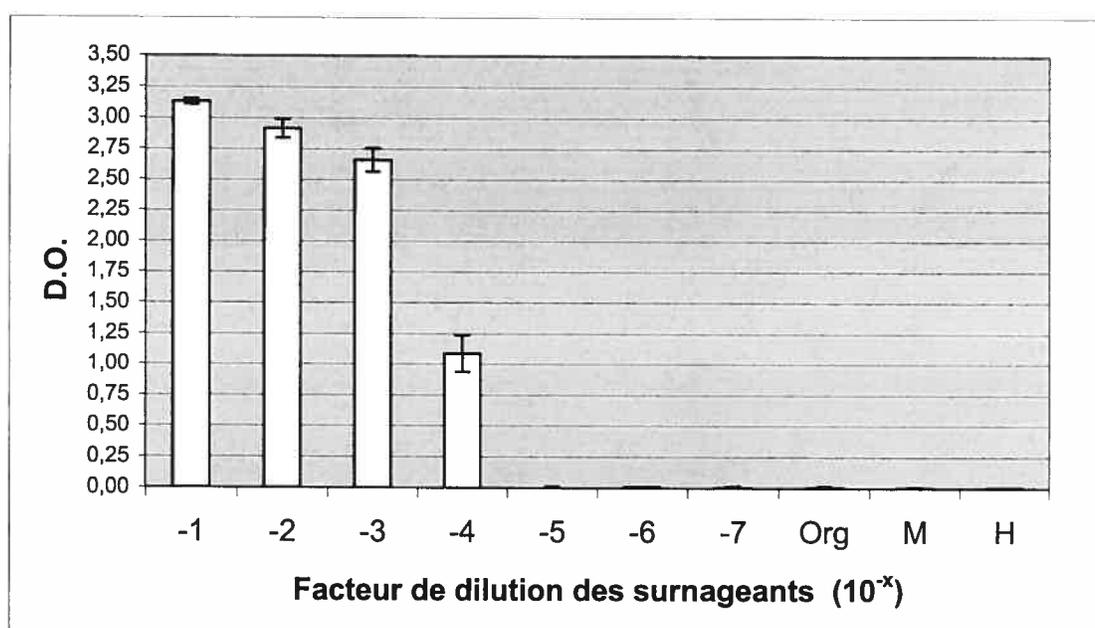


Figure 32 : Évaluation de la sensibilité du PCR-ELISA à l'aide d'extraction d'ADN de surnageant de Cux-1 en présence d'ADN génomique de rate de poulet. Densité optique (D.O.) obtenue pour chacune des dilutions de Cux-1 utilisées (10^{-1} à 10^{-7}) en présence de 200 ng d'ADN génomique de rate lors du PCR-ELISA. Les témoins négatifs sont identifiés par la lettre H (H₂O), M (milieu de culture cellulaire DMEM) et Org (ADN d'organe).

3.9 Résumé des principaux résultats en égard à la sensibilité

Les différents résultats obtenus avec les trois tests (PCR conventionnel, Southern et PCR-ELISA) ont été comptabilisés et la sensibilité maximale observée pour chaque type d'échantillon biologique (plasmide pCux, Cux-1, CIA-1 et vaccin CAV-VAC®) a été notée (tableau V). La sensibilité maximale obtenue avec le plasmide pCux a été d'une molécule par réaction avec la technique de Southern. Lorsque les tests sur le plasmide ont été effectués en présence de 200 ng d'ADN génomique de poulet, la sensibilité maximale a été de 10^1 (10 molécules) avec la technique de Southern et le PCR-ELISA. La sensibilité maximale observée lorsque le surnageant viral de la souche Cux-1 a été employé, a été le facteur de dilution de 10^{-5} et 10^{-4} en présence de 200 ng d'ADN génomique de poulet pour tous les tests employés. Le surnageant viral de CIA-1 a pour sa part donné une sensibilité de 10^{-5} (facteur de dilution) pour les tests de Southern et PCR-ELISA. Finalement, l'utilisation de l'ADN du vaccin CAV-VAC® a démontré une sensibilité maximale avec un facteur de dilution de 10^{-6} pour la technique du PCR-ELISA.

Tableau V. Résumé de la limite de détection des trois tests utilisés (PCR conventionnel, transfert de type Southern et PCR-ELISA) en # plasmides par réaction ou en facteur de dilution de surnageant pour chacun des types d'échantillons utilisés (pCux, Cux-1, CIA-1, vaccin CAV-VAC® et pCux ou Cux-1 en présence d'ADN de rate de poulet). La meilleure sensibilité, pour chaque échantillon, a été identifiée ainsi que le ou les tests ayant cette dite sensibilité.

| Type d'échantillon utilisé | Test employé | | | Sensibilité maximale observée |
|----------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------------------------------|
| | PCR Conv. | Southern | PCR-ELISA | |
| Plasmide pCux | 10^2 | 10^0 | 10^1 | 10^0 (Southern) |
| pCux + ADN rate | 10^2 | 10^1 | 10^1 | 10^1 (Southern et PCR-ELISA) |
| Surnageant Cux-1 | 10^{-5} | 10^{-5} | 10^{-5} | 10^{-5} (Tous) |
| Cux-1 + ADN rate | 10^{-4} | 10^{-4} | 10^{-4} | 10^{-4} (Tous) |
| Surnageant CIA-1 | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-5} | 10^{-5} (Southern et PCR-ELISA) |
| Surnageant Vaccin | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-6} (PCR-ELISA) |

En conclusion, la technique de PCR-ELISA démontre dans l'ensemble une sensibilité accrue comparativement au PCR conventionnel et une sensibilité similaire ou légèrement supérieure à celle observée avec la technique du transfert de type Southern. Le transfert de Southern s'est quant à lui démarqué lors de l'utilisation du plasmide.

3.10 Évaluation d'une infection *in vitro*

Comme dernier point abordé dans les résultats, une expérience préliminaire dans le suivi d'infections *in vitro* a été effectuée. Il a été observé un signal positif par PCR jusqu'au facteur de dilution 10^{-3} pour les infections des cellules de moelle osseuse ou de thymus par les surnageants viraux de Cux-1 ou de CIA-1 (titres inconnus) (fig. 33). L'intensité des bandes a été plus grande au niveau des expériences réalisés avec les cellules du thymus. Aucune réaction n'a été observée dans les témoins négatifs de PCR : eau (H) ou avec du milieu de culture cellulaire DMEM (M) ni dans le témoin d'infection : cellules non infectées (NI).

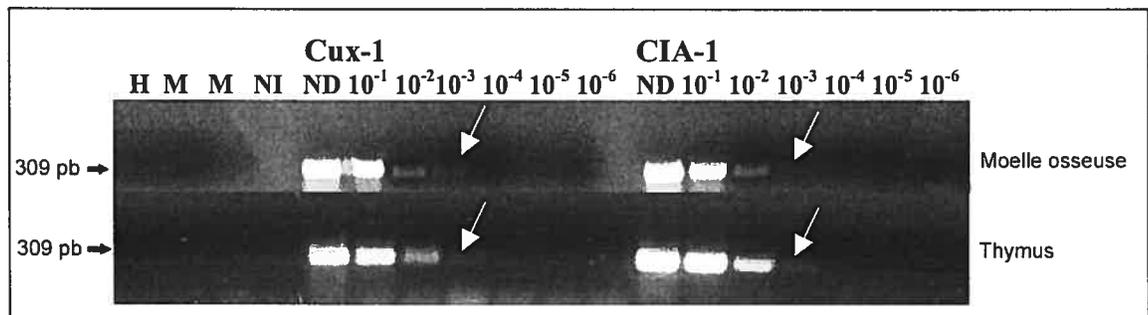


Figure 33 : Évaluation, par réaction de PCR avec les amorces VP3, d'une infection par le virus de l'anémie aviaire de souche Cux-1 et CIA-1 sur des cellules de moelle osseuse et de thymus mises en culture. Les cellules infectées ont été utilisées de non diluée (ND) jusqu'à l'obtention d'un facteur de dilution 10^{-6} . Les témoins eau (H), milieu de culture cellulaire DMEM (M) et de cellules non infectées (NI) ont aussi été vérifiés.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet avait pour but d'élaborer un test sensible et spécifique permettant la détection du virus de l'anémie aviaire (VAA) dans des échantillons provenant de cultures cellulaires ou d'organes infectés. Pour ce faire, la technique du PCR-ELISA a été développée et comparée au PCR conventionnel ainsi qu'au transfert de type Southern.

Par observation générale des résultats, la technique du transfert de type Southern et celle du PCR-ELISA ont tous deux démontré une plus grande sensibilité que le PCR conventionnel. Cependant, tous deux dépendaient de la qualité, c'est-à-dire de la sensibilité et de la spécificité des amplifications réalisées par la technique de PCR. L'optimisation de cette technique était donc primordiale à la bonne démarche de ce projet. Celle-ci a débuté par la comparaison des génomes du VAA. Certaines différences, au niveau de la composition nucléique, ont été notées parmi les différentes souches. Une comparaison de trois souches (Cux-1, CIA-1 et TR-20) a été démontrée en annexe (fig. 34), mais en tout, une vingtaine de séquences ont été comparées et analysées dans l'ensemble du projet (résultats non présentés). Ces différences ont été majoritairement retrouvées dans la région codant pour la capsid (VP1), tel que mentionné par Noteborn et Koch (1995) et Todd *et al.* (2002). Le développement d'amorces spécifiques à chacun des cadres de lecture ouverts (CLO) du VAA a donc pu être réalisé. Les régions variables ont été évitées et les amorces n'ont ciblés que des régions très conservées. Toutefois, la stabilité interne, l'absence de repliement sur elle-même et l'obtention d'une température d'appariement (T_m) similaire entre les différentes amorces étant les conditions recherchées, trois des amorces ainsi que la sonde créées se sont retrouvées avec quelques nucléotides de différences par rapport aux séquences de référence (un à trois). Ces différences ont été notées par rapport aux séquences des souches japonaise TR-20 fournie par Okamura *et al.* (1999) dont le

code dans *GenBank* est AB027470 pour les amorces VP1F et VP1R, américaine CIA-1 (Renshaw *et al.*, 1996 ; code : L14767) pour VP3R, allemande Cux-1 (Noteborn *et al.*, 1991 ; code : M55918) pour VP3R et le clone atténué de Cux-1 (Meehan *et al.*, 1997 ; code: U66304) pour la sonde. Malgré la présence d'un nucléotide de différence, les expériences d'amplification par PCR réalisées avec les amorces VP3 sur la souche Cux-1 ont donné un signal comparable sinon meilleur aux autres amplifications réalisées avec VP1 et VP2, ceux-ci ne possédant pas de différence entre leur composition et la séquence de Cux-1 (fig. 15 et 16). Aucun nucléotide dissemblable n'a été noté pour la sonde excepté dans le cas du clone atténué de Cux-1. Suite aux résultats et analyses effectués lors de cette étude, il est possible d'affirmer que les amorces et la sonde, de par leur composition, peuvent théoriquement être employées pour détecter toutes les souches existante du VAA.

L'obtention d'une T_m similaire a permis d'utiliser les amorces autant en PCR conventionnel qu'en PCR niché. Par exemple, la création de plus longs fragments par l'utilisation des amorces VP2F et VP1R aurait aussi été possible. Les conditions théoriques de la température d'amorçage du PCR (tableau I), obtenues par le logiciel *pDraw32*, se sont avérées être légèrement inférieures à celles optimales (fig. 11). Cette constatation a aussi été notée par les autres membres du laboratoire lors d'expériences réalisées dans le cadre de divers projets. C'est ainsi que l'ajout d'un degré Celsius a été effectué dès le début des expériences et que cette nouvelle valeur de T_m a été considérée comme étant la valeur théorique. Ces affirmations sont toutefois très empiriques et ne sont probablement valables qu'en combinant les valeurs obtenues avec le logiciel *pDraw32* et l'appareil utilisé dans le cadre de ce projet, le GeneAmp® PCR system 2400 de Perkin Elmer. Lors de la détermination expérimentale de la T_m optimale (fig. 11), une variation plus petite, de l'ordre de 0,5°C ou moins, aurait pu permettre de trouver une meilleure T_m et ainsi, optimiser encore plus la réaction. D'ailleurs, l'intensité d'amplification obtenue à 53°C était légèrement plus grande que celle observée à 55°C ce qui laisse croire qu'entre 53°C et 54°C pourrait se situer la véritable température optimale de la T_m . Cette démarche n'a cependant pas été entreprise et aurait été trop fastidieuse pour le gain de sensibilité possiblement obtenu.

Une étude de la T_m , pour chacune des amorces, aurait aussi pu être entreprise, mais encore une fois, cette étape aurait été trop longue, d'autant plus que les amorces, théoriquement, possèdent une T_m identique ou presque selon les cas (tableau I).

Le second point optimisé a été le nombre de cycles d'amplification (fig. 12). Celui-ci a été évalué optimal (démontrant le plus fort signal) à 35. Cette valeur s'apparente à celle généralement mentionnée dans la littérature : 30 (Noteborn *et al.*, 1992; Tham et Stanislawek, 1992; St-Laurent *et al.*, 1994; Imai *et al.*, 1998; Pamba *et al.*, 1999 et Liu *et al.*, 2000,) ou 35 cycles (Feucht *et al.*, 1995; Larochelle et Magar, 1997; Larochelle *et al.*, 1999a; Larochelle *et al.*, 1999b; Larochelle *et al.*, 2000; Kim et Chae, 2001; Kim *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2001 et Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002). Cependant, des valeurs aussi petites que 15 ou 20 cycles (Lin *et al.*, 1991) ou aussi grandes que 40 (Ramina *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2001 et Zerbini *et al.*, 2001), 45 (Aberham *et al.*, 2001), 50 (Todd *et al.*, 1992) et 55 cycles (Kearns *et al.*, 2001) ont aussi été notées. L'effet d'une augmentation du nombre de cycles à des valeurs supérieures n'a pas été vérifié, mais n'aurait probablement pas donné de meilleurs résultats dus à l'atteinte du plateau d'amplification (Gibbs *et al.*, 2003).

Suite aux expériences préliminaires, les produits amplifiés par PCR ont été clonés et séquencés afin de confirmer leur identité. Les clones (annexe 5.2.2) ont été digérés enzymatiquement et les patrons de migration obtenus ont concordé avec ceux attendus (méthodologie 2.5.5). De plus, un séquençage sur les trois clones (pBlue-VP1, -VP2 et -VP3) a permis de constater l'identité des produits amplifiés (fig. 39, 40 et 41). En conséquence, les séquences amplifiées par PCR avec les paires d'amorces VP1, VP2 et VP3 étaient bel et bien celles recherchées. Ainsi, d'après les résultats obtenus avec ces deux approches, que la réaction de PCR, peu importe la paire d'amorces choisie, a donné une amplification très spécifique ne contenant que l'ADN cible et seulement celui-ci.

La qualité des amplifications étant confirmée, le dernier point d'optimisation de la technique de PCR a pu être réglé. Le choix de la paire d'amorces la plus sensible a été effectué. La différence de sensibilité observée entre les trois paires d'amorces, bien que ne dépassant généralement que d'un facteur de dilution, serait peut-être due à leur composition. Malgré l'étude réalisée à l'aide de logiciels, une légère variation dans la T_m optimale, dans son habileté à se replier sur elles-mêmes ou à fixer l'ADN cible pourrait expliquer cette différence. Un autre facteur qui aurait pu influencer la sensibilité observée est la possible dégradation d'ADN lorsque celui-ci est en solution à faible concentration (Markowski-Grimrud *et al.*, 2002). Ces conditions ont pu survenir lors d'extractions de surnageants viraux ou de la dilution du plasmide puisque les solutions ainsi préparées ne contenaient pas beaucoup d'ADN. Donc, les différents tests étaient effectués la journée même afin d'éviter l'effet de dégradation ou à l'intérieur de trois à quatre jours si nécessaire. Une perte de un à deux facteurs de dilution ou d'un log de la quantité de plasmide a de fait été observé dans quelques échantillons après deux semaines de conservation des échantillons d'ADN à -20°C . Ceux-ci n'ont pas été utilisés comme résultats. Le problème des variations ayant été réglé, la comparaison des trois amorces sur différents types d'échantillons a été effectuée et a permis de cibler la paire d'amorces VP3 comme étant la plus sensible. Ce choix a été aussi confirmé par les résultats obtenus avec la technique du transfert de type Southern.

La technique du transfert de type Southern a été, dès les expériences préliminaires, un test très sensible et spécifique. En effet, un signal d'une forte intensité n'a été observé qu'à la position, sur la membrane, des amplifications d'ADN du VAA par VP2 ou VP3 (fig. 13) ainsi que sur l'ADN du plasmide pCux contenant le génome entier du VAA (fig. 14). Le test a donc été réalisé tel que conçu tout en variant le temps d'exposition du film afin de visualiser les bandes les plus faibles pouvant être reconnues par la sonde. Dans la majorité des cas, le dernier signal observable a été détecté après un temps d'exposition de trois à cinq minutes et une exposition plus longue n'a fait que confirmer cette détection. Les expériences de sensibilité réalisées avec le Southern ont démontré un signal plus fort et une détection dans des dilutions d'un log plus élevées

avec les amorces VP3 (fig. 15, 16 et 17) qu'avec les amorces VP2 . Tous ces éléments étant considérés, la paire d'amorces VP3 fut celle retenue tant pour son efficacité au PCR conventionnel qu'au transfert de type Southern.

Pour faire suite à l'optimisation de la technique du PCR conventionnel, une comparaison avec des techniques publiées a été effectuée. La sensibilité du PCR avec les amorces de Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) ainsi que celles de Noteborn *et al.* (1992) ont donc été évaluées. Noteborn *et al.* (1992) ont obtenu une sensibilité d'environ 100 cellules infectées par réaction (déterminé par un titre viral), valeurs difficilement comparables avec les présents résultats puisque ceux-ci ont été obtenus à partir de surnageants viraux de titres inconnus. De plus, une cellule infectée contient généralement plus d'une particule virale. D'autre part, les amorces retenues provenant de Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) formaient la deuxième paire utilisée lors de leur PCR niché. De par la nature des valeurs publiées, aucune donnée concrète n'a donc pu être utilisée pour la comparaison. Il est toutefois possible que les résultats obtenus diffèrent légèrement de ceux attendus. En effet, bien que les conditions pour chacune des approches aient été respectées, la variation induite par l'utilisation d'un appareil (thermo-cycleur) différent de celui utilisé lors de leurs expériences (MacPherson *et al.*, 1993) ou par le matériel biologique différent a pu être suffisante pour que les résultats obtenus lors de ce projet divergent de ceux attendus. De plus, Noteborn *et al.* (1992) ont employé un tampon contenant une concentration différente de MgCl (3 mM), du sérum d'albumine bovine (0,01%), des amorces à 1 μ M au lieu de 20 pM (présent projet) et de l'enzyme Taq (1 U au lieu de 2,5 U). Le tout a été réalisé dans 100 μ L au lieu de 50 μ L de volume total des réactions de PCR. L'influence du volume final a d'ailleurs été notée par Tham et Stanislawek (1992) et l'emploi d'un plus petit volume augmente la sensibilité du PCR. Les amorces de Markowski-Grimsrud *et al.* (2002) étaient quant à elles, employées à 10 μ M au lieu de 20 pM. Quoi qu'il en soit, l'ensemble des résultats obtenus avec leurs amorces démontre une sensibilité moindre que celle observée avec les amorces de ce projet.

La considération majeure de la technique de PCR, quel que soit le type employé, est la contamination. Celle-ci est plus sévère dans les laboratoires de diagnostic et est surtout composée de produits de PCR préalablement amplifiés (Cimino *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2001 et Sails *et al.*, 2001). Dans ce projet, la présence de contaminations (faux positifs) a été observée tant et aussi longtemps que des mesures strictes, mais nécessaires, de décontamination et de manipulation n'ont pas été prises. Ces mesures ont été citées dans la méthodologie (séparation physique des lieux, aliquots, irradiation aux rayons UV) (Sarkar et Sommer, 1990a; Dwyer et Saksena, 1992; Prince et Andrus, 1992 et Watson *et al.*, 1994) et c'est par leur application que les faux positifs ont été évités. Lors des premières expériences, les contaminations s'observaient dans les tubes témoins négatifs, mais aussi dans les tubes contenant des dilutions très fortes d'ADN cible (10^{-1} plasmides ou 10^{-7} de surnageant), tubes ne donnant normalement aucun signal positif. La présence d'ADN contaminant dans des tubes donnant un signal fortement positif n'a pu être mesurée, mais a probablement dû survenir. L'utilisation de dilutions progressives a permis de les cibler, mais cela aurait été impossible lors d'un diagnostic d'échantillons inconnus. La validité des résultats obtenus avec le PCR a donc été assurée par les mesures de décontamination et de manipulation prises lors de ce projet. Son utilisation en diagnostic est donc envisageable.

Le PCR niché est reconnu comme l'une des techniques les plus sensibles (Imai *et al.*, 1998). C'est pourquoi le développement de cette technique a été initié. Les essais n'ont pas été fructueux, la présence de contaminations rendant la détermination de la sensibilité impossible (fig. 24). L'utilisation du PCR niché implique l'emploi de techniques de décontamination et de manipulations très rigoureuses. Telle que mentionnée précédemment, la source majeure de contamination des réactions de PCR citée dans la littérature est celle créée par les séquences amplifiées (Cimino *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2001 et Sails *et al.*, 2001). Un des moyens d'éliminer la contamination est l'emploi de produits rendant l'ADN amplifié inutilisable dans une réaction subséquente de PCR tel le dUTP, au lieu du dTTP, couplé à l'utilisation d'uracile glycosylase (Cimino *et al.*, 1991; Thornton *et al.*, 1992; Aslanzadeh, 1993; Watson *et al.*, 1994 et Sharma *et al.*, 2002). Cependant, le PCR niché est basé sur la réutilisation d'ADN

préalablement amplifié. Puisque les résultats obtenus avec les techniques de PCR conventionnel et de transfert de type Southern étaient concluants, le PCR niché a été mis de côté pour le reste du projet.

Un dernier point évalué dans le développement du PCR a été de vérifier si le test réagissait avec des génomes appartenant à d'autres virus aviaires. Pour ce faire, l'ADN d'adénovirus aviaire et l'ADNc de réovirus ont été soumis au PCR avec les amorces VP3 (fig. 23). L'absence de signal pour les deux échantillons a démontré sa spécificité. L'utilisation d'ADN du VAA, sous forme de plasmide, dans les tubes contenant les échantillons a permis de confirmer que l'absence de signal observé n'était pas due à une inhibition, mais bien à une non reconnaissance par les amorces du génome présenté. De plus, le génome de ces virus n'avait pas été reconnu lors de l'étude par BLAST sur les séquences retrouvées dans *GenBank* (méthodologie 2.2.3).

Le dernier test développé dans le cadre de ce projet a été le PCR-ELISA. Son optimisation a été effectuée en quatre étapes. La qualité du PCR marqué, première étape du PCR-ELISA a d'abord été analysée. Bien qu'à quelques reprises, une sensibilité moindre ait été observée avec le PCR marqué comparativement au PCR conventionnel, aucune différence significative n'a été notée (section 3.8.1). Les légères variations peuvent s'expliquer par la pré-coloration des gels au bromure d'éthidium, colorations n'étant pas toujours uniformes. Pour une même amplification déposée sur deux gels différents, des variations d'un facteur de dilution ont déjà été observées. La réalisation de plusieurs expériences en duplicata a permis de contourner cette variation. Une autre hypothèse pourrait aussi être mise de l'avant. En effet, lors du marquage des produits de PCR, le dUTP ainsi que l'uracile glycosylase ont été employés. Toutefois, un problème a été noté par Thornton *et al.* (1992). Cette enzyme pourrait dégrader l'ADN amplifié si celui-ci n'est pas congelé rapidement. Il est donc possible que certains échantillons, n'ayant pas été utilisés rapidement, aient subi une dégradation. Ce point n'a toutefois pas été investigué, les différences observées n'étant pas significatives ou constantes, mais pourrait avoir tout de même diminué quelque peu la sensibilité du PCR-ELISA.

Le temps d'hybridation à 51°C a par la suite été évalué (fig. 25). Une incubation de trois heures a démontré un meilleur rendement. Le fabricant, Roche Diagnostics, indique d'ailleurs qu'une hybridation de trois heures donne 50% de plus de signal (D.O.) qu'une incubation d'une heure trente, mais qu'une plus longue hybridation n'augmentera pas l'intensité du signal. Sails *et al.* (2001) ont noté une perte de sensibilité lorsqu'un temps d'hybridation d'une heure était employé au lieu d'un temps de 90 minutes. Une agitation a aussi été employée. Encore une fois, le fabricant (Roche Diagnostics) indique qu'une agitation, lors des incubations, peut doubler le signal observé. Sails *et al.* (2001) ont par ailleurs utilisé, pour réaliser leur PCR-ELISA, des temps d'hybridation comparables à ce qui a été retenu dans ce projet, eux aussi se fiant aux recommandations du fabricant.

La température d'hybridation de la sonde est aussi un point important à considérer dans la technique du PCR-ELISA. Une température trop élevée va augmenter sa spécificité, mais réduire sa sensibilité (Sails *et al.*, 2001). Ces deux variables n'ont pas été évaluées durant le projet, mais la validation des T_m théoriques par PCR (validées expérimentalement) (fig. 11) ainsi que l'obtention d'un très bon signal par Southern (fig. 13) ont confirmé, indirectement, l'utilisation de la température choisie. L'absence de nucléotides différents entre la sonde et les souches Cux-1 et CIA-1 a favorisé l'obtention d'une bonne hybridation (fig. 34). Une différence d'un nucléotide, quelle que soit sa position, aurait pu être tolérée (légère perte de sensibilité), mais la présence de deux et plus aurait probablement empêché la détection du virus (Sails *et al.*, 2001). Il est à noter que l'effet de la concentration de la sonde n'a pas été étudié. Tout comme les autres points abordés précédemment, ce facteur aurait pu lui-aussi influencer la sensibilité. Lors des expériences, une concentration de 7,5 pM a été utilisée. Le fabricant Roche Diagnostics conseille quant à lui, une variation de la concentration de la sonde entre 5 pM et 25 pM selon les résultats obtenus.

Un autre point analysé a été le temps de révélation avec le substrat ABTS (3.8.1). Il a été déterminé qu'un signal négatif à 10 minutes l'était aussi après une heure. Ceci s'explique par la réaction rapide de la peroxydase avec son substrat, donnant un signal très rapidement, mais qu'en l'absence de celle-ci, aucun signal ne sera perceptible.

Le PCR-ELISA a démontré une très grande reproductibilité lorsque différentes dilutions de produits de PCR ont été utilisées (fig. 26). L'intensité du signal n'a cependant pas été jugée représentative de la quantité amplifiée puisque la lecture des D.O. obtenues pour les plus fortes concentrations d'ADN a toujours été maximale et ne corrélait pas avec les facteurs de dilution. Cette observation est confirmée par Gibbs *et al.* (2003) qui expliquent que différentes quantités d'ADNc amplifié par PCR génèrent des quantités similaires d'ADN lorsque le plateau d'amplification a été atteint. La saturation de la réaction ainsi que celle du lecteur ont aussi été atteints. Ces états de fait ne sont pas problématiques puisque le but est de détecter la présence virale et non de la titrer.

Pour conclure la mise au point du PCR-ELISA et son appréciation, le seuil de détection de celui-ci a été déterminé en se basant sur la littérature et la qualité des résultats obtenus. En effet, le choix du seuil se justifie par un très faible écart type et par l'absence de signal dans les échantillons négatifs ou témoins négatifs. Un statut positif était donné aux échantillons lorsqu'ils obtenaient un signal supérieur à la D.O. moyenne des négatifs plus quatre écarts types et négatif si moins de deux (tableau II). Entre les deux statuts, une zone d'incertitude, requerrant une réévaluation par un second test, a été définie. Par l'utilisation de 200 échantillons négatifs, Simard *et al.* (2001) ont, pour leur part, déterminé un seuil de détection sérologique pour leur ELISA (servant à détecter le virus de l'arthrite encéphalite caprine [*Caprine Arthritis-Encephalitis virus*]) à la moyenne des négatifs plus trois écarts types. Les valeurs jugées incertaines se retrouvaient entre trois et cinq écarts types, tandis que les valeurs positives étaient celles donnant des D.O. supérieures à cinq écarts types. Park *et al.* (2001) ont aussi utilisé trois écarts types comme seuil de détection pour leur ELISA

indirect détectant le *Plasmodium vivax*. Sails *et al.* (2001) ont, pour leur part, déterminé la valeur seuil de leur PCR-ELISA en utilisant le double de la moyenne des D.O. obtenues avec le témoin eau, tandis que Chansiri *et al.* (2002) n'ont utilisé que la moyenne de trois négatifs comme seuil pour leur PCR-ELISA. Ces valeurs sont similaires, mais non identiques à celle déterminées dans cette étude. La validation du seuil sur les 405 échantillons négatifs a de fait appuyé cette décision (tableau III). De plus, aucun résultat ambigu n'a été obtenu lors des différents PCR-ELISA réalisés sur tous les échantillons. D'un autre côté, aucun des échantillons possiblement positifs (contenant l'ADN cible mais non marqué) n'a été reconnu par le PCR-ELISA. Ceci démontre la spécificité du PCR-ELISA développé dans cette étude.

Lors d'une étude portant sur *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*, la sensibilité du PCR-ELISA a été évaluée à un équivalent de génome (1600 kb) par Sails *et al.* (2001) Ces auteurs ont déterminé une sensibilité de 10 à 100 fois supérieure à celle obtenue par migration de produits de PCR sur gel d'agarose, tout comme Masake *et al.* (2002) avec *Trypanosoma brucei*. Munch *et al.* (2001) ont aussi évalué le PCR-ELISA 100 fois plus sensible que le PCR conventionnel lors de leur détection du virus de l'influenza. Chanciri *et al.* (2002) vont dans le même sens avec une détection d'un parasite (*Trypanosoma evansi*) par mL correspondant à 100 fois la sensibilité obtenue avec la détection par PCR. Gilligan *et al.* (2000) ont évalué leur PCR-ELISA 10 fois plus sensible que le PCR pour la détection de *Staphylococcus aureus*. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans la présente étude. Une détection 10 fois supérieure à la sensibilité obtenue avec le PCR conventionnel a été notée dans la majorité des cas. Une sensibilité similaire à celle observée avec le PCR-ELISA a été obtenue avec la technique de Southern. Cela a aussi été observé par Rola et Kuzmak (2002) dans leur étude relativement à la détection du virus de la leucémie bovine.

La limite de détection a pu être évaluée précisément avec le plasmide pCux. Celle-ci se situait à environ un plasmide par réaction avec le Southern, 10 avec le PCR-ELISA et 100 plasmides avec le PCR conventionnel (fig. 15 et 27). Les conditions, lors de ces expériences, ne représentaient pas les conditions retrouvées en culture cellulaire

ou lorsque des organes étaient manipulés. Les résultats ne peuvent donc pas être considérés comme représentatifs de la sensibilité que l'on obtiendrait en diagnostic. Cependant, l'utilisation du plasmide a permis d'obtenir une valeur mesurable et quantifiable de la sensibilité des tests. En ce qui concerne les surnageants viraux, le titre viral n'ayant pu être obtenu ni pour les surnageants provenant du laboratoire affilié ni du vaccin CAV-VAC®, secret industriel oblige, la quantification de la sensibilité n'a pu être évaluée avec précision. Il est toutefois possible d'évaluer le titre viral généralement observé dans les cultures cellulaires de MDCC. En effet, selon McNulty (1991), le VAA n'est obtenu qu'à de faibles titres, ne dépassant généralement pas les 10^5 à 10^6 TCID₅₀/0,1mL dans les cellules MDCC-MSB1. Lors de ce projet, 200 µL de surnageant viral étaient employés lors des extractions. En supposant que les surnageants employés avaient un titre maximal, l'extrapolation des données théoriques impliquerait une détection de 2 à 20 particules virales (génomes du VAA) pour une sensibilité obtenue à un facteur de dilution de 10^{-5} (tel qu'observé dans ce projet, fig. 16, 20, 28 et 29). Ces résultats seraient supérieurs à ceux obtenus par Tham et Stanislawek (1992) qui ont détecté jusqu'à 1 fg d'ADN de VAA (équivalent à 100 à 200 génomes selon leur publication) par PCR. Les tests élaborés dans le cadre de ce projet seraient d'une sensibilité similaire à celle obtenue avec le PCR en temps réel. En effet, une détection de 10 copies d'ADN génomique (Aberham *et al.*, 2001; Kearns *et al.*, 2001) ou de 1,7 à 4,2 molécules (Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002) ont déjà été observé dans d'autres systèmes infectieux. Ce serait cependant moindre que les résultats obtenus par PCR niché (une molécule d'ADN de VAA) rapportés par l'équipe d'Imai *et al.* (1998).

Les derniers tests effectués ont été réalisés à l'aide d'ADN de rates de poulets SPF (fig. 21, 22, 31 et 32). La rate a été préférée aux autres organes due à sa faible composition en polysaccharides et en tissus adipeux ainsi qu'à la facilité d'extraction qui en résulte. Ces tests de reconstitution ne représentent pas un diagnostic véritable sur des organes infectés, mais donnent une idée de la faisabilité des différents tests en présence d'ADN génomique et d'autres substances potentiellement inhibitrices telles les polysaccharides, l'urée et l'hémoglobine (Todd *et al.*, 1992; Moreira, 1998 et Zerbini *et*

al., 2001). Une légère perte du signal a été observée pour tous les tests lorsque le surnageant viral Cux-1 a été analysé (fig. 22 et 32) comparativement à ceux réalisés sans la présence d'ADN génomique. Afin de mieux quantifier et identifier cette inhibition, la diversification des sources d'ADN et d'autres substances cellulaires aurait été souhaitable. Il aurait aussi été important d'infecter des organes et de réaliser des expériences de sensibilité. Une meilleure appréciation et quantification des tests en situation concrète auraient donc pu être possibles.

En ce qui concerne le temps requis pour chacune des trois approches, il est possible de les classer par ordre de rapidité. Compléter l'amplification par la réaction de PCR se réalisait en deux heures trente minutes et était suivi par une migration sur gel d'une demi-heure. Le PCR conventionnel arrive donc bon premier en ce qui a trait à la rapidité d'exécution avec ses trois heures (quatre heures en considérant les extractions). Le PCR-ELISA est pour sa part réalisable en une journée (nécessitant de huit à neuf heures en tout) et le Southern, arrive bon dernier avec ses trois jours, dû d'abord à l'extraction et au PCR (quatre heures) puis au transfert et finalement à l'hybridation, tous deux d'une durée de 12 à 16 heures (généralement réalisés de nuit) suivi des manipulations de révélation. L'ensemble de ces manipulations et incubations rendent la réalisation du transfert de Southern impossible à réaliser en moins de temps.

Pour faire suite aux résultats obtenus lors de ce projet, il est possible d'entrevoir d'autres développements apportant une continuité à cette étude. Un point important à régler serait d'obtenir des surnageants viraux dont le titre est connu afin d'évaluer précisément la sensibilité des différents tests. Ainsi, en comparant le titre réel à la dilution maximale donnant un signal, une détermination approximative du titre viral par PCR conventionnel ou PCR-ELISA serait chose possible. Cette approche pourrait servir lors d'études *in vitro*. D'ailleurs, l'utilisation du PCR conventionnel dans le suivi des infections *in vitro* ayant déjà été éprouvée dans ce projet (fig. 33), il serait intéressant de poursuivre dans cette voie. L'évaluation de la présence virale par PCR permettrait de mettre en évidence l'effet de différents facteurs cellulaires sur la répllication virale dans les différents tissus ciblés par le VAA. Une évaluation de la

présence virale dans le surnageant comparativement à celle observée dans les cellules serait aussi possible en séparant les deux entités lors de l'extraction d'ADN. Cette approche permettrait de différencier infection et réplication.

L'infection expérimentale des poulets pourrait aussi être envisageable. Dans un premier temps, cela confirmerait l'emploi des tests dans une application diagnostique et dans un deuxième temps, cela permettrait de réaliser une étude fondamentale. En effet, il serait possible d'effectuer une évaluation de la protection des anticorps maternels chez les poussins naissants jusqu'à la perte de leur protection, c'est-à-dire vers la troisième semaine par une infection de poussins d'âges variables (Otaki *et al.*, 1992 et McNulty, 1997). La détection de la présence virale dans différents organes ciblés par le virus serait effectuée. Cette approche permettrait aussi d'évaluer la distribution du virus dans les organes selon l'âge à laquelle l'infection se produit.

Comme dernière approche proposée, la présence du VAA dans les poulets d'abattoirs pourrait être analysée à l'aide des tests développés dans cette étude. Pour ce faire, un échantillonnage effectué dans plusieurs abattoirs en ne manipulant qu'un échantillon à la fois (tant à la cueillette qu'à l'extraction) permettrait d'évaluer cette présence. L'idée que les poulets soient contaminés sans pour autant démontrer des signes évidents d'infection est plausible et probablement même représentative de la réalité (Rosenberger et Cloud, 1989). Un début d'infection, avant même de développer des symptômes, pourrait aussi expliquer la présence virale qui a été reconnue par les tests. Les poulets étant abattus de plus en plus jeunes, il est possible que l'infection se soit produite juste avant l'abattage, dans leur période de susceptibilité au virus. Celle-ci débute suite à la fin de la protection offerte par les anticorps maternels, soit environ trois semaines après l'éclosion (Otaki *et al.*, 1992 et McNulty, 1997). Une autre possibilité serait la présence latente du virus (Cardona *et al.*, 2000). Cependant, Markowski-Grimrud *et al.* (2002) n'ont découvert cette persistance que dans les gonades. Il reste donc beaucoup à faire pour bien comprendre la complexité de la pathogenèse du VAA et de la maladie en découlant.

La simplification et le raffinement des manipulations seraient un atout si jamais l'utilisation des tests devenait commerciale. Une automatisation serait même souhaitée dans le cas de la gestion d'une large quantité d'échantillons. La minimisation des manipulations réduirait d'autant plus les risques de contamination. Il serait aussi bon d'avoir un test de référence afin de valider encore plus l'approche employée. L'immunofluorescence indirecte ou l'emploi d'un ensemble de détection commercial par ELISA pourraient être des choix intéressants grâce à leurs rapidité, sensibilité et facilité d'utilisation.

Un autre point à considérer serait l'utilisation du PCR niché dans le but d'obtenir une sensibilité encore plus grande en moins de temps et d'investissement. Pour ce faire, l'application stricte des règles de manipulation et de décontamination devra être respectée.

CONCLUSION

Le projet a permis de développer trois approches moléculaires à la détection du virus de l'anémie aviaire. Les trois techniques se sont révélées très sensibles, spécifiques et rapides. Le plus rapide étant le PCR conventionnel qui en seulement trois heures était complété et analysé, tandis que le plus sensible a été le PCR-ELISA. Les objectifs généraux du projet ont été atteints et complétés.

La technique privilégiée, le PCR-ELISA, comporte cependant un problème de taille : son coût d'utilisation. En effet, le marquage par la digoxigénine des produits de PCR ainsi que la détection par ELISA de ceux-ci sont réalisés à l'aide d'ensembles commerciaux. Le prix de chaque ensemble est à considérer si une application de diagnostic est envisagée. Bien que le transfert de type Southern soit plus long à réaliser que le PCR-ELISA, celui-ci est beaucoup moins coûteux tout en offrant une augmentation de la sensibilité par rapport au PCR conventionnel seul. La gestion des contaminations a été effectuée avec succès, mais avec un meilleur contrôle de l'ADN indésirable, le développement d'un PCR niché serait envisageable selon les conditions établies lors de ce projet et permettrait peut-être d'obtenir une meilleure sensibilité et une meilleure rapidité d'exécution.

BIBLIOGRAPHIE

Abe, K., Inami, T., Asano, K., Miyoshi, C., Masaki, N., Hayashi, S., Ishikawa, K.-I., Takebe, Y., Win, K.M., El-Zayadi, A.R., Han, K.-H. et Zhang, D.Y. 1999. TT virus infection is widespread in general populations from different geographic regions. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 2703-2705

Aberham, C., Pendl, C., Gross, P., Zerhauth, G. et Gessner, M. 2001. A quantitative, internally controlled real-time PCR Assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Meth.* 92 : 183-191

Adair, B.M. 2000. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Dev. Comp. Immunol.* 24 : 247-255

Adair, B.M., McNeilly, F., McConnell, C.D.C. Todd, D., Nelson, R.T. et McNulty, M.S. 1991. Effect of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 35 : 783-792

Aslanzadeh, J. 1993. Application of hydroxylamine hydrochloride for post-PCR sterilization. *Mol. Cell. Probes* 7 : 145-150

Barbour, E.K., Farran, M.T., Hamadeh, S.K., Bouljihad, M., Faroon, O. et Kreydiyyeh, S. 2002. Comparative Impact of Live Chicken Infectious Anaemia Virus Vaccine versus Natural Exposure in Meat Chicken Breeders on immunity to Infectivity by CIA and Inclusion Body hepatitis Viruses in their Offspring. *Vet. Res. Commun.* 26 : 397-405

Bassami, M.R., Berryman, D., Wilcox, G.E. et Raidal, S.R. 1998. Psittacine Beak and Feather Diseases Virus Nucleotide Sequence Analysis and its to Porcine Circovirus, Plant Circoviruses, and Chicken Anaemia Virus. *Virology* 249 : 453-459

Bendinelli, M., Pistello, M., Maggi, F., Fornai, C., Freer, G. et Vatteroni, M.L. 2001. Molecular properties, biology, and clinical implication of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 : 98-113

Bounous, D.I., Goodwin, M.A., Brooks Jr., R.L., Lamichhane, C.M., Campagnoli, R.P., Brown, J. et Snyder, D.B. 1995. Immunosuppression and intracellular calcium signaling in splenocytes from chicks infected with chicken anemia virus, CL-1 isolate. *Avian Dis.* 39 : 135-140

Burgess, L.C. et Hall, J.O. 1999. UV Light Irradiation of Plastic Reaction Tubes Inhibits PCR. *Biotechniques* 27 : 252-256

- Calnek, B.W., Lucio-Martinez, B., Cardona, C., Harris, R.W., Schat, K.A. et Buscaglia, C. 2000. Comparative Susceptibility of Marek's Disease Cell Lines to Chicken Infectious Anemia Virus. *Avian Dis.* 44 : 114-124
- Cardona, C., Lucio, B., O'Connell, P., Jagne, J. et Schat, K.A. 2000a. Humoral immune responses to chicken infectious anemia virus in three strains of chickens in a closed flock. *Avian Dis.* 44 : 661-667
- Cardona, C.J., Oswald, W.B. et Schat, K.A. 2000b. Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. *J. Gen. Virol.* 81 : 2067-2075
- Chansiri, K., Khuchareontaworn, S. et Sarataphan, N. 2002. PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in animal and vector. *Mol. Cell. Probes* 16 : 173-177
- Cheng, C.-M., Huang, S.-p., Chang, Y.-F., Chung, W.-Y. et Yuo, C.-Y. 2003. The viral death protein Apoptin interacts with Hippin, the protein interactor of Huntingtin-interacting protein 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 : 359-364
- Cimino, G.D., Metchette, K.C., Tessman, J.W., Hearst, J. et Isaacs, S.T. 1991. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 19 : 99-107
- Classens, J.A.J., Schrier, C.C., Mockett, A.P.A., Jagt, E.H.J.M. et Sondermeijer, P.J.A.. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of the genome of chicken anaemia agent. *J. Gen. Virol.* 72 : 2003-2006
- Cloud, S.S., Lillehoj, H.S. et Rosenberg, J.K. 1992. Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. I. Kinetic alteration of avian lymphocyte subpopulations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 34 : 337-352
- Danen-Van Oorschot, A.A.A.M., Zhang, Y., Erkeland, S.J., Fischer, D.F., Van Der Eb, A.J. et Noteborn, M.H.M.. 1999. The effect of Bcl-2 Apoptin in 'normal' vs transformed human cells. *Leukemia* 13 : S75-S77
- Danen-Van Oorschot, A.A.A.M., Fischer, D.F., Grimbergen, J.M., Klein, B., Zhuang, S.-M., Falkenburg, J.H.F., Backendorf, C., Quax, P.H.A., Van der Eb, A.J. et Noteborn, M.H.M. 1997. Apoptin induce apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 5843-5847
- Danen-van Oorschot, A.A.A.M., Van Der Eb, A.J. et Noteborn, M.H.M. 2000. The Chicken anemia virus-derived protein apoptin requires activation of caspases for induction of apoptosis in human tumor cells. *J. Virol.* 74 : 7072-7078

- Danen-van Oorschot, A.A.A.M., Zhang, Y.-H., Leliveld, S.R., Rohn, J.L., Seelen, M.C.M.J., Bolk, M.W., van Zon, A., Erkeland, S.J., Abrahams, J.-P., Mumberg, D. et Noteborn, M.H.M. 2003. Importance of nuclear localization of Apoptin for tumor-specific induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278 : 27729-27736
- De Herdt, P., Van Den Bosch, G., Ducatelle, R., Uyttebroeck, E. et Schrier, C. 2001. Epidemiology and significance of chicken infectious anemia virus infections in broilers and broiler parents under nonvaccinated European circumstances. *Avian Dis.* 45 : 706-708
- Deragon, J.-M., Sinnott, D., Mitchell, G., Potier, M. et Labuda, D. 1990 Use of gamma irradiation to eliminate DNA contamination for PCR. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6149
- Dohner, D.E., Dehner, M.S. et Gelb, L.D. 1995. Inhibition of PCR by Mineral Oil Exposed to UV Irradiation for Prolonged Periods. *Biotechniques* 18 : 964-967
- Dren, C., Farkas, T. et Nemeth, I. 1996. Serological survey on the prevalence of chicken anaemia virus infection in Hungarian chicken flocks. *Vet. Microbiol.* 50 : 7-16
- Dwyer, D.E. et Saksena, N. 1992. Failure of ultra-violet irradiation and autoclaving to eliminate PCR contamination. *Mol. Cell. Probes* 6 : 87-88
- Ellis, J.A., Wiseman, B.M., Allan, G., Konoby, C., Krakowka, S., Meehan, B.M. et McNeilly, F. 2000. Analysis of seroconversion to porcine circovirus 2 among veterinarians from the United States and Canada. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217 : 1645-1646
- Engstrom, B.E. 1999. Prevalence of antibody to chicken anaemia virus (CAV) in Swedish chicken breeding flocks correlated to outbreaks of blue wing disease (BWD) in their progeny. *Acta Vet. Scand.* 40 : 97-107
- Exner, M.M. et Lewinski, M.A. 2002 . Sensitivity of multiplex real-time PCR reactions, using the LightCycler and the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, is dependent on the concentration of the DNA polymerase. *Mol. Cell. Probes* 16 : 351-357
- Farkas, T., Tanaka, A., Kai, K. et Kanoe, M. 1996. Cloning and Sequencing of the Genome of Chicken Anaemia Virus (CAV) TK-5803 Strain and Comparison with Other CAV Strains. *J. Vet. Med. Sci.* 58 : 681-684
- Feucht, H.-H., Zöllner, B. et Laufs, R. 1995. Comparison of conventional autoradiography with a new DNA enzyme immunoassay for the detection of hepatitis C virus-polymerase chain reaction amplification products. *J. Virol. Meth.* 55 : 105-110
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R. et Skalka, A.M. 2000. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM Press, 804 pp

- Fox, J.C., Ait-Khaled, M., Webster, A. et Emery, V.C. 1991. Eliminating PCR contamination: is UV irradiation the answer? *J. Virol. Meth.* 33 : 375-382
- Frothingham, R., Blichington, R.B., Lee, D.H., Greene, R.C. et Wilson, K.H. 1992. UV Absorption Complicates PCR Decontamination. *Biotechniques* 13 : 208-210
- Fussell, L.W. 1998. Poultry industry strategies for control of immunosuppressive diseases. *Poult. Sci.* 77 : 1193-1196
- Garcia, F., Bernal, M.C., Leyva, A., Piedrola, G. et Maroto, M.C. 1995. Evaluation of enzyme immunoassay for hepatitis B virus DNA based on anti-double-stranded DNA. *J. Clin. Microbiol.* 33 : 413-415
- Gelderblom, H., Kling, S., Lurz, R., Tischer, I. et Bülow, V.V. 1989. Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA). *Arch. Virol.* 109 : 115-120
- Gibbs, P.J., Tan, L.C., Sadek, S.A. et Howell, W.M. 2003. Comparative evaluation of 'TaqMan' RT-PCR and RT-PCR ELISA for immunological monitoring of renal transplant recipients. *Transpl. Immunol.* 11 : 65-72
- Gilligan, K., Shipley, M., Stiles, B., Hadfield, T.L. et Ibrahim, M.S. 2000. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. *Mol. Cell. Probes* 14 : 71-78
- Goryo, M., Suwa, T., Matsumoto, S., Umemura, T. et Itakura, C. 1987. Serial propagation and purification of chicken anaemia agent in MDCC-MSB1 cell line. *Avian Pathol.* 16 : 149-163
- Goryo, M., Suwa, T., Umemura, T., Itakura, C. et Yamashiro, S. 1989. Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathol.* 18 : 73-89
- Hatterman, K., Soike, D., Grund, C. et Mankertz, A. 2002. A method to diagnose Pigeon circovirus infection in vivo. *J. Virol. Meth.* 104 : 55-58
- Hoop, R.K. 1993. Transmission of chicken anaemia virus with semen. *Vet. Rec.* 133 : 551-552
- Hornok, S., Heijmans, J.F., Békési, L., Peek, H.W., Dobos-Kovacs, M., Dren, C.N. et Varga, I. 1998. Interaction of chicken anaemia virus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Vet. Parasitol.* 76 : 43-55
- Hu, L.-B., Lucio, B. et Schat, K.A. 1993. Depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocyte subpopulations by CIA-1, a chicken infectious anemia virus. *Avian Dis.* 37 : 492-500

- Imai, K., Mase, M., Yamaguchi, S., Yuasa, N. et Nakamura, K. 1998. Detection of chicken anaemia virus DNA from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 64 : 205-208
- Islam, M.R., Johne, R., raue, R., Todd, D. et Müller, H. 2002. Sequence Analysis of the Full-Length Cloned DNA of a Chicken Anaemia Virus (CAV) Strain Bangladesh: Evidence for Genetic Grouping of CAV Strains Based on the Deduced VP1 Amino Acid Sequences. *J. Vet. Med.* 49 : 332-337
- Iwata, N., Fujino, M., Tuchiya, K., Iwata, A., Otaki, Y. et Ue, S. 1997. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Anemia Virus Proteins Expressed in a Baculovirus Vector System. *J. Vet. Med. Sci.* 60 : 175-180
- Janeway, C.A. et Travers, P. 1997. *Immunobiologie*, 2^e édition. DeBoeck Université
- Jeurissen, S.H.M. et Boer, G.F. 1993. Chicken anaemia virus influences the pathogenesis of marek's disease in experimental infections, depending on the dose of Marek's disease virus. *Vet. Q.* 14 : 81-84
- Jeurissen, S.H.M., Wagenaar, F., Pol, J.M.A., Van Der Eb, A.J. et Noteborn, M.H.M. 1992. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after *In vivo* infection and of cell lines in vitro infection. *J. Virol.* 66 : 7383-7388
- Kato, A.Fujino, M., Nakamura, T., Ishihama, A. et Otaki, Y. 1995. Gene organization of Chicken Anemia Virus. *Virology* 209 : 480-488
- Kearns, A.M., Guiver, M., James, V. et King, J. 2001. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR for the detection of human cytomegalovirus. *J. Virol. Meth.* 95 : 121-131
- Kim, J. et Chae, C. 2001a. Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by *in situ* hybridisation. *Res. Vet. Sci.* 70 : 265-269
- Kim, J. et Chae, C. 2001b. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with *in situ* hybridization. *J. Virol. Meth.* 92 : 105-111
- Kim, J., Han, D.U., Choi, C. et Chae, C. 2001. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 98 : 25-31
- Knight, J.C., McGuire, W., Kortok, M.M. et Kwiatkowski, D. 1999. Accuracy of Genotyping of Single-Nucleotide polymorphisms by PCR-ELISA Allele-specific Oligonucleotide Hybridation typing and by amplification Refractory mutation System. *Clin. Chem.* 45 : 1860-1863

- Kreuzer, K.-A., Bohn, A., Lass, U., Peters, U.R. et Schmidt, C.A. 2000. Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan™ probe format in the LightCycler™ instrument. *Mol. Cell. Probes* 14 : 57-60
- Lamichhane, C.M., Snyder, B., Girschick, T., Goodwin, M.A. et Miller, S.L. 1992. Development and comparison of serologic methods for diagnosing chicken anemia virus infection. *Avian Dis.* 36 : 725-729
- Landgraf, A., Reckmann, B. et Pingoud, A. 1991. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. *Anal. Biochem.* 198 : 86-91
- Larochelle, R. et Magar, R. 1997. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in packaged pig meat using virus isolation and polymerase chain reaction (PCR) method. *Vet. Microbiol.* 58 : 37264
- Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M. et Magar, R. 1999a. Typing of porcine circovirus in clinical specimen by multiplex PCR. *J. Virol. Meth.* 80 : 69-75
- Larochelle, R., Bielanski, A., Müller, P. et Magar, R. 2000. PCR Detection and Evidence of Shedding of Porcine Circovirus Type " in Boar Semen. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 4629-4632
- Larochelle, R., Morin, M., Antaya, M. et Magar, R. 1999b. Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Québec as determined by PCR. *Vet. Rec.* 145 : 140-142
- Latimer, K.S., Steffens III, W.L., Rakich, P.M., Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Kircher, I.M. et Lukert, P.D. 1992. Cryptosporidiosis in four cockatoos with psittacine beak and feather disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200 : 707-710
- Ledesma, N., Fehervari, T., Casaubon, M.T., Lucio, E. et Ratz, F. 2001. Chicken infectious anemia in Mexico: Virus identification and serology survey. *Avian Dis.* 45 : 788-796
- Leliveld, S.R., Zhang, Y.-H., Rohn, J.L., Noteborn, M.H.M. et Abrahams, J. P. 2003. Apoptin Induce Tumor-specific Apoptosis as a Globular Multimer. *J. Biol. Chem.* 278 : 9042-9051
- Liu, Q., Wang, L., Wilson, P. et Babiuk, L.A. 2000. Quantitative, Competitive PCR Analysis of Porcine Circovirus DNA in Serum from Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 3474-3477
- Lucio, B., Schat, K.A. et Shivaprasad, H.L. 1990. Identification of the chicken anemia agent, Reproduction of the disease, and serological survey in the United States. *Avian Dis.* 34 : 146-153

- Ma, L., Bluysen, H.A.R., De Raeymaeker, M., Laurysens, V., Van Der Beek, N., Pavliska, H., Van Zonneveld, A.-J., Tomme, P. et Van Es, H. H. G. 2001. Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR. *J. Virol. Meth.* 93 : 181-188
- MacPherson, J.M., Eckstein, P.E., Scoles, G.J. et Gajadhar, A.A. 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Mol. Cell. Probes* 7 : 293-299
- Magar, R., Larochelle, R., Thibault, S. et Lamontagne, L. 2000. Experimental Transmission of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in Weaned Pigs: a Sequential Study. *J. Comp. Pathol.* 123 : 258-269
- Mankertz, A., Persson, F., Mankertz, J., Blaess, G. et Buhk, H.-E. 1997. Mapping and Characterization of the Origin of DNA Replication of Porcine Circovirus. *J. Virol.* 71 : 2562-2566
- Markowski-Grimsrud, C.J. et Schat, K.A. 2003. Infection with chicken anemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 109 : 283-294
- Markowski-Grimsrud, C.J., Miller, M.M. et Schat, K.A. 2002. Development of strain-specific real-time PCR and RT-PCR assay for chicken anemia virus (CAV) quantification. *J. Virol. Meth.* 101 : 135-147
- Masake, R.A., Njuguna, J.T., Brown, C.C. et Majiwa, P.A.O. 2002. The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. vivax* infections in livestock. *Vet. Parasitol.* 105 : 179-189
- McConnell, C.D.G., Adair, B.M. et McNulty, M.S. 1993. Effect of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chicken exposed to the virus by a natural route. *Avian Dis.* 37 : 366-374
- McConnell, C.D.G., Adair, B.M. et McNulty, M.S. 1995. Effect of chicken anemia virus on macrophage function in chickens. *Avian Dis.* 37 : 358-365
- McIlroy, S.G., McNulty, M.S., Bruce, D.W., Smyth, J.A., Goodall, E.A. et Alcorn, M.J. 1992. Economic effect of clinical chicken anemia agent infection on profitable broiler production. *Avian Diseases* 36 : 566-574
- McNeilly, F., Smyth, J.A., Adair, B.M. et McNulty, M.S. 1995. Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian Dis.* 39 : 532-537
- McNulty, M.S. 1991. Chicken anaemia agent: a review. *Avian Pathol.* 20 : 187-203

- McNulty, M.S. 1997. Chicken anaemia virus--a glimpse of the future? *Br. Poultry Sci.* 38 : 7-13
- McNulty, M.S., Connor, T.J., McNeilly, F., Kirkpatrick, K.S. et McFerran, J.B. 1988. A serological survey of domestic poultry in the United Kingdom for antibody to chicken anaemia agent. *Avian Pathol.* 17 : 315-324
- McNulty, M.S., Curran, W.L., Todd, D. et Mackie, D.P. 1990. Chicken anemia agent: an electron microscopic study. *Avian Dis.* 34 : 736-743
- McNulty, M.S., McIlroy, S.G., Bruce, D.W. et Todd, D. 1991. Economic effect of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Dis.* 35 : 263-268
- Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S. et Todd, D. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 78 : 221-227
- Meehan, B.M., Todd, D., Creelan, J.L., Connor, T.J. et McNulty, M.S. 1997. Investigation of the attenuation exhibited by a molecularly cloned chicken anemia virus isolate by utilizing a chimeric virus approach. *J. Virol.* 71 : 8362-8367
- Meehan, B.M., Todd, D., Creelan, J.L., Earle, J.A.P. et McNulty, M.S. 1992. Characterization of viral DNA from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Arch. Virol.* 124 : 301-319
- Miles, A.M., Reddy, S.M. et Morgan, R.W. 2001. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and Chicken infectious anemia virus: Effect of MDV pathotype. *Avian Dis.* 45: 9-18
- Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M.A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K. et Hino, S. 1999. Identification of a novel GC-Rich 113-Nucleotide region to complete circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J. Virol.* 73 : 3582-3586
- Moreira, D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitor using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res.* 26 : 3309-3310
- Muller, E., Jacquot, E. et Yot, P. 2001. Early detection of cacao swollen shoot virus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 93 : 15-22
- Munch, M., Nielsen, L.P., Handberg, K.J. et Jorgensen, P.H. 2001. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch. Virol.* 146 : 87-97
- Murphy, A. 1999. Apoptin: nuclear switch triggers cancer cell death. *Gene Ther.* 6 : 713-714

Mushahwar, I.K., Erker, J.C., Muerhoff, S.A., Leary, T.P., Simons, J.N., Birkenmeyer, L.G., Chalmers, M.L., Pilot-Mathias, T.J. et Dexai, S.M. 1999. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 3177-3182

Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S. et Lukert, P.D. 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 143 : 1723-1744

Noteborn, M.H.M. et Koch, G. 1995. Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathol.* 24 : 11-31

Noteborn, M.H.M., De Boer, G.F., van Roozelaar, D.J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J.G., Jeurissen, S.H.M., Hoeben, R.C., Zantema, A., Koch, G., van Ormondt, H. et van der Eb, A.J. 1991. Characterization of Cloned Chicken Anemia Virus DNA That Contains All Elements for the Infectious Replication Cycle. *J. Virol.* 65 : 3131-3139

Noteborn, M.H.M., Todd, D., Verschueren, C.A.J., De Gauw, H.W.F.M., Curran, W.L., Veldkamp, S., Douglas, A.J., McNulty, M.S., Van Der Eb, A.J. et Koch, G. 1994. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J. Virol.* 68 : 346-351

Noteborn, M.H.M., Verschueren, C.A.J., van Roozelaar, D.J., Veldkamp, S., Van der Eb, A.J. et De Boer, G.F. 1992. Detection of chicken anaemia virus by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 21 : 107-118

Noteborn, M.H.M., Verschueren, C.A.J., Koch, G. et Van der Eb, A.J. 1998. Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope. *J. Gen. Virol.* 79 : 3073-3077

Novak, R. et Ragland, W. 1997. In situ hybridization for detection of chicken anaemia virus in peripheral blood smears. *Mol. Cell. Probes* 11 : 135-141

Otaki, Y., Saito, K., Tajima, M. et Noruma, Y. 1992. Persistence of maternal antibody to chicken anaemia agent and its effect on the susceptibility of young chickens. *Avian Pathol.* 21 : 147-151

Padua, R.A., Parrado, A., Larghero, J. et Chomienne, C. 1999. UV and clean air result in contamination-free PCR. *Leukemia* 13 : 1898-1899

Pamba, R., Jeronimo, C. et Archambault, D. 1999. Detection of bovine retrospumavirus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 78 : 199-208

Pao, C.C., Jen Hor, J., Ling Tsai, P. et Yow Horng, M. 1993. Inhibition of in-vitro enzymatic DNA amplification reaction by ultra-violet light irradiation. *Mol. Cell. Probes* 7 : 217-219

- Park, J.-W., Moon, S.-H., Yeom, J.-S., Lim, K.-J., Sohn, M.-J., Jung, W.-C., Cho, Y.-J., Jeon, K.-W., Ju, W., Ki, C.-S., Oh, M.-D. et Choe, K. 2001. Naturally Acquired Antibody Responses to the C-Terminal Region of Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8 : 14-20
- Peters, M.A., Jackson, D.C., Crabb, B.S. et Browning, G.F. 2002. Chicken Anemia Virus VP2 Is a Novel Dual Specificity protein Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 277 : 39566-39573
- Phenix, K.V., Meehan, B.M., Todd, D. et McNulty, M.S. 1994. Transcriptional analysis and genome expression of chicken anaemia virus. *J. Gen. Virol.* 75 : 905-909
- Phenix, K.V., Weston, J.H., Ypelaar, I., Lavazza, A., Smyth, J.A., Todd, D., Wilcox, G.E. et Raidal, S.R. 2001. Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus Circovirus of the family Circoviridae. *J. Gen. Virol.* 82 : 2805-2809
- Pietersen, A., Van Der Eb, M.M., Rademaker, H.J., Van Der Wollenberg, D.J.M., Rabelink, M.J.W.E., Kuppen, P.J.K., Van Dierendonck, J.H., Van Omond, H., Masman, D., Van De Velde, C.J.H., Van Der Eb, A.J., Hoeben, R.C. et Noteborn, M.H.M. 1999. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Ther.* 6 : 882-892
- Pope, C.R. 1991. Chicken anemia agent. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30 : 51-65
- Prescott, L., Harley, J.P. et Klein, D.A. 1995. *Microbiologie*. DeBoeck Université
- Pringle, C.R. 1999. Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia 1999. *Arch. Virol.* 144 : 2065-2070
- Ragland, W.L., Novak, R., El-Attrache, J., Savic, V. et Ester, K. 2002. Chicken Anemia virus and infectious bursal disease virus interfere with transcription of chicken IFN- α and IFN- γ mRNA. *J. Interferon Cytokine Res.* 22 : 437-441
- Ramina, A., Valle, L.D., De Mas, S. Tisato, E., Zuin, A., Renier, M., Cuteri, V., Valente, C. et Cancellotti, F.M. 1999. Detection of equine arteritis virus in semen by reverse transcriptase polymerase chain reaction-ELISA. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 22 : 187-197
- Renshaw, R.W., Soiné, C., Weinkle, T., O'Connell, P.H., Ohashi, K., Watson, S., Lucio, B., Harrington, S. et Schat, K.A. 1996. A Hypervariable Region in VP1 of Chicken Infectious Anemia Virus Mediate Rate of Spread and Cell Tropism in Tissue Culture. *J. Virol.* 70 : 8872-8878
- Ritchie, B.W., Niagro, F.D., Lukert, P.D., Steffens III, W.L. et Latimer, K.S. 1989. Characterization of a new virus from cockatoos with Psittacine beak and feather disease. *Virology* 171 : 83-88

- Rohn, J.L., Zhang, Y.-H., Aalbers, R.I.J.M., Otto, N., den Hertog, J., Henriquez, N.V., van de Velde, C.J.H., Kuppen, P.J.K., Mumberg, D., Donner, P. et Noteborn, M.H.M. 2002. A Tumor-specific Kinase Activity Regulates the Viral Death Protein Apoptin. *J. Biol. Chem.* 277 : 50820-50827
- Rola, M. et Kuzmak, J. 2002. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J. Virol. Meth.* 99 : 33-40
- Rosenberger, J.K. et Cloud, S.S. 1989. The effect of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). *Avian Dis.* 33 : 753-759
- Rosenberger, J.K. et Cloud, S.S. 1998. Chicken anemia virus. *Poult. Sci.* 77 : 1190-1192
- Rozypal, T.L., Skeeles, J.K., Dash, J.K., Anderson, E.J. et Beasley, J.N. 1997. Identification and partial characterization of Arkansas isolates of chicken anemia virus. *Avian Dis.* 41 : 610-616
- Sails, A.D., Fox, A.J., Bolton, F.J., Wareing, D.R.A., Greenway, D.L.A. et Borrow, R. 2001. Development of a PCR-ELISA assay for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol. Cell. Probes* 15 : 291-300
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sander, J., Williams, R., Novak, R. et Ragland, W. 1997. In situ hybridization on blood smears for diagnosis of chicken anemia virus in broiler breeder flocks. *Avian Dis.* 41 : 988-992
- Sarkar, G. et Sommer, S.S. 1990a. Shedding light on PCR contamination. *Nature* 343 : 27
- Sarkar, G. et Sommer, S.S. 1990b. More light on PCR contamination. *Nature* 347 : 340-341
- Sarkar, G. et Sommer, S.S. 1991. Parameters Affecting Susceptibility of PCR Contamination to UV Inactivation. *Biotechniques* 10 : 591-593
- Scott, A.N.J., Connor, T.J., Creelan, J.L., McNulty, M.S. et Todd, D. 1999. Antigenicity and pathogenicity characteristics of molecularly cloned chicken anaemia virus isolates obtained after multiple cell culture passage. *Arch. Virol.* 144 : 1961-1975
- Sharma, S., Das, D., Anand, R., Das, T. et Kannabiran, C. 2002. Reliability of Nested Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Bacterial Endophthalmitis. *Am. J. Ophthalmol.* 133 : 142-144

- Simard, C., Kibenge, M.T., Singh, P. et Dixon, P. 2001. Simple and Rapid Method for Production of Whole-Virus Antigen for Serodiagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8: 352-356
- Smyth, J.A., Weston, J., Moffett, D.A. et Todd, D. 2001. Detection of circovirus infection in pigeons by *in situ* hybridization using cloned DNA probes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13 : 475-482
- Soiné, C., Watson, S.K., Rybicki, E., Lucio, B., Nordgren, R.M., Parrish, C.R. et Schat, K.A. 1993. Determination of the Detection limit of the polymerase Chain reaction for Chicken Anemia Virus. *Avian Dis.* 37 : 467-476
- Spackman, E., Cloud, S.S. et Rosenberger, J.K. 2002a. Comparison of a Putative Second Serotype of Chicken Infectious Anemia Virus with a Prototypical isolate II. Antigenic and Physicochemical Characteristics. *Avian Dis.* 46 : 956-963
- Spackman, E., Cloud, S.S., Pope, C.R. et Rosenberger, J.K. 2002b. Comparison of a Putative Second Serotype of Chicken Infectious Anemia Virus with a Prototypical isolate I. Pathogenesis. *Avian Dis.* 46 : 945-955
- St-Laurent, G., Morin, G. et Archambault, D. 1994. Detection of Equine Arteritis Virus following Amplification of Structural and Nonstructural Viral Genes by Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 658-665
- Studdert, M.J. 1993. Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. *Aust. Vet. J.* 70 : 121-122
- Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M. et Mishiro, S. 2000. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch. Virol.* 145 : 979-993
- Takase, K., Murakawa, Y., Ariyoshi, R., Eriguchi, S.-I., Sugimura, T. et Fujikawa, H. 2000. Serological Monitoring on Layer Farms with Specific Pathogen-Free Chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 62 : 1327-1329
- Taniguchi, T., Yuasa, N., Maeda, M. et Horiuchi, T. 1983. Chronological observations on Hemato-pathological changes in chicks inoculated with chicken anemia agent. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* 23 : 1-12
- Tham, K.M. et Stanislawek, W.L. 1992. Polymerase Chain Reaction Amplification for Direct Detection of Chicken Anemia Virus DNA in Tissues and Sera. *Avian Dis.* 36 : 1000-1006
- Thornton, C.G., Hartley, J.L. et Ayoub, R. 1992. Utilizing Uracil DNA Glycosylase to Control Carryover Contamination in PCR: Characterization of Residual UDG Activity Following Thermal Cycling. *Biotechniques* 13 : 180-183

Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W. et Koch, M.A. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295 : 64-65

Todd, D. 2000. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol.* 29 : 373-394

Todd, D., Creelan, J.L. et McNulty, M.S. 1991. Dot blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA Probe. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 933-939

Todd, D., Creelan, J.L., Mackie, D.P., Rixon, F. et McNulty M.S. 1990. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J. Gen. Virol.* 71 : 819-823

Todd, D., Creelan, J.L., Meehan, B.M. et McNulty, M.S. 1996. Investigation of the transfection capability of cloned tandemly-repeated chicken anaemia virus DNA fragments. *Arch. Virol.* 141 : 1523-1534

Todd, D., Mawhinney, K.A. et McNulty M.S. 1992. Detection and Differentiation of Chicken Anemia Virus Isolates by Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 1661-1666

Todd, D., Mawhinney, K.A., Graham, D.A. et Scott, A.N.J. 1999. Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of chicken anaemia virus. *J. Virol. Meth.* 82 : 177-184

Todd, D., Niagro, F.D., Ritchie, B.W., Curran, W., Allan, G.M., Lukert, P.D., Latimer, K.S., Steffens III, W.L. et McNulty, M.S. 1991. Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Arch. Virol.* 117 : 129-135

Todd, D., Scott, A.N.J., Ball, N.W., Borghmans, B.J. et Adair, B.M. 2002. Molecular Basis of the Attenuation Exhibited by molecularly Cloned highly Passaged Chicken Anemia virus Isolates. *J. Virol.* 76 : 8472-8474

Todd, D., Weston, J.H., Soike, D. et Smyth, J.A. 2001. Genome Sequence Determination and Analyses of Novel Circoviruses from Goose and Pigeon. *Virology* 286 : 354-362

Toro, H., Gonzalez, C., Cerda, L., Hess, M., Reyes, E. et Geisse, C. 2000. Chicken anemia virus and fowl Adenoviruses: association to induce the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome. *Avian Dis.* 44 : 51-58

Toro, H., Gonzalez, O., Escobar, C., Cerda, L., Morales, M.A. et Gonzalez, C. 2001. Vertical induction of the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome with fowl adenovirus and chicken anemia virus. *Avian Dis.* 45 : 215-222

Urling, H.A.P., De Boer, G.F., Van Roozelaar, D.J. et Koch, G. 1993. Inactivation of chicken anaemia virus in chickens by heating and fermentation. *Vet. Q.* 14 : 85-88

Vielitz, E, Conrad, C., Voss, M., von Bulow, V., Dorn, P., Bachmeier, J. et Lohren, U. 1991. Vaccination against infectious anemia of poultry (CAA) -- results of field studies. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 98 : 144-147

Watson, J.D., Gilma, M., Witkowski, J. et Zoller, M. 1994. ADN recombinant, 2^e Édition. DeBoeck Université. 626 pp

Xiang, X., Qiu, D., Chan, K.P., Chan, S.H., Hegele, R.G. et Tan, W.C. 2002. Comparison of three methods for respiratory virus detection between induced sputum and nasopharyngeal aspirate specimens in acute asthma. *J. Virol.Meth.* 101 : 127-133

Yamaguchi, S., Imada, T., Kaji, N., Mase, M., Tsukamoto, K., Tanimura, N. et Yuasa, N. 2001. Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anemia virus. *J. Gen. Virol.* 82 : 1233-1238

Yamaguchi, S., Kaji, N., Munang'andu, H.M., Kojima, C., Mase, M. et Tsukamoto, K. 2000. Quantification of chicken anaemia virus by competitive polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 29 : 305-310

Young, K.-C., Chang, T.-T., Hsiao, W.-C., Cheng, P.-N., Chen, S.-H. et Jen, C.-M. 2002. A reverse-transcription competitive PCR assay based on chemiluminescence hybridization for detection and quantification of hepatitis C virus RNA. *J. Virol. Meth.* 103 : 27-39

Yuasa, N. et Imai, K. 1986. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathol.* 15 : 639-645

Yuasa, N. et Yoshida, I. 1983. Experimental egg transmission of chicken anemia agent. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* 23 : 99-100

Yuasa, N., Taniguchi, T. et Yoshida, I. 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis.* 23 : 366-385

Yuasa, N., Taniguchi, T., Goda, M., Shibatani, M., Imada, T. et Hihara, H. 1983a. Isolation of chicken anemia agent with MDCC-MSB1 cells from chicken in the field. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* 23 : 75-77

Yuasa, N., Taniguchi, T., Imada, T. et Hihara, H. 1983b. Distribution of chicken anemia agent (CAA) and detection of neutralizing antibody in chicks experimentally inoculated with CAA. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* 23 : 78-81

Zerbini, M., Gentilomi, G., Cricca, M., Manaresi, E., Bonvicini, F. et Musiani, M. 2001. A system to enhance the sensivity of digoxigenin-labelled probe: detection of B19 DNA in serum samples. *J. Virol. Meth.* 93 : 137-144

Zhang, Y.-H., Abrahams, P.J., Van Der Eb, A.J., Noteborn, M.H.M. 1999. The viral protein apoptin induces apoptosis in UV-C-irradiated Cells from Individuals with various hereditary cancer-prone syndromes. *Cancer Res.* 59 : 3010-3015

Zhou, W., Shen, B., Yang, B., Han, S., Wei, L., Xiao, B. et Zhou, J. 1997. Isolation and Identification of Chicken Infectious Anemia Virus in China. *Avian Dis.* 41 : 361-364

Zhou, W., Yang, B., Shen, B., Han, S. et Zhou, J. 1996. A serologic survey of antibody against chicken infectious anemia virus by indirect immunofluorescent assay in domestic poultry in china. *Avian Dis.* 40 : 358-360

Zhuang, S.-M., Landegent, J.E., Verschueren, C.A.J., Falkenburg, F., van Ormondt, H., van der Eb, A.J. et Noteborn, M.H.M. 1995. Apoptin, a Protein Encoded by Chicken Anemia Virus, Induces Cell Death in Various Human Hematologic malignant Cells in vitro. *Leukemia* 9 : S118-S120

ANNEXES

5.1 Étude du génome viral

5.1.1 Variabilité des souches

Les pages suivantes présentent les séquences de trois souches du VAA (fig. 34). La souche allemande Cux-1, présentée par Noteborn *et al.* (1991) et dont le code dans *GenBank* est M55918, représente la séquence de référence. Le clone atténué de Meehan *et al.* (1997) (code : U66304) est aussi de la souche Cux-1. La souche CIA-1 (États-Unis) est représentée par la séquence donnée par Renshaw *et al.* (1996) et dont le code d'accèsion est L14767. Finalement, la souche japonaise TR20 a été fournie par Okamura *et al.* (1999) (code : AB027470). Les séquences sont représentées par leur code d'accèsion dans *GenBank* et la position du premier et dernier nucléotide de chacune des lignes est indiquée. Seuls les nucléotides de la séquence de référence sont présentés ainsi que les nucléotides différents de celle-ci. Les nucléotides identiques à ceux de la séquence de référence sont représentés par des points (.) et l'absence de nucléotides identiques est représentée par un tiret (-). Les séquences de la sonde et des amorces sens (F) et anti-sens (R) sont représentées au-dessus des séquences génomique à leur position d'appariement.

| | | | |
|----------|-----|---|-----|
| M55918 | 1 | gaattccgagtggttactattccatcaccattctagcctgtacacagaaagtcaagatgg | 60 |
| U66304 | 1 | | 60 |
| L14767 | 1 |g..... | 60 |
| AB027470 | 1 | .c..... | 60 |
| M55918 | 61 | acgaatcgctcgacttcgctcgcgattcgtcgaaggcggggggccggaggcccccgggtg | 120 |
| U66304 | 61 | | 120 |
| L14767 | 61 | | 120 |
| AB027470 | 61 | | 120 |
| M55918 | 121 | gccccctccaacgagtgaggacacgtacaggggggtacgtcatccgtacaggggggtacg | 180 |
| U66304 | 121 | | 180 |
| L14767 | 121 |t..... | 180 |
| AB027470 | 121 |t..... | 180 |
| M55918 | 181 | tcacccgtacaggggggtacgtcacaagaggcgttcccgtacaggggggtacgtcacgc | 240 |
| U66304 | 181 | | 240 |
| L14767 | 181 | | 219 |
| AB027470 | 181 |a.....g... | 219 |
| M55918 | 241 | gtacaggggggtacgtcacagccaatcaaaagctgccacgttgcgaaagtgacgtttcga | 300 |
| U66304 | 241 |g.. | 300 |
| L14767 | 220 |g..... | 279 |
| AB027470 | 220 |g..... | 279 |
| M55918 | 301 | aatgggcgggcgaagcctctctatatattgagcgcacataccggtcggcagtaggtata | 360 |
| U66304 | 301 |t..... | 360 |
| L14767 | 280 | | 339 |
| AB027470 | 280 | | 339 |
| M55918 | 361 | cgcaaggcgggtccgggtggatgcacgggaacggcggacaaccggccgctgggggcagtga | 420 |
| U66304 | 361 | | 420 |
| L14767 | 340 |t..... | 399 |
| AB027470 | 340 | | 399 |
| | | GCTTAGCCGAGAGGGGCA (VP2F) | |
| M55918 | 421 | atcggcgttagccgagagggggcaacctgggcccagcggagccgcgaggggcaagtaat | 480 |
| U66304 | 421 | | 480 |
| L14767 | 400 | | 459 |
| AB027470 | 400 | | 459 |
| | | CGCTCTCCAAGAAGATACTCCAC (VP3F) | |
| M55918 | 481 | ttcaaatgaacgctctccaagaagatactccacccggaccatcaacgggtgttcaggccac | 540 |
| U66304 | 481 | .t..... | 540 |
| L14767 | 460 | | 519 |
| AB027470 | 460 | | 519 |
| | | CGCTG | |
| M55918 | 541 | caacaagttcacggccggttggaaaccctcactgcagagagatccggattgggtatcgtg | 600 |
| U66304 | 541 | | 600 |
| L14767 | 520 | | 579 |
| AB027470 | 520 | | 579 |
| | | GAATTACAATCACTC (Sonde) | |
| M55918 | 601 | gaattacaatcactctatcgcgtgtgtggctgcgcgaatgctcgcgctcccacgctaagat | 660 |
| U66304 | 601 | c..... | 660 |
| L14767 | 580 | | 639 |
| AB027470 | 580 | | 639 |
| M55918 | 661 | ctgcaactgcccgaactcagaaagcactgggttcaagaatgtgccggacttgaggaccg | 720 |
| U66304 | 661 | | 720 |
| L14767 | 640 | | 699 |
| AB027470 | 640 |a..... | 699 |

| | | | |
|----------|------|---|------|
| M55918 | 721 | atcaacccaagcctccctcgaagaagcgatcctgcgacccctccgagtacagggtaagcg | 780 |
| U66304 | 721 | | 780 |
| L14767 | 700 | | 759 |
| AB027470 | 700 | | 759 |
| | | (VP2R) TTACCACTACTCCCAGCCGAC CGAACCGCAAGAAGGCGTA | |
| M55918 | 781 | agctaaaagaaagcttgattaccactactcccagccgaccccgaaaccgcaaaaaggcgta | 840 |
| U66304 | 781 |g..... | 840 |
| L14767 | 760 |g...t... | 819 |
| AB027470 | 760 |g...t... | 819 |
| | | TA (VP3R) | |
| M55918 | 841 | taagactgtaagatggcaagacgagctcgagaccgagagggcggattttactccttcaga | 900 |
| U66304 | 841 |g..... | 900 |
| L14767 | 820 |g..... | 879 |
| AB027470 | 820 |a.....g..... | 879 |
| M55918 | 901 | agaggacgggtggcaccacctcaagcgacttcgacgaagatataaatttcgacatcggagg | 960 |
| U66304 | 901 | | 960 |
| L14767 | 880 |a..... | 939 |
| AB027470 | 880 | | 939 |
| M55918 | 961 | agacagcgggtatcgtagacgagcttttaggaaggcctttcacaacccccgccccggtagc | 1020 |
| U66304 | 961 | | 1020 |
| L14767 | 940 | | 999 |
| AB027470 | 940 | | 999 |
| | | CCCAATCTACTATGACTATCCGC (VP1F) | |
| M55918 | 1021 | tatagtgtgaggctgccgaaccccccaatctactatgactatccgcttccaaggggtcatc | 1080 |
| U66304 | 1021 | | 1080 |
| L14767 | 1000 |aa...a | 1059 |
| AB027470 | 1000 |a.....g.a.g.....t.....aa...t | 1059 |
| M55918 | 1081 | tttctcacggaaggactcattctgcctaaaaacagcacagcggggggctatgcagaccac | 1140 |
| U66304 | 1081 | | 1140 |
| L14767 | 1060 | | 1119 |
| AB027470 | 1060 |t.c.....a.....t.....a..... | 1119 |
| M55918 | 1141 | atgtacggggcgagagtcgccaagatctctgtgaacctgaaagagttcctgctagcctca | 1200 |
| U66304 | 1141 | | 1200 |
| L14767 | 1120 | t.....g... | 1179 |
| AB027470 | 1120 | c.c.....a.....c.....g... | 1179 |
| M55918 | 1201 | atgaacctgacatacgtgagcaaaatcggaggcccatcgccggtgagttgattgcggac | 1260 |
| U66304 | 1201 |c..... | 1260 |
| L14767 | 1180 | | 1239 |
| AB027470 | 1180 |a..... | 1239 |
| M55918 | 1261 | gggtctaaatcacaagccgcggaacaattggcctaattgctggctgccgctagataataac | 1320 |
| U66304 | 1261 |t.....g..... | 1320 |
| L14767 | 1240 |c.....c.g.c..... | 1299 |
| AB027470 | 1240 |c.....c.g..... | 1299 |
| M55918 | 1321 | gtgccctccgctacaccatcggcatgggtggagatgggccttaatgatgatgcagcccacg | 1380 |
| U66304 | 1321 | | 1380 |
| L14767 | 1300 |g..... | 1359 |
| AB027470 | 1300 |t..... | 1359 |
| | | (VP1R) CTGCAAGACATGGGTCCGATG | |
| M55918 | 1381 | gactcttgccggttctttaatcacccaaagcagatgaccctgcaagacatgggtcgcatg | 1440 |
| U66304 | 1381 | | 1440 |
| L14767 | 1360 |c.....t..... | 1419 |
| AB027470 | 1360 |a.....g... | 1419 |

| | | | |
|-----------------|------|--|------|
| M55918 | 1441 | tttgggggctggcacctgttccgacacattgaaaccgctttcagctccttgccactaag | 1500 |
| U66304 | 1441 | | 1500 |
| L14767 | 1420 |g..... | 1479 |
| AB027470 | 1420 | | 1479 |
| M55918 | 1501 | aatgagggatccttcagccccgtggcgagtcttctctcccaggagagtacctcacgcgt | 1560 |
| U66304 | 1501 | | 1560 |
| L14767 | 1480 | | 1539 |
| AB027470 | 1480 | | 1539 |
| M55918 | 1561 | cgggacgatgttaagtacagcagcgatcaccagaaccggtggcaaaaaggcggacaaccg | 1620 |
| U66304 | 1561 |ca..... | 1620 |
| L14767 | 1540 |g.....a..... | 1599 |
| AB027470 | 1540 |a.....g.....ag..... | 1599 |
| M55918 | 1621 | atgacggggggcattgcttatgcgaccgggaaaatgagaccgacgagcaacagtaccct | 1680 |
| U66304 | 1621 | | 1680 |
| L14767 | 1600 |t..... | 1659 |
| AB027470 | 1600 |t.....g..... | 1659 |
| M55918 | 1681 | gctatgccccagacccccgatcatcaccgctactacagcgcaaggcacgcaagtccgc | 1740 |
| U66304 | 1681 | | 1740 |
| L14767 | 1660 | | 1719 |
| AB027470 | 1660 |c.....a...c...c..... | 1719 |
| M55918 | 1741 | tgcatgaatagcacgcaagcttgggtggtcatgggacacatatatgagctttgcaacactc | 1800 |
| U66304 | 1741 |c..... | 1800 |
| L14767 | 1720 | | 1779 |
| AB027470 | 1720 |g.....g..... | 1779 |
| M55918 | 1801 | acagcactcgggtgcacaatggtcttttccctccagggaacggttcagtttctagacggctc | 1860 |
| U66304 | 1801 |g..... | 1860 |
| L14767 | 1780 | | 1839 |
| AB027470 | 1780 |g.....c.....c.g..... | 1839 |
| M55918 | 1861 | ttcaaccaccacaaggcgagaggagccggggaccccaagggccagagatggcacacgctg | 1920 |
| U66304 | 1861 | | 1920 |
| L14767 | 1840 |t.....a.....a.g..... | 1899 |
| AB027470 | 1840 |a.....g.....a.....t..... | 1899 |
| M55918 | 1921 | gtgccgctcggcacggagaccatcaccgacagctacatgtcagcaccgcatcagagctg | 1980 |
| U66304 | 1921 | | 1980 |
| L14767 | 1900 |a.....g.....agt.....t..... | 1959 |
| AB027470 | 1900 | ..t.....a.....agt.....g..... | 1959 |
| M55918 | 1981 | gacactaatttctttacgctttacgtagcgcgaaggcacaataagtcgcaacagttacaag | 2040 |
| U66304 | 1981 | | 2040 |
| L14767 | 1960 |g.....g..... | 2019 |
| AB027470 | 1960 |c.....a.....g..... | 2019 |
| M55918 | 2041 | ttcggcacagctacatacgcgctaaaggagccggtaatgaagagcgatgcatgggcagtg | 2100 |
| U66304 | 2041 | | 2100 |
| L14767 | 2020 | | 2079 |
| AB027470 | 2020 |a.....g... .. | 2079 |
| M55918 | 2101 | gtacgcgtccagtcggtctggcagctgggtaacaggcagaggccatacccatgggacgtc | 2160 |
| U66304 | 2101 | | 2160 |
| L14767 | 2080 |a..... | 2139 |
| AB027470 | 2080 |a.....a..... | 2139 |

```

M55918 2161 aactgggcgaacagcaccatgtactgggggacgcagccctgaaaaggggggggctaaa 2220
U66304 2161 ..... 2220
L14767 2140 .....c.....t..... 2199
AB027470 2140 .....c.....t..... 2187

M55918 2221 gcccccccccttaaacccccccctgggggggattccccccagacccccctttatata 2280
U66304 2221 .....a..... 2280
L14767 2200 .....g.....a... 2259
AB027470

M55918 2281 gcactcaataaacgcagaaaatagatttatcgactatc 2319
U66304 2281 ..... 2292
L14767 2260 .....c..... 2298
AB027470

```

Figure 34 : Séquences de 4 clones représentant les souches Cux-1 (M55918 et U66304), CIA-1 (L14767) et TR-20 (AB027470).

5.2 Étude des clones

5.2.1 Représentation schématique de pBluescript

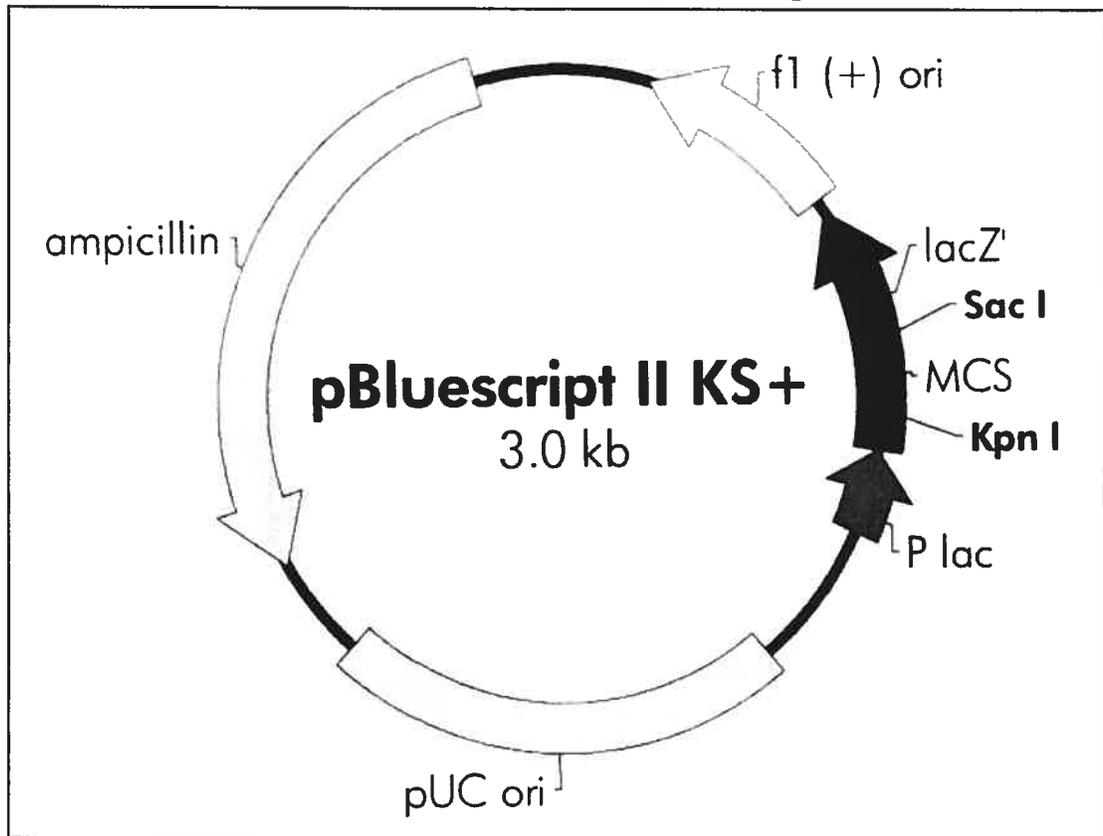


Figure 35 : Schématisation du plasmide pBluescript II KS + ayant servi à cloner le génome complet du VAA (pCux) dans les sites BamHI/EcoRI (Soiné *et al.*, 1993) et les amplifications de PCR (VP1, VP2 et VP3) dans le site EcoRV.

5.2.2 Représentation schématique des clones produits

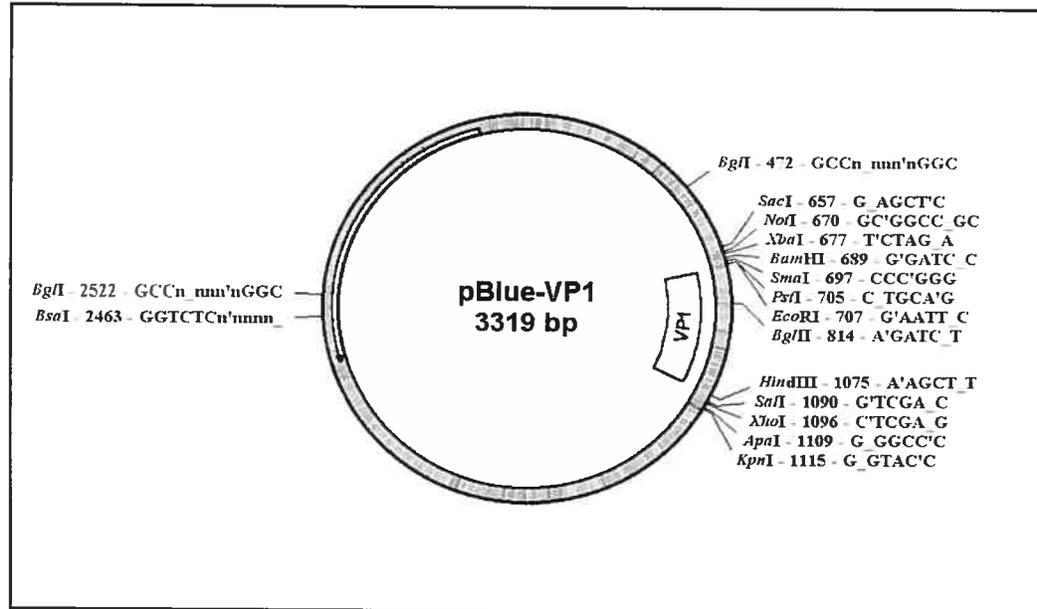


Figure 36 : Plasmide pBluescript contenant l'insert VP1 (dans le site EcoRV) provenant de l'amplification par PCR de la région bordée par les amorce VP1F et VP1R sur le génome du VAA. Les enzymes généralement employées dans le laboratoire ont été indiquées avec leur position et la composition du site qu'elles reconnaissent.

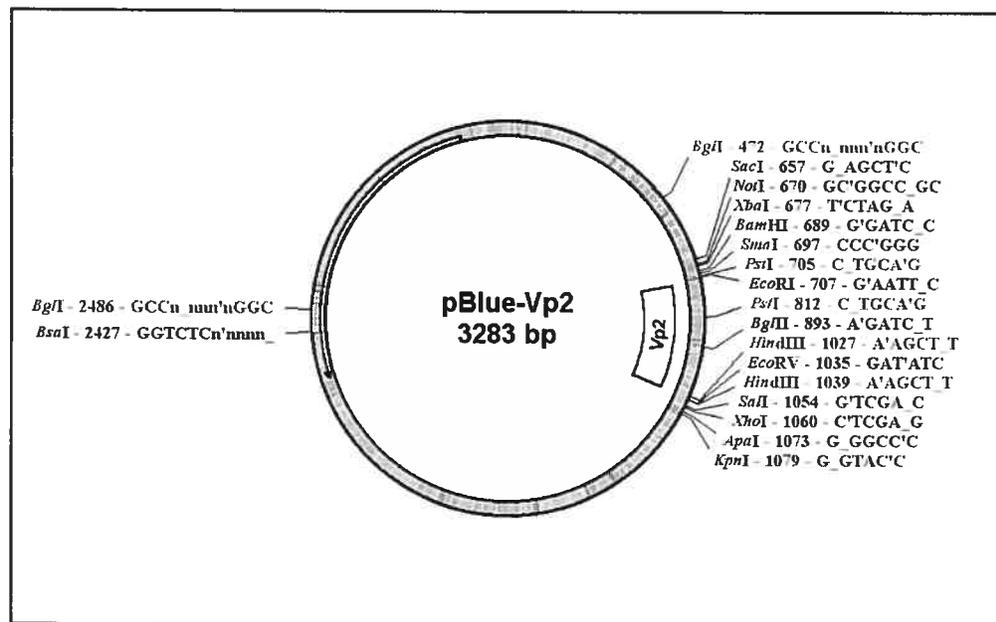


Figure 37 : Plasmide pBluescript contenant l'insert VP2 (dans le site EcoRV) provenant de l'amplification par PCR de la région bordée par les amorce VP2F et VP2R sur le génome du VAA. Les enzymes généralement employées dans le laboratoire ont été indiquées avec leur position et la composition du site qu'elles reconnaissent.

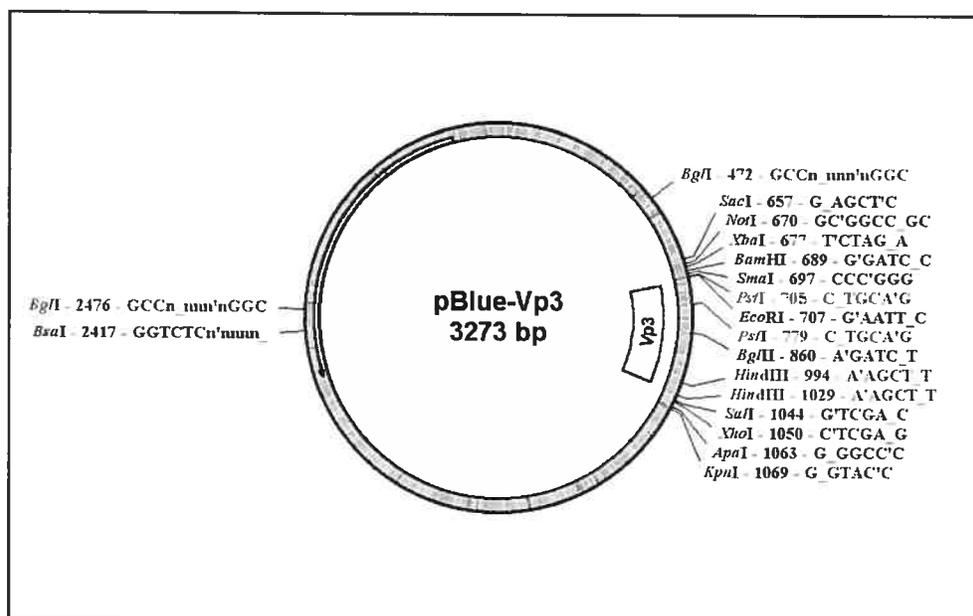


Figure 38 : Plasmide pBluescript contenant l'insert VP3 (dans le site EcoRV) provenant de l'amplification par PCR de la région bordée par les amorces VP3F et VP3R sur le génome du VAA. Les enzymes généralement employées dans le laboratoire ont été indiquées avec leur position et la composition du site qu'elles reconnaissent.

5.2.3 Évaluation de l'intégrité des plasmides par séquençage

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                60          70          80          90          100
Clone 24 F   TGGATCCCC GGGCTGCAGG AATTCGATCC CAATCTACTA TGACTATCCG
vp1          -----
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                110         120         130         140         150
Clone 24 F   CTTCCAAGGG GTCATCTTTC TCACGGAAGG ACTCTATCTG CCT-AAAACA
vp1          cttccaaggg atcatctttc tcacggaagg actcattctg cctaaaaaca
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                160         170         180         190         200
Clone 24 F   GCACAGC-GG GGGCGATGCA GACCACATGT AC--GGCGAG AGTCG-C-AG
vp1          gcacagcggg gggctatgca gaccacatgt acggggcgag agtcgccaag
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                210         220         230         240         250
Clone 24 F   ATCTC--TGG A--TCGAAGA GTTCGTCACT CACTGATCGA TCATCAGCAT
vp1          atctctgtga acctgaaaga gttcctgcta gcctcaatga acctga-cat
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                260         270         280         290         300
Clone 24 F   CGGCTGCGTG TAGTGC-----
vp1          acg-tgagca aactgggagg ccccatcgcc ggtgagttga ttgcggaagg
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                260         270         280         290         300
Clone 24 R   ----- -ATGCTGCTG CGCTGATATA CGTGCTCGCT CGCTCACACA
vp1          ctaattgctg gctgcccgt- agataata-a cgtgcccctc- cgctacacca
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                310         320         330         340         350
Clone 24 R   TC-GCAT-G- TGAGAT-GG- -CTATAGTAG TAGCAG-CC- AGGCATCTTG
vp1          tcggcatggt ggagatgggc cttaatgatg atgcagccca cggactcttg
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                360         370         380         390         400
Clone 24 R   CCGGTTCTTT AATCACCCAA AGCAGATGAC CCTGCAAGAC ATGGGTCGCA
vp1          ccggttcttt aatcacccaa agcagatgac cctgcaagac atgggtcgca
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                410         420         430         440         450
Clone 24 R   TATCAAGCTT ATCGATACCG TCGACCTCGA GGGGGGGCCC GGTACCCAGC
vp1          tg-----
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                460         470         480
Clone 24 R   TTTTGTTCCT TTTAGTGAGG GTTAATTGCG CGCTTGCGC
vp1          -----

```

Figure 39 : Séquençage du clone 24 de pBlue-VP1 avec amorce sens (F) et anti-sens (R) comparé à la séquence de VP1 (codant pour la capsid) selon Noteborn *et al.*, (1991) dont le numéro d'accèsion dans *GenBank* est : M55918.

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                60          70          80          90          100
Clone 2 F    TGGATCCCC GGGCTGCAGG AATTCGATGC TTAGCCGAGA GGGGCAACCT
vp2          -----gc ttagccgaga ggggcaacct

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                110         120         130         140         150
Clone 2 F    GGGCCCAGCG GAG-CGCGCA GGGGCAAGTA A-TTTCAATG AACGCTCTCC
vp2          gggcccagcg gagccgcgca ggggcaagta attttaaagt aacgctctcc

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                160         170         180         190         200
Clone 2 F    AAGAAGATAC T-C-ACC-GA -CATC-A-CG TG-T-----C AGC-ACACAG
vp2          aagaagatac tccaccgga ccatcaacgg tgttcaggcc agcaacaagt

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                210         220         230         240         250
Clone 2 F    TCAC-G-CG- T---GA--CC T-ACTGCAGA GAG--TC-GA -T-GTA-CGC
vp2          tcacggccgt tggaaacccc tactgcaga gagatccgga ttggtatcgc

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                260         270         280         290         300
Clone 2 F    T-G--ATA-C ATCA-TCCAT CG-TGTGTG- -----
vp2          tggaattata atcactctat cgctgtgtgg ctgcggaat gctcgcgctc

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                210         220         230         240         250
Clone 2 R    -----ATGTCC GTCCA-GCT- AGATCTGC-A CTGC-GAC-A
vp2          ggctgcgca atgctcgcgc tcccacgcta agatctgcaa ctgcggaaca

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                260         270         280         290         300
Clone 2 R    -TCAG-AAGC ACT-G-TTC- A-GATGTGC- -GAC-TGA-G -ACGATCAA-
vp2          ttcagaaagc actggtttca agaatgtgca ggacttgagg accgatcaac

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                310         320         330         340         350
Clone 2 R    CCAAGAAT-A ATAGAAGAAG CGATCCTGCG ACCCCTCCGA GTACA-GGTA
vp2          ccaagcctcc ctcgaagaag cgatcctgcg acccctccga gtacagggta

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                360         370         380         390         400
Clone 2 R    AGCGAGCTAA AAGAAAGCTT GATTACCACT ACTCCCAGCC GACATCAAGC
vp2          agcgagctaa aagaaagctt gattaccact actcccagcc gac-----

```

Figure 40 : Séquençage du clone 2 de pBlue-VP2 avec amorce sens (F) et anti-sens (R) comparé à la séquence de VP2 selon Noteborn *et al.*, (1991) dont le numéro d'accèsion dans *GenBank* est : M55918.

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      60          70          80          90          100
Clone 5 F  TGGATCCCCC GGGCTGCAGG AATTCGATCG -TCTCCAAGA AGATACTACC
vp3        -----
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      110         120         130         140         150
Clone 5 F  ACCCGGACCA TCAACGGTGT TCAGGCCACC AACAAAGTTCA CGGCCGTTGG
vp3        acccggacca tcaacgggtgt tcaggccagc aacaagttca cggccgttgg
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160         170         180         190         200
Clone 5 F  -AA-CCCTCA CTGCAGAGAG AGTC-G-AT- GTATCGCT-G ATACATCAT-
vp3        aaaccctca ctgcagagag atccggattg gtatcgctgg aattataatc
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      210         220         230         240         250
Clone 5 F  -CTCTACGTC TGTCGCGCA- -----
vp3        actctatcgc tgtgtggctg cgccaatgct cgcgctccca cgctaagatc

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      160         170         180         190         200
Clone 5 R  -----
vp3        tcgcgctccc acgctaagat ctgcaactgc ggacaattca gaaagcactg
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      210         220         230         240         250
Clone 5 R  g-ttc-a-ga tgtgccggac -tga-gaccg atc-acccaa gcct-cctcg
vp3        gtttcaagaa tgtgcaggac ttgaggaccg atcaacccaa gcctccctcg
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      260         270         280         290         300
Clone 5 R  aagaagcgat cctgcgaccc ctccgagtac -gagtagacg agctaaaaga
vp3        aagaagcgat cctgcgaccc ctccgagtac agggtaagcg agctaaaaga
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      310         320         330         340         350
Clone 5 R  aagcttgatt accactactc ccagccgacc ccgaaccgca aaaaggcgta
vp3        aagcttgatt accactactc ccagccgacc ccgaaccgca agaaggcgta
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      360         370         380         390         400
Clone 5 R  tcttgcttat cgataccgtc gacctcgagg cgatatcttg ttatcgatac
vp3        t-----

```

Figure 41 : Séquençage du clone 5 de pBlue-VP3 avec amorce sens (F) et anti-sens (R) comparé à la séquence de VP3 (codant pour l'apoptine) selon Noteborn *et al.*, (1991) dont le numéro d'accèsion dans *GenBank* est : M55918.

5.3 Solutions utilisées

5.3.1 Culture cellulaire

Milieu LM pour cellules MDCC-CU147

- 500 mL de milieu McCoy 5A (Gibco)
- 500 mL de milieu Leibovitz L-15 (Gibco)
- 100 mL de bouillon tryptose phosphate (Difco)
- 2,6 mL de solution 10% de bicarbonate de sodium (0,02 % final)
- 13 mL de 2-mercaptoéthanol 1 mM (0,01 mM final)
- 13 mL de pyruvate de sodium 100X (1,1 X final)
- 13 mL de L-glutamine 200 mM (2,25 mM final)
- 13 mL d'antibiotiques (pénicilline (1,1 U/mL final), streptomycine (1,1 µg/mL) et de l'amphotéricine B (0,003 µg/mL)
- Le milieu est utilisé avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco)

5.3.2 Extraction d'ADN plasmidique par lyse alcaline

Solution I

- Glucose 50 mM
- Tris-HCL 25 mM pH 8,0
- EDTA 10 mM pH 8,0 (Éthylène diamine tetra acétate)

Solution II

- NaOH 0,2 M
- SDS 1% (sodium dodecylsulfate)

Solution III

- KOAc 3 M
- HOAc 5 M

TE pH 8,0 (Tris-EDTA)

- Tris 10 mM
- EDTA 1 mM

5.3.3 Transfert de type Southern

Solution de dénaturation

- 0,5 M NaOH
- 1,5 M NaCl

Solution de neutralisation

- 0,5 M Tris-HCL pH 7,5
- 1,5 M NaCl

Solution SSC 20 X (Sodium citrate)

- 3 M NaCl,
- 0,15 M Na citrate,
- Ajusté le pH à 7,0

Tampon d'acide maléique

- 0,1 M acide maléique
- 0,15 M NaCl
- Ajusté le pH à 7,5 avec NaOH solide

Solution de lavage

- Tween 20 (0,3 % v/v) dans le tampon d'acide maléique

Solution de lavage rigoureux

- 2 x SSC
- 0,1 % SDS

Solution de blocage 10 X

- 10 % (p/v) de la poudre # 1096176 (Boehringer, Burlington, Ontario) dans le tampon d'acide

Solution de blocage 1 X (faite au moment de l'expérience)

- Dilué 1/10 la solution de blocage 10 X dans le tampon d'acide maléique

Solution de blocage avec streptavidine couplée à une peroxydase

- 17,98 mL de tampon d'acide maléique
- 2 mL de solution de blocage 10 X
- 20 μ L de streptavidine couplée à une Horse radish peroxydase (Immunoselect, Elbestraße, Allemagne) à une dilution 1/1000

SDS 10 %

- 10 g SDS
- 100 mL H₂O dd
- Chauffé à 68°C et agité
- Ajusté le pH à 7,2

Solution de Denhart 50 X

- 5 g de Ficoll 400
- 5 g de polyvinylpyrrolidone
- 5 g de BSA
- 500 mL d'H₂O dd
- Filtré sous vide
- Conservé à - 20°C

Tampon de pré-hybridation et d'hybridation (30 mL chacune)

- 5 X Denhart: 3 mL de 50 X
- 6 X SSC: 9 mL de 20 X
- 1 % SDS: 3 mL de 10 %
- 100 μ g/mL d'ADN: 0,3 mL de 10 mg/mL
- 14,7 mL d'H₂O
- Pour le tampon d'hybridation, 113 μ L de sonde biotinilée à 2 nM/mL ont été ajoutés (7,5 pM/mL final)

ADN de sperme de poisson (Fisher)

- 10 mg/mL
- Juste avant l'expérience, chauffé cinq minutes à 100°C et refroidi dans un bain eau-glace

5.3.4 SéquençageGel de polyacrylamide 6 %, Urée 8 M

Dans un erlenmeyer, mélangé jusqu'à l'obtention d'une solution limpide (~ une heure):

- Urée 96 g
- Acrylamide 11,4 g
- Bis-Acrylamide 0,6 g
- Tampon TBE 5X 40 mL
- H₂O déionisée 60 mL

La solution préalablement préparée a été filtrée sur papier Whatmann # 1 et 1 mL d'ammonium persulfate (APS) et 30 µL de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) ont été ajoutés. La solution a été coulée entre les vitres préalablement traitées au Sigmacote. Le peigne a été placé inversé et le tout a polymérisé durant une heure.

5.3.5 ÉlectrophorèseTampon de migration : Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1 X

- Solution stock de TAE 50 X 80 mL
- H₂O distillée déionisée 3,92 L

Gel d'agarose 1,5 %

- TAE 1 X 100 mL
- Agarose 1,5 g

L'agarose est fondue au micro-onde puis refroidie à l'eau froide. Du bromure d'éthidium est ajouté à raison d'une concentration finale de 0,5 µg/mL.

5.4 Méthodes complémentaires

5.4.1 Congélation des cellules

Toutes les manipulations ont été effectuées sur la glace. Le contenu des flacons de 75 cm² a été centrifugé à 210 g pendant six minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans le milieu LM avec 50% de sérum (25% SVF final). Un décompte cellulaire a été effectué (5.4.3) et la concentration des cellules viables a été ajustée à 4-5 x 10⁶ cellules / mL. De cette solution, 500 µL ont été déposés dans un tube à congélation. Par la suite, le milieu LM contenant 20% de dimethyl sulfoxyde froid (DMSO) (Fisher) (500 µL) (10 % DMSO final) a été ajouté goutte à goutte. Les tubes ont été congelés dans du polystyrène à -80°C de 24 heures à une semaine puis déposés dans l'azote liquide pour une congélation à long terme.

5.4.2 Décongélation des cellules

Dans un bain-Marie à 37°C, le tube congelé a été agité jusqu'à la fonte de la glace. Son contenu a été versé dans 5 mL de milieu LM puis centrifugé à la température de la pièce pendant cinq minutes à 140 g. Le surnageant a été jeté afin d'enlever le DMSO et le culot fut resuspendu dans 9 mL total de milieu LM. Les cellules ont été déposées dans un flacon de 25 cm² contenant 1 mL de SVF (10 % final) et incubées selon les conditions mentionnées dans la méthodologie pendant 24 heures. La F25 a été vidée dans un tube conique de 15 mL et centrifugée à 40°C pendant cinq minutes à 140 g. Le culot a été resuspendu dans 10 mL de milieu LM et déposé dans un flacon de 25 cm² contenant 8 mL de milieu LM et 2 mL de SVF (10%). Les cellules ont encore une fois été incubées selon les conditions de culture.

5.4.3 Décompte cellulaire

À 100 µL de milieu contenant les cellules, 100 µL de bleu de trypan à 0.4% ont été ajoutés. De cette solution, ~ 10 µL ont été déposés sur un hémacymètre. Le décompte des cellules viables (claires) et non viables (bleues) sur les 25 carreaux (pour les deux chambres) a été effectué. La moyenne de ces deux décomptes x 2 (Facteur de

dilution) $\times 10^4$ donne le nombre de cellules par mL. Le pourcentage de viabilité a été déterminé en multipliant le nombre de cellules viables par 100 et en divisant par le nombre de cellules totales.

5.4.4 Culture bactérienne

Un milieu bactérien Luria-Bertani (LB) a été préparé contenant de l'ampicilline à une concentration finale de 200 $\mu\text{g/mL}$. Le bouillon a été ensemencé avec une colonie et le tout fut incubé à 37°C pendant 12 à 16 heures avec agitation à une vitesse de 200 révolutions par minute (rpm).

5.4.5 Congélation bactérienne

Dans un Eppendorf stérile, 250 μL de glycérol stérile ont été déposés. Par la suite, 1 mL de milieu bactérien a été déposé sous la flamme. Le tout a été mélangé puis mis à -80°C pour une conservation à long terme.

5.4.6 Digestion de plasmide

La digestion a été utilisée afin de confirmer la validité des clones reçus et ceux fabriqués suite à l'étape de la lyse alcaline ainsi que pour rendre linéaire et à bout franc le plasmide pBluescript qui a été employé lors de la ligation d'un insert. Dans un tube Eppendorf, 2 μg de pBluescript (Stratagene) ont été déposés. À ce tube, 15 U d'EcoRV (Amersham pharmacia), 1 μL de tampon H 10 X (1X final) et 4,85 μL d' H_2O stérile ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à 37°C pendant une heure 45 minutes et l'enzyme a été inactivée à 70°C pendant 15 minutes. Afin d'obtenir une concentration finale de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 10 μL d' H_2O DEPC ont été ajoutés.

5.4.7 Précipitation de l'ADN

La précipitation a été utilisée pour concentrer un échantillon ou bien pour éliminer les impuretés. Dans un tube Eppendorf, 400 μL d'une solution d'ADN ont été déposés puis 100 μL d'Acétate de sodium 3M (0,3 M final), 500 μL d'isopropanol (1/2 du volume final) et 1 μL de glycérol ont été ajoutés. Le tube a été incubé pendant 15 minutes à -80°C puis a été centrifugé durant 15 minutes à la température de la pièce à 11000 g. Le culot a été lavé avec 500 μL d'EtOH 70 % et centrifugé pendant deux minutes à la température de la pièce à 11 000 g. Le culot a été séché à 37°C puis ressuspendu dans 50 μL de TE.

5.4.8 Dosage de l'ADN

Dans 90 μL de TE ou de NaOH 8 mM, 10 μL d'ADN ont été déposés (dilution 1/10). Une lecture au spectromètre a été effectuée à des longueurs d'onde de 260, 280 et 230 nm (le TE ou le NaOH 8 mM servant de blanc). La lecture de la D.O. à 260 nm a donné la concentration en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (une D.O. de 1 = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ADN double brin) et le ratio 260/280 (1,8 = ADN pur sans protéine ou phénol et 2,0 = ARN pur) et 260/230 (permettant de mettre en évidence les contaminations par des produits tel les tampons, les solvants, la guanidine isothiocyanate et les antibiotiques) ont indiqué la pureté de l'échantillon (Sambrook *et al.*, 1989).

5.4.9 Conversion de la concentration en $\mu\text{g} / \text{mL}$ d'ADN en quantité de molécules / mL

Selon les données décrites par Sambrook *et al.* (1989), le plasmide pBR322 de 4 363 pb à une concentration de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ représente $1,09 \times 10^{13}$ molécules/mL. Par calcul, le nombre de molécules pour une même concentration de pCux (5 282 pb) a pu être trouvée :
$$\frac{1,09 \times 10^{13} * 4363}{5282} = 9,00 \times 10^{12} \text{ molécules/mL.}$$
 Il a donc été possible de calculer la quantité de molécules pour les différentes concentrations mesurées.