



HAL
open science

Epidémiologie moléculaire du virus de la peste équine : étude de la diversité génomique des souches par amplification génique, séquençage et comparaison de la séquence du fragment 10

Stéphan Zientara

► **To cite this version:**

Stéphan Zientara. Epidémiologie moléculaire du virus de la peste équine: étude de la diversité génomique des souches par amplification génique, séquençage et comparaison de la séquence du fragment 10. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1995. Français. NNT: 1995NAN10466 . tel-01747122

HAL Id: tel-01747122

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747122>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

DB 5621

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I
1995

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"
Mention Biochimie structurale moléculaire et cellulaire

Thèse présentée et soutenue le

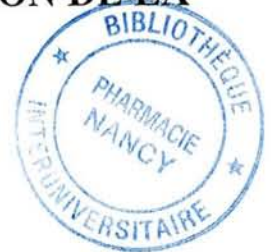
20 septembre 1995

pour obtenir le titre de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

par Stéphan ZIENTARA

**EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DU VIRUS DE LA
PESTE EQUINE : ETUDE DE LA DIVERSITE
GENOMIQUE DES SOUCHES PAR AMPLIFICATION
GENIQUE, SEQUENÇAGE ET COMPARAISON DE LA
SEQUENCE DU FRAGMENT 10.**



MEMBRES DU JURY

Rapporteurs	Professeur A. KLIER Docteur J. LAPORTE	Paris VII INRA-CNEVA
Examineurs	Professeur C. FINANCE Professeur L. SCHWARTZBROD Docteur C. CRUCIERE Docteur E. PLATEAU	Henri Poincaré - Nancy I Henri Poincaré - Nancy I CNEVA-lcrv CNEVA-lcrv



104 030106 0

Membres du personnel enseignant

DOYENC. VIGNERON

VICE DOYENG. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. RICHARD Georges
M. SOLEIL Jean

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

M. ATKINSON Jeffrey	Pharmacodynamie
M. BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, biotechnologies
Mlle BATT Anne Marie	Toxicologie
M. BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M. BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mlle GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M. HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M. JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M. KERGOSIEN Yannick	Mathématiques - Biophysique
M. LABRUDE Pierre	Physiologie
M. LALLOZ Lucien	Chimie Organique
M. LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M. LEMAY René	Droit et économie pharmaceutique
M. LOPPINET Vincent	Chimie thérapeutique
M. MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M. MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M. MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M. MORTIER François	Pharmacognosie
M. NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
Mme SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M. SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M. SIEST Gérard	Chimie biologique
M. VIGNERON Claude	Hématologie

PROFESSEURS ASSOCIES OU INVITES

M.	BAVEYE Philippe	Santé - Environnement
M.	BODMEIER Roland	Pharmacie Galénique
Mle	CHARGOIS Anne	Pharmacologie
M.	O'KANE Maurice	Biochimie
M.	SHUVAEV Vladimir	Biochimie
Mme	STOJANOV Marina	Biochimie Clinique
Mme	STREIBLOVA Eva	Biochimie microbienne
M.	VAN STRALEN Paul	Toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Chimie analytique
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacodynamie
M.	CATAU Gérard	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen - Sécurité industrielle
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mle	FAIVRE Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
Mme	HOFFMAN Marie Antoinette	Pharmacie clinique
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LARTAUD Isabelle ép. IDJOUADIENE	Pharmacologie
Mme	LEININGER MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE OU INVITE

M.	PURI Rajesh	Biologie cellulaire
----	-------------	---------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

M. COCHAUD Christophe

Anglais

ASSISTANTS

Mme BERTHE Marie-Catherine

M. DANGIEN Bernard

Mme MOREAU Blandine

Mme MOUREY Michèle

Mme PAVIS Annie

M. TROCKLE Gabriel

Mme ZINUTTI Colette

Biochimie

Botanique

Pharmacognosie

Cryptogamie

Parasitologie

Pharmacodynamie

Pharmacie galénique

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. DAHAOUI Slimane

Mlle GAVRILOFF Catherine

Mme MENDES-PELLERIN Christina

Mlle UBRICH Nathalie

M. VIARD Benoît

Biophysique - Mathématiques

Chimie Analytique

Biologie Cellulaire - Hématologie

Biophysique - Mathématiques

Biochimie

MONITEURS D'INITIATION A L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

Mlle EVRARD Anne

Mlle FENAUX Marie Laure

M. GASPARD Philippe

Mlle MAGDALINIUK Sandrine

Mlle MAURICE Marie Hélène

Mlle PARMENTIER Christine

M. SOETENS Jean Christophe

Biochimie clinique

Cytologie - Hémostase

Initiation à la connaissance du médicament

Biologie cellulaire

Toxicologie

Chimie Analytique

Biomathématiques

DOCTEURS HONORIS CAUSA

M. ANDERSON Norman G.

M. BETTOLO Marini

M. BLOCH Konrad E.

M. BOVET Daniel

M. DUTTON Geoffrey J.

M. GHUYSEN Jean Marie

M. HEIDELBERGER

M. KOFOD Helmer

M. PARRES FARRAS Ramon

Illinois - USA

Rome - ITALIE

Massachusetts - USA

Rome - ITALIE

Dundee - ECOSSE

Liège - BELGIQUE

New Jersey - USA

Copenhague - DANEMARK

Barcelone - ESPAGNE

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	AZRIA	Pharmacologie
M.	BARADEL	Conseils vétérinaires
Mme	BLOCH	Gynécologie
M.	CAMUZEUX	Maintien à domicile
M.	CHARPIGNON	Gestion, commercialisation
M.	DANOUX	Comptabilité
M.	DEMANGE	Pharmacie clinique
M.	DOUCHE	Services de la Distribution pharmaceutique
Mme	EVARD	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	FRANCAIS	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	GABLE	Maintien à domicile
M.	GIESENFELD	Pharmacie clinique
Mme	GILGENKRANTZ	Génétique
M.	HACHET	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	JACQUOT	Assurance - qualité
M.	JOUAULT	Services de la Distribution pharmaceutique
Mme	LABAEYE	Audiologie
M.	LAMOTTE	Physique (acoustique)
M.	LE FLOCH	Gestion, Droit du travail, Droit commercial
M.	LEVIN	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	LOUIS	Séméiologie
Mle	MANGIN	Pharmacie clinique
M.	MAUARY	Séméiologie
M.	MAY	Maladies infectieuses
M.	NICOLAY	Anatomie
M.	PARDON	Services de la Distribution pharmaceutique
Mle	PICAUT	Pharmacie clinique
M.	RENAUX	Secourisme
M.	RETOURNARD	Electronique
M.	ROLLET	Secourisme
M.	ROUYER	Législation, Podologie, Orthopédie
M.	SIMON	Audiologie
M.	TRECHOT	Pharmacovigilance - Effets indésirables des médicaments
M.	TURKAWKA	Relations humaines, techniques de la communication
Mle	WOLF	Services de la Distribution pharmaceutique

A Mireille

A mes parents,
A Franck, Sandrine et Ivan,

A Nathalie et Serge,
A Adèle, Francis, Zef et à la grand-mère,

A Anne, Christian et Gabriel,
A Laurence, Stéphane et Marie,
A Christine, Claude et Hélène,
A Christine, Loïc, Antoine et Suzanne,
A Valérie et Erick,
A Christine, Gilles, Charles et Quentin,
A Aïcha, Labib et Tarik,
A Isabelle, André, Thomas et Agathe,
A Amino, Philippe et Leïla,
A Hélène et Christophe,
A mes amis du RC 91.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans l'unité de Virologie, dirigée par Madame Crucière, du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires du CNEVA (Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires).

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous les membres du jury.

A Madame le Professeur Finance, pour l'honneur et le plaisir qu'elle m'a fait d'accepter de diriger ce travail et en remerciement de la très grande disponibilité d'écoute dont elle a fait preuve à notre égard et des précieux conseils qu'elle m'a prodigués pour la rédaction de ce mémoire.

A Monsieur le Professeur Klier, à qui j'exprime mes sentiments de sincère reconnaissance pour avoir accepté, malgré ses nombreuses obligations, d'être rapporteur de ce mémoire.

A Monsieur Laporte, à qui je tiens à adresser mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'il a toujours porté à ce travail et pour m'avoir encouragé à persévérer dans des périodes difficiles. Je lui exprime ma profonde gratitude pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

A Monsieur le Professeur Schwartzbrod, que je remercie chaleureusement pour avoir accepté de siéger parmi les membres de ce jury.

A Madame Crucière, chef de l'unité de Virologie du CNEVA-LCRV, à qui j'exprime mes sentiments de chaleureuse reconnaissance pour avoir accepté d'encadrer ce travail et m'avoir témoigné pendant ces années, une grande confiance et pour sa disponibilité, ses conseils bienveillants, ses remarques, ses critiques et ses encouragements qui m'ont toujours été précieux. Je la remercie également d'avoir accepté de participer à ce jury.

Au Docteur Plateau, je lui adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de participer à cette soutenance mais aussi pour m'avoir accueilli dans son service, m'avoir initié aux joies et aux peines de la virologie équine et pour ces discussions passionnées où nous refaisons le monde vétérinaire.

A Corinne que je remercie pour son aide et à laquelle ce travail doit beaucoup, pour sa grande générosité et pour ses qualités humaines et professionnelles qui en font une collègue et une collaboratrice remarquable, pour avoir accepté que "le véto en blouse dans le labo" partage, avec son mètre 90, la moitié des 3 m² de sa pièce de travail pendant une si longue période.

A Serge, qui m'a appris que PSG ne signifiait pas Portion Semi-Glandulaire et dont les cris "c'est la fin du monde" m'ont fait découvrir les perturbations orageuses sous un autre angle, pour son sérieux, sa grande générosité, sa bonne humeur, pour son sens de l'humour parfois si particulier et pour me laisser un souvenir inoubliable de ce contrat sur la peste équine.

A Bernard, pour sa disponibilité, sa gentillesse, son amitié et pour tous ces instants, chargés de complicité, qui rendent une vie professionnelle si variée et intense.

A Jacques, pour son calme imperturbable en toutes circonstances, pour son sérieux, sa disponibilité de tous les instants, sa rigueur, son souci de l'accréditation et pour l'aide constante et efficace qu'il m'a toujours apportée.

A Josiane, pour sa gentillesse, son sérieux, pour la contribution qu'elle rend tous les jours au développement du test de "Coggins" en France et pour l'écoute constante dont elle a su faire preuve depuis maintenant déjà deux ans.

A Jeanine, pour ses qualités humaines et professionnelles et pour son soutien sur lequel nous pouvons toujours compter.

A Christine, pour sa disponibilité et l'aide qu'elle apporte au service de virologie équine.

A Monsieur Alliot, pour les moyens informatiques qu'il a mis à ma disposition et pour m'avoir permis d'aborder le monde parfois déroutant des logiciels de Bureautique et des progiciels d'application.

A Michelle, Annie, Monique, Françoise, Raymonde, Muriel, Sylvain et à toutes les autres personnes de l'unité de Virologie.

A Jean-Pierre et Corinne, pour leurs séquences, pour leurs conseils, pour leur aide si précieuse à la réalisation de ce travail, pour leur accueil toujours si chaleureux et surtout pour leur ... amitié.

Aux Dr Lalloz et Pons-Hermant, pour avoir fait naître une vocation et pour la qualité et la sincérité de leur accueil toujours chaleureux.

Aux Dr Gras et Dubois pour m'avoir confraternellement accueillis en Charente.

SOMMAIRE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. TAXONOMIE.....	3
1.1. CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA FAMILLE DES <i>REOVIRIDAE</i> ..3	
1.1.1. Structures et propriétés physico-chimiques	3
1.1.2. Cycle de réplication.....	3
1.1.3. Spectre d'hôte et pouvoir pathogène	4
1.2. LES <i>ORTHOREOVIRUS</i>	6
1.3. LES <i>ROTAVIRUS</i>	6
1.4. LES <i>COLTIVIRUS</i>	6
1.5. LES <i>ORBIVIRUS</i> : BIOLOGIE ET PATHOGENIE	7
1.5.1. Les infections à <i>Orbivirus</i> chez l'homme	7
1.5.2. Les <i>Orbivirus</i> pathogènes pour l'animal : le virus de la fièvre catarrhale du mouton (ou virus de la bluetongue)	9
2. LA PESTE EQUINE	13
2.1. ETUDE DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE.....	13
2.1.1. Structure du virus de la peste équine.....	13
2.1.2. Réplication du virus de la peste équine	28
2.2. SYMPTOMATOLOGIE	32
2.3. LES LESIONS	35
2.3.1. macroscopiques	35
2.3.2. Microscopiques	37
2.4. PHYSIOPATHOLOGIE.....	37
2.5. EPIDEMIOLOGIE.....	37
2.5.1. Analytique.....	39
2.5.2. Synthétique	39
2.6. DIAGNOSTIC	42
2.6.1. Isolement du virus	42
2.6.2. Détection des anticorps.....	43
2.6.3. Les limites des méthodes de diagnostic.....	44
2.7. PROPHYLAXIE	45
2.7.1. sanitaire.....	45
2.7.2. médicale	45
2.7.3. Prophylaxie médico-sanitaire	46
2.8. LEGISLATION SANITAIRE.....	47

BUT DU TRAVAIL.....	48
MATERIEL ET METHODES.....	51
1. MATERIEL.....	52
1.1. Souches virales et milieux de culture.....	52
1.2. Souche bactérienne et milieu de culture.....	54
1.3. Vecteur plasmidique Bluescript.....	55
1.4. Les échantillons biologiques.....	56
1.5. Les enzymes et les tampons.....	61
1.6. Les principaux réactifs.....	62
1.7. Appareillage.....	64
1.8. Petit matériel.....	64
2. METHODES.....	65
2.1. La production virale.....	65
2.2. Purification du virus de la peste équine.....	67
2.3. Extraction des ARN génomiques.....	68
2.4. Amplification en chaîne par polymérase.....	70
2.5. Hydrolyse par les endonucléases de restriction.....	74
2.6. Electrophorèse analytique en gel d'agarose.....	75
2.7. Techniques d'hybridation moléculaire.....	75
2.8. Clonage dans le plasmide Bluescript.....	80
2.9. Détermination de la séquence nucléotidique.....	84
RESULTATS.....	89
1. DETECTION DE L'ARN GENOMIQUE DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE PAR RT-PCR.....	90
1.1. Amplification génique de l'ARN extrait du virus purifié.....	90
1.2. Optimisation des paramètres.....	93
1.3. Révélation par sonde moléculaire.....	100
1.4. Amplification génique de l'ARN extrait de culture de cellules infectées...100	
1.5. Amplification génique de l'ARN extrait de cerveaux de souriceaux nouveau-nés infectés.....	100
1.6. "Nested-PCR".....	101
1.7. Vérification de la spécificité des amorces sélectionnées.....	103
1.8. Détermination de la sensibilité.....	106
1.9. Application de la RT-PCR au diagnostic du virus de la peste équine.....	112

2.	ETUDE DES POLYMORPHISMES DE RESTRICTION DES PRODUITS D'AMPLIFICATION DES GENES S7 ET S10	125
2.1.	Profils de restriction des produits d'amplification des gènes S7	125
2.2.	Profils de restriction des produits d'amplification des gènes S10.....	130
3.	DETERMINATION DE LA SEQUENCE DU GENE S10 DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE.....	136
3.1.	Clonage du gène S10	136
3.2.	Clonage du gène S10 dans le plasmide Bluescript	136
3.3.	Détermination des séquences des inserts	137
3.4.	Comparaison de la séquence du génome des différentes souches de virus équine.....	145
	DISCUSSION.....	155
1.	DEVELOPPEMENT DE L'AMPLIFICATION EN CHAINE PAR POLYMERASE POUR LA DETECTION DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE	156
1.1.	Spécificité de la réaction RT-PCR	156
1.2.	Sensibilité de la réaction PCR	160
1.3.	Détection du virus de la peste équine à partir d'échantillons biologiques.....	162
2.	INTERETS ET LIMITES DU POLYMORPHISME DE RESTRICTION DES PRODUITS D'AMPLIFICATION	169
2.1.	Segment S7.....	170
2.2.	Segment S10.....	172
2.3.	Intérêt du polymorphisme de restriction	173
3.	APPLICATION DE LA PCR A L'ETUDE DE LA VIREMIE CHEZ LES ANES ET LES MULETS	175
3.1.	Détection du virus ou de son génome.....	175
3.2.	Conséquences pathogéniques.....	177
3.3.	Conséquences épidémiologiques	178
4.	DETERMINATION ET ANALYSE DE LA SEQUENCE DU GENE S10 DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE.....	181
4.1.	Analyse des séquences en nucléotides et en acides aminés	182
4.2.	Rôle de NS3 et conséquences sur la virulence	197
	CONCLUSION.....	201
	ANNEXE.....	206
	BIBLIOGRAPHIE	210

FIGURES

Fig. n° 1 : Cycle de réplication des réovirus.....	4
Fig. n° 2. Structure du virus de la peste équine	14
Fig. n° 3 : Structure secondaire théorique de l'ARN messenger du gène S7 du virus de la peste équine sérotype 4.	20
Fig. n° 4 : Organisation des gènes 10 des virus de la peste équine de sérotypes 3, 4 et 9.....	22
Fig. n° 5 : Répartition géographique de la peste équine.	38
Fig. n° 6 : Carte de restriction du vecteur Bluescript.....	56
Fig. n° 7 : Localisation sur le gène S7 des amorces P1 et P2 permettant l'amplification de la totalité de ce segment.....	72
Fig. n° 8 : Sites d'hybridation des amorces 21M13 et M13 reverse de part et d'autre du site de clonage <i>EcoRV</i>	85
Fig. n° 9 : Quantités de virus que nous avons recueillies à l'issue des différentes étapes du protocole de purification	92
Fig. n° 10 : Electrophorèse en gel d'agarose à 2 % de l'ARN génomique extrait du virus de la peste équine sérotype 4 USDA purifié.....	94
Fig. n° 11 : Electrophorèse en gel d'agarose à 2 % des ARN génomiques extraits des particules virales des neuf sérotypes.	95
Fig. n° 12 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % du produit d'amplification après transcription-inverse et PCR de l'ARN extrait du virus équine purifié 4 USDA.	96
Fig. n° 13.....	98
A : Influence de la concentration en dNTP sur le rendement de la RT-PCR.....	98
B : Influence du nombre de cycles d'amplification.....	98
Fig. n° 14 : Détermination des températures d'hybridation optimales pour les couples d'amorces P1-P2 (gène S7) et P3-P4 (gène S10).....	99
Fig. n° 15 : Vérification de la spécificité du produit d'amplification (marqué à la digoxigénine) du gène S7 du virus purifié de la peste équine sérotype 4 USDA par hybridation avec les acides nucléiques extraits de cellules infectées et non infectées par le virus équine101	101

Fig. n° 16 : Analyse par électrophorèse en gel d'agarose du produit de "nested-PCR" obtenu après PCR avec les amorces N1 et N2 du produit d'amplification du gène S7 du virus de la peste équine sérotype 4 USDA.	102
Fig. n° 17 : Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification obtenus après RT-PCR effectuée à l'aide des amorces P1 et P2 à partir des acides nucléiques extraits de cellules infectées par les neuf sérotypes de AHSV.....	104
Fig. n° 18 : Contrôle de la spécificité des produits d'amplification.	105
Fig. n° 19 : Détection par électrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification après RT-PCR effectuée à partir de quantités décroissantes d'ARN génomique viral extrait du virus de la peste équine sérotype 4 USDA purifié.....	107
Fig. n° 20 : Détermination de la quantité minimale d'ARN génomique total extrait du virus purifié de la peste équine sérotype 4 USDA par "nested-PCR".....	110
Fig. n° 21 et 22 : Produits obtenus après RT-PCR effectuée à partir d'échantillons de tissu splénique prélevés sur cadavres de chevaux marocains (21) et espagnols (22)	113
Fig. n° 23 : Représentation schématique des résultats de la détection à partir de sang des virus équinestiques (AHSV-4 E/PI et AHSV-9 PI) et de leurs génomes (segments 7) respectivement par isolement en culture de cellules et RT-PCR.	118
Fig. n° 24 : Profils de restriction des produits de RT-PCR des segments S7 des virus des neuf sérotypes.	128
Fig. n° 25 : Profils de restriction des produits de RT-PCR des segments S10 des virus des sérotypes -1 à -6.	132
Fig. n° 26 : Profils de restriction des produits de RT-PCR des segments S10 des virus des sérotypes - 6 à -9.	133
Fig. n° 27 : Analyse de la taille des inserts.	138
Fig. n° 28 : Analyse des cadres de lecture ouverts (ORF) des séquences nucléotidiques AHSV-4 USDA et AHSV-4 Maroc.	140
Fig. n° 29 : Séquences en nucléotides et en acides aminés déduits, des segments S10 des virus de la peste équine sérotype 4 souche vaccinale USDA et 4 Maroc.	144
Fig. n° 30 : Alignement des séquences en nucléotides des gènes S10 des virus de la peste équine de sérotypes 1, 3, 4 (E), 4 (SA), 8, 9 et AHSV-USDA et -4 M.....	148
Fig. n° 31 : Alignement des séquences en acides aminés déduites des séquences en nucléotides des gènes S10 des virus équinestiques -1, -3, -4 USDA, -4 SA, -4 E, -4 M, -8 et -9.	154

Fig. n° 32 : Hypothèse d'un modèle épidémiologique de transmission de la peste équine.....	180
Fig. n° 33 : Dendrogramme résultant de l'alignement multiple des séquences en nucléotides des régions codantes des gènes S10 de AHSV-1, -3, -4 USDA, -4 SA, -4 M 90, -4 E, -8 et -9.....	187
Fig. n° 34 : Profil d'hydrophilicité de la séquence primaire en acides aminés de la protéine NS3 de AHSV-4 Maroc.....	190
Fig. n° 35 : Profil d'hydrophobicité de la séquence primaire en acides aminés de la protéine NS3 de AHSV-4 Maroc.....	191
Fig. n° 36 : Prédiction de la structure secondaire de NS3 de AHSV-4 Maroc.....	192
Fig. n° 37 : Représentation schématique de la structure et des propriétés antigéniques comparées des protéines NS3 du virus BTV-10, NS28 du rotavirus (SA11) et de la protéine NS3 du virus de la peste équine sérotype 4 (souche Maroc1990).	194
Fig. n° 38 : Dendrogramme obtenu par alignement multiple des séquences en acides aminés des protéines NS3 des virus des sérotypes 1, 3, 4, 8 et 9.....	196
Fig. n° 39 : Représentation schématique de l'alignement des séquences en acides aminés des virus de la peste équine 1, 4 SA, 4 E, 4 USDA, 4 M, 8 et 9 et indication des pourcentages d'identité entre les acides aminés de différentes régions des gènes S10.	197

TABLEAUX

Tableau I : Structure et propriétés biologiques caractéristiques des neuf genres de la famille des <i>Reoviridae</i>	5
Tableau II : Les sérogroupes du genre <i>Orbivirus</i>	8
Tableau III : Caractéristiques des segments génomiques et des protéines du virus BTV sérotype 10.....	11
Tableau IV : Gènes et protéines du virus de la peste équine sérotype 4.....	15
Tableau V : Séquences des extrémités 5' et 3' des segments génomiques codants de BTV-10 et AHSV-4.....	16
Tableau VI : Caractéristiques communes des séquences des extrémités 5' des gènes S10 des virus de la peste équine sérotypes 1, 3, 4, 8 et 9 et de la BT sérotype 10.....	21
Tableau VII : Pourcentages de similitude entre les gènes 10 des virus de la peste équine sérotypes 3, 4 et 9.....	21
Tableau VIII : Comparaisons (exprimées en pourcentages d'acides aminés identiques) de quatre protéines structurales du virus de la peste équine sérotype 4 avec les protéines homologues de BTV-10 et EHDV-1.....	23
Tableau IX : Comparaison des séquences en acides aminés des protéines NS1 de différents <i>Orbivirus</i>	26
Tableau X : Comparaison des séquences en acides aminés des protéines NS3/NS3A des virus de la peste équine des cinq sérotypes 1, 3, 4, 8 et 9.....	28
Tableau XI : Principaux virus infectant les équidés et types de cellules utilisées pour leur culture <i>in vitro</i>	53
Tableau XII : Origine géographique, année de prélèvement et nature des échantillons nécropsiques.....	57
Tableau XIII : Nature des différents échantillons biologiques utilisés pour la détection du virus équine par RT-PCR et ELISA.....	59
Tableau XIV : Echantillons prélevés à différents jours sur des chevaux inoculés expérimentalement avec deux types viraux (le type 4 isolé en Espagne : AHSV-4 E/PI et le type 9 provenant d'Afrique du sud : AHSV-9PI).....	61
Tableau XV : Résultats de la RT-PCR effectuée à partir des ARN extraits de cellules Vero infectées par les 24 sérotypes de BTV et EHDV-1, -2, -3, -4 et -7 et de	

l'hybridation moléculaire avec la sonde interne SI dérivée du gène S7 de AHSV-4 USDA.....	106
Tableau XVI : Détermination du seuil de sensibilité de la RT-PCR par estimation de la quantité minimale d'ARN génomique détectée.....	108
Tableau XVII : Détermination de la quantité minimale de virus infectieux, exprimée en DCP50%, détectée par RT-PCR.	111
Tableau XVIII : Résultats de l'isolement du virus équinestique en culture de cellules et de l'amplification des segments génomiques viraux S7 et S10 à partir d'échantillons nécropsiques originaires d'Espagne, du Maroc et du Cameroun.	114
Tableau XIX : Tableau synoptique des résultats de la détection du virus équinestique et de son génome (segment S7) respectivement par isolement en culture de cellules, test ELISA pour capture d'antigène et RT-PCR à partir de 76 échantillons biologiques.	116
Tableau XX : Synthèse des résultats de la détection du virus équinestique et de son génome par RT-PCR et ELISA à partir des 73 échantillons exploitables.....	115
Tableau XXI : Tableau synoptique des résultats comparés de la détection du virus de la peste équine dans le sang par inoculation aux cultures cellulaires et par RT-PCR.....	119
Tableau XXII : Détection du segment S7 du virus équinestique en fonction de la nature de l'anticoagulant utilisé.	120
Tableau XXIII : Evolution des titres en anticorps anti-AHSV-4 détectés par séroneutralisation pour les huit animaux (les titres sont exprimés en log DCP50).	122
Tableau XXIV : Tableau synoptique des résultats de la détection à partir du sang d'ânes et de mulets infectés avec une souche sauvage de virus de la peste équine sérotype 4.....	123
Tableau XXV : Liste des huit enzymes sélectionnées et localisation de leurs sites de restriction à partir de la séquence nucléotidique du segment S7 de la souche espagnole AHSV-4.	125
Tableau XXVI : Comparaison des profils de restriction des produits d'amplification des segments S7 des neuf sérotypes de virus de la peste équine.	129
Tableau XXVII : Endonucléases de restriction utilisées pour l'hydrolyse du segment génomique S10, nombre de sites et tailles théoriques des fragments obtenus.	130

Tableau XXVIII : Comparaison pour chacune des six enzymes, des profils de restriction des produits d'amplification des segments S10 de 13 souches de virus équinestique.....	134
Tableau XXIX : Tableau synoptique des comparaisons des polymorphismes de restriction des ADNc des segments S10 des neuf sérotypes entre eux.....	135
Tableau XXX : Identification des sites de restriction des six enzymes <i>Hinf I</i> , <i>Pvu II</i> , <i>Sph I</i> , <i>Hph I</i> , <i>Cfo I</i> et <i>Rsa I</i> dans les séquences nucléotidiques des gènes S10 de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M.....	139
Tableau XXXI : Comparaison de la position des codons supposés d'initiation de la traduction des protéines NS3 et NS3A des virus de la peste équine 4 USDA et 4 M avec celles des codons d'initiation des segments S10 des virus 1, -3, -4, -8 et -9.	141
Tableau XXXII : Pourcentage de similitude en nucléotides (a) et en acides aminés (b) entre les différentes séquences du segment 10 des virus de la peste équine et du virus de la bluetongue sérotype -1 (BTV-1).....	147
Tableau XXXIII : Pourcentage de similitude des séquences en nucléotides des extrémités terminales 5' et 3' des gènes S7 de AHSV-4, AHSV-9, EHDV-1 et BTV-1 .	158
Tableau XXXIV : Pourcentages de similitude des séquences nucléotidiques des extrémités terminales 5' et 3' des gènes S10 de AHSV-1, AHSV-3, AHSV-4, AHSV-8, AHSV-9 et BTV-1.....	160
Tableau XXXV : Seuils de sensibilité de la RT-PCR effectuée sur les virus de la BT et de la peste équine rapportés par différents auteurs.....	161
Tableau XXXVI : Synthèse du polymorphisme des profils de restriction des segments S7 et S10 des souches virales des neuf sérotypes.	174
Tableau XXXVII : Environnements du premier et du deuxième ATG des séquences connues des segments S10 des virus de la peste équine.	183
Tableau XXXVIII : Pourcentage de divergence en nucléotides entre les séquences complètes (a) et les régions codantes (b) des gènes S10 des virus de la peste équine et du virus de la BT sérotype 1.....	184
Tableau XXXIX : Pourcentage de similitude entre les séquences en acides aminés des protéines NS3 du virus équinestique 4 USDA et celles de BTV-1, -2, -10, -11 et -17.....	195
Tableau XL : Pourcentage de similitude entre les séquences en acides aminés des protéines NS3 des virus de la peste équine des sérotypes 1, 3, 4, 8 et 9.	196

ABREVIATIONS

A : Absorbance.
ADNc : ADN complémentaire.
AHSV : African Horse Sickness virus (virus de la peste équine).
ARNm : ARN messenger.
ARN db : ARN double brin.
ARN sb : ARN simple brin.
ATCC : American Type Culture Collection.
BET : Bromure d'éthidium.
BTV : Bluetongue virus (virus de la fièvre catarrhale).
Da : Dalton.
dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate.
ddNTP : Didésoxyribonucléoside triphosphate.
DEPC : Diéthyl pyrocarbonate.
DIG-11-dUTP : Digoxigénine-11-dUTP.
dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate.
DTT : Dithiothreitol.
ECP : Effet cytopathique.
EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétate.
EEV : Equine Encephalosis Virus.
EHDV : Epizootic Haemorrhagic Disease virus (virus de la maladie hémorragique du cerf).
ELISA : Enzyme -Linked Immunosorbent Assay.
fg : Fentogramme.
kb : Kilobases.
LB : Lacto-Bactotryptone.
μl : Microlitre.
μm : Micromètre.
Nested PCR : PCR nichée.
NLS : N lauryl sarkosyl.
nm : Nanomètre.
pb : Paire de bases.
pg : Picogramme.
RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
Transcription Inverse-Amplification en Chaîne par Polymérase.
SVF : Sérum de veau foetal.
Tm : Température de fusion.



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La première description de la peste équine remonte à 1719 lors d'une épizootie qui provoqua la mort de 1700 chevaux dans la région du Cap en Afrique du sud (Mornet et Gilbert, 1968). Ensuite, cette maladie devint une véritable entité nosologique avec l'établissement en différentes régions du continent africain d'un peuplement européen. L'histoire de la peste équine reflète en quelque sorte la pénétration de ce continent et l'introduction concomitante d'équidés sensibles. Plusieurs épizooties spectaculaires ont porté la peste hors de son berceau africain et attiré l'attention des autorités vétérinaires sanitaires sur la menace qu'elle constitue pour le cheptel équin mondial en raison de son pouvoir de diffusion et la rapidité de sa propagation.

En 1987, la peste équine est introduite en Espagne à la suite de l'importation de zèbres en provenance de Namibie (Lubroth, 1992). Pendant trois années consécutives, des foyers de peste sont recensés en Espagne, provoquant la mort de plusieurs centaines de chevaux. En 1989 et 1990, la maladie se propage aux pays limitrophes, le Portugal et le Maroc. La France reste indemne. Le caractère meurtrier de la maladie et surtout l'arrêt des échanges internationaux d'équidés eurent un effet désastreux sur l'économie de la filière chevaline des pays touchés.

M'Fadyean (1900) a démontré l'ultrafiltrabilité de l'agent pathogène. En 1908, Theiler découvrit la pluralité antigénique (Theiler, 1908) et Ozawa *et al.* (1966) ont visualisé le virus en microscopie électronique.

Le virus équinestique a initialement été répertorié dans le groupe des arbovirus de par son mode de transmission vectorielle (Casals, 1959). Verwoerd, en 1970, proposa de regrouper le virus de la peste équine et le virus de la fièvre catarrhale du mouton au sein d'un groupe des *Diplornavirus*, distinct de celui des réovirus. Cette distinction reposait, entre autres différences, sur la morphologie de leurs capsides qui comprend 32 capsomères alors que celles des réovirus en possèdent 92. En fait, le nom d'*Orbivirus* a été proposé par Borden *et al.* (1971) pour les virus apparentés au virus de la fièvre catarrhale. Ce préfixe "Orbi" ("orbi" en latin signifie cercle) fut choisi en évocation à leurs caractéristiques morphologiques visualisées en microscopie électronique en coloration négative. En 1976, le comité international sur la taxonomie des virus approuva la création du genre *Orbivirus* au sein de la famille des *Reoviridae* (Fenner, 1976).

Le genre *Orbivirus* est l'un des neuf genres de la famille des *Reoviridae* dont nous décrivons succinctement les principales caractéristiques. A l'image des genres composant cette famille virale, la diversité des sérogroupes formant le genre *Orbivirus* sera brièvement évoquée en insistant notamment sur les virus qui infectent l'Homme et sur le virus de la fièvre catarrhale du mouton, virus prototype de ce genre. Le virus de la peste équine ainsi que les aspects cliniques et

épidémiologiques de la maladie seront traités et la problématique qui a guidé ce travail sera présentée.

1. TAXONOMIE

1.1. CARACTERISTIQUES GÉNÉRALES DE LA FAMILLE DES *REOVIRIDAE*

En 1959, Sabin proposa de regrouper au sein d'un groupe spécifique, des virus jusqu'alors classés dans le groupe des échovirus et isolés du tractus gastro-intestinal et de l'arbre respiratoire mais qui n'étaient pas directement associés à des entités cliniques définies. Il proposa le nom de réovirus pour virus Respiratoires, Entériques, Orphelins. Cette famille s'est progressivement enrichie de virus apparentés et est aujourd'hui composée de neuf genres : les *Orthoréovirus*, les *Rotavirus*, les *Coltivirus* et les *Orbivirus* qui infectent les espèces animales (y compris l'espèce humaine), les *Cypovirus*, les *Phytoréovirus*, les *Aquaréovirus* et les *Fijivirus* et les *Oryzavirus* qui infectent les plantes et les arthropodes (Matthews, 1979 ; Holmes, 1991).

1.1.1. Structures et propriétés physico-chimiques

Les réovirus sont dépourvus d'enveloppe virale et possèdent une capsidie à symétrie icosaédrique dont la taille varie de 60 à 80 nm (Joklik, 1983). Cette dernière est constituée d'une capsidie externe et d'une capsidie interne (ou core). La masse molaire de la particule virale est d'environ $120 \cdot 10^6$ Da (Urbano and Urbano, 1994).

Leur génome est constitué de 10 à 12 segments d'ARN bicaténaire, divisés en segments longs (L), moyens (M) et courts (S) selon leur vitesse de migration en gel de polyacrylamide. La masse molaire du génome varie de 12 à $20 \cdot 10^6$ Da.

Leur densité en gradient de chlorure de césium est de 1,36 à 1,39. Ils sont stables à -70°C et à température ambiante.

1.1.2. Cycle de réplication

La réplication s'effectue dans le cytoplasme de la cellule (fig. n° 1). La transcription s'effectue à partir des brins négatifs des ARN bicaténaires et nécessite une ARN polymérase ARN dépendante d'origine virale. Les ARN

messagers, coiffés et méthylés par des protéines virales non - structurales, quittent la particule virale par des pores situés aux sommets de la capsidie icosaédrique (Urbano and Urbano, 1994). Des corps d'inclusion virale, ou viroplastes, sont détectés dans le cytoplasme de la cellule infectée. Ces structures semblent être le lieu de la morphogénèse des particules virales.

1.1.3. Spectre d'hôte et pouvoir pathogène

Les virus de la famille des *Reoviridae* sont caractérisés par un large spectre d'hôte et infectent vertébrés, oiseaux, mammifères et poissons ainsi qu'invertébrés et plantes. Nous ne présenterons brièvement que les *Orthoréovirus*, les *Rotavirus*, les *Coltivirus* et les *Orbivirus*, les caractéristiques

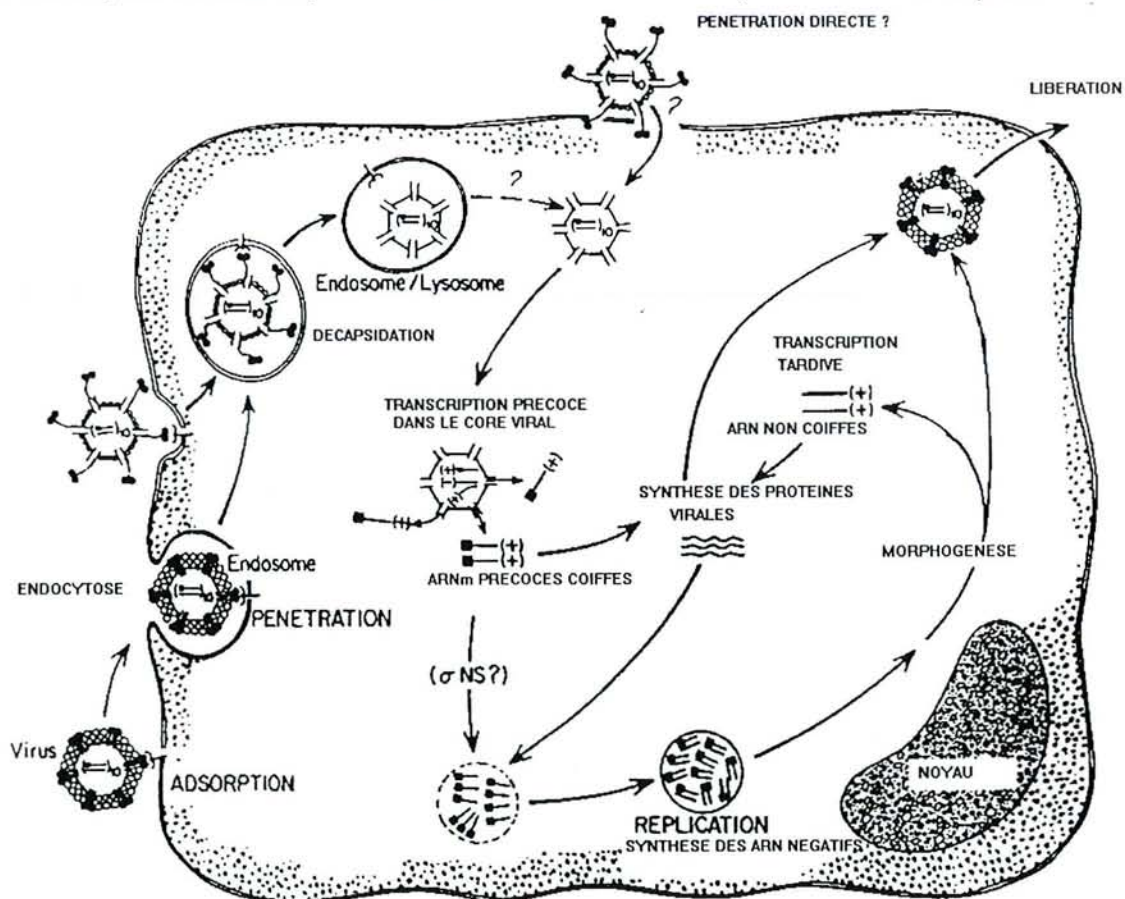


Fig. n° 1 : Cycle de répliation des réovirus (d'après Tyler and Fields (1990)).

des *Aquaréovirus*, des *Phytoréovirus*, des *Cypovirus* et des *Fijivirus* étant résumées dans le tableau I.

Tableau I : Structure et propriétés biologiques caractéristiques des neuf genres de la famille des *Reoviridae*.

	<i>Orthoréovirus</i>	<i>Coltivirus</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Orbivirus</i>
Prototype	Réovirus sérotype 3 (REO-3)	virus de la fièvre à tique du Colorado (CFTV)	rotavirus simien séro groupe A (SA 11)	fièvre catarrhale du mouton (Bluetongue virus)
génomé	10 ARN db	12 ARN db	11 ARN db	10 ARN db
propriétés antigéniques	2 groupes antigéniques : - réovirus aviaires - réovirus de mammifères.	trois sérotypes	6 groupes antigéniques (de A à F) divisés en sérotypes	14 sérogroupes (divisés en sérotypes) et 17 virus non groupés
spectre d'hôte	vertébrés	mammifères et tiques	vertébrés	vertébrés (humains, bovins, ovins, équins, rongeurs, primates)
arthropode vecteur	non	Tiques des genres <i>Dermacentor</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Harmaphysalis</i>	non	oui (moucheron, moustiques, phlébotomes, tiques)
pouvoir pathogène	troubles respiratoires, intestinaux	pathogène pour l'Homme	Diarrhées, gastro-entérites	très pathogène (peste équine) ou infections inapparentes

	<i>Fijivirus</i>	<i>Cypovirus</i>	<i>Phytoréovirus</i>	<i>Oryzavirus</i>	<i>Aquaréovirus</i>
Prototype	Fiji disease virus (FDV)	virus de la polyhédrose cytoplasmique du <i>Bombix mori</i> type1 (<i>BmCPV1</i>)	Wound tumor virus (WTV)	Rice ragged stunt virus (RRSV)	Golden shiner virus (GSV)
génomé	10 ARN db	10 ARN db	12 ARN db	10 ARN db	11 ARN db
propriétés antigéniques	3 groupes antigéniques	(12 électrophorétypes)	3 virus isolés antigéniquement distincts	-	1 antigène de groupe et 6 sérotypes
spectre d'hôte	plantes et insectes	arthropodes (insectes)	plantes (Graminées, Dicotylédones)	plantes (Graminées)	vertébrés poïkilothermes et invertébrés
arthropode vecteur	oui (<i>Delphacidae</i>)	non	oui (<i>Cicadellidae</i>)	oui (sauterelles)	non
pouvoir pathogène	hypertrophie du phloème, tumeurs, galles...	anomalies larvaires et imaginales	galles, colorations anormales des feuilles	destruction de 10 à 20% des cultures de riz en Asie	faible

1.2. LES ORTHOREOVIRUS

Les *Orthoréovirus* n'infectent que les vertébrés et leur spectre d'hôte est large : oiseaux, mammifères et poissons. Leur transmission s'effectue directement par l'intermédiaire d'un cycle oro-fécal ou par voie aérienne. Chez l'Homme, les orthoréovirus sont associés à des pathologies de l'arbre respiratoire supérieur, du tractus intestinal et à un syndrome d'atrésie des voies biliaires chez le nouveau-né. Les orthoréovirus isolés chez les mammifères (bovins, équins, chiens, singes...) sont à l'origine de syndromes très variés mais c'est chez les oiseaux que les différents pathotypes de réovirus aviaires sont responsables de pathologies dont l'incidence économique est non négligeable (arthrites, syndromes de malabsorption, gastro-entérites...).

1.3. LES ROTAVIRUS

Les *Rotavirus* n'infectent que les vertébrés et sont transmis par l'intermédiaire d'un cycle oro-fécal. Six groupes antigéniques de rotavirus sont décrits (de A à F), chaque groupe étant divisé en plusieurs sérotypes (le groupe A est constitué de 14 sérotypes différents). Les virus qui infectent l'Homme appartiennent aux groupes A, B, et C. Les *Rotavirus* sont responsables de gastro-entérites aiguës chez l'enfant et le jeune animal (veau, poulain, porcelet ...) (Mebus *et al.*, 1969). Des *Rotavirus* d'origine humaine peuvent être transmis à des porcelets, des veaux, des agneaux, des chiens non sevrés et à des singes rhésus nouveau-nés chez qui ils peuvent provoquer une diarrhée ou une simple infection. Les *Rotavirus* d'origine équine et simienne ont été transmis à des porcelets (Holmes, 1979). Ces observations indiquent que les rotavirus ne sont pas strictement spécifiques d'une espèce, cependant, la nature de ces échanges entre espèces est peu connue (Acha and Szyfres, 1989).

1.4. LES COLTIVIRUS

La fièvre à tiques du Colorado (appelée aussi "la fièvre des montagnes") a été identifiée au début du siècle par des praticiens du Montana et du Colorado mais il fallut attendre 1930 pour que Becker (1930) la décrive en tant qu'entité nosologique. Le virus de la fièvre à tiques du Colorado (CFT) a été isolé à partir de sang humain en 1944 par Florio *et al.* (1944) en utilisant un système inhabituel

de production de leucocytes chez des hamsters adultes. Deux autres virus antigéniquement distincts ont été ensuite isolés : l'Eyach virus, isolé à partir de tiques du genre *Ixodes* en Allemagne et en France (Chastel *et al.*, 1984) et le virus S6-14-03 isolé à partir d'un lièvre (*Lepus californicus*) en Californie (Lane *et al.*, 1982). Les virus CFT, longtemps considérés comme des *Orbivirus* (les seuls *Orbivirus* à posséder 12 segments d'ARN bicaténaire) sont classés dans le genre des *Coltivirus* (Knudson, 1981 ; Holmes , 1991).

1.5. LES ORBIVIRUS : BIOLOGIE ET PATHOGENIE

Les *Orbivirus* sont responsables de maladies majeures en médecine vétérinaire alors qu'en médecine humaine leur gravité est moindre. Les *Orbivirus* possèdent des caractères morphologiques, structuraux et biologiques communs.

Les *Orbivirus* sont divisés en sérogroupes, les virus d'un même séro groupe possédant un antigène commun localisé au niveau de la capsid interne qui leur confère une réactivité croisée en fixation du complément (Mertens, 1994). Des antigènes, spécifiques de type, sont associés à la capsid externe et induisent la production d'anticorps neutralisants. Actuellement, 14 sérogroupes distincts sont identifiés ainsi qu'un ensemble de virus non-groupés (tableau II). Chaque séro groupe est divisé en sérotypes (Borden *et al.*, 1971 ; Karabatsos, 1985 ; Gould and Hyatt, 1994). Les *Orbivirus* sont isolés de nombreuses espèces animales y compris l'homme et sont répandus dans le monde entier. Ils sont transmis par l'intermédiaire de nombreux vecteurs biologiques : tiques, phlébotomes, moustiques, moucheron (*Culicoïdes...*).

1.5.1. Les infections à *Orbivirus* chez l'homme

1.5.1.1. La fièvre d'Orungo

Le virus de la fièvre d'Orungo est présent en Afrique tropicale. Il fut isolé en 1959 de moustique (*Anopheles funestus*) en Ouganda. Le virus a été isolé au Sénégal, en Cote d'Ivoire, au Nigéria, en République d'Afrique Centrale et des données sérologiques permettent de suspecter sa présence au Ghana, en Sierra Leone et au Cameroun. Le virus est transmis à l'homme et aux animaux domestiques par l'intermédiaire de moustiques du genre *Anopheles* et *Aedes*.

Tableau II : Les sérogroupes du genre *Orbivirus*

sérogroupes	nombre de sérotypes	hôtes vertébrés	invertébrés vecteurs
BTV	24	ruminants domestiques et sauvages	<i>Culicoïdes</i>
EHDV	8	chameaux, bovins lamas, cerfs	<i>Culicoïdes</i>
Eubenangee	4	inconnu	<i>Culicoïdes</i> , moustiques
AHSV	9	équidés, zèbres, chiens, éléphants, chameaux, moutons, chèvres	<i>Culicoïdes</i> , moustiques
Encéphalose équine (EEV)	7	chevaux	<i>Culicoïdes</i> ,
Warrego	2	marsupiaux	<i>Culicoïdes</i> ,
Wallal	2	marsupiaux	<i>Culicoïdes</i> ,
Palyam	11	bovins, moutons	<i>Culicoïdes</i> , moustiques
Changuinola	12	humains, rongeurs	<i>Culicoïdes</i> , phlébotomes
Corriparta	4	humains, rongeurs	moustiques
Kemerovo	40	humains, rongeurs, oiseaux, bovins, moutons	tiques
Umatilla	3	oiseaux	moustiques
Orungo	4	humains, chameaux, bovins, chèvres, singes, moustiques	moustiques
Lebombo	1	humains, rongeurs	moustiques

1.5.1.2. Le groupe Changuinola

Le virus Changuinola est le prototype d'un séro groupe comprenant 12 sérotypes et est le seul responsable d'une maladie chez l'homme. Le virus a été isolé chez un patient qui a présenté un syndrome fébrile modéré au Panama. Le taux de prévalence de l'infection est inconnu. Deux cent soixante dix souches ont été isolées à ce jour (à partir d'insectes notamment) et forment un groupe hétérogène comme l'atteste la diversité des électrophorétiques de 24 souches analysées par Travassos *et al.* (1984).

1.5.1.3. Le groupe Kemerovo

Le groupe Kemerovo, divisé en 4 sous-groupes antigéniques, comporte 23 virus. Les trois virus du sous-groupe Kemerovo (Kemerovo, Lipovnik et Tribec) sont responsables de syndromes fébriles et d'infections neurologiques chez l'homme en Europe Centrale. Les virus des sous-groupes Chenuda, Wad Medani et Great Island ne sont pas pathogènes pour l'homme. Une vingtaine de souches du virus Kemerovo ont été isolées du sang de patients atteints de méningoencéphalites dans la région de Kemerovo en Russie et à partir de tiques: *Ixodes persulcatus* en 1962 (Walton and Osburn, 1992), de *Hyalomma anatolium* dans la même région et d'un oiseau (*Phoenicurus phoenicurus*) en Egypte.

1.5.1.4. Le groupe Lebombo

Le virus Lebombo a été isolé pour la première fois à Ibadan au Nigeria en 1968 d'un enfant atteint d'un syndrome fébrile. Le cycle de transmission n'est pas connu mais des virus ont été isolés à partir de rongeurs (*Thryonomys swinderianus*) et de moustiques (*Mansonia africana* et *Aedes circumluteolus*) au Nigeria et en Afrique du Sud.

1.5.2. Les *Orbivirus* pathogènes pour l'animal : le virus de la fièvre catarrhale du mouton (ou virus de la bluetongue)

L'importance médicale des infections à *Orbivirus* (les virus de la fièvre catarrhale du mouton, de la maladie hémorragique du cerf et de la peste équine)

est considérable en médecine vétérinaire, notamment pour les espèces bovines et équinnes pour lesquelles ces maladies constituent des risques sanitaires majeurs.

Nous présenterons succinctement la structure du virus de la fièvre catarrhale et les caractéristiques cliniques et épidémiologiques de la maladie qu'il provoque chez les espèces sensibles afin de souligner les homologues que cette infection virale présente sur de nombreux points avec l'infection par le virus équinestique.

1.5.2.1. Organisation du génome du virus de la fièvre catarrhale du mouton

Un grand nombre de données sont disponibles sur la biologie moléculaire du virus de la Bluetongue (ou BTV), prototype du genre *Orbivirus*. Le tableau III présente les caractéristiques des segments génomiques du virus de la BT ainsi que de leurs produits d'expression.

1.5.2.2. Espèces affectées

Seuls les ovins sont affectés par ce virus et présentent une maladie grave avec une évolution de type épizootique. Toutefois, il convient de nuancer cette affirmation car certaines races de mouton ont des sensibilités très variées (Lefèvre et Desoutter, 1988). Chez les bovins et les caprins, les manifestations cliniques sont discrètes voire inapparentes. Le rôle de la faune sauvage dans l'épidémiologie de la fièvre catarrhale est un sujet de controverse. Une grande variété de ruminants sauvages peut contracter des infections inapparentes.

1.5.2.3. Distribution géographique

La fièvre catarrhale est longtemps restée cantonnée à la partie sud du continent africain mais, à partir des années 40, elle s'est étendue en Afrique centrale pour atteindre ensuite le bassin méditerranéen et l'Asie. A l'heure actuelle (Lefèvre et Desoutter, 1988), la maladie est signalée sur tous les continents dans une zone comprise au nord entre le 40° et le 50° parallèle et au sud entre le 20° et le 30° parallèle mais tous les sérotypes n'y sont pas représentés de façon identique. En Europe, la fièvre catarrhale a fait des incursions à trois reprises (au Portugal et en Espagne de 1957 à 1960, à Chypre en 1977, en Grèce en 1980 sur

Tableau III : Caractéristiques des segments génomiques et des protéines du virus de la BT sérotype 10 (Prasad *et al.*, 1992 ; Roy, 1992a).

segments	taille (en pb)	protéines	nombre d'acides aminés	Masse molaire (Da)	localisation	nombre de molécules par virion	fonctions ou propriétés
L1	3954	VP1	1302	149 588	protéine mineure du core	environ 6	- antigène de groupe - ARN polymérase
L2	2926	VP2	956	111 112	capside externe	180	- spécificité de type - antigène protecteur - récepteur cellulaire - hémagglutinine
L3	2772	VP3	901	103 344	protéine majeure du core	60	- antigène de groupe
M4	2011	VP4	654	76 433	protéine mineure du core	environ 5	- antigène de groupe - guanylyltransférase
M5	1639	VP5	526	59 163	capside externe	120	spécificité de type
M6	1770	NS1	552	64 445	protéine non structurale	-	antigène de groupe
S7	1156	VP7	349	38 548	protéine majeure de surface du core	780	antigène de groupe
S8	1123	NS2	357	40 999	protéine non structurale	environ 37	- associée aux corps d'inclusion - fixe les ARN messagers
S9	1 046	VP6/VP6A	328	35 750	protéine mineure du core	-	- antigène de groupe - fixe les ARN sb et db (hélicase)
S10	822	NS3/NS3A	229/216	25 572/24 020	protéine non structurale	-	- glycoprotéine, - libération des virions

l'île de Lesbos) mais l'efficacité des mesures défensives (abattage des animaux infectés et contaminés, désinsectisation ...) ainsi que les conditions climatiques peu favorables à la survie du vecteur ont contribué à son éradication.

1.5.2.4. Symptomatologie

Après une incubation de 2 à 18 jours, l'animal présente une forte hyperthermie (de l'ordre de 42°C) qui précède de 24 à 48 heures les premiers signes locaux, conséquences de phénomènes congestifs puis oedémateux et hémorragiques. La congestion touche en premier lieu les muqueuses buccales et nasales et se traduit par une hypersalivation associée à un oedème des lèvres et de la langue qui peut s'étendre de façon inconstante à l'ensemble de la tête. A ce stade, la langue, augmentée de volume, devient cyanotique et prend une couleur bleue pourpre à l'origine de la dénomination "blue tongue". Cette stomatite cyanotique est transformée en stomatite ulcéreuse. A ces localisations buccales, s'ajoutent des lésions podales annoncées par des boiteries des membres postérieurs notamment. Les onglons sont le siège d'une pododermatite qui se traduit par une inflammation du bourrelet coronaire et du tissu podophylleux et peut parfois se compliquer d'une exongulation. La mort survient entre le dixième et le douzième jour en général. Si l'animal résiste, la convalescence est toujours très lente et un animal guéri reste souvent une non-valeur économique.

Tous les intermédiaires existent entre la forme aiguë et les formes très frustes se traduisant par un simple syndrome fébrile de courte durée suivi parfois d'une congestion passagère de la muqueuse buccale, d'avortements ou de malformations néonatales. Les formes moins sévères, voire inapparentes, sont les plus fréquentes.

1.5.2.5. Epidémiologie analytique

Sources de contagion

La principale source de contagion est le sang : la virémie apparaît dans les heures qui précèdent l'hyperthermie puis disparaît avec la phase fébrile.

Modalités de transmission

Elles présentent de très grandes analogies avec celles de la peste équine et imposent à l'épidémiologie ses aspects particuliers et en tous points comparables à celle du virus équinestique.

La transmission directe nécessite l'intervention d'un arthropode piqueur, vecteur "biologique" ou "mécanique". De nombreuses espèces ont été incriminées mais seuls les membres du genre *Culicoïdes* (Famille des *Ceratopogonidae*, ordre des *Diptères*) sont d'authentiques vecteurs biologiques du virus.

2. LA PESTE EQUINE

La première partie de cette étude bibliographique sera consacrée à l'étude du virus de la peste équine. La seconde partie abordera la description clinique de la maladie, la physiopathologie de l'infection par le virus équinestique ainsi que les perspectives en matière de diagnostic biologique et de prophylaxie.

2.1. ETUDE DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE

2.1.1. Structure du virus de la peste équine

Les travaux sur la structure et l'organisation du génome du virus de la peste équine n'ont véritablement progressé que depuis les cinq dernières années.

2.1.1.1. Le génome viral et son organisation

Les caractéristiques morphologiques et moléculaires des particules du virus de la peste équine ("AHS") sont comparables à celles du virus de la "bluetongue" ("BT"), virus référence du genre *Orbivirus*. La densité du virus de la peste équine en gradient de chlorure de césium est de 1,33 (Mertens *et al.*, 1987). Ce virus (comme celui de la bluetongue) possède sept protéines structurales différentes (VP1 à VP7) réparties en deux capsides (fig. n° 2).

La capside externe est composée de VP2 et VP5. La capside interne ou "core", est composée des deux protéines majeures VP3 et VP7 et des trois protéines mineures VP1, VP4 et VP6. Le génome, localisé dans la capside

interne, est constitué de dix segments d'ARN double-brin (db) de tailles différentes (Roy *et al.*, 1994) numérotés de 1 à 10 en fonction de leur ordre de migration en gel de polyacrylamide et sont classés en segments longs (L pour "large", L1 à L3), moyens (M pour "medium", M4 à M6) et courts (S pour "short", S1 à S10). La totalité de la séquence en nucléotides du génome du virus de la peste équine n'a pas été déterminée. Les séquences de huit des dix segments d'ARN suivants sont aujourd'hui connues pour les sérotypes 4 (souche sauvage espagnole et souche vaccinale), 3 et 9 : L2, L3, M4, M5, M6, S7, S8, S10 (Roy *et al.*, 1991 ; Van Staden and Huismans, 1991 ; Van Staden *et al.*, 1991 ; Mizukoshi *et al.*, 1992, 1993, 1994 ; Sakamoto *et al.*, 1994a ; Sakamoto *et al.*, 1994b ; Iwata *et al.*, 1992b ; Wade-Evans *et al.*, 1993 ; Vreede and Huismans, 1994)(tableau IV).

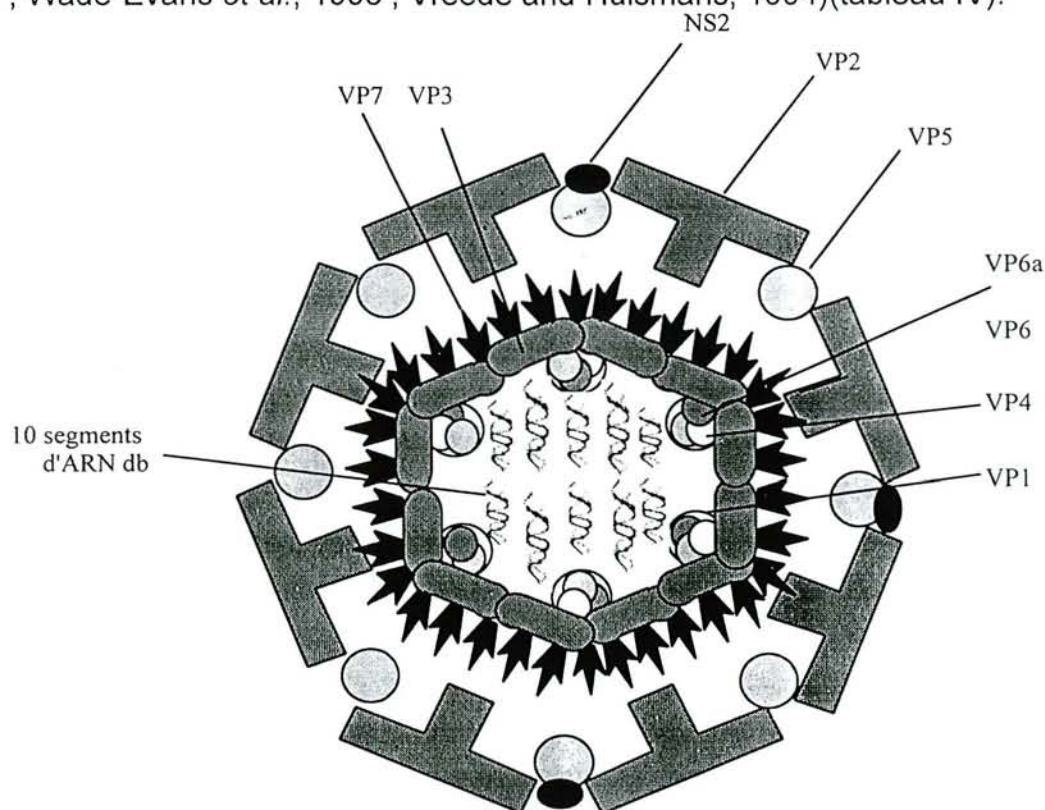


Fig. n° 2. Structure du virus de la peste équine (d'après Mertens *et al.*, 1994).

La composition moyenne de la totalité du génome séquencé est la suivante : 57% (A + U) et 43 % (G + C). La taille moyenne des séquences non codantes des extrémités 5' varie de 12 pb (segment L2) à 35 pb (segment M5) alors que les séquences non codantes des extrémités 3' sont plus longues : de 29 pb (segment M6) à 100 pb (segment S7). Contrairement aux segments d'ARN du virus de la BT qui possèdent des séquences communes (Mertens and Sangar, 1985), les six nucléotides des extrémités 5' et 3' des gènes du virus de la peste équine ne sont

Tableau IV : Gènes et protéines du virus de la peste équine sérotype 4.

segment	longueur (en pb)	masse molaire (en kDa)	composition en % A + T	composition en % G + C	protéine	acides aminés	masse molaire (en Da)	localisation
L1	≅ 3500	inconnu	inconnu	inconnu	VP1	inconnu	inconnu	core
L2	3229	2,2 10 ⁶	59,9	40,1	VP2	1060	124 057	capside externe
L3	2792	1,9 10 ⁶	57,1	42,4	VP3	905	103 269	core
M4	1978	1,27 10 ⁶	57,1	42,5	VP4	642	75 826	core
M5	1566	1,06 10 ⁶	58,2	41,8	NS1	548	63 122	non structurale
M6	1751	1,12 10 ⁶	55,7	44,3	VP5 (VP6 ou VP5')	505	56 780	capside externe
S7	1179	7,0 10 ⁵	53,4	46,1	VP7	354	38 107	core
S8	1123	7,6 10 ⁵	54,9	45,1	NS2	365	41 197	non structurale
S9	≅ 1100	inconnu	inconnu	inconnu	VP6 (?)	inconnu	inconnu	core
S10	758	5,0 10 ⁵	57,8	42,2	NS3/NS3A	217/206	23 636/ 22 541	non structurale

Tableau V : Séquences des extrémités 5' et 3' des segments génomiques codants de BTV-10 et AHSV-4.

segments	AHSV		BTV		AHSV		BTV	
	extrémités 5'	longueur (en pb) des régions non codantes	extrémités 5'	longueur (en pb) des régions non codantes	extrémités 3'	longueur (en pb) des régions non codantes	extrémités 3'	longueur (en pb) des régions non codantes
L1	inconnue	-	5'GUUAAA...	11	inconnue	-	...ACUUAC3'	37
L2	5'GUUAAA...	12	GUUAAA...	19	...ACAUAC3'	34	...ACUUAC	39
L3	GUUAAU...	26	GUUAAA...	17	...ACUUAC	49	...ACUUAC	52
M4	GUUUAU...	11	GUUAAA...	8	...CCUUAC	38	...ACUUAC	41
M5	GUUAAA...	35	GUUAAA...	29	...ACUUAC	68	...ACUUAC	31
M6	GUUAAU...	17	GUUAAA...	34	...ACAUAC	29	...ACUUAC	79
S7	GUUAAA...	17	GUUAAA...	17	...ACUUAC	100	...ACUUAC	92
S8	GUUAAA...	22	GUUAAA...	19	...ACAUAC	46	...ACUUAC	34
S9	inconnue	-	GUUAAA...	15	inconnue	-	...ACUUAC	47
S10	GUUUAA...	19	GUUAAA...	19	...ACUUAC	85	...ACUUAC	116

pas conservés entre les différents segments. Ces séquences sont indiquées dans le tableau V. Les séquences consensus des extrémités terminales 5' et 3' sont respectivement 5' GUU(A/U)A(A/U)... et ...AC(A/U)UAC 3'. Les séquences des extrémités 5' et 3' de chaque segment d'ARN présentent des séquences complémentaires inversées et permettent aux ARN simple brin de former des structures secondaires.

Les segments génomiques L1, L2 et L3

Segment L1

La séquence nucléotidique de ce segment n'est pas connue.

Segment L2

Ce segment, qui code pour la protéine VP2, a une masse molaire de $2,2 \cdot 10^6$ Da et une longueur de 3220 pb environ.

Il s'avère être plus long que les segments L2 homologues des six sérotypes de BTV et EHDV dont les séquences en nucléotides ont été publiées (Roy *et al.*, 1990 ; Iwata *et al.*, 1992b). Les segments L2 de BTV-1 (2943 pb) et EHDV-1 (2968 pb) sont plus courts, de 286 à 261 bp respectivement que le gène L2 de AHSV-4. La comparaison des séquences nucléotidiques indique que le degré de similitude entre ces trois gènes n'est que de 39 %. La séquence de ce gène est hautement variable comme la comparaison des séquences des gènes L2 des deux souches sauvage et vaccinale de AHSV-4 l'illustre : 9 % des nucléotides, sur l'ensemble de la séquence ont subi une mutation (Sakamoto *et al.*, 1994a).

Le segment L2 s'avère être spécifique de type comme l'illustrent les travaux d'hybridation moléculaire croisée du gène L2 d'un sérotype donné (AHSV-3) avec les gènes des autres sérotypes (Bremer *et al.*, 1990).

Segment L3

Le segment L3 du virus de la peste équine de sérotype 4 (Iwata *et al.*, 1992b) a une longueur de 2792 pb et s'avère être plus long (de 20 nucléotides) que le gène L3 homologue du virus de la BT sérotype 10 (Purdy *et al.*, 1984) et EHDV sérotype 1 (Le Blois *et al.*, 1991).

Les gènes de ces trois virus sont plus conservés entre eux que ne le sont leurs segments L2 : 59 % des nucléotides des gènes L3 sont communs.

Les segments M4, M5, M6

Les séquences de ces trois gènes présentent un haut degré de similitude avec les gènes équivalents du virus de la BT.

Segment M4

Le gène M4 du virus de la peste équine de sérotype 4, d'une taille de 1978 pb et d'une masse molaire de $1,24 \cdot 10^6$ Da (Mizukoshi *et al.*, 1993) présente 55,4 % de similitude avec la séquence du gène M4 du virus de la BT sérotype 10 (Yu *et al.*, 1987). Les séquences des extrémités 5' et 3', respectivement : 5' GUUUAAU... et ...CCUUAC 3', s'avèrent différentes des séquences terminales caractéristiques des *Orbivirus* (5' GUUAAA... et ...ACUUAC 3') (tableau V).

Le gène M4, qui code pour la protéine mineure du core VP4, est conservé entre les neuf sérotypes (Bremer *et al.*, 1990) bien que les différences d'intensité des signaux de révélation des hybridations moléculaires (dans des conditions de stringence identiques) traduisent des variations génétiques entre certains sérotypes. Ainsi, les gènes M4 des sérotypes 1, 2, 3, 4 et 7 semblent très similaires alors que ceux des sérotypes 5, 6, 7 et 8 sont moins conservés (Mizukoshi *et al.*, 1992).

Cependant, il serait nécessaire de préciser si ces différences d'homologie sont effectivement au niveau du sérotype (variations inter-sérotype) ou au niveau de l'isolat ou du topotype (variations intra-sérotype) (Gould, 1988b).

Segment M5

Ce segment, de 1751 pb pour AHSV-4 (Mizukoshi *et al.*, 1992) est l'homologue du gène 6 du virus de la BT avec lequel il partage 49% de similitude (Lee and Roy, 1987). Il code pour la protéine non structurale NS1 (Tableau IV). Les extrémités terminales (tableau V) sont 5'GUUAAA... et ...ACUUAC 3' caractéristiques de celles des *Orbivirus*.

Le gène M5 du virus de la peste équine de sérotype 4, dans des conditions de forte stringence, s'hybride avec les gènes 5 des 8 autres sérotypes (Mizukoshi *et al.*, 1992) ce qui traduit un haut degré de conservation entre les sérotypes.

Segment M6

Le segment 6, de 1566 pb, a une masse molaire de $1,06 \cdot 10^6$ Da. La séquence nucléotidique est moins variable que celle du gène L2 puisque le gène M6 du virus de la peste équine de sérotype 4 présente 53 % de similitude avec les segments M5 homologues des virus de la BT sérotype 10 et de l'EHD sérotype 1.

Les séquences des segments M6 des souches AHSV-4 vaccinale et virulente présentent 98 % de similitude (Sakamoto *et al.*, 1994a).

Les segments S7, S8, S9 et S10

Segment S7

Les séquences nucléotidiques des virus de la peste équine de sérotypes 4 (Roy *et al.*, 1991) et 9 (Wade-Evans *et al.*, 1993) ont été déterminées.

Ces deux gènes sont très conservés puisque les deux séquences présentent un degré de similitude de 98,3 %. La protéine VP7 pour laquelle ils codent possède des déterminants antigéniques spécifiques de groupe. Le segment S7 de AHSV-4 a une taille de 1179 pb, une masse molaire de $7,0 \cdot 10^5$ Da et des séquences nucléotidiques terminales caractéristiques des *Orbivirus* (tableau V) (Roy *et al.*, 1991). La composition en nucléotides du brin codant d'ARN S7 du virus de la peste équine sérotype 4 (27,5% U, 26,4 % A, 19,7 % C et 26,5 % G) s'avère identique à celle du segment S7 homologue du virus de la BT sérotype 10 (Yu *et al.*, 1988).

Les extrémités 5' et 3' présentent des séquences inversées complémentaires qui permettraient la formation de structures secondaires (Roy *et al.*, 1991) (fig. n° 3).

De telles structures secondaires ont aussi été décrites pour les segments S7 de BTV-10, BTV-13 et BTV-17 (Yu *et al.*, 1988 ; Kowalik and Li, 1989 ; Kowalik *et al.*, 1990). Ces structures secondaires peuvent être déduites de toutes les séquences connues des virus de la BT et de l'EHD (Roy *et al.*, 1991) et présentent des caractéristiques communes : par exemple, la séquence CACA, située à l'extrémité 3' de l'ARN AHSV-4 S7 ou la structure à l'extrémité 5' constituée par le troisième nucléotide T du premier codon dont la base qui lui est complémentaire est déléetée. Les codons d'initiation et de terminaison de la traduction de la protéine VP7 (TAG) sont situés dans des structures potentielles en épingle à cheveux (fig. n° 3).

Bien que le rôle exact de ces structures secondaires potentielles déduites des séquences des gènes S7 ne soit pas connu, les hypothèses suivantes peuvent être formulées (Roy *et al.*, 1991):

- faciliter la transcription en favorisant la fixation de l'ARN polymérase (VP1) sur l'ARN génomique,

- protéger les ARN messagers de l'action des exonucléases,

- améliorer la terminaison de la traduction,

- permettre la sélection des 10 ARN db lors de l'étape d'encapsidation.

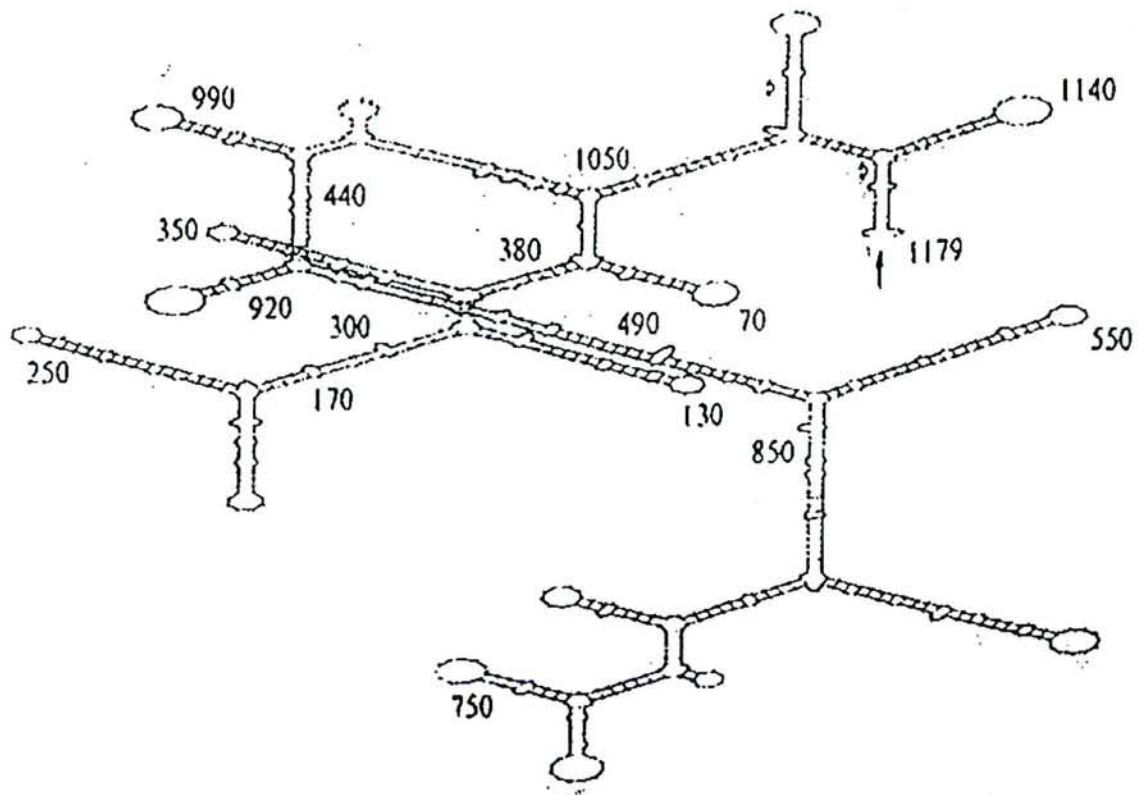


Fig. n° 3 : Structure secondaire théorique de l'ARN messager du gène S7 du virus de la peste équine sérotype 4 (d'après Iwata *et al.*, 1992a).

Segment S8

Les séquences nucléotidiques des gènes S8 des virus de la peste équine de sérotypes 3 et 9 ont été publiées. Le gène a une taille de 1166 pb. Alors que les séquences des gènes S8 de EHDV-1 et BTV-10 ont 60 % de similitude, les séquences des segments S8 de AHSV-9 et EHDV-1 et AHSV-9 et BTV-1 ne présentent que 53 % de similitude (Van Staden *et al.*, 1991).

Segment S10

Les séquences des segments 10 des sérotypes -1, -3, -4, -8 et -9 ont été déterminées (Van staden and Huismans, 1991 ; De Sa *et al.*, 1994). La longueur totale en nucléotides, des segments S10 varient de 737 (AHSV-9), 758 (AHSV-3 et -4) à 764 (AHSV-1 et -8) (Roy *et al.*, 1994 ; De Sa *et al.*, 1994). La taille du segment 10 de BTV-10 est de 822 nucléotides (Lee and Roy, 1987).

Les séquences des extrémités 5' terminales des virus de la peste équine -1, -3, -4 et -9 diffèrent de la séquence consensus des *Orbivirus* par la substitution d'un A par un T en position 4 (Tableau VI).

Tableau VI : Caractéristiques communes des séquences des extrémités 5' des gènes S10 des virus de la peste équine sérotypes 1, 3, 4, 8 et 9 et de la BT sérotype 10 (Van Staden and Huismans, 1991 ; De Sa *et al.*, 1994).

virus	taille de la région non codante (pb)	séquences de l'extrémité 5'	premier codon ATG		deuxième codon ATG	
			position séquences	position séquences	position séquences	position séquences
BTV-10	19	GUUAAA	20-22	GCCATGC	59-61	AAGATGA
AHSV-1	19	GUUUAA	20-22	GTCATGA	50-52	TATATGT
AHSV-3	19	GUUUAA	20-22	GTCATGA	50-52	ATGATGC
AHSV-4	19	GUUUAA	20-22	GTCATGA	53-55	AGTATGC
AHSV-8	19	GUUUAA	20-22	GTCATGA	50-52	TATATGT
AHSV-9	18	GUUUAA	19-21	GTCATGA	52-54	AGTATGC

Les résultats des comparaisons des séquences nucléotidiques des segments 10 des différents sérotypes sont résumés dans le tableau VII.

Tableau VII : Pourcentages de similitude entre les gènes 10 des virus de la peste équine -3, -4 et -9.

	AHSV-3	AHSV-4	AHSV-9
AHSV- 3	100%		
AHSV- 4	76%	100%	
AHSV- 9	74%	95%	100%

Ces résultats confirment les données publiées par Bremer *et al.* (1990) dont les études d'hybridation moléculaire indiquent un faible degré de similitude entre les sérotypes à l'exception des sérotypes 3 et 7.

L'initiation de la traduction des deux protéines NS3 et NS3A s'effectue à partir de deux codons ATG distants d'une trentaine de nucléotides (fig. n° 4) (Van Staden and Huismans, 1991).

Les régions non codantes des extrémités 3' ont une taille d'environ 90 nucléotides (88 pour AHSV-3 et -4 et 91 pour AHSV-1 et -8) alors que les autres gènes possèdent des régions non codantes plus courtes. La signification biologique de cette caractéristique n'est pas connue (Van Staden and Huismans, 1991 ; De Sa *et al.*, 1994).

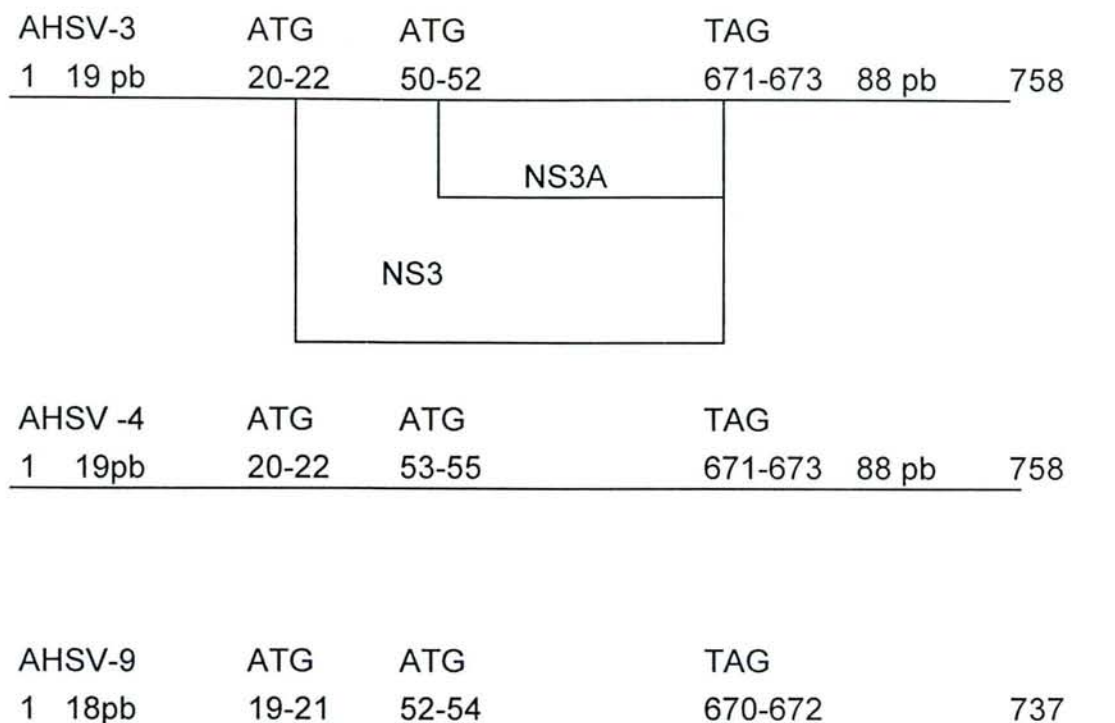


Fig. n° 4 : Organisation des gènes 10 des virus de la peste équine de sérotypes 3, 4 et 9.

Variabilité génomique des sérotypes

Les études d'hybridation moléculaire de Bremer *et al.* (1990) ont clairement démontré que les segments L1, L3, M4, M5 et S7 du virus de la peste équine sérotype 3 hybridait avec les gènes homologues des autres sérotypes et s'avéraient être conservés entre les sérotypes viraux. Des résultats similaires ont été obtenus avec les mêmes segments du virus de la peste équine sérotype 4 (Mizukoshi *et al.*, 1992 ; Mizukoshi *et al.*, 1994). Ainsi, L2 (VP2) et M6 (VP5) qui codent pour les protéines de capsid externe, sont les gènes les plus variables entre les neuf sérotypes du groupe AHSV. Les gènes S10 (NS3/NS3A) sont aussi fortement variables entre les sérotypes de AHSV alors que les gènes S10 homologues du groupe BTV sont plus conservés (Roy *et al.*, 1990 ; De Sa *et al.*, 1994).

2.1.1.2. Les protéines structurales

Le virus de la peste équine est constitué de sept protéines structurales :

- VP1, VP4 et VP6, trois protéines, qui avec les dix ARN bicaténaires et la protéine majeure VP7, forment le core viral,
- les deux protéines, VP2 et VP5, qui constituent la capsid externe.

Les protéines de capsid externe, VP2 et VP5

La protéine VP2

La protéine VP2, constituant majeur de la capsid externe, exposée à la surface de la particule virale, est un antigène spécifique de type (Bremer, 1976 ; Vreede and Huismans, 1994). Les anticorps neutralisant le virus de la peste équine sont induits par des épitopes localisés sur la protéine VP2. Le site de fixation du virus à son récepteur cellulaire serait situé sur VP2 (Burrage *et al.*, 1993 ; Martinez-Torrecedrada *et al.*, 1994). La comparaison des séquences en acides aminés, déduites des séquences nucléotidiques des segments génomiques L2 des souches sauvage et vaccinale du virus de la peste équine sérotype 4 (Iwata *et al.*, 1992a ; Sakamoto *et al.*, 1994a) permet d'établir les conclusions suivantes. Les deux séquences en acides aminés présentent 96% de similitude et ont des masses molaires de 124 057 Da (VP2, souche sauvage) et 123 017 Da (VP2, souche vaccinale). La protéine VP2, constituée de 1060 acides aminés, est une protéine hydrophile constituée de 32% d'acides aminés chargés positivement (arginine, lysine, histidine) ou négativement (acide aspartique, acide glutamique). La comparaison des séquences en acides aminés des protéines VP2 de AHSV-4 et BTV-10 (Iwata *et al.*, 1992b ; Mizukoshi *et al.*, 1994) (Tableau VIII) permet d'émettre l'hypothèse que ces protéines auraient eu un ancêtre commun puis qu'elles auraient évolué notamment sous l'influence de la pression de sélection du système immunitaire des hôtes respectifs de ces virus (Roy *et al.*, 1994). Seules, les extrémités carboxy-terminales de ces protéines sont conservées. Ces régions, non exposées à la surface du virion, pourraient être impliquées dans des interactions avec les protéines de capsid (notamment VP5 et VP7) (Roy *et al.*, 1994).

Tableau VIII : Comparaisons (exprimées en pourcentages d'acides aminés identiques) de quatre protéines structurales du virus de la peste équine sérotype 4 avec les protéines homologues de BTV-10 et EHDV-1 (Iwata *et al.*, 1992b).

	CORE				CAPSIDE EXTERNE			
	VP3		VP7		VP5		VP2	
	BTV-10 (%)	EHDV-1 (%)	BTV-10 (%)	EHDV-1 (%)	BTV-10 (%)	EHDV-1 (%)	BTV-10 (%)	EHDV-1 (%)
AHSV-4	58	57	44	46	45	43	17	20
EHDV-1	79	-	64	-	62	-	23	-

La protéine VP5

La protéine VP5 du virus de la peste équine est codée par le gène M6 alors que les protéines VP5 homologues des virus de la BT et de l'EHD sont codées par le gène M5 (Iwata *et al.*, 1991 ; Iwata *et al.*, 1992b). VP5 est constituée de 505 acides aminés (Iwata *et al.*, 1992a). Son poids moléculaire (56 780 Da pour la souche virulente, 56 793 Da pour la souche vaccinale) est inférieur à celui des protéines VP5 des virus de la BT sérotype 10 et de l'EHD sérotype 1 dont les masses molaires sont d'environ 59 kDa (Iwata *et al.*, 1992a). L'identité, notamment structurale, des deux protéines VP5 de AHSV-4 et BTV-10 est illustrée par les 45% d'acides aminés que ces deux protéines partagent (Sakamoto *et al.*, 1994a). Les protéines VP5 de AHSV-4, BTV-10 et EHDV-1 présentent des profils d'hydrophilicité identiques, caractérisés par la présence de trois régions hydrophiles dont l'une est située à l'extrémité carboxy-terminale. La protéine VP5 serait moins exposée à la surface de la particule virale que la protéine VP2 (Iwata *et al.*, 1992b).

Le segment M6 coderait pour la protéine VP5 (constituée de 505 acides aminés) dont le codon d'initiation, précédé d'une séquence consensus favorable de Kozak (1981, 1984) est situé en position 20-22 et pour une seconde protéine (formée de 479 acides aminés) dont le codon d'initiation est en position 98-100 (Grubman and Lewis, 1992 ; Sakamoto *et al.*, 1994a). Cette protéine est appelée VP6 par Grubman and Lewis (1992). Cependant, Burroughs *et al.* (1994), arguant du fait que cette protéine ne semble pas être l'homologue de la protéine VP6 codée par le segment S9 du virus de la BT, ont proposé de la nommer VP5' (ou VP5A). La nomenclature (segment M6 codant pour VP5) et VP6 codée par le segment S9 est celle qui est retenue pour le virus de la bluetongue. La protéine VP5' pourrait aussi être le produit de dégradation de VP5 par une protéase (Roy *et al.*, 1994).

Les anticorps induits par VP5 ne semblent pas neutraliser le virus de la peste équine *in vitro* (Roy *et al.*, 1994).

Les deux protéines majeures du core, VP3 et VP7

La protéine VP3

La protéine VP3 est une protéine de la capside interne. Elle possède des déterminants antigéniques spécifiques de groupe (Roy, 1992a; Iwata *et al.*, 1992b). Elle est codée par le gène L3, est composée de 905 acides aminés et possède une masse molaire estimée à 103 269 Da (Iwata *et al.*, 1992b). VP3 est la protéine la plus conservée entre AHSV-4, BTV-10 et EHDV-1 (tableau VIII).

La protéine VP7

La protéine VP7 (dont la masse molaire est de 38 107 Da) est codée par le gène S7. Elle constitue le composant majeur de la capsid interne du virus de la peste équine (Bremer, 1976 ; Roy *et al.*, 1991).

L'unique cadre de lecture ouvert du gène S7 du virus de la peste équine code pour un polypeptide de 354 acides aminés (possédant 5 acides aminés supplémentaires par rapport à la protéine homologue du virus de la BT sérotype 10) (Yu *et al.*, 1988 ; Roy *et al.*, 1991). Les séquences en acides aminés des protéines VP7 des deux virus de la peste équine de sérotypes 4 et 9 s'avèrent fortement conservées puisqu'elles possèdent 99,7 % d'identité (Wade-Evans *et al.*, 1993). La présence d'acides aminés tels que l'alanine, la méthionine et la proline confère à VP7 une grande hydrophobicité (Roy *et al.*, 1991). Cette protéine apparaît conservée entre les groupes BTV, EHDV et AHSV mais à un degré moindre que VP3 (tableau VIII).

VP7 est un antigène spécifique de groupe mais possède des déterminants antigéniques avec d'autres *Orbivirus*. Les protéines VP7 de AHSV et BTV possèdent au moins deux déterminants antigéniques communs (un site linéaire et un site conformationnel) (Chuma *et al.*, 1992). Ces deux protéines présentent une forte similitude notamment dans les régions amino- et carboxy-terminales (Roy *et al.*, 1991).

Les protéines mineures VP1, VP4 et VP6

Bien qu'il n'y ait que très peu de données sur les mécanismes de la transcription et de la réplication du virus de la peste équine, les homologies structurales entre les protéines VP1, VP4 et VP6 du virus équine avec celles du virus de la BT autorisent à extrapoler les informations disponibles pour ce dernier au virus de la peste équine. Ces trois protéines, dans le cas du virus de la BT, possèdent des activités enzymatiques (Roy *et al.*, 1992a).

La protéine VP1

Les nombreuses analogies entre les protéines VP1 des virus de la BT et de la peste équine (similitudes de masse molaire, de localisation dans le core, de séquences en acides aminés, la présence de motifs GDD communs aux polymérases...) permettent de suggérer que VP1 serait la transcriptase virale (Roy *et al.*, 1994).

La protéine VP4

Les extrémités 5' des ARN messagers viraux sont coiffés et méthylés pendant la transcription. Dans le cas du virus de la BT, il a été démontré que le complexe core-GTP, par l'intermédiaire de VP4, catalyse le "coiffage" de l'ARN messenger (Roy *et al.*, 1992a). La protéine VP4 homologue du virus de la peste équine serait l'enzyme qui catalyserait la fixation du GTP à l'ARN messenger (Mizukoshi *et al.*, 1993 ; Roy *et al.*, 1994).

La protéine VP6

La séquence nucléotidique du gène S9 du virus de la peste équine n'a, pour l'instant, pas été déterminée. La protéine VP6 du virus de la BT possède une séquence commune aux hélicases et fixe, avec une grande affinité, les ARN simple ou double brin (Roy *et al.*, 1992a). Une activité de ce type serait nécessaire pour dérouler les ARN db avant la synthèse des brins d'ARN complémentaires. VP6 interviendrait pendant la transcription mais aussi pendant l'encapsidation des ARN génomiques dans la particule virale (Roy *et al.*, 1994).

2.1.1.3. Les protéines non structurales

La protéine NS1

La protéine NS1, constituée de 584 acides aminés et de masse molaire 63 122 Da (Mizukoshi *et al.*, 1992 ; Grubman and Lewis, 1992) est codée par le gène M5. La protéine NS1 est très conservée au sein d'un même groupe. Par contre, des différences sont observées, en particulier au niveau des extrémités carboxy-terminales entre les protéines NS1 de AHSV, BTV et EHDV (Nel *et al.*, 1992) (tableau IX).

Tableau IX : Comparaison des séquences en acides aminés des protéines NS1 de différents *Orbivirus* (d'après Nel *et al.*, 1992).

	Pourcentage d'acides aminés identiques (%)
AHSV-4 / AHSV-9	98
AHSV-4 / EHDV-2	28
AHSV-4 / BTV-10	28
EHDV-2 / BTV-10	50

Les fonctions de la protéine NS1 du virus de la peste équine ne sont pas connues. Quant à la protéine homologue du virus de la BT, elle forme, dans le cytoplasme de la cellule infectée, des tubules (Huisman and Els, 1979). Ces tubules, de 68 nm de large, sont constituées de dimères de NS1 enroulés en hélice (Roy *et al.*, 1994). Des structures tubulaires, d'un diamètre de 18 nm, sont détectées dans le cytoplasme des cellules infectées par le virus de la peste équine. NS1, sous cette forme, serait impliquée dans la morphogenèse de la particule virale notamment du core (Eaton *et al.*, 1988). NS1, protéine non-structurale, a été détectée, en faible quantité, dans des particules virales purifiées (Eaton *et al.*, 1990).

La protéine NS2

La protéine NS2, codée par le gène S8, du virus de la peste équine sérotype-9 est constituée de 365 acides aminés et a une masse molaire de 41 197 Da (Van Staden *et al.*, 1991). La protéine NS2 de AHSV-9 ne présente que 33 % de similitude avec la protéine NS2 de BTV-10 et 35 % avec NS2 de EHDV-1 alors que les protéines NS2 de BTV-10 et EHDV-1 sont plus conservées (46 % de similitude)(Van Staden *et al.*, 1991).

NS2 du virus de la BT est une phosphoprotéine capable de se fixer aux ARN simple brin (Thomas *et al.*, 1990 ; Theron *et al.*, 1994). L'analyse de sa séquence en acides aminés indique que la protéine NS2 de AHSV semble posséder un domaine de fixation similaire en région amino-terminale (Van Staden *et al.*, 1991).

La fonction de cette protéine est peu connue. NS2 est le constituant majeur des corps d'inclusion qui apparaissent dans le cytoplasme des cellules infectées (par BTV, EHDV ou AHSV) 4 à 8 heures après l'infection. Elle favoriserait la traduction des ARN messagers des protéines du core au sein de ces corps d'inclusion (Hyatt *et al.*, 1992).

La protéine NS3

Le gène S10 code, à partir de deux codons d'initiation situés dans le même cadre de lecture, pour deux protéines NS3/NS3A (Van Staden and Huisman, 1991) ou NS4/NS4A (Grubman and Lewis, 1992). Les protéines NS3 des cinq sérotypes (AHSV-1, -3, -4, -8 et -9) dont les séquences en nucléotides des gènes S10 ont été déterminées, sont formées de 217 acides aminés (AHSV-3, -4 et -9) ou de 218 acides aminés (AHSV-1 et 8) (De Sa *et al.*, 1994 ; Van Staden and Huisman, 1991).

La qualité et la quantité des différents acides aminés qui composent ces cinq protéines (acides aminés polaires, non polaires, acides, basiques...) sont identiques (tableau X).

Tableau X : Comparaison des séquences en acides aminés des protéines NS3/NS3A des virus de la peste équine des cinq sérotypes -1, -3, -4, -8 et -9 (d'après De Sa *et al.*, 1994).

AHSV	Pourcentage d'acides aminés identiques				
	1	3	4	8	9
1					
3	65				
4	65	75			
8	99	65	65		
9	65	76	95	65	

Cependant, les variations des séquences nucléotidiques entre les gènes S10 des cinq sérotypes AHSV-1, -3, -4, -8 et -9 sont beaucoup plus importantes que les variations des gènes S10 homologues entre les sérotypes de BTV, EEV (Equine Encephalosis Virus) ou Palyam (De Sa *et al.*, 1994).

Les fonctions de ces protéines ne sont pas connues. Cependant, Hyatt *et al.* (1991) ont montré que NS3/NS3A (du virus de la BT) étaient associées avec des vésicules d'exocytose et la membrane cellulaire. Ces protéines NS3, glycosylées, favoriseraient la fusion des vésicules de transport avec la membrane plasmique et la libération des particules virales par bourgeonnement, hors de la cellule infectée (Hyatt *et al.*, 1993).

Bien que les protéines NS3 de AHSV et BTV ne partagent que 25 à 30% de similitude, une région située entre les acides aminés 40 à 100 des deux protéines présentent une très forte similitude. Cette région commune pourrait être impliquée dans la fonction de cette protéine (Van Staden and Huismans, 1991).

2.1.2. Réplication du virus de la peste équine

Le cycle de multiplication du virus de la peste équine est, à l'heure actuelle, inconnu mais les données disponibles sur les stratégies de réplication du réovirus et du virus de la fièvre catarrhale du mouton permettent, par extrapolation, de proposer le modèle suivant.

Le cycle de réplication est rapide puisque 8 à 10 h après inoculation d'une culture de cellules MS ou Vero à haute multiplicité d'infection à 37 °C, le virus est décelé dans le surnageant de culture (Breese and Ozawa, 1969 ; Ozawa, 1967). A cette phase d'éclipse, succède une phase de croissance exponentielle jusqu'à la 24ème heure. Le titre viral continue à augmenter et atteint son maximum à la 72ème heure. Le titre diminue ensuite régulièrement jusqu'au 3ème jour. Le virus

se multiplie dans le cytoplasme cellulaire et engendre un effet cytopathique peu caractéristique.

2.1.2.1. Adsorption et pénétration du virus

L'attachement du virion à la membrane cellulaire s'effectuerait par l'intermédiaire de la protéine VP2 (Purdy *et al.*, 1985 ; Burrage *et al.*, 1993). Le récepteur cellulaire n'est pas identifié. Cependant, l'étude des interactions entre le virus de la fièvre catarrhale du mouton (BTV) et les érythrocytes indique que le virus se fixerait par l'intermédiaire de la protéine VP2 à des glycoprotéines (les glycophorines) présentes à la surface des hématies d'origine humaine et animale (Eaton and Crameri, 1989).

Le virus se fixe à son récepteur localisé dans la membrane cellulaire dans un site caractérisé par la présence de molécules de clathrine. La membrane cellulaire s'invagine alors produisant une vésicule (appelée "coated-pit") dont la surface externe est recouverte de clathrine.

Un mode de pénétration directe du virus de la BT dans la cellule cible a été décrit pour les particules infectieuses subvirales (qui résultent de la digestion du virion, *in vitro*, par la chymotrypsine et qui contiennent les produits de clivage de la protéine VP2) et les cores viraux (particules virales ne contenant pas les protéines externes VP2 et VP5)(Mertens *et al.*, 1987 ; Burroughs *et al.*, 1992). Les particules infectieuses subvirales et les cores sont 100 à 500 fois plus infectieuses pour les cellules d'insectes (*Aedes albopictus*) que pour les cellules de Mammifère et sont 100 fois plus infectieuses pour les cellules d'insectes que les particules virales intactes (Mellor, 1990).

2.1.2.2. La décapsidation

Les vacuoles d'endocytose fusionnent avec des lysosomes. Huisman *et al.* (1987) ont montré que 1 heure après pénétration du virus de la BT dans la cellule, la capsid externe contenant les protéines VP2 et VP5 a été hydrolysée. Cette décapsidation est nécessaire à l'activation de la transcriptase virale (Huisman *et al.*, 1987 ; Roy and Gorman, 1990).

2.1.2.3. Transcription du génome viral

L'initiation de la transcription est effectuée dans les virions décapsidés mais, en ce qui concerne le réovirus, aucune étude n'a permis de préciser si les virions restaient dans les vésicules lysosomiales ou traversaient les membranes

cellulaires. La seconde hypothèse est la plus probable car la présence de ribonucléases, de phosphatases et l'absence de nucléotides triphosphates dans les endosomes constituent des facteurs défavorables à une éventuelle transcription.

La protéine VP1 du virus de la fièvre catarrhale, homologue à la protéine VP1 du virus de la peste équine, serait l'ARN polymérase ARN dépendante. Elle est présente à une concentration de six molécules par virion (Roy *et al.*, 1988). La température optimale d'activité de la transcriptase du virus de la BT est de 28°C alors que celle du réovirus est de 47 à 52°C (Kapuler, 1970). Cette propriété est à relier avec le fait que le virus de la BT (comme le virus de la peste équine) est transmis par des insectes dans lesquels il se réplique.

Les brins négatifs des ARN db sont transcrits en ARN messagers précoces. La transcription précoce est définie comme l'étape de transcription se déroulant dans le core viral et produisant des ARNm coiffés qui permettront la synthèse de protéines et serviront de matrice à la synthèse des ARN négatifs.

Les ARNm précoces sont coiffés et polyadénylés. La protéine VP4 serait, toujours chez le virus de la fièvre catarrhale, la guanilyl-transférase (Le Blois *et al.*, 1992). Les ARNm synthétisés à l'intérieur du core, quitteraient celui-ci selon un mécanisme encore mal connu qui impliquerait un changement de conformation du core viral.

2.1.2.4. Réplication des ARN double brin

Les ARN génomiques négatifs sont synthétisés à partir des ARN positifs préalablement transcrits. Cette synthèse s'effectue simultanément à la formation des particules provirales. La protéine NS2, une phosphoprotéine, se fixe sur les ARN simples brins et interviendrait dans la réplication. Les brins complémentaires ainsi synthétisés restent associés sous forme d'ARN double brin.

Les mécanismes par lesquels les dix ARN db génomiques s'associent ensemble à l'intérieur de chaque particule virale en formation restent inconnus. Les protéines VP6/VP6a du virus de la fièvre catarrhale, produits de traduction du segment 9 et qui possèdent des séquences en acides aminés communes à celles des hélicases, pourraient jouer un rôle dans l'encapsidation des ARN db (Roy, 1992b).

2.1.2.5. Traduction des ARNm

Deux heures après l'infection de la cellule, des protéines d'origine virale peuvent être détectées dans le cytoplasme. Cette production de protéines virales s'effectue aux dépens de la synthèse des protéines cellulaires. L'inactivation,

inexpliquée, de la protéine VP4 responsable du phénomène de coiffe des ARNm, explique l'arrêt de la traduction des ARNm coiffés (traduction "coiffe dépendante") aux profits de la traduction des ARNm tardifs non coiffés (traduction "coiffe indépendante"). Ces derniers codent pour des protéines structurales.

2.1.2.6. Assemblage des virions

L'étude des produits d'expression en système eucaryote des protéines structurales VP2, VP3 et VP5 du virus de la fièvre catarrhale (Liu *et al.*, 1992 ; Roy, 1992b) permet de proposer le schéma d'assemblage suivant.

Les protéines VP3 synthétisées forment, dans le cytoplasme une particule instable à géométrie icosaédrique. Les trois protéines VP1, VP4 et VP6 interagissent avec cette structure dans laquelle les ARN double brin sont encapsidés. La protéine VP7, sous forme de trimère, se fixe à la surface de cette capsid interne, puis les protéines VP2 et VP5 constituent, dans une dernière étape, la capsid externe.

Le cytoplasme des cellules infectées par les *Orbivirus* contient des tubules caractéristiques composées de protéines NS1 polymérisées auxquelles seraient associées les protéines VP3 et VP7. La fonction exacte de ces tubules est inconnue (Huisman and Els, 1979) mais elles pourraient être impliquées dans les mécanismes de transfert intra-cellulaire car elles semblent être associées aux protéines du cytosquelette (Roy, 1992b).

2.1.2.7. Libération des virions

Les particules virales sont associées aux filaments du cytosquelette via les protéines VP2 et/ou VP5 et transportées vers le système membranaire de la cellule (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi). Les protéines NS3 et NS3A sont ancrées dans les membranes des vésicules intracellulaires et dans la membrane cellulaire. Ces deux protéines permettraient la fixation et le transport des particules virales dans les compartiments membranaires de la cellule et favoriseraient la libération des virions par bourgeonnement.

2.1.2.8. Réassortiment de segments génomiques

Des échanges de segments génomiques peuvent se produire lors d'infections simultanées d'une cellule par deux *Orbivirus* d'un même groupe mais de sérotype différent (Gorman *et al.*, 1978). La fréquence de réassortiment des gènes est variable : certains gènes, soumis à une forte pression de sélection, sont

plus fréquemment échangés que d'autres (Gould and Hyatt, 1994). Ce phénomène de réassortiment participe à l'évolution génétique des *Orbivirus*.

En ce qui concerne le virus de la peste équine, O'Hara *et al.* (1995) ont récemment obtenu, *in vitro*, des virus réassortants par co-infection de cellules par les virus des sérotypes 3 et 8. Laegreid *et al.* (1995) ont obtenu des réassortants entre deux souches de virus de sérotype 4. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur l'importance et la fréquence de ces réassortiments dans la nature.

2.2. SYMPTOMATOLOGIE

L'incubation est de durée variable selon la virulence de la souche et la réceptivité de l'équidé mais est, en moyenne, de 3 à 15 jours (Theiler, 1930).

La maladie survient après une poussée fébrile irrégulière et progressivement ascendante. Elle peut évoluer sous des formes quelque peu différentes selon la prédominance de l'atteinte pulmonaire ou cardiaque.

Forme pulmonaire :

C'est la plus grave et la plus dramatique : l'évolution aiguë ou suraiguë (parfois foudroyante) sur les animaux les plus réceptifs contaminés par une souche très pathogène (Mornet et Gilbert, 1968).

Elle débute par une ascension thermique rapide (41 à 42° C en 2 à 4 jours), associée à une accélération du rythme cardiaque, à une congestion des muqueuses (parfois des pétéchies), à une anorexie plus ou moins brutale. Une sudation, diversement localisée (naseaux, base des oreilles, faces latérales de l'encolure, aine, anus...) peut-être notée chez certains sujets.

Soudainement, le rythme respiratoire s'accélère, la dyspnée s'installe : le faciès est angoissé, les naseaux dilatés, la langue pendante. Le sujet se tient immobile, la tête tendue sur l'encolure, les antérieurs écartés, le dos voûté. La tachycardie devient manifeste, le pouls très discret.

La difficulté respiratoire s'accroît rapidement et un jetage séreux vient encombrer les naseaux : une toux forte, spasmodique et douloureuse, secoue l'animal. Très vite sa fréquence augmente et elle se transforme en quintes prolongées irrépressibles. Le jetage prend alors un aspect spumeux de "blanc d'oeuf en neige" par suite de son brassage avec l'air dans les voies respiratoires.

A ce stade, l'animal maintient avec peine son équilibre, il se couche ou tombe brutalement et meurt par asphyxie sans agitation. Dans les minutes qui précèdent la mort, de grandes quantités de jetage mousseux s'écoulent parfois des naseaux. Chez certains sujets, entre l'apparition de la dyspnée et la mort, s'écoule moins d'une 1/2 heure mais en général l'issue fatale se produit en 24 à

48 heures. Lors d'évolution plus lente, la guérison est possible mais exceptionnelle.

Forme oedémateuse ou cardiaque :

Elle se rencontre sur les individus plus résistants ou infectés par une souche de pouvoir pathogène plus faible (Brown and Mebus, 1992). Cette forme clinique a fréquemment été rencontrée lors de l'épizootie qui frappa l'Espagne en 1988 (Rodriguez *et al.*, 1993).

La poussée thermique initiale est ici plus progressive et moins intense (acmé à 39 et 40°C atteint en 10 à 12 jours). Elle se maintient ensuite en plateau ou le plus souvent, diminue progressivement. Les signes généraux sont plus discrets et l'appétit peut être conservé.

Vers le 14-15ème jour, alors que la baisse de température est amorcée, apparaissent des oedèmes sous-cutanés. Ils débutent dans les fosses temporales : déformation en saillie de la région sus-orbitale qui peut atteindre le volume d'une mandarine en 3 à 4 jours (la précocité d'apparition de ces oedèmes en cours de phase fébrile est un élément de gravité du pronostic).

Parfois, ce gonflement disparaît en quelques jours. Il peut cependant persister, s'étendre et atteindre les paupières (qui, tuméfiées, se ferment avec parfois éversion de la conjonctive), le globe oculaire (qui, exorbité par l'oedème sous-jacent, fait saillie et devient fixe -un larmolement abondant souille les joues-), la région des masséters et intermandibulaire, le chanfrein, les naseaux et parfois le larynx (d'où cornage). La tête présente alors un aspect tuméfié (tête d'hippopotame ou "dikkop" en langue vernaculaire). Dans certains cas, l'oedème peut aussi envahir l'encolure et descendre le long des membres antérieurs (Borkovec, 1966). Il s'agit d'un oedème froid, indolore, ferme au début ; le signe du godet n'apparaît qu'en quelques jours .

Simultanément apparaissent des signes cardiaques : lorsque les oedèmes sont constitués, les bruits du coeur deviennent plus faibles en raison de la formation d'une péricardite exsudative. Le pouls, jusque là fort et bien frappé, devient filiforme et imperceptible.

Dans les cas graves, le processus oedémateux peut s'étendre à l'appareil respiratoire (accélération du rythme, dédoublement de l'expiration), mais la dyspnée n'est jamais aussi intense dans la forme pulmonaire, la toux et le jetage demeurent absents.

Le sujet, jusque là apathique, finit par se coucher ; l'apparition de sueurs froides, le refroidissement des oreilles, des mouvements désordonnés (simulant des coliques) et une détresse respiratoire annoncent l'arrêt plus ou moins brutal du coeur.

L'évolution mortelle se fait en 3 à 10 jours après développement des oedèmes sous-cutanés. La guérison peut survenir quelle que soit l'importance des oedèmes sous-cutanés.

Forme mixte :

Dans ce cas, les signes pulmonaires et les oedèmes sous-cutanés apparaissent simultanément ou successivement dans un ordre indéterminé (Montilla and Marti, 1968). La défaillance cardiaque ou l'asphyxie emporte le malade. De 1989 à 1990, en Espagne, cette forme fut la plus répandue (Rodriguez *et al.*, 1993).

L'examen nécropsique révèle la coexistence très fréquente de l'atteinte pulmonaire et cardiaque malgré un tableau clinique plus sélectif.

Formes atypiques :

Peuvent parfois être rencontrées :

- des formes nerveuses marquées par une vive agitation, des contractures, des convulsions en rapport avec un oedème des centres nerveux.

- des formes fébriles pures (frustes, parfois inapparentes) sur des sujets bénéficiant d'un certain degré d'immunité (région d'enzootie ou de prophylaxie médicale active), ou sur des races peu réceptives (chevaux de l'ouest africain, mulets, ânes).

Une réaction thermique (hyperthermie à 40°-41 °C), accompagnée d'une légère polypnée et tachycardie, d'inappétence et de nonchalance, s'estompe en 10 à 15 jours avec retour à un habitus normal.

Complications :

Elles risquent de venir assombrir le pronostic (Mornet et Gilbert, 1968) :

- paralysie de l'oesophage rencontrée dans les formes oedémateuses graves,

- paralysie du nerf optique (amaurose bilatérale),

- hémoparasitoses : piroplasmose, trypanosomiase... qui peuvent venir altérer le tableau clinique ou aggraver brutalement une forme fébrile pure.

La peste équine chez le chien :

Certains auteurs ont reproduit, chez le chien, une maladie semblable à celle décrite chez le cheval (Theiler, 1910 ; Lew, 1911). Cependant, les doses et voies d'administration utilisées expérimentalement (voie intra-veineuse, intra-cérébrale,

sous-cutanée) ne permettent pas d'expliquer de façon définitive le rôle du chien dans l'épidémiologie de la peste équine. De plus, d'autres auteurs (Dardiri and Ozawa, 1969), après inoculation à 18 chiens par voie orale, oculaire, ou intracérébrale, d'une souche neurotropicque du virus de la peste équine sérotype 2 n'ont observé aucun signe clinique. Neuf animaux sur 18 ont présenté une virémie transitoire.

Pronostic :

A l'échelon individuel, le pronostic dépend de la forme clinique :

- la forme pulmonaire : le pronostic est très défavorable, la mort étant annoncée par l'apparition du jetage spumeux. La guérison est exceptionnelle.

- la forme cardiaque : il est plus nuancé (possibilité de guérison) mais, même lors de réaction fébrile modérée, d'apparition tardive d'oedèmes localisés, des complications cardiaques graves peuvent toujours survenir et s'accompagner d'insuffisance avec dyspnée d'effort persistante.

A l'échelon national : le pronostic peut être désastreux pour un pays nouvellement infecté où le virus trouve un "terrain" particulièrement favorable à l'expression de sa contagiosité et de son agressivité. La disparition d'un grand nombre d'équidés (parfois de grande valeur) s'accompagne de conséquences économiques graves pour le sport hippique et pour l'agriculture de certaines régions peu motorisées. De plus, il faut toujours redouter la création d'un cycle épidémiologique assurant une infection locale pérenne, imposant le recours à une prophylaxie permanente dispendieuse en l'absence de thérapeutique spécifique efficace.

2.3. LES LESIONS

2.3.1. Macroscopiques

Le tableau nécropsique est de type septicémique à dominante oedémateuse respiratoire et cardiaque (Brown and Mebus, 1992).

Forme pulmonaire :

Les lésions essentielles intéressent la cavité thoracique qui, à l'ouverture, apparaît totalement remplie par des poumons turgescents.

La plèvre viscérale est luisante, humide, épaissie, parfois semée de pétéchies et présente des plaques gélatineuses ou fibrineuses, surtout près de la base du coeur et autour des vaisseaux du hile.

Le parenchyme pulmonaire est ferme, très humide, d'aspect irrégulier, bosselé en raison de la saillie des cloisons interlobulaires gorgées de sérosité. Des foyers emphysémateux déforment son bord ventral, une sérosité claire, rose pâle, sourd abondamment à la coupe et un liquide blanc mousseux s'échappe à la pression.

Les bronches, la trachée, le larynx et les cavités nasales sont encombrés d'une spumosité blanchâtre recouvrant une muqueuse congestionnée porteuse de pétéchies.

Les noeuds lymphatiques sont hypertrophiés, infiltrés, enrobés d'un oedème gélatineux qui s'étale dans le médiastin, porteur de suffusions ou d'écchymoses et remonte dans la gouttière oesophagienne.

La cavité pleurale renferme un épanchement clair, jaunâtre, plus ou moins abondant (quelques millilitres à plusieurs litres).

La muqueuse de l'estomac, au niveau du cul de sac glandulaire et de la région pylorique est épaissie par l'oedème, congestionnée (de façon diffuse ou par plaque) et des lésions hémorragiques (notamment en région fondique).

Le foie, la rate, les reins sont congestionnés, tuméfiés à des degrés divers.

Forme cardiaque :

Les lésions essentielles intéressent le conjonctif sous-cutané et l'appareil cardio-vasculaire.

Au niveau des tuméfactions, le tissu conjonctif et conjonctivo-adipeux est imprégné d'une sérosité gélatineuse pouvant infiltrer les différents tissus ou espaces de la tête, de l'encolure et de la région axillaire. La section des muscles de la tête et du cou laisse exsuder un liquide jaunâtre même en région profonde.

En revanche, une péricardite exsudative bien développée est de règle. La graisse épicaudique d'aspect hémorragique peut être remplacée par un oedème gélatineux. L'épicarde et l'endocarde sont le siège d'hémorragies diffuses ou localisées. Ces dernières se retrouvent au sein du myocarde présentant des oedèmes et une myosite dégénérative avec des zones de nécrose focale.

Les lésions digestives, hépatiques, spléniques et rénales sont identiques à celles de la forme pulmonaire mais souvent plus accusées.

Forme mixte :

Cette forme est caractérisée par la coexistence de lésions pulmonaires, cardiaques, oedémateuses et digestives précédemment décrites.

2.3.2. Microscopiques

Il n'existe aucune lésion microscopique caractéristique de la peste équine en dehors des lésions histologiques de congestion, d'œdème et d'hémorragie en rapport avec les lésions macroscopiques.

2.4. PHYSIOPATHOLOGIE

Après l'inoculation et la phase d'infection latente qui caractérise la période d'incubation, le virus apparaît rapidement dans le sang, intimement lié aux hématies et, d'emblée, à forte concentration. Cette virémie précoce et intense, propice à une transmission vectorielle, est contemporaine d'une réaction thermique d'amplitude variable.

Le virus se multiplie dans les cellules endothéliales (Laegreid *et al.*, 1992 ; Skowronek *et al.*, 1995). L'action (directe ou indirecte) du virus se traduit par une fragilisation inflammatoire des parois capillaires s'accompagnant d'une augmentation de la perméabilité vasculaire avec transsudation du plasma dans les tissus et les cavités ; ce phénomène est particulièrement grave au niveau du parenchyme pulmonaire (œdème, jetage mousseux, asphyxie) et du cœur (défaillance cardiaque).

La rapide montée du taux des anticorps neutralisants (dès le 9^{ème} jour) expliquerait la disparition rapide du virus ou sa détection rapidement difficile. Ces mêmes anticorps, supports essentiels de l'immunité faisant suite à la guérison, se transmettent naturellement de la mère au poulain par ingestion de colostrum. Le taux maximum d'anticorps est atteint chez ce dernier vers la 30^{ème} heure. La protection passive ainsi conférée se révèle efficace jusqu'à l'âge de 5 à 6 mois.

2.5. EPIDEMIOLOGIE

La peste équine est enzootique sur le continent africain au sud d'une ligne allant du Sénégal et de la Gambie à l'ouest, à l'Éthiopie à l'est et jusqu'en Afrique du sud (fig. n° 5).

La plus ancienne description de la peste équine semble être l'affection décrite dans un manuscrit arabe, le "Kitâb el Akouâl el Kafiah wa el Foucouîl ef Charfiah" (Livre des dissertations suffisantes et des sections satisfaisantes) écrit vers l'an 728 de l'Hégire (1327-1328 de notre ère) (Mornet et Gilbert, 1968). A ce moment sévit au Yémen, une épizootie meurtrière qui décime la population de chevaux et mulets. La soudaineté de l'apparition et la rapidité de l'évolution de la peste sont confirmées par cette anecdote : un acheteur débat le prix du cheval

avec le vendeur ; pendant ce temps, l'animal tombe, un jetage s'écoule des naseaux et il meurt.

La peste a tendance à se répandre hors de ses zones d'enzootie habituelles et provoque dans les régions où elle apparaît, des flambées épizootiques meurtrières. Trois de ces épizooties ont provoqué des pertes considérables : l'épizootie de 1943-1944 en Egypte et en Palestine, l'épizootie de 1959-1960 au Moyen orient et en Asie du sud-est qui provoqua la mort de 300 000 équidés (l'Iran, l'Irak, le Pakistan, l'Inde, la Turquie, le Liban et Chypre ont été infectés) et en 1965-1966 dans le Maghreb. En 1965, la peste équine apparut au Maroc puis s'étendit à l'Algérie, la Tunisie et traversa le détroit de Gibraltar en 1966. L'épizootie, provoquée par le virus sérotype 9 (Montilla and Marti, 1968), a rapidement été jugulée grâce aux mesures de vaccination et de police sanitaire. L'Europe et l'Afrique du Nord restèrent indemnes jusqu'en 1987 où un foyer, causé par le virus sérotype 4, a été confirmé dans la province de Madrid (Lubroth, 1988). Malgré les mesures d'abattage et de vaccination (38 000 équidés vaccinés) (Mellor, 1993), une recrudescence de peste équine fut observée dans le sud de l'Espagne (Plateau, 1989), dans la province d'Andalousie, l'année suivante. En 1989, la peste traversa la frontière portugaise et, comme elle l'avait fait 24 ans auparavant, le détroit de Gibraltar (mais cette fois, dans l'autre sens !).

Mellor (1991) estime à 2000 le nombre d'équidés morts de peste pendant cette année 1989. Les mesures de lutte appliquées en Espagne et au Portugal ont permis à ces deux pays d'éradiquer la peste en 1991 (les derniers cas ont été répertoriés en 1990).

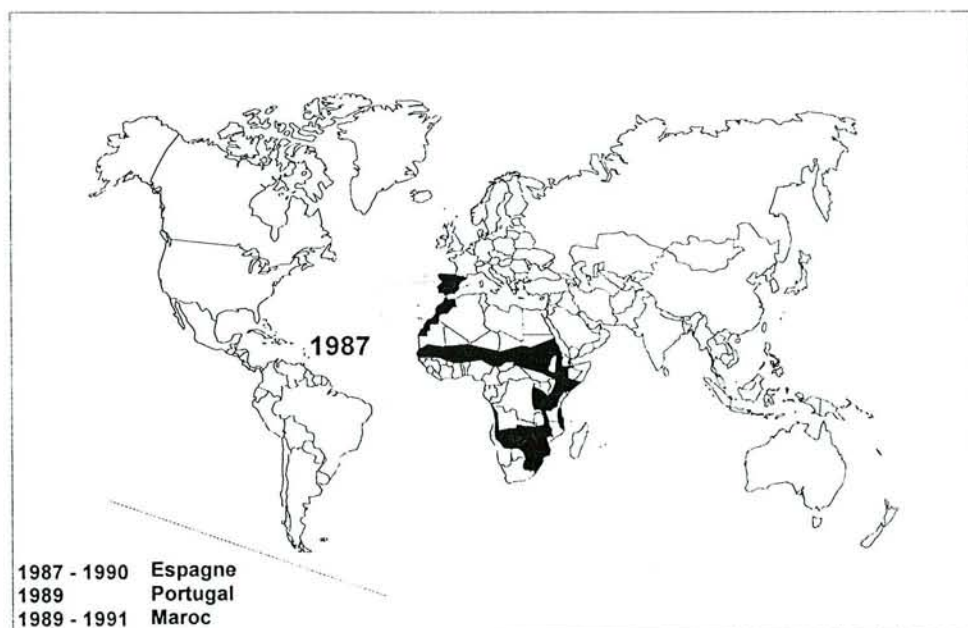


Fig. n° 5 : Répartition géographique de la peste équine.

2.5.1. Analytique

Modalités de la transmission :

A l'exception du cas particulier des canidés contaminés par ingestion de produits virulents (viandes ou abats d'équidés infectés), la peste équine se transmet chez les équidés, de façon indirecte par l'intermédiaire d'arthropodes hématophages. De nombreux vecteurs semblent potentiellement capables de transmettre la peste équine (notamment les moustiques des genres *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* ou les tiques des genres *Hyalomma* ou *Rhipicephalus*) (Mellor, 1993). Cependant, le vecteur biologique majeur s'avère être un insecte du genre *Culicoïdes* (Du Toit, 1944). Le virus a été isolé de l'espèce *Culicoïdes imicola* au Zimbabwe (Blackburn *et al.*, 1985) et en Espagne (Mellor *et al.*, 1990a). Les espèces de *Culicoïdes* (*C. imicola*, *variipennis*, *obsoletus* et *pulicaris*), dont le rôle dans la transmission de la peste est prouvé ou très fortement suspecté, sont aussi impliquées dans la transmission de la fièvre catarrhale du mouton (Mellor *et al.*, 1990b).

Le rôle quasi-exclusif des arthropodes hématophages confère à l'épidémiologie de la peste équine ses aspects particuliers.

2.5.2. Synthétique

Evolution dans le temps

Elle est directement liée aux périodes d'activité des vecteurs en saison chaude et humide:

- région subtropicale : après la saison des pluies
- région tempérée : dès le printemps, jusqu'à la fin de l'automne (disparition aux premiers froids).

Evolution dans l'espace

Elle est tributaire des zones de pullulation des vecteurs. Elle se rencontre surtout dans les régions basses et humides (marécages, bords des fleuves et cours d'eau), dans la proximité des points d'eau, là où le couvert végétal entretient les conditions d'hygrométrie favorables au développement des larves et à la survie des adultes (dans certaines régions chaudes et marécageuses d'Ethiopie, elle peut sévir toute l'année).

Réceptivité et sensibilité

Ces deux caractéristiques du terrain, conditionnant l'apparition de la maladie, sont dominés par la notion d'espèce : dans les conditions naturelles, mis à part la contamination accidentelle des canidés, la peste équine affecte seulement les équidés, surtout le cheval, de loin le plus sensible (formes aiguës et suraiguës le plus souvent mortelles), puis le mulet et le bardot (formes le plus souvent curables), enfin l'âne (forme volontiers inapparente).

La race joue aussi un rôle non négligeable : les races importées sont beaucoup plus réceptives et sensibles que les races locales et ne semblent pas acquérir de résistance, même après plusieurs générations en région infectée.

Réservoir de virus

L'apparition explosive de la maladie certaines années, supposant la contamination simultanée d'un grand nombre d'insectes avant l'apparition des premiers cas équins, plaident en faveur de l'existence d'un réservoir de virus présentant une virémie (persistante ou à éclipse). Les équidés ne seraient que les révélateurs d'une virose entretenue à bas bruit chez au moins un hôte différent. La nature de ce réservoir demeure encore inconnue.

Certains arguments permettent d'étayer cette hypothèse :

- l'absence de porteur chronique chez les équidés introduits (virémie fugace),
- l'apparition spontanée de la peste équine chez des équidés introduits dans des régions jusque là totalement dépourvues de ces animaux,
- la persistance dans certaines régions (Afrique du Sud) de types de virus anciennement isolés malgré une immunisation massive et répétée des équidés contre ces derniers (Mornet et Gilbert, 1968).

La persistance de la peste en Espagne pendant 4 ans pourrait, d'après Mellor (1993), s'expliquer par la capacité de survie de *C. imicola* pendant l'hiver, saison particulièrement tempérée dans le sud de l'Espagne.

En l'absence d'un réservoir vertébré identifié et d'une transmission transovarienne chez les *Culicoïdes* (Mellor, 1993), le virus équine ne pourra survivre que par le biais de cycles ininterrompus de transmission entre ses hôtes vertébrés et invertébrés. Ainsi, le virus de la fièvre catarrhale par exemple, infecte les ruminants qui, en général, constituent des populations nombreuses (d'où la forte probabilité qu'un culicoïde pique un bovin virémique) et chez lesquels la durée de la virémie peut atteindre 70 à 100 jours (Nevill, 1971). Cette longue durée de la virémie constitue un mécanisme de survie du virus de la BT, notamment dans les régions dont les conditions climatiques empêchent l'activité des insectes vecteurs pendant 2 à 3 mois de l'année.

Dans le cas de la peste équine, les conditions climatiques qui règnent en Afrique sub-saharienne permettent une survie permanente des vecteurs tout au long de l'année. Par contre, les épizooties successives (de 1987 à 1990) en Espagne nécessitent que le virus ait survécu pendant les mois d'hiver.

Ainsi, le virus pourrait circuler entre la population d'insectes vecteurs dont la densité est excessivement réduite pendant la saison froide et la population d'ânes ou de mules dont la virémie est plus longue que chez le cheval (Mellor, 1993). La durée maximale de la virémie chez le cheval est 18 jours (Mellor, 1993). Venter *et al.* (1992) ont étudié la virémie du virus équine chez l'âne. Ces auteurs ont inoculé 16 ânes avec les trois sérotypes -1, -3 et -5 du virus de la peste équine. Les virus de sérotypes 1 et 3 n'ont été détectés que le 8ème jour et à des titres inférieurs à 10^2 DCP50/ml. Le virus de la peste équine sérotype 5 a été détecté du premier au septième jour à un titre identique. Cependant, l'isolement de virus à partir du sang s'avère difficile notamment lorsque les titres viraux sont faibles et, comme l'indique Lubroth (1992), il est probable que la durée de la virémie chez l'âne européen (*Equus asinus*) et africain (*Equus asinus africanus*) soit du même ordre de grandeur que chez le zèbre (de 10 à 27 jours)(Erasmus *et al.*, 1978).

La détermination de la durée de la virémie chez l'hôte dépend de la sensibilité de la méthode utilisée pour détecter le virus. Ainsi, Mac Lachlan *et al.* (1994) ont étudié la durée de la virémie de BTV sérotype 10 chez sept veaux inoculés expérimentalement. Le sang des animaux était prélevé chaque semaine pendant 24 semaines et le virus y était recherché par inoculation à des oeufs embryonnés, à des insectes vecteurs ou le génome viral détecté par PCR. Le génome du virus de la BT est détecté dans le sang par PCR jusqu'à la 20ème semaine, pendant 2 à 8 semaines par inoculation aux oeufs et pendant deux semaines par inoculation aux vecteurs.

De même, il est possible que le virus équine puisse persister en quantité difficilement détectable par les méthodes classiques d'isolement du virus, dans le sang des ânes ou des mulets. La capacité de survie des moucheron adultes (*C. imicola*) pendant la saison froide en région méditerranéenne (Mellor, 1993) ainsi qu'une longue durée de la virémie chez les ânes et les mulets sont des facteurs qui seraient susceptibles d'expliquer le maintien du virus de la peste équine pendant la période hivernale. Au niveau épidémiologique, cette hypothèse pourrait s'avérer particulièrement importante au Maroc où la population d'équidés est constituée de deux millions de têtes comprenant 80% d'ânes et de mulets et 20% de chevaux (Mellor, 1994).

2.6. DIAGNOSTIC

Bien que les symptômes et lésions de la peste équine ne soient pas pathognomoniques, les tableaux clinique et nécropsique ainsi que le caractère épizootique de la maladie permettent d'orienter le diagnostic. Cependant, le recours au laboratoire est nécessaire pour confirmer le diagnostic et identifier le sérotype du virus.

2.6.1. Isolement du virus

Il doit être tenté le plus tôt possible ; si la virémie atteint un titre maximum pendant la période fébrile initiale, les chances d'isolement diminuent dès l'apparition et l'évolution des signes cliniques (Mornet et Gilbert, 1968).

L'isolement du virus est classiquement effectué :

- par inoculation à des cultures de cellules

Le virus peut être isolé à partir d'échantillon de tissu splénique, de cœur ou, chez l'animal virémique, de sang (Mirchamsy and Taslimi, 1963 ; Ozawa and Hazrati, 1964). Différentes lignées cellulaires permettent la multiplication du virus équine : BHK (cellules de rein de jeune hamster), MS (cellules de rein de singe *Maccacus rhesus*) ou cellules Vero (cellules de rein de singe vert africain, *Cercopithecus oethiops*).

- par inoculation aux souriceaux nouveau-nés par voie intracérébrale

Après une période d'incubation de 4 à 20 jours, les souriceaux présentent des signes de prostration, de parésie, d'incoordination motrice et meurent en 4 à 5 jours (Howell, 1962).

L'inoculation aux oeufs embryonnés ou l'inoculation au cheval peuvent aussi être employées (Rodriguez *et al.*, 1993).

La mise en évidence des antigènes spécifiques est possible à partir du sang du malade ou de rate broyée, introduits dans une réaction de précipitation en milieu gélifié en face d'un sérum de référence. Cette réaction, très simple, permet d'établir, en 24 à 48 heures, une suspicion mais devra dans tous les cas être complétée par l'isolement et l'identification du virus.

L'identification du virus fait appel à des réactions sérologiques utilisant le virus isolé comme antigène :

- la fixation du complément ou l'immunofluorescence permettent une identification d'urgence mais limitée à l'appartenance au groupe peste équine.
- le test de séroneutralisation à l'aide d'anti-sérums spécifiques de type demeure la technique de choix pour l'identification du type de virus en cause. Il n'y a pas de neutralisation croisée entre les neuf virus à l'exception des sérotypes 9 et 6.

2.6.2. Détection des anticorps

Le diagnostic biologique d'une suspicion d'une épizootie ne doit pas être fondée sur l'utilisation des tests sérologiques. En effet, de nombreux chevaux vont mourir avant d'avoir développé une réponse immunitaire à médiation humorale (les anticorps apparaissent 10 à 14 jours après l'infection).

Cependant, les techniques sérologiques permettent, à l'échelon d'un pays ou d'une région et en l'absence d'isolement du virus, de confirmer la suspicion d'une épizootie.

La réaction de fixation du complément

La réaction de fixation du complément est la méthode sérologique de référence recommandée par l'Office International des épizooties (Manual of Standard for Diagnostic tests and Vaccines, 1992). La présence d'anticorps fixant le complément dans le sérum d'un animal traduit l'évolution d'une infection antérieure récente par un virus appartenant au groupe de la peste équine.

Test de séroneutralisation

Les anticorps neutralisants sont décelés à partir de la 3ème semaine et persistent pendant plusieurs années.

Tests immuno-enzymatiques (ELISA)

Ont été développés, ces dernières années, des tests ELISA, indirects ou par compétition, à base d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux et dont les antigènes sont constitués de virus purifié ou de protéines exprimées en système procaryote ou eucaryote. Ces techniques détectent des anticorps de groupe (Hamblin *et al.*, 1990 ; Hamblin *et al.*, 1991a ; Hamblin *et al.*, 1991b ; Hamblin *et al.*, 1992 ; House *et al.*, 1990 ; Van Wyngaardt *et al.*, 1992 ; Wade-Evans *et al.*, 1993 ; Williams, 1987 ; Williams *et al.*, 1993). Laviada *et al.* (1993) ont développé un test ELISA qui détecte les anticorps anti-NS3. Ces anticorps permettent de différencier les

sérums d'animaux infectés ou vaccinés avec un vaccin atténué des sérums d'animaux vaccinés avec un vaccin inactivé.

2.6.3. Les limites des méthodes de diagnostic

Détection virale

Pendant la phase fébrile, le virus peut être isolé à partir du sang total prélevé sur anticoagulant (10 UI/ml d'héparine) et conservé à +4°C. Les suspensions d'hématies lavées sont inoculées à des cultures de cellules Vero ou BHK21. L'effet cytopathique apparaît 3 à 7 jours après inoculation ou après plusieurs passages en aveugle. L'isolement et l'identification du virus nécessite un délai minimum de 7 à 14 jours (Hamblin *et al.*, 1991b).

Afin de diminuer le délai nécessaire au diagnostic de l'infection équine, diverses méthodes ont été développées.

Il convient de citer, par exemple, l'immunofluorescence directe ou indirecte qui permet l'identification du virus en culture de tissus. Ce test est spécifique de groupe. Il est effectué à partir de tissu splénique mais manque de sensibilité (Tessler, 1972).

Plusieurs tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) pour la détection de l'antigène viral ont été récemment développés. Des sérums polyclonaux ou des anticorps monoclonaux fixés au fond de cupules permettent la capture de l'antigène viral qui est ensuite détecté par des anticorps anti-AHSV (Hamblin *et al.*, 1991b ; Du Plessis *et al.*, 1990 ; Laviada *et al.*, 1992 ; Ranz *et al.*, 1992).

Cependant, à partir du tissu splénique, le seuil de sensibilité de ces méthodes ELISA varie de $1,4 \cdot 10^3$ DCP50/ml (Hamblin *et al.*, 1992) à $2,5 \cdot 10^3$ DCP50/ml (Laviada *et al.*, 1992).

A partir du sang, le seuil de détection de l'antigène viral par ELISA s'avère être beaucoup plus élevé (Laegreid, 1994).

Détection des anticorps anti-AHSV

Les sensibilités des techniques ELISA et fixation du complément sont équivalentes. Elles s'avèrent plus sensibles que l'immunodiffusion en gélose (House *et al.*, 1990). Un test ELISA, utilisant un anticorps monoclonal anti-VP7 et un antigène VP7 recombinant a été développé (Wade-Evans *et al.*, 1993).

Cependant, le diagnostic d'une infection à virus équine ne peut reposer sur les épreuves sérologiques car la plupart des chevaux décèdent avant d'avoir développé une réponse humorale rapidement détectable.

La nécessité de disposer de tests sensibles, spécifiques et rapides permettant la détection des protéines virales ou de son génome, s'impose.

2.7. PROPHYLAXIE

La lutte contre la peste équine se limite à empêcher l'introduction de la maladie dans une région ou un pays (prophylaxie sanitaire) ou à limiter son extension à partir d'un foyer déclaré (prophylaxie médico-sanitaire).

2.7.1. sanitaire

Elle consiste en un ensemble de mesures qui ont pour but d'éviter l'introduction du virus dans un pays indemne (certificats sanitaires exigés à l'importation), d'empêcher l'extension d'une épizootie à des régions voisines indemnes, de limiter, circonscrire, isoler les foyers de la maladie et d'en assurer l'éradication.

En région accidentellement infectée, l'abattage des animaux atteints et contaminés, la destruction rationnelle de leurs cadavres et une désinsectisation sont mis en oeuvre dans les foyers.

2.7.2. médicale

Elle consiste en la protection préventive des espèces sensibles par une immunisation spécifique active (vaccins monovalents ou polyvalents) ou passives (séroprophylaxie).

La prophylaxie médicale repose, à l'heure actuelle, sur l'emploi des vaccins atténués. Plusieurs types de vaccins sont disponibles :

- vaccins neurotropes-souris : l'atténuation du virus sauvage est obtenue après une centaine de passages par voie intra-cérébrale sur souris. Ces vaccins, outre la nécessité d'élever un grand nombre de souris, ont l'inconvénient de provoquer des accidents post-vaccinaux de type encéphalitique,

- vaccins neurotropes-culture de cellules : les souches virales sauvages préalablement modifiées par passage sur cerveaux de souris, sont adaptées à la culture cellulaire qui permet la production industrielle de vaccin,

- vaccins viscérotropes-culture de cellules : l'atténuation du virus sauvage est obtenue après une dizaine de passages sur culture cellulaire.

Ces vaccins cellulaires sont largement utilisés (ils ont été employés en Espagne, au Portugal et sont actuellement utilisés au Maroc). Cependant, ils présentent quelques inconvénients :

- la réversion éventuelle de la souche vaccinale à la virulence (chez l'hôte ou chez l'insecte vecteur) (Burrage and Laegreid, 1994),
- l'impossibilité de différencier les anticorps post-infectieux et post-vaccinaux,
- le risque potentiel d'apparition de virus réassortants par recombinaison lors de la multiplication simultanée sur un même sujet de plusieurs virus vaccinaux ou de virus vaccinal et de virus sauvage,
- le faible pouvoir antigénique de certains sérotypes (AHSV-4 notamment) utilisés dans ces vaccins,
- la présence d'une virémie post-vaccinale suffisante pour permettre l'infection du vecteur (House *et al.*, 1992).

Un vaccin inactivé monovalent a été développé (Dubourget *et al.*, 1992) par inactivation de la souche vaccinale AHSV-4 d'Afrique du sud. Ce vaccin induit une protection satisfaisante et de longue durée. De plus, l'absence de la protéine NS3 dans la suspension injectable permet de différencier les chevaux vaccinés avec ce vaccin inactivé (absence d'anticorps anti-NS3) des chevaux infectés ou vaccinés avec un vaccin atténué (présence d'anticorps anti NS3) (Laviada *et al.*, 1993).

Un vaccin candidat, actuellement en cours de développement, pourrait se révéler prometteur. Spontanément, les protéines VP7, VP2 et VP5, exprimées en baculovirus, s'associent et forment une particule de type viral dont l'immunogénicité serait tout à fait satisfaisante (et dont l'innocuité serait totale) (Roy *et al.*, 1994).

2.7.3. Prophylaxie médico-sanitaire

L'inefficacité des seules mesures sanitaires impose l'association des mesures de prophylaxie sanitaire et médicale. Les mesures de prophylaxie sanitaires sont appliquées dans les foyers de la maladie (abattage, désinsectisation, interdiction de mouvements). Autour des foyers, la vaccination des équidés est obligatoire. Ces mesures de prophylaxie médico-sanitaire ont été appliquées en Espagne, au Portugal.

2.8. LEGISLATION SANITAIRE

Règlementation nationale

La peste équine, en France, a été ajoutée à la nomenclature des maladies réputées contagieuses par décret du 7 décembre 1966 et du 20 novembre 1967. Les arrêtés d'application du 22 avril 1974 et du 8 juin 1990 complètent les dispositions de ces décrets.

Règlementation internationale

Le code zoosanitaire de l'Office International des Epizooties (1992) définit les notions de pays ou de région indemne ou infecté de peste équine ainsi que les garanties sanitaires exigées lors de l'importation d'équidés en provenance de ces régions.

Au niveau communautaire, les directives 90/426/CEE (1990) et 92/35/CEE (1992) précisent respectivement les conditions de police sanitaire régissant les mouvements et les importations d'équidés en provenance des pays tiers et les règles de contrôle ainsi que les mesures de lutte contre la peste équine. L'autorisation d'importation en provenance de pays infectés est conditionnée à l'obligation d'une quarantaine et de l'obtention de deux résultats négatifs à deux épreuves sérologiques effectuées par la technique de réaction de fixation du complément à un intervalle d'au moins 21 jours et d'au plus 30 jours, la deuxième épreuve étant réalisée 14 jours au plus avant le chargement des animaux.

BUT DU TRAVAIL

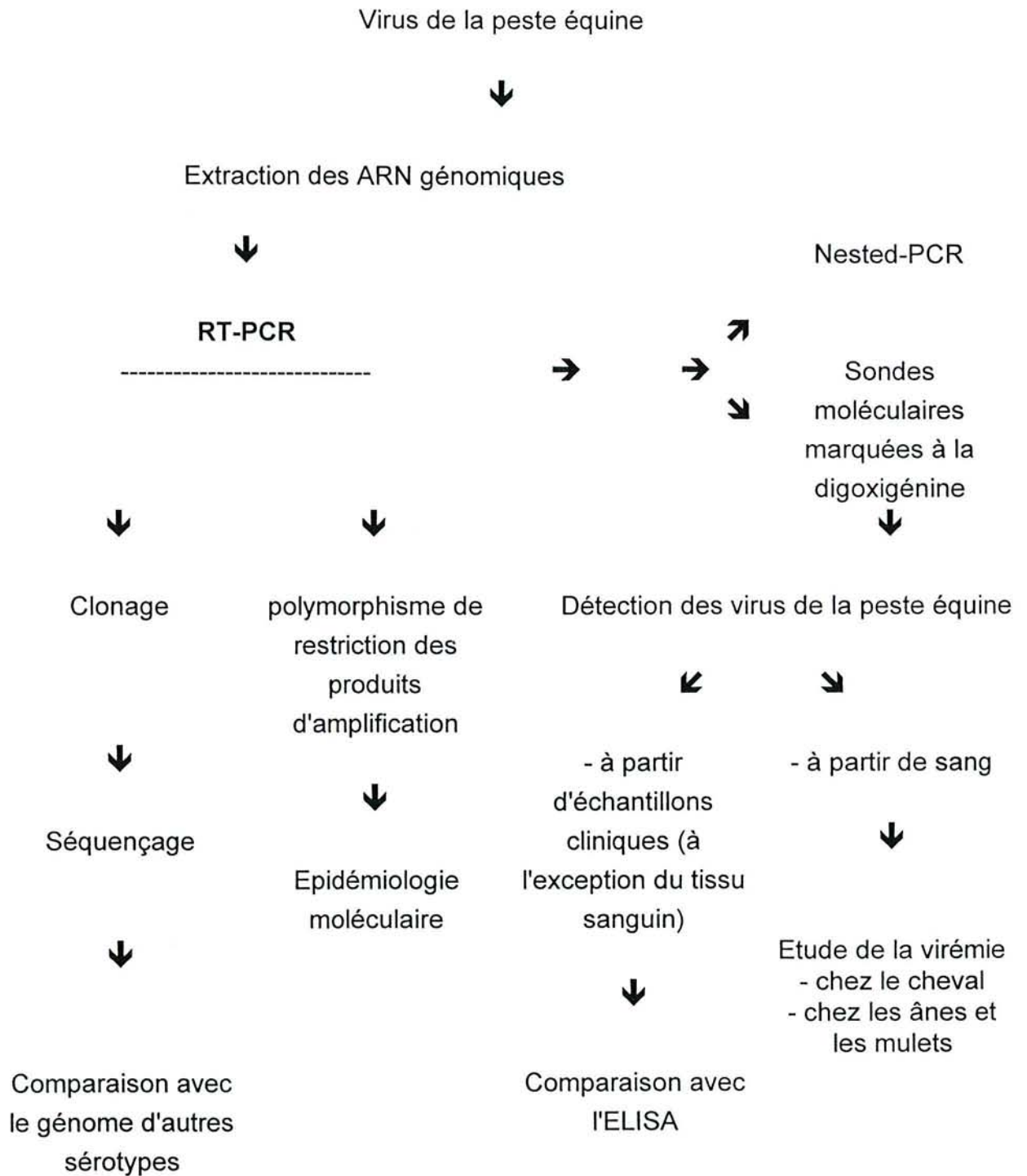
La peste équine constitue l'un des risques sanitaires majeurs chez les équidés. Les conséquences économiques sont désastreuses pour l'industrie du cheval lorsqu'un pays est déclaré infecté. Les contrôles sanitaires à l'importation dans les pays de l'Union Européenne sont donc une nécessité absolue notamment pour les équidés en provenance des pays tiers. Les techniques de diagnostic classiquement utilisées en routine ne s'avèrent pas suffisamment sensibles comme l'apparition de la peste équine dans la péninsule ibérique l'a illustrée. C'est à la suite de ces épizooties que la Communauté Economique Européenne a décidé, en 1991, de lancer un grand programme de lutte contre la peste équine intitulé " la peste équine en Europe " (contrat 8001- CT91- 0211). Cinq laboratoires européens sont impliqués dans ce contrat (Institute for Animal Health, Pirbright, Angleterre; Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid, Espagne ; Laboratorio de Sanidad y Produccion Animal, Madrid, Espagne; Faculdade de Ciencias da Universidade de Lisboa, Portugal ; Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Maisons Alfort, France). Les objectifs de ce programme sont, d'une part, d'approfondir les connaissances fondamentales sur la biologie et la structure du virus et d'autre part, d'améliorer le diagnostic en développant de nouveaux outils spécifiques, sensibles et rapides. C'est dans ce cadre que ce travail a été effectué.

L'objectif principal a consisté à mettre au point un test d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) permettant la détection du virus de la peste équine à partir d'échantillons cliniques. Les segments génomiques 7 et 10 ont été choisis comme séquences cibles de la PCR. Ces gènes codent respectivement pour les protéines VP7 et NS3/NS3A qui s'avèrent être conservées entre les neuf sérotypes connus du virus de la peste équine. La spécificité des produits d'amplification a été confirmée par l'étude des polymorphismes de restriction, hybridation moléculaire avec une sonde interne ou par "nested-PCR". La sensibilité et la spécificité de la PCR ont été comparées avec celles de l'inoculation aux cultures de cellules et de l'immunocapture (ELISA).

La détection par RT-PCR de l'ARN viral a permis d'estimer la durée de la virémie chez le cheval mais surtout chez les ânes et mulets dont le rôle dans l'épidémiologie de la maladie est peu connu.

Les séquences nucléotidiques des segments S10 des virus de sérotype 4, souche vaccinale (USDA) et souche sauvage isolée au Maroc en 1990, ont été déterminées et comparées avec les séquences des gènes S10 des virus de sérotypes -1, -3, -4 (souche espagnole), -8 et -9 afin d'étudier les variations génétiques entre ces gènes homologues de virus de différents sérotypes. Le degré de similitude des séquences des segments génomiques 10 de ces deux souches ainsi que les caractéristiques de leurs produits de traduction ont été déterminés.

Notre plan de travail peut être résumé par le schéma suivant :



MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL

1.1. Souches virales et milieux de culture

1.1.1. Les souches du virus équineptique

a) Souches vaccinales

Ces souches nous ont été fournies par le Dr Pearson du laboratoire de référence américain d'Ames (United State Department of Agriculture, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa). Les souches des sérotypes de 1 à 7 ont été isolées en 1968 en Afrique du sud. Les souches des sérotypes 8 et 9 ont été isolées en Iran en 1969. Toutes ces souches ont été atténuées par une centaine de passages sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés. Elles sont appelées respectivement : **AHSV-1 USDA ; AHSV-2 USDA ; AHSV-3 USDA ; AHSV-4 USDA ; AHSV-5 USDA ; AHSV-6 USDA ; AHSV-7 USDA ; AHSV-8 USDA ; AHSV-9 USDA.**

Deux autres souches vaccinales de sérotypes 4 et 9 atténuées par passages sur cultures cellulaires nous ont été fournies par le Dr Erasmus (Onderstepoort Veterinary Research Institute, Afrique du sud). Ces deux souches sont nommées : **AHSV-4 SA ; AHSV-9 SA .**

b) Souches sauvages

Deux souches sauvages de sérotype 4 ont été isolées à partir d'échantillons cliniques (prélèvements de tissu splénique). Ces prélèvements nous ont été fournis par le Dr Hooghuis (laboratoire national de référence de la peste équine d'Algete, Madrid, Espagne) et par le Dr El-Harrack (laboratoire Biopharma, Rabat, Maroc). Ces deux souches sont appelées respectivement : **AHSV 4 E ; AHSV 4M.**

Deux autres souches, nommées **AHSV-9 C** et **AHSV-9 S**, ont été isolées dans notre laboratoire à partir d'échantillons biologiques provenant respectivement du Cameroun (Garoua, laboratoire national vétérinaire) et du Sénégal (Dakar).

Deux autres souches sauvages, l'une de sérotype 4, l'autre de sérotype 9, ont été isolées au laboratoire à partir d'échantillons de sang de chevaux inoculés expérimentalement. Ces échantillons infectés nous ont été envoyés par le Dr

Laegreid (Plum Island Animal Disease Center, Greenport, New York, Etats-Unis). Ces deux souches appelées : **AHSV-4 E/PI** et **AHSV-9 PI** (PI pour "Plum Island") ont été respectivement isolées en Espagne en 1990 et en Iran en 1960. La souche espagnole n'a subi que quatre passages en culture de cellules (Vero) contrairement à la seconde souche qui a subi de nombreux passages sur cellules (tout en conservant, cependant, son pouvoir pathogène).

c) Autres virus

Principaux virus infectant les équidés

Pour l'étude de la spécificité de la réaction d'amplification, cinq autres souches virales couramment rencontrées dans l'espèce équine sont produites en cultures de cellules (tableau XI).

Tableau XI : Principaux virus infectant les équidés et types de cellules utilisées pour leur culture *in vitro*.

Souches virales	Cellules
Artérite virale équine (souche Bucyrus)	Vero (ATCC CCL 81)
Réovirus sérotype 1	Vero
Herpès virus équin 1 (souche Kentucky)	RK13 (ATCC CCI 106)
Grippe (A/equi/2/ Brentwood 79)	MDCK (ATCC CCI 34)
Adénovirus sérotype 1	Equine dermis (ATCC CCI 57)

Autres Orbivirus

Les 24 sérotypes du virus de la fièvre catarrhale du mouton (BTV) ainsi que les sérotypes 1, 2, 3, 4 et 7 du virus de la maladie hémorragique du cerf (EHDV) ont été cultivées sur cellules Vero. Toutes ces souches nous ont été fournies par le Dr Diallo de l'Institut d'Etude et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (IEMVT) à Maisons-Alfort. Ces souches ont subi de un à quatre passages sur oeufs embryonnés, puis sur cellules BHK 21 (un à dix passages selon les souches) et sur cellules Vero (un à deux passages). L'effet cytopathique apparaît 4 à 5 jours après l'inoculation de la culture de cellules.

1.1.2. Lignées cellulaires et milieux de culture

a) Lignées cellulaires

- Les cellules *Vero* (Cellules de reins de singe, *Cercopithecus aethiops*) utilisées pour la croissance et l'entretien du virus de la peste équine et du virus de l'artérite virale des équidés (référence ATCC CCL 81).

- Les cellules *RK13* (Cellules "Rabbit Kidney", de rein de lapin) utilisées pour la croissance et l'entretien de l'herpès virus équin EHV-1 (Equine Herpes Virus-1, ou virus de l'avortement) (référence ATCC CCL106).

- Les cellules *MDCK* (Madin Darby Canine Kidney ou cellules de rein de chien) utilisées pour la croissance du virus grippal équin A/equi 2/Brentwood/79 (ATCC CCL 34).

- Les cellules *E.D* ("Equine Dermal", de derme de cheval) utilisées pour la croissance du virus et l'entretien de l'adénovirus équin sérotype 1 (ATCC CCL 57).

b) Milieux de culture cellulaire

Le milieu RPMI 1640 (Techgen-Paris) est utilisé pour la croissance et l'entretien des cellules *Vero* ainsi que pour la production et le titrage du virus. Ce milieu de base est additionné d'antibiotiques (Streptomycine 100 µg/ml et Pénicilline 100 UI/ml ainsi que de sérum de veau foetal (Gibco BRL) à la concentration de 8% pour la croissance des cellules comme pour la production du virus.

Le milieu MEM (Techgen-Paris) est utilisé pour la croissance et l'entretien des cellules *RK13*, *MDCK* et *ED*. Il est additionné des antibiotiques cités précédemment et de 10% de SVF.

1.2. Souche bactérienne et milieu de culture

1.2.1. *Escherichia coli* XL1-Blue

Cette souche d'*Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) permet l'amplification des plasmides recombinés. Ces bactéries sont cultivées sur milieu gélosé contenant de la tétracycline à la concentration de 12,5 µg/ml. La présence de cet antibiotique assure la sélection des bactéries contenant l'épisome F' qui porte le gène lacZΔM15 codant pour la partie α de la β-galactosidase. Ces bactéries,

après intégration du phagemide Bluescript, sont capables de produire une β -galactosidase fonctionnelle.

1.2.2. Milieu de culture

Le milieu LB (Luria-Bertani : 10 g de Bactotryptone ; 5 g de Bactoyeast Extract ; 10 g de NaCl ; eau en quantité suffisante pour 1 l ajusté à pH 7,5 ; 20 minutes à l'autoclave à 120 °C) est utilisé pour la culture de *E.coli* XL1-Blue. La conservation des souches s'effectue à -20 °C dans ce milieu additionné de 50% de glycérol (v/v). La sélection des bactéries transformées par le phagemide Bluescript se fait sur milieu LB solide contenant 50 μ g/ml d'ampicilline et 12,5 μ g/ml de tétracycline et sur lequel sont étalés 40 μ l d'IPTG (100 mM) et 100 μ l de X-gal (80 μ g/ml). L'X-gal est dissous dans la diméthylformamide et l'IPTG est dissous dans l'eau.

1.3. Vecteur plasmidique Bluescript

Le plasmide (ou phagemide) Bluescript, dont la taille est de 2961 paires de bases, contient un site de clonage multiple de 21 sites de restriction uniques bordés par les promoteurs des phages T3 et T7 et localisé dans la partie N terminale du fragment du gène LacZ qui code pour le peptide α de la β -galactosidase. Le produit de ce gène complémente le fragment Ω de la β -galactosidase. Cette α complémentation permet aux bactéries en présence d'un composé inducteur, l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) de produire la β -galactosidase. Ces bactéries sont alors capables de dégrader le substrat X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) et les colonies sont colorées en bleu. Lorsqu'un fragment d'ADN est inséré dans ce multisite de clonage, l' α complémentation ne peut plus s'effectuer. Les bactéries ne peuvent plus dégrader le X-gal et les clones recombinants sont sélectionnés par leur phénotype *lacZ*⁻ (colonies blanches en présence d'IPTG et de X-gal). Le phagemide Bluescript contient le gène de résistance à l'ampicilline et l'origine de réplication du phage M13 (fig. n° 6).

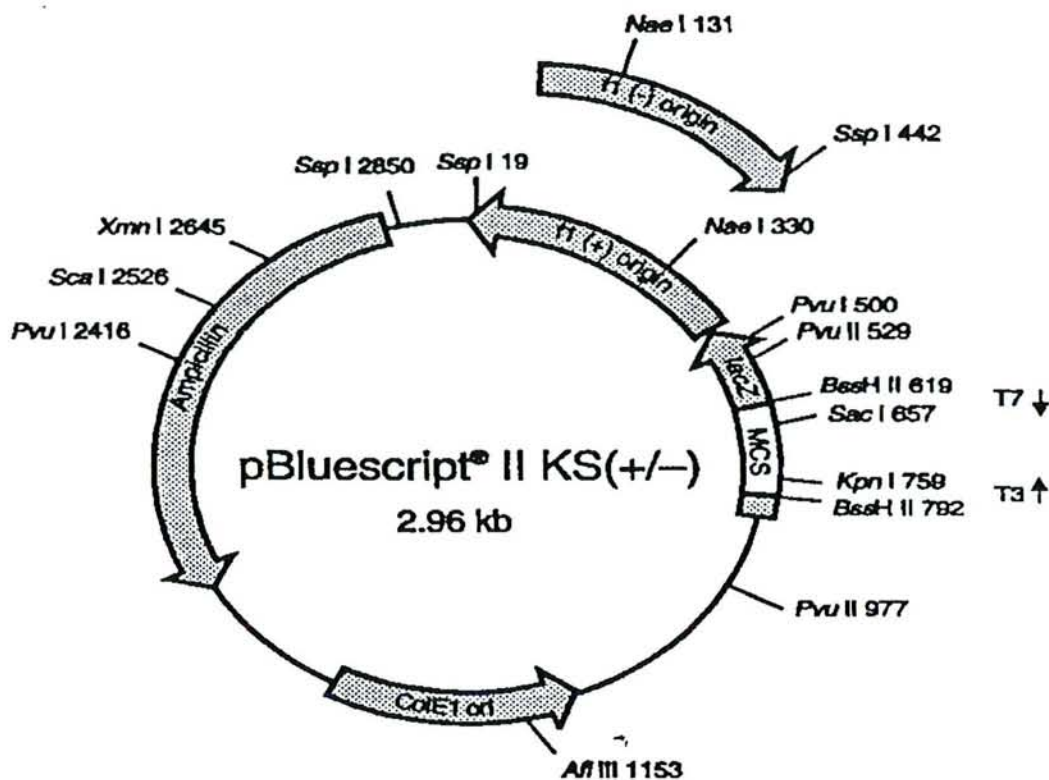


Fig. n° 6 : Carte de restriction du vecteur Bluescript (d'après Stratagene).

1.4. Les échantillons biologiques

1.4.1. Prélèvements cliniques

Les échantillons biologiques sont constitués d'échantillons nécropsiques prélevés sur des cadavres de chevaux infectés ou non par les virus de la peste équine de sérotype 4 ou de sérotype 9 (tableau XII).

Les échantillons de 20 à 29 sont des échantillons de rates prélevés sur des avortons ou des cadavres de chevaux adultes. Les prélèvements d'avortons ont été adressés au laboratoire pour suspicion d'avortement d'origine virale (herpès virus équin EHV-1). Tous les échantillons ont été prélevés à partir d'animaux originaires de la région Normandie indemne de peste équine. De plus, l'absence du virus de la peste équine dans ces prélèvements a été confirmée par inoculation à des cultures cellulaires.

Des sérums ante-mortem de quelques chevaux camerounais d'un même effectif s'étant avérés être positifs par la méthode de fixation du complément, nous avons jugé nécessaire de confirmer la suspicion de peste équine par un examen virologique. Les échantillons nécropsiques 31 à 37 nous ainsi été adressés par le laboratoire vétérinaire de Garoua (Dr Cardinal, Cameroun). A partir du prélèvement 35, le virus de la peste équine sérotype 9 (C) a été isolé et identifié.

Tableau XII : Origine géographique, année de prélèvement et nature des échantillons nécropsiques.

n° de l'échantillon	Nature	Origine	Année
1	rate	Kenitra (Maroc)	1989
2	rate	Ouarzazate (Maroc)	1989
3	rate	Khouribga (Maroc)	1989
4	rate	Taounate (Maroc)	1989
5	rate	Boulaouane (Maroc)	1989
6	rate	Missour (Maroc)	1989
7	rate	Fes (Maroc)	1989
8	rate	Oujda (Maroc)	1989
9	rate	Tahla (Maroc)	1989
10	rate	Agadir (Maroc)	1989
11	rate	Espagne	1990
12	rate	Espagne	1990
13	rate	Espagne	1990
14	rate	Espagne	1990
15	rate	Espagne	1990
16	rate	Espagne	1990
17	rate	Espagne	1990
18	rate	Espagne	1990
19	rate	Espagne	1990
20 à 29	rates	France	de 1990 à 1993
30	ganglion	Cameroun (Garoua)	1994
31	coeur	Cameroun	1994
32	rein	Cameroun	1994
33	rate	Cameroun	1994
34	poumon	Cameroun	1994
35	intestin	Cameroun	1994
36	foie	Cameroun	1994
37	langue	Cameroun	1994

1.4.2. Echantillons biologiques

76 échantillons constitués de matériel biologique varié (tissu splénique, culture cellulaire, cerveaux de souriceaux nouveau-nés, insectes broyés) ont été analysés (tableau XIII). Les prélèvements de rate (39 à 42) de chevaux infectés par différents sérotypes du virus de la peste équine ont été fournis par le Dr Erasmus (Onderstepoort Veterinary Research Institute, Afrique du sud) alors que les prélèvements spléniques 21 à 30 proviennent de cadavres de chevaux décédés pendant les épizooties espagnoles et nous ont été adressés par le laboratoire d'Algete (Madrid, Dr Hooghuis). Les cultures de cellules et les insectes ont été infectés expérimentalement au laboratoire d'Algete.

1.4.3. Infections expérimentales

Les animaux

Souriceaux nouveau-nés

Une vingtaine de souriceaux nouveau-nés, de la lignée Balb/c, âgés de 9 à 11 jours, ont été inoculés par voie intra-cérébrale, avec le virus de la peste équine sérotype 4 souche USDA ($3 \cdot 10^7$ DCP50/ml) sous un volume de 0,1 ml. Les souriceaux ont été examinés quotidiennement. Le cerveau de chaque souriceau décédé a été prélevé.

Les chevaux

Six chevaux adultes, cliniquement sains, séronégatifs vis-à-vis de la peste équine, de l'anémie infectieuse et de l'artérite virale des équidés, ont subi une épreuve virulente dans l'animalerie protégée du laboratoire de Plum Island aux Etats Unis (Dr Laegreid, Greenport, Plum Island Disease Center, USDA).

Tableau XIII : Nature des différents échantillons biologiques utilisés pour la détection du virus équinestique par RT-PCR et ELISA.

n° des échantillons	Nature de l'échantillon
1 à 20	Rates non infectées
21 à 30	Rates infectées par AHSV-4
31 à 38	Cultures cellulaires infectées par AHSV-4
39	Rate infectée par AHSV-1
40	Rate infectée par AHSV-4
41	Rate infectée par AHSV-5
42	Rate infectée par AHSV-7
43 à 51	Cerveaux de souriceaux nouveau-nés infectés par AHSV-1 à 9
52 à 60	Culture cellulaire infectées par AHSV-1 à 9
61	Insectes inoculés avec AHSV-4
62	Insectes non inoculés
63 à 70	Cerveaux de souriceaux inoculés avec AHSV-2 à 9
71	Culture cellulaire infectée par Bluetongue, sérotype 4
72	Culture cellulaire infectée par Bluetongue, sérotype 1
73	Culture cellulaire infectée par le virus Akabane
74	Culture cellulaire infectée par EHDV, sérotype 2
75	Culture cellulaire infectée par EHDV, sérotype 1
76	Culture cellulaire infectée par EHDV, sérotype 3

EHDV : virus de la maladie hémorragique du cerf
 Akabane : virus de la famille des *Bunyaviridae*.

Les ânes et mulets

Quatre ânes et quatre mulets adultes, séronégatifs vis-à-vis de la peste équine, de l'anémie infectieuse et de l'artérite virale des équidés, ont subi une épreuve virulente dans l'animalerie protégée du laboratoire Biopharma à Rabat (Dr El-Harrack, Maroc).

Epreuves virulentes

Sur chevaux

Trois chevaux (n° 49, 50 et 54) ont été inoculés avec 1 ml d'une suspension de AHSV-4 E/PI titrant 10^4 DCP50/ml par voie intraveineuse. Le deuxième groupe de chevaux (n° 46, 56 et 58) a été inoculé avec la même dose de AHSV-9 PI.

Les animaux ont, chaque jour, subi un examen clinique et un relevé de température corporelle.

Prélèvements

Des prises de sang sur anticoagulant (EDTA et héparine) ont été effectuées quotidiennement (tableau XIV). Les échantillons de sang ont été centrifugés à 500 g pendant 10 minutes, le plasma éliminé par aspiration et le culot cellulaire lavé deux fois avec du milieu RPMI 1640. La suspension cellulaire est conservée à -20°C avant traitement par PCR ou inoculation à des cultures de cellules Vero. Des échantillons post-mortem de rate, coeur et poumon ont été prélevés et congelés à -80°C .

Tableau XIV : Echantillons prélevés à différents jours sur des chevaux inoculés expérimentalement avec deux types viraux (le type 4 isolé en Espagne : AHSV-4 E/PI et le type 9 provenant d'Afrique du sud : AHSV-9PI).

n° du cheval	46	49	50	54	56	58
Prélèvements	sang de Jo à J11 post-infection	sang de Jo à J6 post-infection	sang de Jo à J6 post-infection	sang de Jo à J6 post-infection	sang de Jo à J14 post-infection	sang de Jo à J14 et J16, J18, J20 post-infection
	Mort de l'animal à J11	Mort de l'animal à J6	Mort de l'animal à J6	Mort de l'animal à J6	Mort de l'animal à J14	L'animal a survécu
Souches inoculées	AHSV-9 PI	AHSV-4 E/PI	AHSV-4 E/PI	AHSV-4 E/PI	AHSV-9 PI	AHSV-9 PI

Sur ânes et mulets

Les ânes et mulets ont été inoculés, par la voie sous-cutanée, avec 1 ml d'une suspension du virus marocain de la peste équine sérotype 4 souche Larache, isolée en 1989, titrant 10^6 DCP50/ml. Quotidiennement, du jour J0 de l'inoculation à J51, ont été effectués, sur chaque animal :

- un examen clinique,
- un relevé de température corporelle,
- un prélèvement de sang sur tube dépourvu d'anticoagulant.

Tous les deux jours, de J1 à J51, du sang fut prélevé sur EDTA et conservé à -20°C avant traitement par PCR. Des fractions aliquotes ont été inoculées à des cultures de cellules Vero.

1.5. Les enzymes et les tampons

Les enzymes sont le plus souvent fournies par le fabricant avec un tampon approprié.

ARNase inhibiteur (BOEHRINGER MANNHEIM) : 40U/ μ l.

Transcriptase inverse AMV-RT (transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (APPLIGENE) : 20U/μl.

Taq polymérase (BOEHRINGER MANNHEIM) : 5U/μl Tampon d'incubation 10X (Tris-HCl 100mM ; MgCl₂ 15mM ; KCl 500mM ; gélatine 1mg/ml ; pH 8,3 à 20°C).

Phosphatase alcaline ("Calf intestinal phosphatase") (BOEHRINGER MANNHEIM) : 1U/μl Tampon 10X (Tris-HCl 0,5M ; EDTA 1 mM ; pH 8,5 à 20°C).

T4 ADN ligase (BOEHRINGER MANNHEIM) : 1U/μl Tampon 10X (Tris-HCl 660 mM ; MgCl₂ 50mM ; dithioerythritol 10mM, ATP 10mM ; pH 7,5 à 20°C).

Fragment de Klenow (BOEHRINGER MANNHEIM): 5U/μl Tampon de Klenow (Tris HCl 10mM, pH 8,0, MgCl₂ 5mM ; DTT 6mM ; dNTP 0,5 mM).

Enzymes de restriction et tampons (BOEHRINGER MANNHEIM) :

Sac I : 10U/μl .Tampon A (Tris acétate 33mM, acétate K 66mM, acétate Mg 10mM, dithiothreitol 0,5mM ; pH 7,9 à 37°C).

Hinf I : 10U/μl .Tampon H (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 10mM, dithiothreitol 1mM; pH 7,5 à 37°).

Bam HI : 10U/μl .Tampon B (Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM, 2 mercaptoethanol 1mM ; pH 8,0 à 37°C).

Pvu II : 10U/μl Tampon M (Tris-HCl 10mM, NaCl 50mM, MgCl₂ 10mM, dithioerythritol 1mM ; pH 7,5 à 37°C).

Sph I : 10U/μl.Tampon M.

Asn I : 10U/μl .Tampon B.

Cfo I : 10U/μl.Tampon L (Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, dithiothreitol 1mM ; pH 7,5 à 37°C).

EcoRV : 10U/μl. Tampon B

Hph I : 4U/μl.Tampon 4 (acétate de potassium 50mM, acétate Tris 20mM, acétate de magnésium 10mM ; pH 7,9 à 25°C) (Biolabs).

1.6. Les principaux réactifs

Antibiotiques :

solution stock (SIGMA)

Pénicilline G (10 000U/ml).

Streptomycine (100 mg/ml).

mercaptoéthanol (SIGMA).

Agarose à bas point de fusion NUSIEVE GTG (TEBU).

Agarose ultrapure SEAKEM GTG (TEBU).

Amorces non purifiées (BIOPROBE, EUROGENTEC, IEMVT). Elles sont ajustées, pour leur conservation, à une concentration de 20 μ M.

Bromure d'éthidium (BOERHINGER MANNHEIM) : Solution stock 10mg/ml

Chloroforme (OSI).

Désoxyribonucléotides triphosphates (BOERHINGER MANNHEIM) : solution stock de dATP- dCTP- dGTP- dTTP 100mM.

DEPC (diéthylpyrocarbonate) (SERVA).

Dig-11 dUTP (BOERHINGER MANNHEIM).

Ethanol.

Huile minérale (SIGMA).

Hydroxy-méthyl-mercure (SIGMA): solution 0,02M.

Isopropanol (SIGMA).

Kit de révélation de la Digoxigénine par chemiluminescence (BOERHINGER MANNHEIM).

Kit JETSORB de purification de produit d'amplification (BIOPROBE).

Kit de séquençage T7TM (PHARMACIA).

Marqueur de masse moléculaire

Pour électrophorèse des acides nucléiques

Marqueur VII de poids moléculaire (BOERHINGER MANNHEIM) : 15 fragments de l'ADN du phage SPP 1 hydrolysé par l'endonucléase de restriction *EcoRI*.

Marqueur VI de poids moléculaire (BOERHINGER MANNHEIM) : 15 fragments de l'ADN de pBR328 hydrolysé par les endonucléases de restriction *Bgl I* et *Hinf I*.

N lauryl sarkosyl (SIGMA): solution stock 10%.

Phénol saturé en eau (APPLIGENE).

Radioisotopes :

désoxyadénine triphosphate marquée au ³⁵S (AMERSHAM), solution aqueuse, >1000 Ci/mmol.

Réactif pour l'extraction des ARN : solution RNA BTM (BIOPROBE).

Sodium Dodécyl Sulfate (SIGMA) : solution stock 20%.

Support de chromatographie :

Sephadex G50 medium (PHARMACIA, Saint Quentin, France).

Thiocyanate de guanidine (SIGMA).

1.7. Appareillage

Appareil à dépôt SRC 96 MINIFOLD I (SCHLEICHER und SCHUELL).

Bain-marie (APELEX).

Etuves à atmosphère contrôlée (JOUAN).

Etuve à hybridation Hybridiser HB-1 D (TECHNE).

Générateur ST150-D (APELEX).

Hottes à flux laminaire (ADS-LAMINAIRE et ESI-FLUFRANCE).

Microcentrifugeuses pour tubes Eppendorf Biofuge A (HERAEUS).

Microscope inversé (ZEISS).

Pompe à vide (AVANTEC).

Spectrophomètre UV-visible DU 62 (BECKMAN).

Table UV (BIOBLOCK).

Thermocycleur PTC 100/60 (PROLABO), thermocycleur PHC-3 (TECHNE).

Ultracentrifugeuse (BECKMAN).

1.8. Petit matériel

Cassette pour autoradiographie (KODAK).

Films radiologiques (KODAK) et Hyperfilm-ECL pour luminescence (AMERSHAM).

Filtres de nitrocellulose 20 x 20 cm, HYBON™-ECL (AMERSHAM).

Filtres de nylon 20 x 30 cm (BOEHRINGER MANNHEIM)

Filtres papier Whatman 3MM.

Flacons plastiques (75 cm² et 150 cm²), boîtes de Pétri (10 cm de diamètre).

Plaques de 6 puits pour culture cellulaire de 75 cm² (COSTAR).

Plaques de 96 puits pour culture de cellules (NUNCLON™).

Saran Wrap.

2. METHODES

2.1. La production virale

2.1.1. Les cellules

Les cellules Vero sont cultivées en milieu RPMI 1640, additionné de 8% de sérum de veau foetal (SVF) et de deux antibiotiques (Streptomycine à 100 µg/ml et Pénicilline à 100UI/ml). Le tapis cellulaire, après confluence, est traité avec une solution de trypsine versène (0,2‰) qui permet la dissociation des cellules. Les cellules sont alors reprises dans 10 ml de RPMI contenant 10% de SVF (qui permet la neutralisation de la trypsine) et réparties dans des flacons de culture cellulaire 150 cm² (CORNING) à la concentration de 200 000 cellules par ml à raison de 50 ml de milieu de croissance par boîte. Les boîtes sont placées à 37°C.

2.1.2. L'inoculation des virus

a) Virus de la peste équine

Les différentes souches virales sont inoculées à des flacons de cultures cellulaires présentant un tapis complet à 80%, soit 24h après trypsination. Après élimination du milieu de croissance et rinçage du tapis cellulaire, 5 ml de chaque suspension virale est inoculée. L'adsorption du virus est réalisée pendant 1 h à 37°C, puis les cellules infectées sont recouvertes de 30 ml de RPMI contenant 8% de SVF. Les boîtes sont alors placées dans une étuve à 37°C. Un effet cytopathique (ECP) se produit entre 48 et 96 heures selon les souches. Quand environ 80% du tapis cellulaire est détruit, les boîtes sont congelées à -80°C.

b) Autres virus

L'inoculation des virus de la rhinopneumonie équine (EHV-1), de l'artérite virale équine (EAV), du réovirus équin sérotype 3, de la grippe équine (H₃N₈) et de l'adénovirus équin aux différentes cultures de cellules

(tableau XI) est effectuée selon le protocole décrit pour le virus de la peste équine.

2.1.3. Isolement des virus à partir d'échantillons cliniques

Les prélèvements des tissus spléniques, cardiaques et pulmonaires sont, après broyage, centrifugés à 500g pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite inoculé à raison de 5 ml par flacon de culture de cellules de 150 cm² ou de 0,5 ml par flacon de 25 cm².

Après lyse des hématies par congélation à -80°C, les prélèvements de sang sont inoculés aux cultures de cellules. Plusieurs passages peuvent s'avérer nécessaires avant l'obtention d'un effet cytopathique.

2.1.4. Titrage des virus

Le titre du virus produit en culture de cellules ou isolé à partir d'échantillons cliniques est déterminé par la méthode du tout ou rien (Reed and Muench, 1938). Le titre viral correspond à l'inverse de la dilution de la suspension virale qui provoque une destruction de 50% d'un tapis cellulaire. Des dilutions en série du virus, de raison 10 (de 10⁻² à 10⁻⁹), sont préparées et 100 µl de chaque dilution sont déposés dans chaque cupule d'une microplaque à 96 puits, à fond plat. Quatre cupules sont prévues par dilution. Cent µl d'une suspension de cellules préalablement trypsinées et reprises dans du milieu de culture sont déposés dans chacune des cupules. Des cupules témoin ne contenant pas de virus, sont aussi préparées. Les plaques sont placées à 37°C pendant cinq jours sous atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules sont fixées par le formol à 10% pendant 30 minutes puis colorées au bleu de méthylène à 0,05%.

Selon le principe que les cupules qui présentent un effet cytopathique (ECP) à une dilution donnée auraient été détruites à une concentration plus forte et inversement, le calcul du titre est effectué de la façon suivante :

dilution	présence d'ECP	absence d'ECP
n	A	C
n +1	B	D

où A, B,C et D représentent les valeurs numériques des totaux cumulés encadrant la dilution 50%.

$$y = (A-B)(C+D) / 2 (AD-BC)$$

Les titres obtenus varient de 10^5 à 10^7 DCP50 selon les souches.

2.2. Purification du virus de la peste équine

La concentration virale

Après décongélation des cellules infectées, une clarification de la suspension par centrifugation à 800 g pendant 10 mn est effectuée. Le surnageant est alors ultracentrifugé à 100 000g pendant 4 heures à 4°C en rotor SW28 (Beckman). Les culots viraux sont repris dans 200 µl de TNE (Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM).

La purification du virus de la peste équine

Le virus étant fortement lié aux structures et protéines cellulaires et les particules virales formant des agrégats, il s'avère difficile de récupérer une bande "virale" après centrifugation en gradient continu de saccharose (Mertens *et al.*, 1987). La purification du virus de la peste équine est effectuée par centrifugation en gradient discontinu de saccharose, selon un protocole adapté de celui suivi par Mertens *et al.* (1987).

Le lysat cellulaire obtenu après congélation puis décongélation de huit flacons de culture de cellules infectées est clarifié par centrifugation à 800 g pendant 10 minutes. Le culot est remis en suspension dans du tampon TNET (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,2 M, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,5%) et la suspension obtenue est traitée aux ultrasons pendant 1 minute à 0°C. Cette suspension contenant essentiellement les noyaux des cellules est centrifugée à 800 g pendant 10 minutes, le culot obtenu est resuspendu dans le même tampon que précédemment, centrifugé à nouveau puis le culot est éliminé. Les surnageants obtenus lors de ces centrifugations successives constituent des extraits cytoplasmiques. Ils sont mélangés et gardés à 0°C. Le milieu de culture récupéré après l'étape initiale de clarification représente environ 10% du pouvoir infectieux total. Ce surnageant est mélangé avec un égal volume d'une solution de PBS 0,04 M pH 7,6 saturée en sulfate d'ammonium (afin de précipiter les particules

virales) et centrifugé à 3 000 g pendant 1 heure à 4°C. Le culot obtenu est resuspendu dans un faible volume de TNET et mélangé avec les extraits cytoplasmiques préalablement préparés. Le matériel, sous un volume de 24 ml, est ensuite centrifugé à 85 000 g dans un gradient discontinu de saccharose (6 ml de saccharose 66% (m/m), 10 ml de saccharose 40% (m/m)) dans du Tris HCl 0,2 M pH 8,0 pendant 3 heures à 4°C. Le virus et les constituants cellulaires qui forment un disque fin situé à l'interface des solutions de saccharose sont collectés et resuspendus dans du TNE. La suspension virale est ultracentrifugée à 30 000 g pendant 3 heures afin d'éliminer le saccharose et précipiter les particules virales.

2.3. Extraction des ARN génomiques

L'extraction des ARN génomiques viraux a été effectuée d'après le protocole décrit par Chomczynski and Sacchi (1987) et en utilisant le kit d'extraction commercialisé par BIOPROBE (RNATM). Plusieurs procédés d'extraction peuvent être utilisés mais les meilleurs résultats sont obtenus avec l'isothiocyanate de guanidium, molécule qui possède un puissant effet inhibiteur des ARNases et qui supprime les structures secondaires.

La verrerie et les solutions utilisées pour la manipulation des ARN sont traitées afin de détruire les ARNases. La verrerie est passée dans un four à 250°C pendant 4 heures. Les solutions additionnées de 0,1 % de DEPC (diéthyl pyrocarbonate) sont autoclavées après 24 heures, à 140°C pendant 1 heure 30.

2.3.1. A partir du virus purifié

Les culots viraux repris dans 200 µl de TNE sont additionnés d'un même volume d'une solution de dénaturation contenant du thiocyanate de guanidium 4M, du citrate de sodium 25 mM à pH 7, 0,5% de sarcosyl et 0,1 M de 2-mercaptoéthanol, ainsi que de 40 µl (1/10 du volume) d'acétate de sodium 2 M. Après mélange par renversement, l'ARN génomique est extrait par addition d'un volume de phénol saturé en eau (400 µl) et de 40 µl de chloroforme isoamylalcool (49/1). Les tubes sont homogénéisés par agitation vigoureuse et laissés 15 minutes dans la glace. Après une centrifugation de 10 minutes à 10 000 g, la phase aqueuse contenant les

ARN est récupérée (les ADN et les protéines restent à l'interface). La précipitation des ARN est effectuée par addition de 400 µl (1 volume) d'isopropanol. Vingt unités d'inhibiteur des ARNases sont ajoutées. Les ARN sont placés à -20°C pendant au minimum 1 heure. Après une nouvelle centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes, le culot est de nouveau traité avec 120 µl (1/3 du volume initial) de solution de dénaturation puis additionné de 1 volume d'isopropanol et de 20 unités d'inhibiteur des ARNases. La précipitation s'effectue pendant 2 heures à 4°C. Les échantillons sont alors centrifugés 10 minutes à 10 000g, les culots lavés à l'éthanol à 75% et séchés sous une cloche à vide après une nouvelle centrifugation. Chaque échantillon est alors repris dans 20 µl d'eau bidistillée stérile traitée au DEPC.

Les ARN, extraits des cellules infectées par les autres souches virales, le sont selon un protocole identique.

2.3.2. A partir des échantillons biologiques

L'extraction des ARN à partir des échantillons biologiques (tissu splénique, sang total) peut être effectuée indifféremment selon la méthode précédemment décrite de Chomczynski and Sacchi (1987) ou selon le protocole préconisé par le fournisseur BIOPROBE dans son kit RNA TM. C'est le mode d'emploi de ce dernier qui est ici décrit.

Cent mg de tissu splénique sont broyés dans la glace et homogénéisés avec 1 ml d'une solution contenant le thiocyanate de guanidium et le phénol (RNA TM). Le chloroforme est ajouté à raison de 0,1 volume, soit 100µl. Les tubes sont agités vigoureusement pendant 15 secondes et placés dans la glace pendant 5 minutes puis centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes. Les ARN contenus dans la phase aqueuse sont précipités à 4°C pendant 15 minutes après l'addition de 1 volume d'isopropanol. Le culot d'ARN est repris dans 20 µl d'eau après centrifugation, lavage à l'alcool à 75%, centrifugation et séchage.

A partir du sang total prélevé sur anticoagulant (EDTA ou héparine), 200 µl de sang sont ajoutés à un même volume de solution de dénaturation RNATM puis le même protocole est appliqué.

Dosage Spectrophotométrique

L'absorbance à 260 nm permet de déterminer la concentration en ADN ou en ARN de l'échantillon sachant qu'une absorbance de 1 correspond à une concentration de 50 µg/µl d'ADN bicaténaire ou de 40 µg/ml d'ADN ou d'ARN simple brin.

Le dosage est réalisé avec un spectrophotomètre BECKMAN de type DU série 60 à l'aide d'un programme de dosage des acides nucléiques (Nucleic Acid Soft-pacTM, module BECKMAN).

2.4. Amplification en chaîne par polymérase

La technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR ou "polymerase chain reaction") est celle décrite par Saiki *et al.* (1985). Cette technique est une réaction de polymérisation réitérative de nucléotides triphosphates qui permet la synthèse rapide d'un très grand nombre de copies d'une séquence polynucléotidique (ADN ou ARN) unique.

Les trois étapes qui constituent un cycle d'amplification sont les suivantes :

- la dénaturation thermique des brins d'ADN matriciels,
- l'hybridation des amorces à leurs séquences cibles,
- l'élongation des amorces par l'action d'une ADN polymérase thermostable (Taq ADN polymérase).

2.4.1. Amplification des séquences ribonucléotidiques

L'amplification de séquences ribonucléotidiques repose sur la synthèse préalable d'ADN complémentaire (ADNc) qui sert de matrice pour l'amplification. Deux types de méthodes sont utilisées pour amplifier des séquences connues complémentaires d'ARN :

- les étapes de transcription inverse et d'amplification des ADNc s'effectuent dans des conditions expérimentales distinctes et dans des tampons propres à chacune des deux étapes.

- ou les deux réactions s'effectuent dans un tampon unique sans purification des ADNc synthétisés par la transcriptase inverse.

Nous avons indistinctement utilisé ces deux méthodes. La limitation de la méthode de transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase

(ou RT-PCR) est conditionnée par le rendement de l'étape de transcription qui, étant effectuée à une température relativement basse (37°C) peut être fortement affectée par la présence de structures secondaires stables à cette température.

2.4.2. Choix des amorces nucléotidiques

Le choix des amorces (appelées aussi amplimères) revêt une grande importance puisqu'il est à la base même de la spécificité de la réaction. La taille optimale des oligonucléotides utilisés comme amorces est de 20 à 25 bases. De tels oligonucléotides ne sont théoriquement pas assez longs pour former entre eux des appariements stables aux températures utilisées au cours de la réaction de polymérisation.

La température moyenne de fusion (T_m) de l'oligonucléotide choisi comme amorce ne doit pas être incompatible avec les conditions de température choisies pour l'étape d'hybridation.

La formule suivante :

$$T_m = 16,6 \text{ Log[sel]} + 0,41 (\%G+C) + 81,5 - \frac{\%(\text{misappariement})}{\text{longueur en bases}} - 0,65 (\% \text{ formamide})$$

qui est classiquement utilisée pour calculer la température moyenne de fusion d'un polynucléotide de taille inférieure à 100 paires de bases peut être remplacée par la formule simplifiée :

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T).$$

Il est utile d'éviter l'utilisation d'amorces contenant des polypyrimidines, des polypurines ou tout autre motif qui pourrait générer des structures secondaires particulières.

Segment génomique 7

La séquence nucléotidique du segment génomique 7 du virus de la peste équine sérotype 4 (souche sauvage isolée en 1987 en Espagne) a été déterminée par Roy *et al.* (1991). Les amorces choisies sont les suivantes

Amorces	Séquence (5'→3')	Localisation (pb)
P1	GTAAAATTCGGTTAGGATG	1-20
P2 (inverse)	GTAAGTGTATTCGGTATTGA	1179-1159
N1	CGCGATAGCAGCAAGAGCC	23-42
N2 (inverse)	GTTGCCAACGCCTGATCATA	288-268

Le couple d'amorces P1-P2 permet l'amplification de la totalité du segment S7 (soit 1179 pb). Les amorces N1-N2 permettent l'amplification d'un oligonucléotide qui sera utilisé comme sonde froide (fig. n° 7).

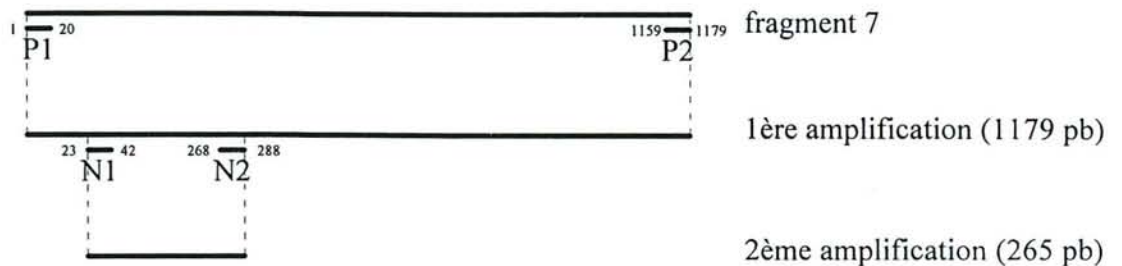


Fig. n° 7 : Localisation sur le gène S7 des amorces P1 et P2 permettant l'amplification de la totalité de ce segment.

Localisation des amorces internes N1 et N2 permettant par "nested-PCR" l'amplification d'un segment de 265 pb.

segment génomique 10

Les séquences nucléotidiques du segment S10 du virus de la peste équine sérotypes 3 et 9 ont été déterminées par Van Staden and Huismans (1991).

Amorces	Séquence (5'→3')	Localisation (pb)
P3	GTTTAAATTATCCCTTGTC	1-20
P4 (reverse)	GTAAGTCGTTATCCCGGCTC	758-739

Les deux amorces permettent l'amplification de la totalité du gène 10. Les amorces ont été synthétisées à l'Institut d'Etudes et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux à Maisons-Alfort au moyen d'un synthétiseur d'oligonucléotides Beckman, par les sociétés Eurogentec (Seraing, Belgique) et Bioprobe avec un synthétiseur Gene Assembleur Plus. La concentration des amorces est ajustée à 20 µM.

2.4.3. Synthèse de l'ADN complémentaire

2,5 µl de chaque échantillon d'ARN extrait sont dénaturés avec un volume égal de 0,02 M d'hydroxy-méthyl-mercure, avant d'être utilisés comme matrices pour la synthèse de l'ADNc. Après réduction de l'hydroxy-

méthyl-mercure par addition de 1 μ l de 0,7 M de 2 mercaptoéthanol, 40 unités d'inhibiteur des ARNases sont ajoutées.

Quatre μ l de ce mélange sont déposés dans un tube Eppendorf de 0,5 ml contenant 20 μ l de 50 mM Tris pH 8,3, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM de chaque dNTP, 6 mM MgCl₂ et 10 pmol de chaque amorce. Dix unités de transcriptase inverse AMV du virus de la myéloblastose aviaire (AMV-RT) sont ajoutées au mélange réactionnel qui est incubé à 37°C pendant 1 heure.

2.4.4. Amplification génique

Un μ l de la solution d'ADNc est mélangé dans un volume final de 100 μ l avec 10 mM Tris, pH 8,8, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl et 100 μ M de chaque dNTP. Cinq pmol de chaque amorce et 2,5 unités de Taq ADN polymérase sont ajoutés. Cent μ l d'huile minérale recouvrent le mélange réactionnel afin d'éviter l'évaporation de l'échantillon. Une étape de dénaturation de 95°C permettant une dénaturation de l'ADN précède les cycles d'amplification.

a) Conditions d'amplification

L'amplification génique est conduite dans un appareil chauffant programmable (Thermocycleur PTC 100/60, Prolabo). Les différentes étapes de chacun des quarante cycles sont les suivantes :

- étape de dénaturation à 95°C pendant 1 minute,
- étape d'hybridation amorce/cible à 55°C pendant 1 minute,
- étape d'élongation des amorces à 70°C pendant 2 minutes.

Enfin, une étape d'élongation terminale est effectuée à 70°C pendant 8 minutes puis la température décroît de 1°C toutes les 30 secondes. Les produits de la réaction sont analysés par électrophorèse d'une fraction aliquote (10 μ l) en gel d'agarose à 2% (Nusieve-Seakem).

b) RT-PCR

La transcription inverse et l'amplification sont effectuées en une seule étape dans un même mélange réactionnel. Les ARN double brin dénaturés sont déposés dans 100 μ l d'une solution contenant les réactifs nécessaires à

la transcription et à la PCR : tampon de la Taq polymérase, 100 μM de chaque dNTP, 10 pmoles de chaque amorce, 10 unités de transcriptase inverse et 7 unités de Taq polymérase. Il est nécessaire de veiller à ce que le rapport [transcriptase inverse]/[Taq polymérase] soit inférieur à 3/2 car, au delà, la transcriptase inverse exerce une inhibition de l'activité de la Taq polymérase (Sellner *et al.*, 1992). Après addition d'huile minérale, les tubes sont placés dans le thermocycleur programmé de la façon suivante :

- une première étape de transcription inverse à 37°C pendant 1 heure,
- une deuxième étape de dénaturation des ADNc à 95°C pendant 5 minutes,
- puis 40 cycles d'amplification (précédemment décrits),
- une dernière étape d'élongation terminale à 70°C pendant 8 minutes.

Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

c) PCR nichée ou "nested-PCR"

Cette réaction consiste à amplifier une séquence du produit d'amplification de la première PCR. Cette seconde amplification garantit la spécificité et augmente la sensibilité de la première amplification.

Un μl du produit d'amplification est mélangé à 100 μl du mélange réactionnel suivant : tampon Taq 1X, 10 picomoles de chaque amorce, 100 μM de chaque dNTP et 5 unités de Taq polymérase. Le programme suivant est effectué : 40 cycles de 95°C pendant 1 minute, 55 °C pendant 1 minute, 72°C pendant 2 minutes suivis des étapes d'élongation terminale et de refroidissement précédemment décrits. Les produits de la "nested-PCR" sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

2.5. Hydrolyse par les endonucléases de restriction

L'hydrolyse des ADN par les enzymes de restriction est réalisée par l'incubation de 5 à 10 μl d'échantillon d'ADN (soit 0,1 à 5 μg) dans 2 μl du tampon (1 X final) approprié à l'enzyme à raison de 5 à 20 unités d'enzyme à la température d'activité optimale de l'enzyme (37°C généralement). Il est recommandé de ne pas ajouter plus de 1/10 de volume d'enzyme au volume final du milieu réactionnel car en présence de quantité trop importante de

glycérol, l'activité de l'enzyme peut être inhibée ou favoriser des clivages inattendus.

2.6. Electrophorèse analytique en gel d'agarose

Les ADN natifs ou hydrolysés sont analysés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 2 % (1 % Nusieve, 1 % Seakem (m/v)) dans du tampon TAE (Tris 40 mM, acétate de sodium 5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Une solution "de charge" est ajoutée à l'échantillon à raison de 1/10ème du volume total. Cette solution est composée de glycérol (v/v), 1 % SDS (m/v), 0,1 M EDTA et 0,5 mg/ml de bleu de bromophénol. Le temps de migration varie de 1 à 3 heures selon la taille de l'ADN à analyser et la tension. Après migration, le gel est immergé dans une solution de BET (bromure d'éthidium) à la concentration finale de 1 µg/ml pendant 15 minutes puis est rincé à l'eau distillée. Le BET est un agent intercalant qui se fixe entre les bases des acides nucléiques en donnant une fluorescence sous UV. Les fragments d'ADN sont visualisés et photographiés sous lumière UV à 312 nm (Transilluminateur Bioblock). La taille des fragments d'ADN est estimée par rapport à ceux de marqueurs de taille : les marqueurs V et VI (Boehringer Mannheim).

2.7. Techniques d'hybridation moléculaire

2.7.1. Préparation et marquage de la sonde

a) Marquage non radioactif

Le marquage de l'ADN est effectué par incorporation par PCR du nucléotide modifié, le DIG (Digoxigénine)-11-dUTP. L'ADN marqué est ensuite utilisé comme sonde et révélé par des méthodes immunoenzymatiques. La sonde non radioactive est constituée par le produit obtenu après amplification d'une séquence nucléotidique interne de 265 pb située dans le segment 7. Les amorces N1 et N2 sont utilisées.

A 100 µl du mélange réactionnel suivant : tampon Taq 1X, 10 picomoles de chaque amorce, 5 unités de Taq polymérase, 200 µM de

dATP, de dGTP, de dCTP chacun, 130 μ M de dTTP et 70 μ M de DIG-11-dUTP, est ajouté 1 μ l du produit d'amplification du gène 7 obtenu comme décrit à la section "4.2.4.4. Amplification génique". L'amplification génique est effectuée dans les conditions suivantes : 30 cycles de 95°C pendant 1 minute, 55°C pendant 1 minute et 72°C pendant 2 minutes puis les étapes d'élongation terminale et de refroidissement. Les produits d'amplification sont visualisés sur gel d'agarose. La taille de cette sonde est appréciée par comparaison à la migration des marqueurs de masse moléculaire. Le fragment marqué migre plus lentement que le fragment non marqué car le Dig-11-dUTP freine la migration de la sonde à travers le gel.

b) Electroélution

Ce procédé permet, après migration électrophorétique, d'extraire l'ADN à partir d'un gel d'agarose. La technique peut être réalisée dans la cuve contenant le tampon TBE ayant servi à l'électrophorèse. Les fragments d'ADN (correspondant aux fragments d'ADN amplifiés ayant incorporé les digoxigénine-11-dUTP), localisés par transillumination du gel d'agarose à 320 nm, sont découpés au scalpel et placés dans un tube à dialyse (préalablement rincé à l'eau ultrapure) rempli de tampon TAE 1X. Le tube est fermé à l'aide de clamps et placé dans une cuve à électrophorèse remplie de tampon TAE. L'électroélution est réalisée sous une tension de 120 V pendant 30 minutes afin de permettre à l'ADN de sortir du gel et de se positionner sur les parois du sac de dialyse. Après inversion du courant pendant 30 secondes à 150 V, pour décrocher l'ADN des parois, l'électroéluat est récupéré avec le tampon de rinçage du tube. Le sac de dialyse est lavé avec une petite quantité de TAE. La qualité de l'électroélution est vérifiée par examen de la bande d'agarose au transilluminateur. L'électroéluat est soumis à deux extractions avec un volume de phénol et avec un volume de phénol-chloroforme. L'ADN est précipité à l'éthanol pendant une nuit à -20°C après addition d'acétate de sodium 0,25 M à pH 5,2 et de deux volumes d'éthanol absolu. Le culot, obtenu après centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes, est rincé avec 500 μ l d'éthanol à 70 %, séché et repris dans 40 μ l d'eau bidistillée stérile. La sonde est stable à -20°C pendant plusieurs années.

La concentration d'ADN est mesurée au spectrophotomètre par la lecture de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm. Une dilution au 1/100 est effectuée avant la mesure de l'absorbance (Maniatis et coll., 1989).

Sachant qu'une absorbance de 1 correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin, la concentration de la sonde est déterminée par la formule suivante:
$$A \text{ à } 260 \times 50 \times 100 / 1000 = \text{Quantité de sonde en } \mu\text{g} / \mu\text{l}.$$

2.7.2. Dépôt des échantillons sur membrane

Les échantillons (acides nucléiques dénaturés extraits de virus purifié, de cultures de cellules, de prélèvements biologiques ou produits d'amplification) sont déposés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose selon deux procédés.

a) Dépôt manuel en spot ("dot-blot")

Les échantillons sont dénaturés pendant 10 minutes dans 0,1 volume de NaOH 1M puis, après addition d'un volume d'une solution neutralisante de NaCl 1 M, citrate de sodium 0,3 M et Tris 0,5 M (pH 8,0). Ils sont déposés sur une membrane de nylon (Hybon) ou de nitrocellulose sous un volume de 20 µl. La membrane est séchée, les acides nucléiques sont ensuite fixés par irradiation aux ultra-violets pendant 1 minute 30 par face (Maniatis et coll., 1989).

b) Dépôt par filtration sous vide sur un appareil de transfert

L'appareil de "dot-blot" utilisé est constitué de trois parties :

- un bloc supérieur creusé de 24 cupules de dépôt dont le fond est constitué d'une fente de 0,6 X 0,8 mm,
- un bloc médian creusé de fentes identiques à celles du bloc supérieur et servant de support à la membrane,
- un bloc inférieur permettant le recueil des liquides écoulés et relié à une pompe à vide.

La dépression provoquée par le vide oblige chaque échantillon à passer au travers d'une fente étroite, les acides nucléiques étant retenus sur la membrane.

Les échantillons, après dénaturation, sont déposés sous un volume de 100 µl dans chaque cupule puis rapidement aspirés. Après séchage de la membrane, les ADN sont fixés par les ultra-violets.

2.7.3. Transfert par la méthode Southern

Cette technique, décrite par Southern (1975), permet de transférer des fragments d'ADN du gel d'agarose sur lequel ils ont migré sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose. Le transfert s'effectue par capillarité.

Le gel d'agarose est prétraité par une série de bains. Deux bains successifs de 10 minutes chacun dans une solution de dénaturation NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M permettent de dénaturer l'ADN. Deux bains de neutralisation sont ensuite effectués dans une solution de Tris 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,0. Le transfert est réalisé en tampon 20X SSC (1X SSC : NaCl 0,15 M, citrate trisodique 0,015 M, pH 7,0) pendant une nuit. L'ADN est ensuite fixé à la membrane par irradiation aux UV ou par une cuisson de deux heures dans un four à 80°C.

2.7.4. Hybridation

L'hybridation consiste en l'appariement d'une sonde avec un acide nucléique cible. La spécificité de cet appariement dépend de la complémentarité entre les bases qui forment entre elles des liaisons hydrogène. La formation de ces liaisons suit une cinétique d'association-dissociation. Les facteurs principaux qui influencent cet équilibre sont la température et la force ionique du milieu d'hybridation. Un taux d'appariement maximal est obtenu lorsque ces conditions correspondent à une faible stringence, c'est à dire en solution de forte salinité et à une température de l'ordre de 42°C.

Les membranes de nylon préparées sont placées dans un sac plastique thermosoudable et préhybridées dans un tampon (50 % de formamide, SSC 5X, SDS 0,02 %, N-laurylsarcosine 0,1 % (m/v) et tampon de blocage 5% (Boehringer Mannheim)) à raison de 0,2 ml par cm² de membrane. Les hybridations sont effectuées dans une étuve à hybridation. Une incubation de 2 à 4 heures, sous agitation lente est effectuée à 42°C. La préhybridation permet une saturation de la membrane par des macromolécules afin que la sonde ne puisse se fixer que sur les séquences qui lui sont complémentaires. Après élimination du tampon de préhybridation, les membranes sont incubées une nuit sous agitation lente à 42°C dans le même tampon que précédemment décrit auquel est ajouté la

sonde (150 ng de sonde/ml de tampon) préalablement dénaturée par chauffage à 95°C pendant 5 minutes. La solution d'hybridation est ajoutée à raison de 0,025 ml par cm² de membrane .

Les membranes sont ensuite lavées, sous agitation dans des solutions de rinçage A et B de force ionique décroissante (solution A : SSC 2X ; SDS 0,1%. solution B : SSC 0,1X ; SDS 0,1%). Deux lavages de 5 minutes à température ambiante dans le tampon A, puis deux lavages de 15 minutes à 68°C dans le tampon B sont réalisés. Les membranes peuvent être révélées ou être conservées séchées.

2.7.5. Révélation des sondes froides

Un anticorps polyclonal anti-digoxigénine (DIG) conjugué à la phosphatase alcaline détecte les duplex ADN-sonde marquée à la DIG. La déphosphorylation d'un substrat chimiluminescent (le *Lumigen*) par la phosphatase alcaline en présence d'un tampon basique provoque l'émission de photons qui impressionnent un film photographique. La détection de la sonde est effectuée par utilisation du kit de révélation de la digoxigénine par chimioluminescence (Boehringer Mannheim).

Les membranes hybridées sont lavées pendant 5 minutes dans un tampon de lavage contenant acide maléique 0,1 M ; NaCl 0,15 M à pH 7,5 additionné de 0,3% de Tween 20 et immergées pendant 30 minutes dans un tampon de blocage (réactif de blocage fourni dans le kit dilué à 1% dans le tampon de lavage). Après saturation, les membranes sont incubées pendant 30 minutes dans la solution d'anticorps anti-digoxigénine (l'anticorps est dilué au 1/5000ème) marqués à la phosphatase alcaline. Les membranes sont lavées deux fois pendant 15 minutes dans le tampon de lavage puis immergées pendant 2 minutes dans le tampon suivant : Tris-HCl 0,1M; NaCl 0,1M; MgCl₂ 50mM à pH 9,5 à raison de 0,2 ml/cm². Les membranes sont incubées pendant 5 minutes dans une solution de coloration contenant de l'AMPPD (3-(2'-spiroadamantane)-4-méthoxy-4-(3''phosphoryloxy)-phényl-1,2-dioxétane). Ce composé est un substrat chimioluminescent de la phosphatase alcaline. Un intermédiaire instable (l'AMPD) s'accumule pendant la déphosphorylation et se décompose en adamantanone. Le transfert de charge excite l'anion méthyl méta-oxybenzoate qui émet alors des photons. Les membranes sont placées dans un sac à hybridation à l'obscurité à 37°C pendant 30 minutes. La membrane est exposée dans une

cassette à un film radiologique (hyperfilm ECL). Le film est développé après 10 minutes à 2 heures d'exposition.

2.8. Clonage dans le plasmide Bluescript

2.8.1. Préparation du plasmide vecteur

Le principe de la technique est décrit par Maniatis *et al.* (1989). Le phagemide est linéarisé par l'enzyme de restriction *EcoRV* puis les groupements terminaux 5' phosphate sont hydrolysés afin d'éviter la recircularisation du vecteur sur lui-même au cours de la réaction de ligature. 5 µg du phagemide Bluescript sont hydrolysés par l'enzyme *EcoRV* (10U/µl) pendant 2 heures à 37 °C. L'enzyme de restriction *EcoRV* génère des fragments d'ADN à bouts francs. La linéarisation est vérifiée par électrophorèse. L'enzyme de restriction est ensuite inactivée par une incubation de 10 minutes à 70 °C. Le plasmide linéarisé est extrait avec un volume égal de chloroforme puis un volume de phénol-chloroforme sous une agitation douce pendant 5 minutes à chaque extraction. Le phagemide est précipité par 2 volumes (V) d'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium (2.5M)(V/10) une nuit à -20°C. L'ADN est lavé à l'éthanol à 70% puis repris dans 44 µl de Tris HCl (10mM, pH 8,0).

a) Déphosphorylation du plasmide

La déphosphorylation du plasmide s'effectue par une première addition d'une unité de phosphatase alcaline d'intestin de veau par microgramme d'ADN plasmidique en présence de tampon spécifique (Tris HCl 0,5 mM, pH 8,5, EDTA 1mM) et incubation à 37 °C pendant 30 minutes. Après un second traitement identique, la déphosphorylation est interrompue par addition de 300 µl d'une solution d'arrêt (7,5 µl de SDS 20%, 0,6 µl d' EDTA 0,5M ; 1,5 µl de protéinase K (20mg/ml) et H₂O qsp 300 µl. Après 30 minutes d'incubation à 56°C, l'ADN plasmidique est extrait au phénol et au chloroforme comme décrit précédemment.

b) Ligature

La ligature de fragments d'ADN avec les extrémités du vecteur linéarisé est réalisée grâce à l'action de l'ADN ligase du phage T4 d'*Escherichia coli*. Cette enzyme catalyse la formation de ponts phosphodiester entre les extrémités 3' OH du vecteur et les extrémités 5' phosphate des fragments à insérer. Quatre cents ng de fragments à cloner ont été mélangés à 50 ng de vecteur linéarisé, déphosphorylé, en présence de 1,5 unités de T4 ADN ligase sous un volume final de 10 μ l. Le mélange réactionnel est incubé à 16°C pendant 16 heures. Des réactions témoins sont effectuées en parallèle : deux témoins négatifs contiennent uniquement le phagemide Bluescript linéarisé par Eco RV et déphosphorylé. A l'un de ces témoins est ajoutée la T4 ADN ligase. Ces deux essais permettent de contrôler l'efficacité de la déphosphorylation. Un troisième tube témoin contenant le plasmide linéarisé, non déphosphorylé et l'enzyme T4 ADN ligase permet de contrôler l'activité de cette dernière. La ligase est dénaturée par chauffage du milieu réactionnel à 70°C pendant 10 minutes.

c) Préparation du fragment à cloner

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans le phagemide Bluescript sont purifiés par électroélution ou à l'aide du kit de purification JETSORB.

Correction des extrémités :

La ligature devant s'effectuer dans un site de coupure à bouts francs, il est indispensable de rendre bouts francs les extrémités du fragment à cloner. Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* par son activité polymérasique 5'→ 3' permet le comblement des extrémités 5' sortantes.

A 10 μ l de produit d'amplification, sont ajoutés 2 μ l de dNTP (5 mM), 2 μ l de fragment de Klenow (5U/ μ l) et 10 μ l du tampon spécifique. Le mélange réactionnel est complété à un volume de 10 μ l puis incubé 30 minutes à 22°C.

Le fragment de Klenow est ensuite inactivée par chauffage à 68°C pendant 10 minutes. Après extraction par le phénol et le chloroforme, les

oligonucléotides en excès sont séparés du fragment à cloner par filtration sur colonne Sephadex G 50 ("spun Column") (Maniatis et Coll., 1989). La colonne est une seringue à insuline de 1 ml au fond de laquelle est placé un bouchon de laine de verre siliconé recouvert par 1 ml environ de Sephadex G 50 tassé par centrifugation à 1600 g pendant 4 minutes et équilibré dans du tampon TE. L'ADNc à cloner est déposé sur la colonne sous un volume de 100 μ l, filtré puis est ensuite précipité à l'éthanol, centrifugé, séché sous vide puis repris dans 10 μ l d'eau distillée. La concentration d'acides nucléiques est mesurée au spectrophotomètre.

d) Transformation de la souche *E.coli* XL1-Blue par le plasmide Bluescript

α) Production des bactéries compétentes

Un volume de 5 ml de milieu LB additionné de tétracycline (12,5 μ g/ml) estensemencé avec une colonie de la souche réceptrice XL1-Blue et incubé une nuit à 37°C sous agitation.

Dix ml de milieu LB additionné de tétracycline sont inoculés avec 500 μ l de cette préculture. L'incubation se poursuit à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance (absorbance $A_{550nm} = 0,5$). La suspension bactérienne est alors placée dans la glace pendant 10 minutes puis centrifugée à 2000 g à 4°C pendant 10 minutes.

Les opérations suivantes sont toutes effectuées dans la glace ou à 4°C. Le culot de bactéries est doucement remis en suspension dans 1 ml d'une solution de chlorure de calcium 10mM et centrifugé 30 secondes à 3000 g. Les cellules sont resuspendues à nouveau dans 500 μ l de la même solution de $CaCl_2$ (10mM), centrifugées puis reprises une troisième fois dans 500 μ l de $CaCl_2$ (75mM). Les bactéries ainsi rendues compétentes peuvent être conservées dans la glace jusqu'au lendemain ou immédiatement utilisées.

β) Transformation des bactéries

La suspension de bactéries compétentes (100 μ l) est mélangée à 150 ng de plasmide recombiné (soit 10 μ l du mélange de ligature). Sont

préparés dans les mêmes conditions, un témoin de compétence avec 150 ng de plasmide, d'un témoin de non-recircularisation du vecteur sur lui-même avec la même quantité de plasmide. Après une incubation de 45 minutes dans la glace, les bactéries subissent un choc thermique de 2 minutes à 42°C puis sont remises 2 minutes dans la glace. Elles sont alors diluées dans 1 ml de milieu LB, incubées sous agitation douce à 37°C pendant 1 heure puis étalées à raison de 200 µl par boîte, sur milieu sélectif LB "gélose" additionné de tétracycline, d'ampicilline, de X-gal et d'IPTG comme précédemment décrit. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant une nuit.

χ) Identification des clones recombinants

Les colonies qui se sont développées sont sélectionnées.

e) Minipréparation de l'ADN plasmidique

La méthode de minipréparation est celle décrite par Birnboim and Doly en 1979. Une colonie bactérienne de "type recombinant" est mise en culture à l'aide d'un cure-dent dans 3 ml de milieu LB additionné d'ampicilline à la concentration finale de 50 µg/ml. Après une nuit d'incubation à 37 °C sous agitation, les cellules sont sédimentées à 12000 g pendant 10 minutes puis remises en suspension dans 100 µl de solution contenant du glucose 15% (m/v), Tris HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 10 minutes puis 200 µl de solution de lyse (NaOH 0,2 N, SDS 1% (m/v)) sont additionnés. Après incubation du mélange 5 minutes dans la glace, 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 3M pH 5,0 sont ajoutés et l'ensemble est vigoureusement agité avant d'être incubé pendant 10 minutes dans la glace puis centrifugé pendant 15 minutes à 12000 g. Le surnageant est soumis à une première déprotéinisation par le phénol-chloroforme (v/v) saturé en TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0 ; EDTA 1 mM) puis à une seconde par le chloroforme. L'ADN plasmidique est précipité par deux volumes d'éthanol à 95 % pendant 1 heure à -20 °C. Le culot final d'acides nucléiques, obtenu après une centrifugation de 10 minutes à 12 000 g, est dissous dans 50 µl de tampon TE additionné de ARNase pancréatique à la concentration finale de 20 µg/ ml.

2.9. Détermination de la séquence nucléotidique

Les réactions de séquence sont réalisées à partir d'ADN plasmidique avec le kit de séquençage T7™ Pharmacia (Saint Quentin, France) selon le protocole joint par le fournisseur.

2.9.1. Analyse des plasmides recombinants

L'ADN plasmidique extrait de chaque clone est hydrolysé par l'enzyme de restriction *Pvu* II puis analysé sur gel d'agarose à 1%. En effet, l'enzyme *Pvu* II possède deux sites de restriction dans le phagemide Bluescript, l'un en position 529, l'autre en position 977, situés de part et d'autre du site *EcoRV*. La migration en parallèle avec un marqueur de masse moléculaire permet de vérifier la présence et la taille des fragments insérés.

2.9.2. Préparation de l'ADN plasmidique

Le pH est neutralisé par addition de 4,5 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 4,8). Le volume final est ajusté à 20 µl avec de l'eau stérile et l'ADN plasmidique est précipité par 60µl d'éthanol 100%. La solution d'ADN est laissée 15 minutes sur carboglace, centrifugée à 10 000g pendant 10 minutes puis le surnageant est éliminé et le culot délicatement rincé à l'éthanol 70% froid. Le précipité, obtenu après une seconde centrifugation, est séché sous vide puis dissous dans 10 µl d'eau distillée stérile.

2.9.3. Hybridation de l'amorce avec la matrice

Aux 10 µl de matrice d'ADN dénaturé, sont ajoutés 2 µl de tampon d'hybridation recommandé par le fournisseur et 2 µl de solution d'amorce dont la concentration est telle que le rapport amorce/matrice soit de 30/1. Les deux amorces standard utilisées dans les réactions de séquençages sont les suivantes :

groupement hydroxyl 3' impliqué dans les liaisons phosphodiester 5'-3' des chaînes d'ADN, ni le groupement hydroxyl 2' de la portion ribose. L'incorporation d'un didésoxyribonucléotide dans un brin d'ADN en cours d'élongation entraîne un arrêt de sa synthèse. Le rapport molaire entre un des quatre dNTP et son analogue ddNTP, est choisi de telle sorte que toutes les possibilités de terminaison de chaîne, à la base spécifique soient représentées. L'incorporation d'un désoxyribonucléotide radiomarké, dans notre cas le dATP $\alpha^{35}\text{S}$, permettra de détecter les chaînes d'ADN synthétisées. La séquence nucléotidique est déterminée après avoir mené en parallèle quatre réactions de synthèse, chacune d'elles étant réalisée en présence de l'un des quatre dNTP. La longueur des chaînes d'ADN obtenues dans ces conditions est fonction de la séquence nucléotidique d'un fragment particulier.

L'ADN polymérase du phage T7 qui catalyse l'extension de l'amorce, présente une grande stabilité. Dans le tube contenant l'hybridation amorce-matrice, 6 μl du mélange suivant sont ajoutés : 2 μl d'ADN polymérase de T7 diluée dans son tampon, 20 μl d'ATP $\alpha^{35}\text{S}$, 3 μl de mélange de marquage (recommandé par le fournisseur) de dCTP, dGTP et de dTTP. Après une agitation douce, le mélange réactionnel est incubé à température ambiante pendant 5 minutes.

2.9.5. Réaction de terminaison

Quatre tubes (notés A, G, C, T) contenant chacun 2,5 μl d'un mélange de chacun des quatre didésoxynucléotides triphosphate et les trois dNTP complémentaires sont chauffés à 37°C pendant 1 minute. 4,5 μl du mélange réactionnel contenant l'enzyme, la matrice et le nucléotide radiomarké, sont ajoutés dans chacun de ces quatre tubes qui sont incubés alors pendant 5 minutes à 37°C. Après addition de 5 μl de la solution d'arrêt (solution de formamide désionisée contenant EDTA, xylène cyanol et bleu de bromophénol), agitation douce et centrifugation brève, 3 μl de chacun des quatre mélanges de séquençage sont prélevés, dénaturés à 80°C pendant deux minutes puis chargés sur un gel de séquence.

2.9.6. Electrophorèse des produits de réactions de séquençage

Le gel de séquençage d'une hauteur de 50 cm et de 0,4 mm d'épaisseur est constitué d'une solution d'acrylamide à 8%, bis-acrylamide à 3% et d'urée 7 M (18,4 %) dans un tampon TBE 1X. Ce mélange est filtré (0,45 μm) et dégazé sous vide pendant 5 minutes.

La polymérisation du gel est effectuée par addition de 0,05% de persulfate d'ammonium (v/v) et de 0,1% de TEMED (v/v). La solution est injectée entre deux plaques de verre siliconées (diméthyl-dichlorosilane 2% (v/v)) et séparées par des espaceurs latéraux de 0,4 mm d'épaisseur. Le gel est soumis à un préchauffage à 1500 volts pendant 30 minutes puis les échantillons sont ensuite déposés sous un volume de 2 μl par dépôt. La migration s'effectue alors à 1500 volts à une puissance d'environ 40W. Lorsque le xylène-cyanol du dernier échantillon déposé arrive à 4 cm du bas du gel (ce qui correspond à un fragment de 160 pb), la migration est arrêtée, les puits rincés puis une autre série d'échantillons est déposée. La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol des derniers puits chargés atteint le bas du gel (ce qui correspond à un fragment de 45 pb).

Après migration, le gel est immergé dans une solution d'acide acétique 10% /méthanol 10% pendant 20 minutes. Il est ensuite égoutté, transféré sur une feuille de papier Whatman puis recouvert d'un film plastique et séché sous vide à 80°C pendant 45 minutes. Le gel est placé dans une cassette, recouvert d'un film photographique et laissé pendant 6 heures à température ambiante à l'obscurité puis développé.

2.9.7. Séquençage automatique

Certaines séquences ont été obtenues au moyen d'un séquenceur automatique (Applied, Biosystem, model 373A) à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Jouy-en-Josas.

Les produits d'amplification sont purifiés à l'aide du kit JETSORB en suivant le protocole recommandé par le fournisseur puis directement utilisés pour le séquençage.

2.9.8. Traitement informatique des données

L'analyse des séquences nucléotidiques a été effectuée à l'aide du logiciel PC/ GENE (Intelligenetics, version février 1991) installé sur un micro-ordinateur Victor "V386S".

RESULTATS

Nous présenterons, dans la première partie de ce chapitre, les résultats de la détection des segments S7 et S10 par RT-PCR à partir des ARN génomiques extraits du virus purifié, de cultures de cellules infectées et d'échantillons cliniques. Dans la deuxième partie, nous aborderons l'étude de la diversité génétique des souches par l'étude du polymorphisme de restriction des produits d'amplification. Enfin, une troisième partie sera consacrée à la détermination des séquences nucléotidiques des gènes S10 des souches AHSV-4 USDA et AHSV-4 Maroc 1990 et à leur comparaison avec celles publiées pour les autres souches de virus équine.

1. Détection de l'ARN génomique du virus de la peste équine par RT-PCR

1.1. Amplification génique de l'ARN extrait du virus purifié

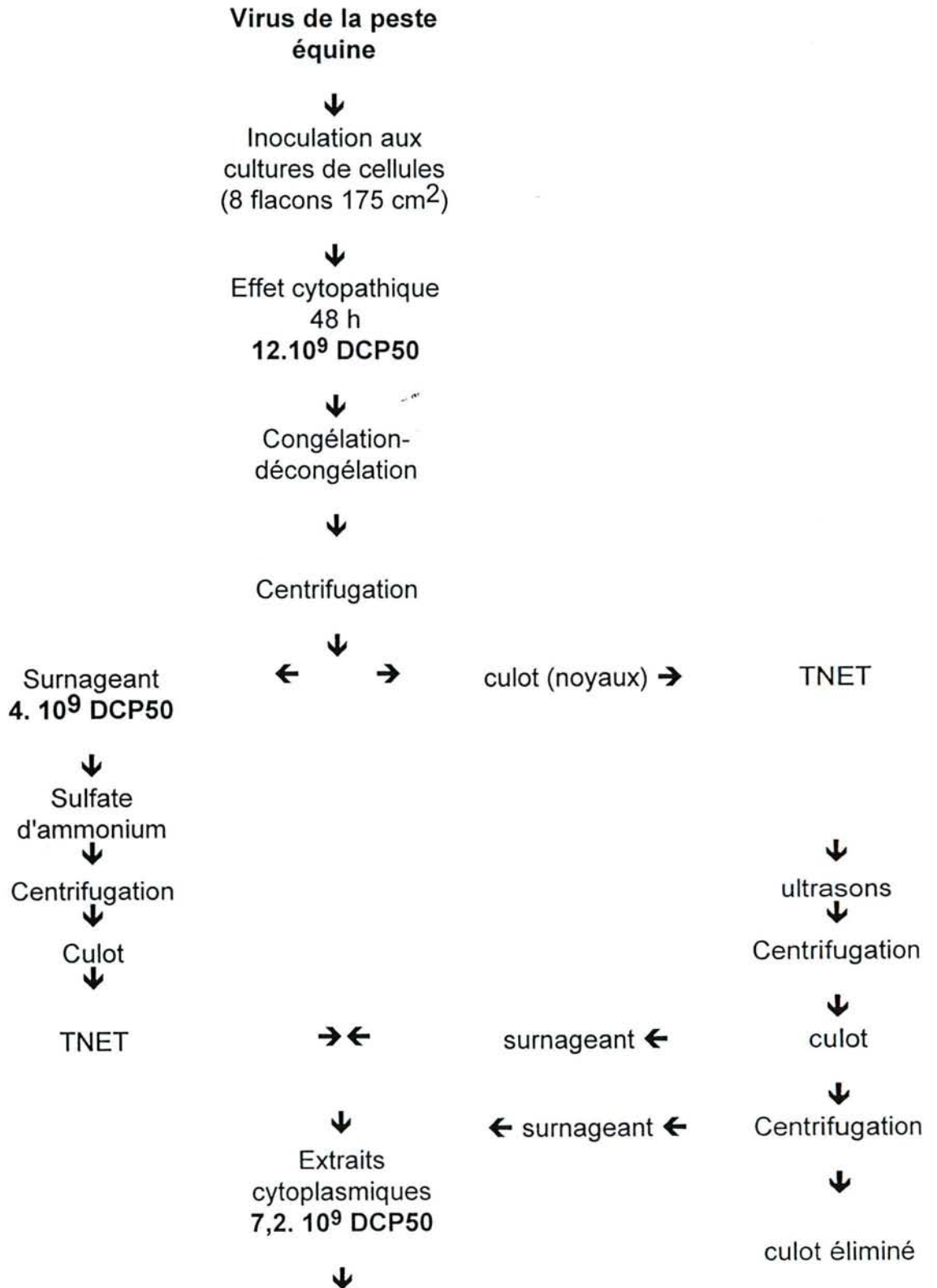
Le choix des amorces (P1 et P2 pour le gène S7 de AHSV-4 USDA et P3 et P4 pour les gènes S10 des virus de la peste équine sérotypes 3 et 9) a été effectué en se fondant sur l'hypothèse d'une forte similitude des séquences nucléotidiques des extrémités terminales 3' et 5' des gènes homologues (comme cela a été décrit pour les sérotypes du virus de la BT) des virus des 9 sérotypes. Afin de déterminer le seuil de sensibilité et d'optimiser les paramètres de la réaction RT-PCR, l'amplification a été réalisée à partir de l'ARN génomique extrait du virus purifié.

1.1.1. Purification du virus sur gradient de saccharose

Nous avons préalablement déterminé que la quantité maximale de virus est obtenue 48 heures après l'infection des cellules Vero par la souche AHSV-4 USDA. Après lyse des cellules par un cycle de congélation - décongélation, le titre viral dans la suspension est de 3.10^7 DCP50/ml ce qui correspond, pour un volume de 400 ml, à une quantité totale de 12.10^9 DCP50.

Le virus étant fortement lié aux membranes cellulaires (Mertens *et al.*, 1987; Burroughs *et al.*, 1992), il est nécessaire de traiter aux ultrasons les culots obtenus après centrifugation à basse vitesse afin de détacher les

particules virales de ces débris cellulaires (fig. n° 9). Le titre viral final obtenu à l'issue de la purification est de $15 \cdot 10^6$ DCP50/ml. Les quantités de virus recueillies à l'issue des différentes étapes du protocole de purification sont les suivantes :



gradient discontinu
de saccharose
(44-66%)



ultracentrifugation



3. 10⁶ DCP50
(15. 10⁶
DCP50/ml)

Fig. n° 9 : Quantités de virus que nous avons recueillies à l'issue des différentes étapes du protocole de purification adapté de la méthode de Mertens *et al.* (1987).

La quantité obtenue, exprimée en doses cytopathiques 50% (DCP50), de virus purifié a considérablement diminué ($3 \cdot 10^6$ DCP50) par rapport à la quantité initiale ($12 \cdot 10^9$ DCP50). Cependant, ces données sont conformes aux résultats obtenus par Mertens *et al.* (1987) pour le virus de la BT et par Burroughs *et al.* (1994) pour le virus de la peste équine. En effet, les particules virales purifiées s'agglutinent et forment des agrégats. L'addition de dithiothreitol (10 mM) qui favoriserait le détachement des virus des débris cellulaires), de N-laurylsarcosine (à 1%) et de désoxycholate de sodium (à 3%), qui, par leur action détergente, empêchent l'agrégation des particules virales entre elles (Mertens *et al.*, 1987), permet d'observer une augmentation d'un facteur 10 du titre viral.

1.1.2. Extraction de l'ARN

A partir de la suspension virale purifiée, nous avons obtenu 100 µg d'ARN génomique (fig. n° 10). L'électrophorèse analytique en gel d'agarose permet de détecter les dix segments d'ARN double brin. Les segments 7, 8 et 9, de masses molaires voisines, co-migrent en gel d'agarose.

Les profils obtenus après migration électrophorétique des segments d'ARN génomiques de treize souches virales sont similaires (fig. n° 11).

1.1.3. Synthèse de l'ADN complémentaire et PCR

La synthèse de l'ADN complémentaire est effectuée à partir de 2,5 μ l (soit 500 ng) d'ARN génomique, extrait du virus purifié et dénaturé par l'hydroxy-méthyl-mercure en présence de deux amorces (P1 et P2 pour le gène S7 et P3 et P4 pour le gène S10). Un μ l du milieu contenant les hétéroduplex ARN-ADNc ainsi synthétisés est mélangé dans le milieu réactionnel contenant la Taq polymérase et les amorces. Un fragment d'environ 1170 pb est obtenu (fig. n° 12).

1.2. Optimisation des paramètres

Le nombre de variables impliquées dans la réaction PCR étant important, l'optimisation des principaux paramètres qui influencent la sensibilité et la spécificité de cette technique, en fonction de la matrice utilisée, est nécessaire (Innis *et al.*, 1990). Ces paramètres sont les suivants: concentration des amorces, nombre de cycles d'amplification, température d'hybridation et concentration en Taq polymérase.

1.2.1. Concentration des amorces

L'influence de différentes concentrations d'amorces (respectivement 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 et 200 μ M de chaque dNTP) sur le rendement de la PCR ont été testées. La concentration de 100 μ M de dNTP s'avère optimale (fig. n° 13A).

1.2.2. Nombre de cycles d'amplification

Différents nombres de cycles d'amplification (10, 15, 20, 30, 35 et 40) ont été testés afin de déterminer le nombre minimal permettant un rendement optimal de la PCR pour une concentration donnée d'amorces. Le nombre minimal de cycles, pour une concentration de 100 μ M de chaque dNTP, est de 40 (fig. n° 13B).

virus AHSV-4 USDA M (marqueur de masse moléculaire)

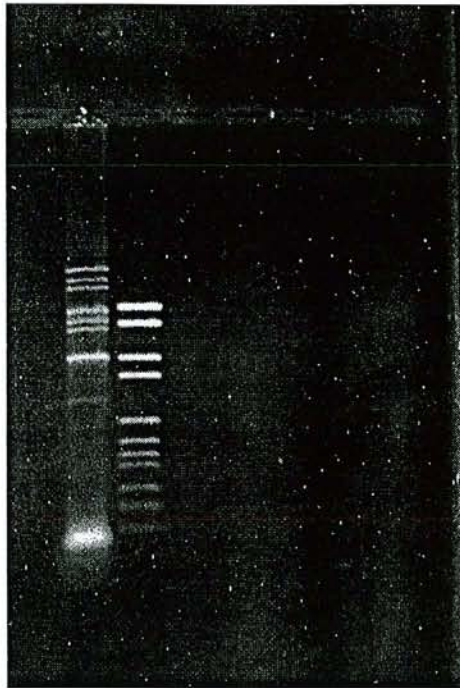


Fig. n° 10 : Electrophorèse en gel d'agarose à 2 % de l'ARN génomique (4 μ g) extrait du virus de la peste équine sérotype 4 (souche USDA) purifié. La taille de ce fragment est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M).

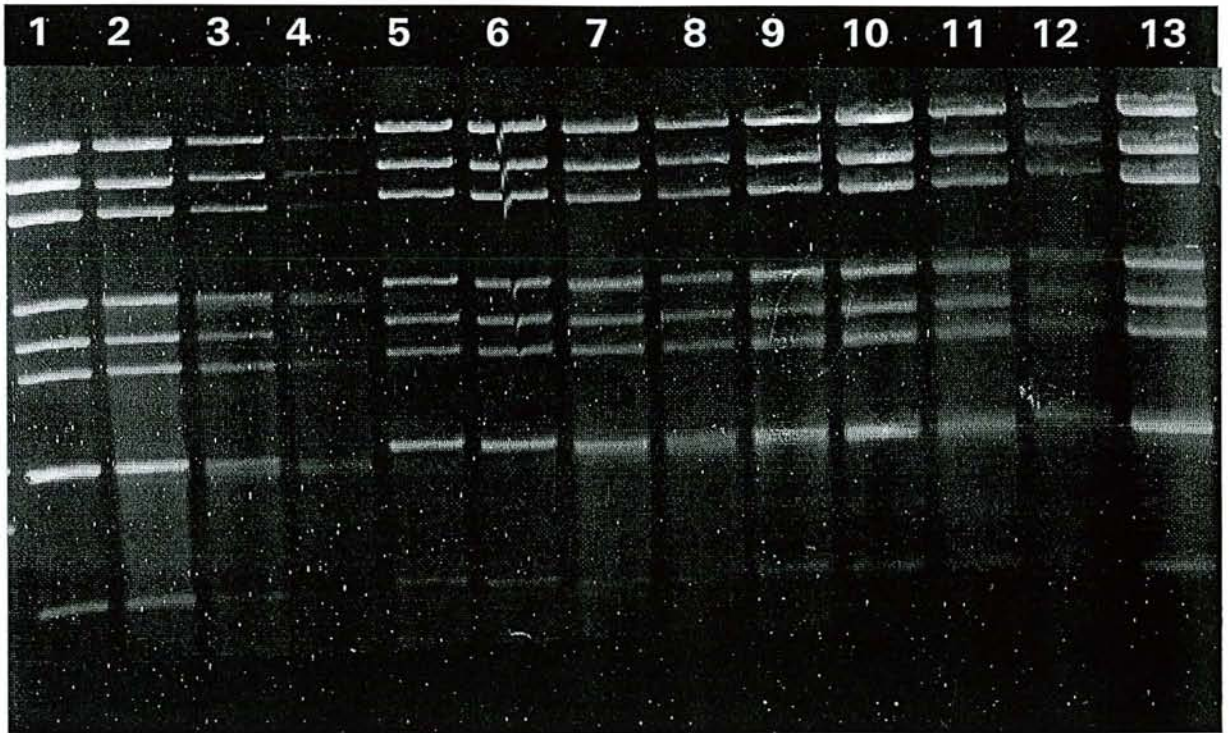


Fig. n° 11 : Electrophorèse en gel d'agarose à 2 % des ARN génomiques extraits des particules virales des souches AHSV-4 S4 (puits 1), AHSV-9 SA (puits 2), AHSV-4 Maroc (puits 3), AHSV-4 E (puits 4), AHSV-1 à -9 USDA (puits 5 à 13).

M gène S7 amplifié



Fig. n° 12 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % du produit d'amplification après transcription-inverse et PCR de l'ARN extrait du virus équinestique purifié 4 USDA. Les amorces utilisées sont P1 et P2, complémentaires des extrémités terminales 5' et 3' du gène S7 de AHSV-4. La taille de ce fragment est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M).

1.2.3. Température d'hybridation

La température d'hybridation des amorces est fonction, en partie, de la température de fusion (T_m) des amorces. Une température d'hybridation trop faible favorise les amplifications non spécifiques, une température trop élevée empêchera l'hybridation des amorces avec la matrice. Les températures de fusion des amorces ont été calculées selon la formule précédemment décrite (4.2.4.2.) :

Amorces	Température de fusion (T_m)
P1	54°C
P2	54
P3	52
P4	62
N1	62
N2	60

Les températures d'hybridation (45 °C, 50 °C et 55 °C) ont été testées pour chacun des couples d'amorces P1-P2 (gène S7) et P3-P4 (gène S10).

La température d'hybridation optimale est de 55 °C pour le couple d'amorces P1-P2 et 50 °C pour le couple d'amorces P3-P4 (fig. n° 14).

1.2.4. Concentration en Taq polymérase

Différentes concentrations de la Taq polymérase ont été testées (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3 unités). La concentration optimale en Taq polymérase s'est avérée être de 2,5 unités pour 100 μ l de milieu réactionnel.

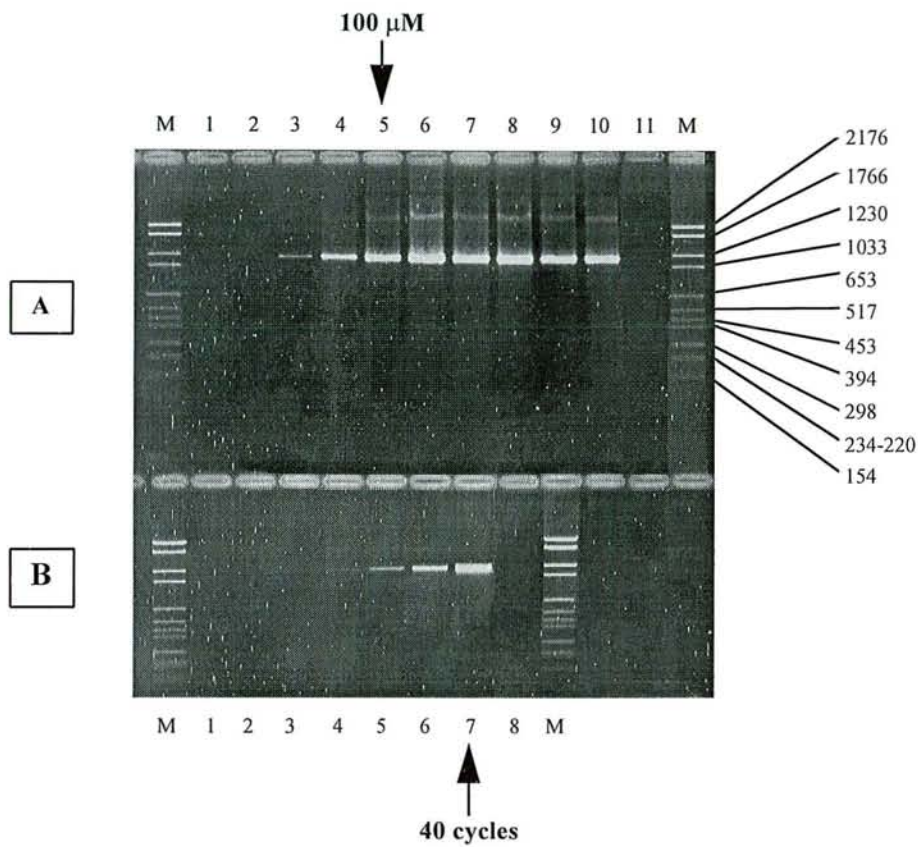


Fig. 13 :

A : Influence de la concentration en dNTP sur le rendement de la RT-PCR. Les puits 1 à 10 correspondent respectivement aux concentrations de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 et 200 μM de chaque dNTP (puits 11 : la matrice est remplacée par de l'eau).

B : Influence du nombre de cycles d'amplification. Les puits 1 à 7 correspondent aux nombres de cycles respectifs de : 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 (puits 8 : la matrice est remplacée par de l'eau).

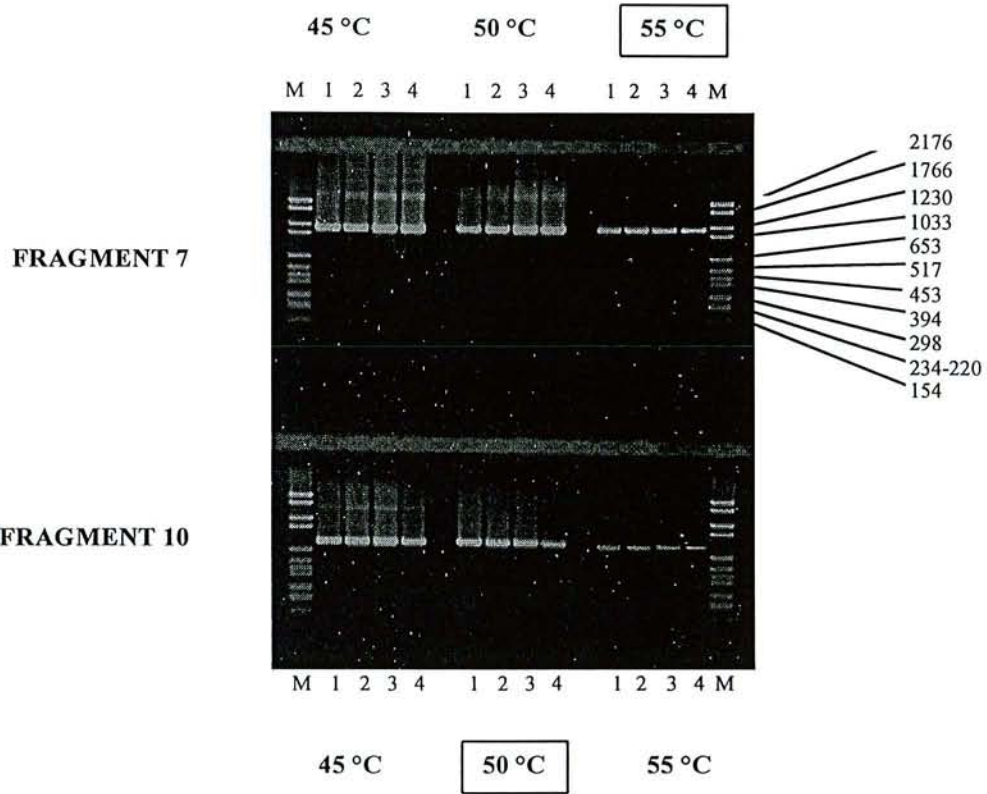


Fig. n° 14 : Détermination des températures d'hybridation optimales pour les couples d'amorces P1-P2 (gène S7) et P3-P4 (gène S10). Puits 1, 2, 3 et 4 (dépôts identiques) : gènes S7 et S10 amplifiés à partir de l'ARN viral génomique extrait du virus purifié de la peste équine sérotype 4 USDA. Les tailles de ces fragments sont évaluées par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M).

1.3. Révélation par sonde moléculaire

La spécificité du produit d'amplification, notamment son origine virale, est vérifiée par hybridation du produit d'amplification marqué à la digoxigénine avec les acides nucléiques extraits de cellules non infectées et infectées par le virus de la peste équine sérotype 4 USDA, immobilisés sur filtre de nitrocellulose (fig. n° 15). L'incorporation du nucléotide Dig-11-dUTP est effectuée au cours de la réaction de PCR. Le produit marqué est purifié, utilisé comme sonde moléculaire et la détection des hybrides est fondée sur la révélation de la molécule de digoxigénine par luminescence.

1.4. Amplification génique de l'ARN extrait de culture de cellules infectées

Les conditions de la RT-PCR ayant été optimisées en utilisant l'ARN extrait du virus purifié de la peste équine sérotype 4 USDA, nous avons employé le même protocole pour détecter le gène S7 à partir d'acides nucléiques extraits de cellules infectées. Le produit d'amplification obtenu après RT-PCR réalisée à partir de l'ARN total extrait d'un flacon de culture de cellules Vero infectées par le virus de la peste équine sérotype 4 USDA, a une taille évaluée à 1170 pb par migration sur gel d'agarose (l'électrophorèse obtenue est identique à celle présentée fig. n° 12). La spécificité de ce fragment est vérifiée par hybridation avec une sonde moléculaire marquée à la digoxigénine.

1.5. Amplification génique de l'ARN extrait de cerveaux de souriceaux nouveau-nés infectés

A partir des ARN extraits des cerveaux des souriceaux inoculés expérimentalement par voie intra-cérébrale avec AHSV-4 USDA, un produit d'amplification unique est obtenu dont la taille est d'environ 1170 pb (l'électrophorèse obtenue est identique à celle présentée fig. n° 12).

1.6. "Nested-PCR"

Le produit d'amplification du gène S7 est soumis à une amplification à l'aide des amorces N1 et N2. La taille du fragment obtenu est estimée à 260 pb par électrophorèse en gel d'agarose (fig. n° 16).

1 2 3



Fig. n° 15 : Vérification de la spécificité du produit d'amplification (marqué à la digoxigénine) du gène S7 du virus purifié de la peste équine sérotype 4 USDA par hybridation avec les acides nucléiques extraits de cellules infectées et non infectées par le virus équinestique.

*Puits 1 : ARN extraits du virus purifié ; puits 2 : acides nucléiques extraits de cellules Vero infectées par le virus de la peste équine sérotype 4 USDA, déposés sur filtre de nitrocellulose ; puits 3 : acides nucléiques extraits de cellules Vero non infectées.

M 1 2

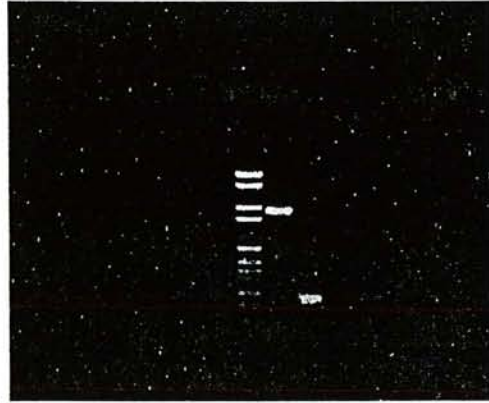


Fig. n° 16 : Analyse par électrophorèse en gel d'agarose du produit de "nested-PCR" obtenu après PCR avec les amorces N1 et N2 du produit d'amplification du gène S7 du virus AHSV-4 USDA. La taille de ce fragment est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M)(les masses moléculaires sont indiquées fig.n° 14). Puits 1 : produit d'amplification du gène S7 ; puits 2 : produit de "nested-PCR".

1.7. Vérification de la spécificité des amorces sélectionnées

1.7.1. Spécificité des produits d'amplification

La RT-PCR a été effectuée à partir des acides nucléiques extraits de cellules Vero infectées ou non par les virus des neuf sérotypes de peste équine. Les acides nucléiques extraits de cellules infectées par les principaux virus qui infectent les équidés sont soumis à une amplification selon le même protocole. Un fragment dont la taille est estimée à 1170 pb est obtenu pour chaque échantillon d'acides nucléiques de cellules infectées par les virus équinepestiques (fig. n° 17). Après RT-PCR et électrophorèse en gel d'agarose, aucun fragment n'est obtenu à partir des échantillons d'acides nucléiques extraits de cellules infectées avec d'autres virus qui infectent les équidés. De même, à partir de l'échantillon constitué des extraits de cellules de cheval ED, non infectées, aucun fragment n'est visible sur gel d'agarose.

Hybridation moléculaire

La spécificité des fragments d'ADN amplifiés est confirmée par hybridation de la sonde moléculaire interne avec les produits d'amplification déposés sur filtre de nitrocellulose ("dot-blot"). Cette sonde interne (SI) est préparée par incorporation de la digoxigénine lors de la PCR nichée du gène S7 du virus de la peste équine sérotype 4 USDA. Sa taille est de 265 pb.

La sonde s'hybride uniquement avec les ADN obtenus après transcription inverse-PCR des ARN extraits à partir de cellules infectées par les virus de la peste équine de sérotypes 1 à 9 (fig. n° 18). Aucune hybridation n'est révélée avec les acides nucléiques des principaux virus infectant les équidés ainsi qu'avec l'ADN extrait de cellules de cheval (ED).

1.7.2. Spécificité de groupe AHSV

La spécificité de groupe AHSV des amorces P1 et P2 a été déterminée vis-à-vis des 24 sérotypes du virus de la Bluetongue et de cinq sérotypes du virus de la maladie hémorragique du cerf. Les ARN des cellules Vero inoculées avec ces différents *Orbivirus* ont été extraits et soumis à une RT-PCR selon le protocole décrit précédemment.

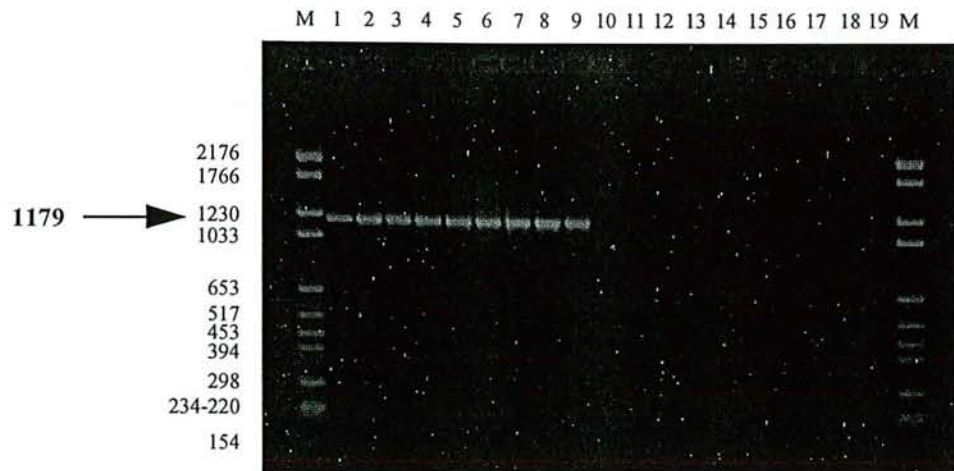


Fig. n° 17 : Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification obtenus après RT-PCR effectuée à l'aide des amorces P1 et P2 à partir des acides nucléiques extraits de cellules infectées par les neuf sérotypes de AHSV et par d'autres virus infectant les équidés. Puits 1 à 9 : cellules Vero infectées par les virus des sérotypes 1 à 9 respectivement (AHSV-1 à -9, souches USDA) ; puits 10, 11, 13, 15 et 17 : cellules infectées respectivement par 10) virus de l'artérite virale des équidés (EAV), 11) réovirus équin sérotype 3, 13) herpès virus équin -1 (EHV1), 15) virus grippal équin A/equi/Brentwood/79, 17) adénovirus équin -1. Puits 12, 14, 16, et 18 : acides nucléiques extraits de cellules non infectées : 12) cellules Vero, 14) cellules RK13, 16) cellules MDCK, 18) cellules ED. Puits 19 : témoin eau.

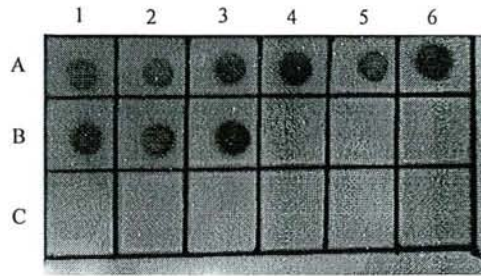


Fig. n° 18 : Contrôle de la spécificité des produits d'amplification. Les fragments amplifiés sont déposés sur filtre de nitrocellulose et hybridés avec la sonde interne SI marquée à la digoxigénine. L'hybridation est visualisée par autoradiographie. La disposition et la nature des dépôts des produits d'amplification effectuée à partir des acides nucléiques extraits de cellules infectées ou non sont les suivantes : A1 à A6 et B1 à B3 : AHSV-1 à -9, souches USDA ; B4 : virus de l'artérite virale des équidés (EAV) ; B5 : réovirus équin sérotype 3 ; B6 : cellules Vero ; C1 : herpès virus équin -1 (EHV1) ; C2 : cellules RK13 ; C3 : virus grippal équin A/equi/Brentwood/79 ; C4 : cellules MDCK ; C5 : adénovirus équin -1 ; C6 : cellules ED.

Aucun produit d'amplification n'a été détecté par amplification en gel d'agarose pour l'ensemble des échantillons. Aucune hybridation entre les éventuels produits amplifiés obtenus et la sonde interne SI dérivée du gène S7 de AHSV-4 USDA n'a pu être détectée (tableau XV).

Tableau XV : Résultats de la RT-PCR effectuée à partir des ARN extraits de cellules Vero infectées par les 24 sérotypes de BTV et EHDV-1, -2, -3, -4 et -7 et de l'hybridation moléculaire avec la sonde interne SI dérivée du gène S7 de AHSV-4 USDA.

	ARN extraits de cellules Vero infectées par les <i>Orbivirus</i>		
	BTV -1 à -24	EHDV-1, -2, -3, -4, -7	AHSV-4 USDA
RT-PCR segment S7 (amorces P1 et P2)	-	-	+
sonde SI (265 pb)	-	-	+

1.8. Détermination de la sensibilité

Le seuil de sensibilité de la RT-PCR a été défini comme la quantité minimale d'ARN génomique cible pouvant être détectée. Ce seuil a été déterminé en fonction des méthodes de révélation des produits d'amplification : électrophorèse analytique en gel d'agarose, hybridation moléculaire ou "nested-PCR".

De plus, en vue de l'utilisation de la RT-PCR dans le diagnostic de l'infection équine et de la comparaison de sa sensibilité avec celle d'autres techniques, le seuil de sensibilité a été déterminé par estimation de la quantité minimale de DCP50% détectable du virus de la peste équine.

1.8.1. Seuil de sensibilité exprimé en quantité d'ARN génomique détectée

Détection du produit d'amplification par électrophorèse en gel d'agarose

A l'aide des amorces P1 et P2, une RT-PCR est effectuée à partir d'échantillons contenant des quantités décroissantes allant de 25 ng à 5 fg d'ARN génomique extrait du virus de la peste équine sérotype 4 USDA purifié (fig. n° 19A).

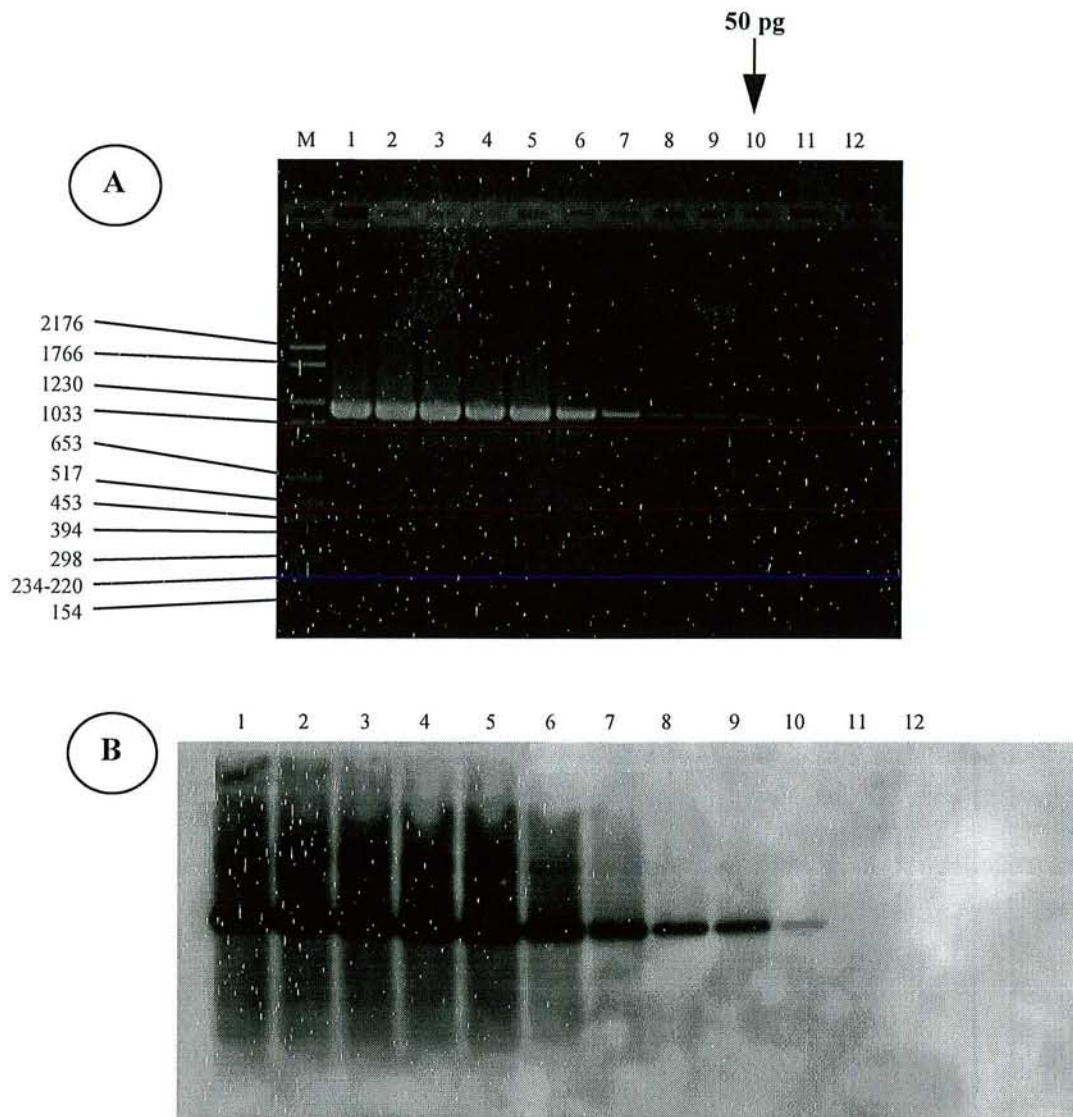


Fig. n° 19 :

A : Détection par électrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification après RT-PCR effectuée à partir de quantités décroissantes d'ARN génomique viral extrait du virus purifié AHSV-4USDA. Les puits 1 à 10 correspondent aux quantités respectives d'ARN db génomique suivantes : 1) 500 ng, 2) 250 ng, 3) 100 ng, 4) 50 ng, 5) 25 ng, 6) 1 ng, 7) 500 pg, 8) 250 pg, 9) 100 pg, 10) 50 pg, 11) 10 pg et 12) 1 pg. La taille des fragments est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M).

B : Les produits d'amplification analysés par électrophorèse en gel d'agarose sont transférés sur filtre de nitrocellulose et hybridés avec la sonde SI. Les hybrides sont révélés par chimioluminescence. Les puits 1 à 10 correspondent aux quantités respectives d'ARN db génomique suivantes : 1) 500 ng, 2) 250 ng, 3) 100 ng, 4) 50 ng, 5) 25 ng, 6) 1 ng, 7) 500 pg, 8) 250 pg, 9) 100 pg, 10) 50 pg, 11) 10 pg et 12) 1 pg.

La limite de détection par visualisation sur gel d'agarose d'un produit d'amplification (gène S7) correspond à une quantité minimale de 50 pg d'ARN génomique viral (tableau XVI).

Tableau XVI : Détermination du seuil de sensibilité de la RT-PCR par estimation de la quantité minimale d'ARN génomique détectée.

La RT-PCR est effectuée à partir de 2,5 µl de chaque dilution d'ARN génomique viral.

Quantité d'ARN génomique total de AHSV-4 USDA	25 ng	1 ng	500 pg	250 pg	100 pg	50 pg	10 pg	1 pg	500 fg	100 fg	50 fg	5 fg
RT-PCR (électrophorèse analytique en gel d'agarose)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

La quantité minimale d'ARN double brin S7 (ARN cible) peut être estimée par le calcul suivant :

$$\frac{\text{(Quantité d'ARN génomique total détectée)}}{\text{(Masse molaire du génome total)}} / \frac{\text{(Quantité d'ARN db S7)}}{\text{(Masse molaire de l'ARN db S7)}} =$$

- La masse molaire de l'ARN db S7 est estimée à :

$$2 \times (\text{Nombre de nucléotides du segment S7}) \times 330 \text{ Da} \times 1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g}$$

(1 Da \approx 1,66 $\cdot 10^{-24}$ g).

- La masse molaire du génome de AHSV-4 USDA est estimée à :

$$2 \times (\sum \text{Nombre de nucléotides de chaque segment génomique}) \times 330 \text{ Da} \times 1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g}.$$

- La quantité d'ARN db S7 (Q ARN db S7) est donc :

$$Q \text{ ARN db S7} = 50 \text{ pg} \times (\text{Nombre de nucléotides de S7}) / (\text{Nombre total de nucléotides du génome})$$

$$Q \text{ ARN db S7} = 50 \times 1179 / 18976$$

$$Q \text{ ARN db S7} = \mathbf{3,1 \text{ pg.}}$$

Conclusion :

La quantité minimale d'ARN db gène S7 détectable par électrophorèse en gel d'agarose après transcription inverse-PCR est de $3,1 \cdot 10^{-12} \text{ g}$.

Calcul du nombre de particules virales détectées

Le nombre minimal théorique de particules virales ainsi détectées peut être calculé :

Nombre de particules détecté = (Quantité d'ARN génomique total détectée) / (Masse molaire du génome viral).

Ce nombre est de $2,5 \cdot 10^6$ particules virales.

Révélation par hybridation moléculaire

Après transfert sur filtre de nitrocellulose des produits d'amplification analysés par électrophorèse en gel d'agarose ("Southern-blot"), les ADNc amplifiés sont hybridés avec la sonde SI et révélés par chimioluminescence (fig. n° 19B).

Le seuil de détection, après révélation des ADNc amplifiés avec la sonde SI, s'avère identique à celui estimé après simple électrophorèse en gel d'agarose (soit 50 pg). Cependant, l'hybridation avec une sonde améliore considérablement la détection du produit d'amplification correspondant à la quantité de 50 pg d'ARN db (fig. n° 19B, puits 10) alors que par électrophorèse en gel d'agarose, ce segment est faiblement visible.

Bien que la quantité d'ARN total initialement détectée ne soit pas modifiée par la révélation à l'aide d'une sonde moléculaire, il est possible d'estimer que l'hybridation moléculaire améliore d'un facteur 10 environ le seuil de détection par rapport à l'électrophorèse analytique.

Détection par "nested-PCR"

La détection est effectuée par une ré-amplification, à l'aide des amorces N1 et N2, des produits d'amplification de la RT-PCR effectuée à l'aide des amorces P1 et P2 (fig. n° 20).

Le seuil de sensibilité après "nested-PCR" est de 5 fg d'ARN génomique viral (fig. n° 20, puits 22) ce qui correspond à une quantité minimale estimée de 0,31 fg d'ARN db cible S7 et à 250 particules virales.

1.8.2. Seuil de sensibilité exprimé en DCP50%

La quantité minimale de virus infectieux, exprimée en DCP50%, a été déterminée par amplification du gène S7 de AHSV-4 USDA à partir de quantités décroissantes de virus (tableau XVII). Quarante huit heures après

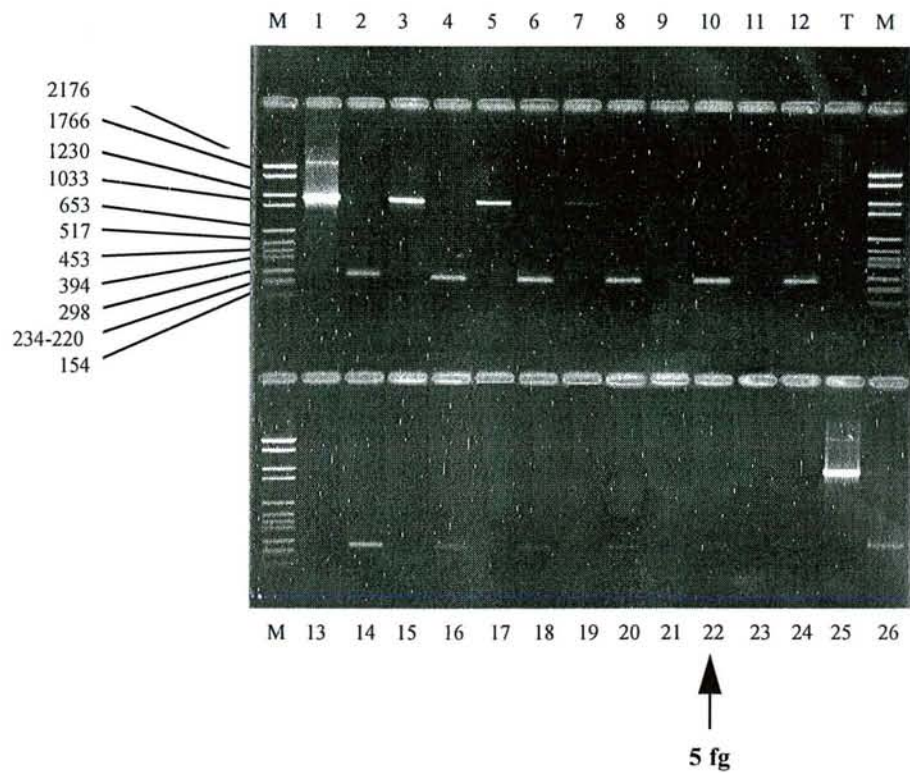


Fig. n° 20 : Détermination de la quantité minimale d'ARN génomique total extrait du virus purifié de la peste équine sérotype 4 USDA par "nested-PCR". Les produits d'amplification obtenus à l'aide des amorces P1 et P2 par RT-PCR sont ré-amplifiés à l'aide des amorces N1 et N2. Un fragment de 265 pb est obtenu. Les puits dont les numéros sont impairs correspondent aux produits d'amplification obtenus pour des quantités initiales de 1) 1 ng, 3) 500 pg, 5) 250 pg, 7) 100 pg, 9) 50 pg, 11) 10 pg, 13) 1 pg, 15) 500 fg, 17) 100 fg, 19) 50 fg, 21) 5 fg et 23) 1 fg. Les puits dont les numéros sont pairs correspondent aux produits de "nested-PCR". Puits 25 et 26 : Témoins positifs. La taille des fragments est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M). T : témoin eau.

inoculation, les cellules subissent un cycle de congélation-décongélation. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à basse vitesse et les particules virales sont précipitées par ultracentrifugation. Les culots sont repris dans 200 µl de tampon TNE.

Le titre infectieux moyen de chaque suspension virale est déterminé. Les ARN totaux sont extraits et repris sous un volume de 20 µl d'eau bidistillée stérile. La transcription inverse-PCR à l'aides des amorces P1 et P2 est effectuée à partir de 2,5 µl de cette suspension d'ARN génomique total.

Tableau XVII : Détermination de la quantité minimale de virus infectieux, exprimée en DCP50%, détectée par RT-PCR.

L'observation d'un éventuel ECP a été effectuée à 48 h post-infection. La quantité minimale de virus infectieux, exprimée en DCP50%, a été déterminée à partir d'un volume de 200 µl après ultracentrifugation .

Quantités de DCP 50% inoculées	$3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^1$	8	$8 \cdot 10^{-1}$
Effet cytopathique	100%	100%	80%	0	0	0	0	0
DCP 50% dans les culots viraux	$6 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^2$	$6 \cdot 10^1$
RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	-

La limite de détection du gène S7 du virus de la peste équine sérotype 4 USDA correspond à la suspension d'ARN extrait de $6 \cdot 10^2$ DCP50%. La RT-PCR ayant été effectuée à partir d'un volume de 2,5 µl, la quantité minimale de virus détectée peut être estimée à 75 DCP50%. La différence entre le titre minimal de virus détecté par simple RT-PCR et le nombre de particules virales ($2,5 \cdot 10^6$) calculé à partir de la quantité minimale d'ARN génomique détectée pourrait s'expliquer par une surestimation de la quantité initiale d'ARN génomique viral. En effet, la corrélation entre le nombre de particules virales détectées par "nested-PCR" (250) et ce titre minimal détecté de 75 DCP50% est tout à fait cohérent.

1.9. Application de la RT-PCR au diagnostic du virus de la peste équine

L'intérêt de la RT-PCR à la détection du génome du virus de la peste équine à partir d'échantillons cliniques est étudié et sa sensibilité et sa spécificité sont comparées avec celles de l'isolement viral et d'un test ELISA de capture d'antigène.

1.9.1. Détection de l'ARN du virus équine à partir de tissus nécropsiques

La transcription inverse-PCR, effectuée en une seule étape dans le même milieu réactionnel, permet d'amplifier le gène S7 du virus de la peste équine à partir d'ARN extraits d'échantillons nécropsiques (fig. n° 21 et 22). La spécificité des produits d'amplification est confirmée par hybridation moléculaire.

Le tableau XVIII résume les résultats de l'isolement viral et de la RT-PCR effectués à partir des échantillons cliniques originaires d'Espagne, du Maroc et du Cameroun.

Les prélèvements 20 à 29 s'avèrent négatifs par isolement viral et RT-PCR. Ces échantillons ont été prélevés de cadavres de chevaux français et constituent les témoins négatifs. L'échantillon 10 (Oujda) provient d'un cadavre de cheval marocain, non infecté et séronégatif. Une bonne corrélation est obtenue entre l'isolement viral et la RT-PCR à l'exception des échantillons 1, 6, 31, 34 et 37. Ces échantillons sont positifs par RT-PCR mais le virus n'a pas été isolé après cinq passages en culture de cellules. Le virus a été isolé de l'échantillon 35 à partir du cinquième passage en culture de cellules. Les prélèvements 30 à 37 (Cameroun) sont parvenus au laboratoire dans un état de putréfaction avancée.

1.9.2. Comparaison de la RT-PCR avec l'ELISA et l'isolement viral

A partir d'un ensemble de 76 échantillons biologiques (rates, cerveaux de souris, insectes...), la sensibilité et la spécificité de la RT-PCR ont été comparées à celles de l'isolement viral et de l'ELISA pour capture d'antigène. La RT-PCR est effectuée en une seule étape (transcription

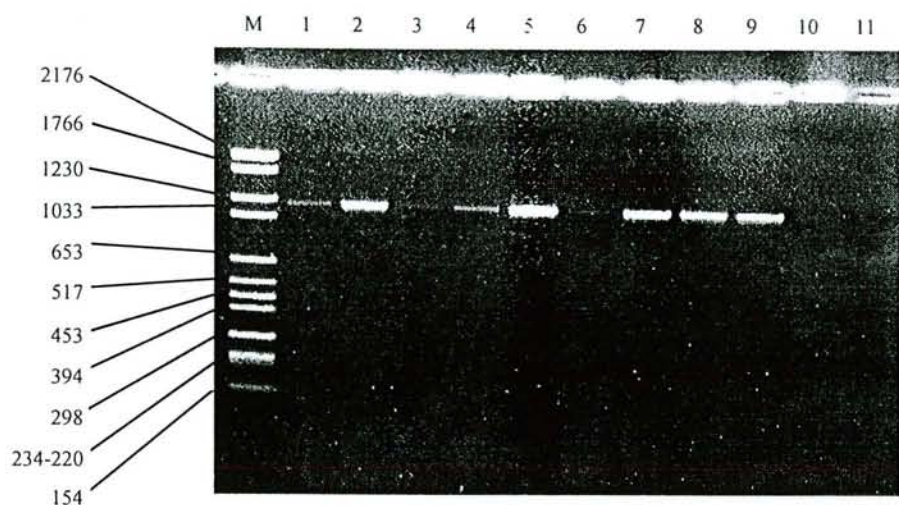


Fig. n° 21

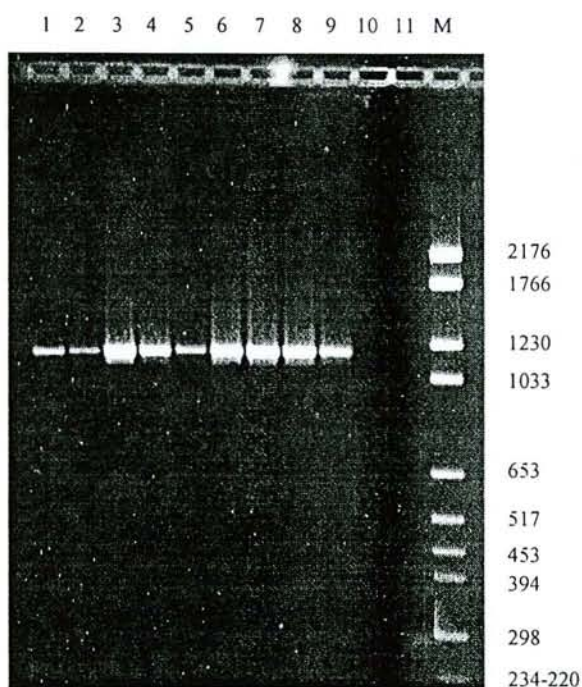


Fig. n° 22

Fig. n° 21 et 22 : Produits obtenus après RT-PCR effectuée à partir d'échantillons de tissu splénique prélevés sur cadavres de chevaux marocains (21) et espagnols (22). Puits 1 à 9 : échantillons spléniques prélevés sur cadavres de chevaux infectés. Puits 10 (fig. 21 et 22) : prélèvement de rate d'un cheval non infecté. Puits 11 : contrôle négatif (absence d'ADNc). La taille des fragments est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M).

Tableau XVIII : Résultats de l'isolement du virus équinestique en culture de cellules et de l'amplification des segments génomiques viraux S7 et S10 à partir d'échantillons nécropsiques originaires d'Espagne, du Maroc et du Cameroun.

(NT : non testé ; échantillons en grisé : RT-PCR + et isolement viral négatif).

n° de l'échantillon	Origine	Isolement viral	RT-PCR Segment S7	RT-PCR Segment S10
1	Kenitra (Maroc)	-	+	+
2	Ouarzazate (Maroc)	+	+	+
3	Khouribga (Maroc)	+	+	+
4	Taounate (Maroc)	+	+	+
5	Boulaouane (Maroc)	+	+	+
6	Missour (Maroc)	-	+	+
7	Fes (Maroc)	+	+	+
8	Agadir (Maroc)	+	+	+
9	Tahla (Maroc)	+	+	+
10	Oujda (Maroc) Témoin négatif	-	-	-
11	Espagne	+	+	+
12	Espagne	+	+	+
13	Espagne	+	+	+
14	Espagne	+	+	+
15	Espagne	+	+	+
16	Espagne	+	+	+
17	Espagne	+	+	+
18	Espagne	+	+	+
19	Espagne	+	+	+
20 à 29	France Témoins négatifs	-	-	-
30	Cameroun	-	-	NT
31	Cameroun	-	+	NT
32	Cameroun	-	-	NT
33	Cameroun	-	-	NT
34	Cameroun	-	+	NT
35	Cameroun	+	+	NT
36	Cameroun	-	-	NT
37	Cameroun	-	+	NT

inverse et PCR simultanées) à l'aide des amorces P1 et P2 (le segment cible est le gène S7). Le tableau XIX résume l'ensemble des résultats.

Une corrélation satisfaisante est obtenue entre les résultats des trois méthodes pour l'ensemble des échantillons testés à l'exception des six prélèvements suivants : 5, 14 et 72 (ELISA - et RT-PCR +) et 43, 45, 63 (ELISA + et RT-PCR -). Cependant, l'extraction des acides nucléiques n'a pu être effectuée qu'à partir d'un volume de 10 µl pour chacun des trois échantillons 43, 45 et 63 contre 200 µl pour les 73 autres échantillons. La "nested-PCR" et l'hybridation moléculaire (sonde SI) se sont révélées négatives pour ces trois échantillons. La faible quantité du matériel biologique utilisable ne permet pas d'exploiter, de façon satisfaisante, les données obtenues à partir de ces trois échantillons (43, 45 et 63) dont les résultats, par la suite, ne seront pas pris en compte (tableau XX).

Tableau XX : Synthèse des résultats de la détection du virus équinestique et de son génome par RT-PCR et ELISA à partir des 73 échantillons exploitables.

		RT-PCR S7		Total
		positive	négative	
ELISA	positif	46	0	46
	négatif	3	24	27
		49	24	73

1.9.3. Détection de l'ARN du virus équinestique à partir de prélèvements de sang

La détection du segment génomique S7 du virus équinestique par RT-PCR a été effectuée à partir du tissu sanguin. La sensibilité de la RT-PCR a, dans un premier temps, été comparée à celle de l'isolement viral dans le cadre de l'étude de la virémie chez le cheval. Dans un second temps, la RT-PCR a permis d'estimer la durée maximale de la détection du génome du virus de la peste équine, après infections expérimentales, dans le sang d'ânes et de mulets.

Tableau XIX : Tableau synoptique des résultats de la détection du virus équine et de son génome (segment S7) respectivement par isolement en culture de cellules, test ELISA pour capture d'antigène et RT-PCR à partir de 76 échantillons biologiques.

(I E : infection expérimentale ; échantillons en grisé : ELISA - et RT-PCR positifs).

n° des échantillons	Nature de l'échantillon	isolement viral	ELISA	RT-PCR
1 à 4	Rates	-	-	-
5	Rate	-	-	+
6 à 13	Rates	-	-	-
14	Rate	-	-	+
15 à 20	Rates	-	-	-
21 à 30	Rates de chevaux infectés par AHSV-4	+	+	+
31 à 38	Cultures cellulaires infectées par AHSV-4	I E	+	+
39	Rate de cheval infecté par AHSV-1	+	+	+
40	Rate de cheval infecté par AHSV-4	+	+	+
41	Rate de cheval infecté par AHSV-5	+	+	+
42	Rate de cheval infecté par AHSV-7	+	+	+
43 à 51	Cerveaux de souriceaux nouveaux infectés par AHSV-1 à 9	I E	+	+ sauf 43,45
52 à 60	Culture cellulaire infectées par AHSV-1 à 9	I E	+	+
61	Insectes inoculés avec AHSV-4	I E	+	+
62	Insectes non inoculés	I E	-	-
63 à 70	Cerveaux de souriceaux inoculés avec AHSV-2 à 9	I E	+	+ sauf 63
71	Culture cellulaire infectée par Blue tongue, sérotype 4	I E	-	-
72	Culture cellulaire infectée par Blue tongue, sérotype 1	I E	-	+
73	Culture cellulaire infectée par le virus Akabane	I E	-	-
74	Culture cellulaire infectée par EHDV, sérotype 2	I E	-	-
75	Culture cellulaire infectée par EHDV, sérotype 1	I E	-	-
76	Culture cellulaire infectée par EHDV, sérotype 3	I E	-	-

a) Etude de la virémie chez le cheval

La mise en évidence du virus de la peste équine dans le sang est effectuée par isolement en culture de cellules Vero et par RT-PCR à partir d'échantillons de sang prélevés quotidiennement. Afin d'étudier un éventuel effet inhibiteur de l'anticoagulant utilisé sur la Taq polymérase, le sang est systématiquement prélevé sur tube contenant de l'héparine ou de l'EDTA.

α) Tableau clinique

Les chevaux 49, 50 et 54, inoculés avec la souche AHSV-4 E/PI, ont présenté un tableau clinique caractéristique de la forme pulmonaire de la peste équine et sont morts au sixième jour après l'épreuve virulente. Les chevaux 46 et 56, inoculés avec la souche AHSV-9 PI, ont respectivement présenté la forme cardiaque et la forme mixte et ont succombé au onzième et au quatorzième jour après l'épreuve virulente. Le cheval 58, inoculé avec cette même souche, n'a présenté qu'une forme fébrile de la maladie (dont les principales caractéristiques sont une hyperthermie et une inappétence) pendant 15 jours.

β) Résultats de la détection du virus de la peste équine et de son génome

Les résultats de la détection à partir de sang des virus équine (AHSV-4 E/PI et AHSV-9 PI) et de leurs génomes sont présentés sur la fig. n° 23.

L'isolement du virus a nécessité, selon les échantillons, de deux à quatre passages, soit un délai minimum de quinze jours entre le prélèvement et la détection du virus. L'identité du virus équine dans les cultures cellulaires a été vérifiée par RT-PCR. Aucun produit d'amplification n'a pu être détecté à partir du sang du cheval 58, alors que l'isolement viral s'est révélé positif aux jours 2, 6, 7, 9, 10, 12 et 13. Pour les autres chevaux, une corrélation satisfaisante des résultats est observée entre l'isolement viral et la RT-PCR. Cependant, la détection du virus par isolement en culture de cellules s'avère moins régulière au cours du temps que la mise en évidence de son génome par RT-PCR.

Les résultats de l'isolement viral effectué dans le laboratoire américain de Plum Island sur les mêmes échantillons sont indiqués dans le tableau XXI

et sont comparés à nos propres résultats. Le protocole appliqué par les collègues américains (qui n'ont effectué que l'isolement viral) a été le suivant: immédiatement après la ponction veineuse à la veine jugulaire, les globules rouges ont été lavés deux fois en milieu RPMI 1640 et lysés par addition de 0,9 volume d'eau bidistillée stérile.

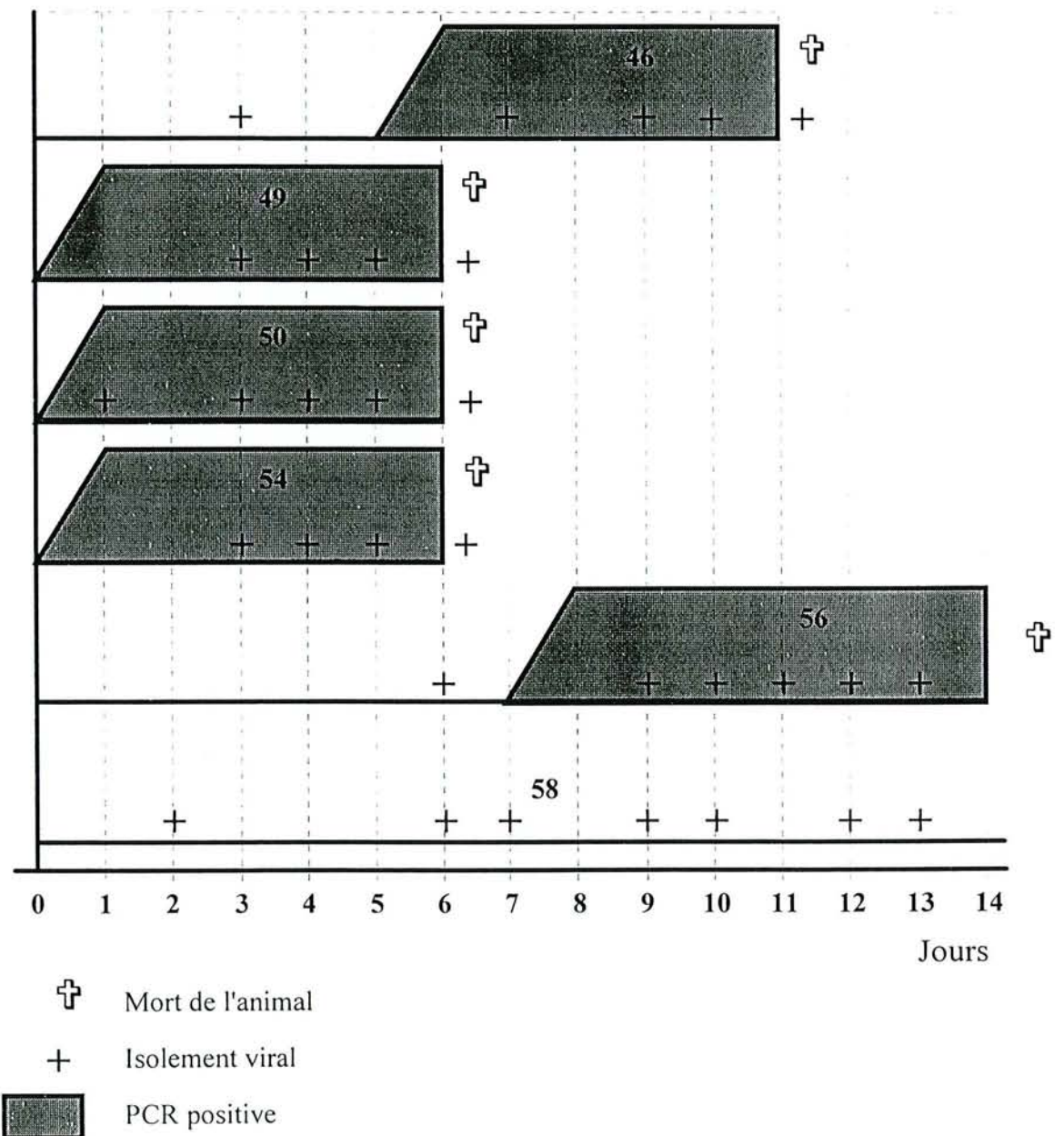


Fig. n° 23 : Représentation schématique des résultats de la détection à partir de sang des virus équinestiques (AHSV-4 E/PI et AHSV-9 PI) et de leurs génomes (segments 7) respectivement par isolement en culture de cellules et RT-PCR.

Tableau XXI : Tableau synoptique des résultats comparés de la détection du virus de la peste équine dans le sang par inoculation aux cultures cellulaires et par RT-PCR.

DV : Détection virale.

	cheval 49 (AHSV-4)		50 (AHSV-4)		54 (AHSV-4)		46 (AHSV-9)		56 (AHSV-9)		58 (AHSV-9)	
	DV	PCR	DV	PCR	DV	PCR	DV	PCR	DV	PCR	DV	PCR
Jours après inoculation												
1	+ (-)	+	+ (+)	+	+ (-)	+	- (-)	-	- (-)	-	- (-)	-
2	+ (-)	+	+ (-)	+	+ (-)	+	- (-)	-	- (-)	-	- (-)	-
3	+ (+)	+	+ (+)	+	+ (+)	+	- (+)	-	- (-)	-	- (-)	-
4	+ (+)	+	+ (+)	+	+ (+)	+	- (-)	-	- (-)	-	- (-)	-
5	+ (+)	+	+ (+)	+	+ (+)	+	- (-)	-	- (-)	-	- (-)	-
6	+ (+)	+	+ (+)	+	+ (+)	+	- (-)	+	- (+)	-	- (+)	-
7							- (+)	+	- (-)	-	- (+)	-
8							+ (-)	+	- (-)	+	+ (-)	-
9							+ (+)	+	- (+)	+	- (+)	-
10							+ (+)	+	- (+)	+	- (+)	-
11							+ (+)	+	- (+)	+	- (-)	-
12									+ (+)	+	- (+)	-
13									- (+)	+	- (+)	-
14									- (-)	+	+ (-)	-

(laboratoires de Plum Island et CNEVA-LCRV : les résultats entre parenthèses sont ceux que nous avons obtenus).

Après rétablissement de l'isotonicité, par addition de 0,1 volume de milieu RPMI 1640 dix fois concentré, la suspension a subi une sonication avant d'être inoculée aux cellules Vero. La détection du virus dans le sang, par inoculation aux cultures cellulaires est obtenue plus précocement par l'équipe américaine. En effet, les américains ont détecté le virus dans le sang, dès le premier ou deuxième jour après inoculation des chevaux 49, 50 et 54, alors que nous ne l'avons détecté par cette même technique, qu'à partir du troisième jour.

Les résultats de la RT-PCR, à l'exception des prélèvements du cheval 58, sont en accord avec ceux de l'isolement viral effectué par l'équipe américaine. Cependant, à partir des prélèvements de sang des chevaux 46 et 56, la détection du virus s'avère plus précoce par RT-PCR (sixième jour par RT-PCR contre huitième jour par isolement du virus pour le cheval 46 et huitième jour par RT-PCR contre douzième par isolement viral pour le cheval 56).

χ) Comparaison des résultats de la RT-PCR en fonction du type d'anticoagulant

Les hématies ont été prélevées dans des tubes contenant deux anticoagulants : l'héparinate de sodium et l'EDTA. Un effet inhibiteur de l'héparine sur l'activité de la Taq polymérase ayant été décrit (Beutler *et al.*, 1990 ; Holodniy *et al.*, 1991 ; Izraeli *et al.*, 1991 ; Wang *et al.*, 1992), nous avons comparé les résultats obtenus avec ces deux anticoagulants (tableau XXII).

Tableau XXII : Nombres d'échantillons testés pour lesquels la détection du segment S7 du virus équinestique en fonction de la nature de l'anticoagulant utilisé, est positive ou négative.

	HEPARINE	EDTA
RT-PCR +	26	23
RT-PCR -	34	37

Aucune différence significative n'a été observée dans la détection du segment S7 par RT-PCR en fonction de l'anticoagulant employé.

b) Etude de la virémie chez les ânes et les mulets

Afin d'étudier la durée de la virémie chez l'âne et le mulet, 4 ânes et 4 mulets (séronégatifs à 21 jours d'intervalle) ont été inoculés par voie sous-cutanée avec $10^{6,25}$ DCP50% de la souche marocaine AHSV-4 Larache (1989).

Le sang de ces animaux a été prélevé tous les deux jours (de J0 à J 57). La détection du virus a été effectuée par inoculation à des cultures de cellules Vero (par le laboratoire Biopharma et par nous-mêmes) ou à des oeufs embryonnés de 10 jours (Pirbright) et par ELISA de capture d'antigène (par le laboratoire de l'INIA (Valdeolmos, Espagne, Dr Sanchez-Vixcaino). Le segment S7 a été détecté par RT-PCR et le produit d'amplification révélé par hybridation moléculaire. Le sang fut prélevé sur EDTA pour l'isolement viral et la RT-PCR et sur héparine pour le test ELISA. Nous avons, au préalable, vérifié que les sangs d'âne et de mulet ne contenaient pas des inhibiteurs de l'amplification du segment S7. Enfin, des prélèvements de sang total à onze ânes français (localisés à l'Ecole Vétérinaire de Nantes, Service de Pathologie de la Reproduction, Professeur Tainturier), de la race Baudet du Poitou, ont été effectués et ont servi de témoins-sang d'ânes non infectés par le virus de la peste équine.

Tableau clinique

Les animaux ont présenté un syndrome fébrile pendant quelques jours (légère hyperthermie, inappétence) puis ont vite retrouvé un habitus normal. Les huit animaux, 7 à 11 jours après l'infection, ont tous présenté une séroconversion comme l'évolution des titres en anticorps déterminés par séroneutralisation le confirme (Tableau XXIII).

Isolement du virus

La détection du virus par isolement en culture de cellules s'est avérée négative pour l'ensemble des prélèvements et pour les trois laboratoires (Biopharma, Pirbright et LCRV). Cependant, à partir des cultures de cellules Vero inoculées après deux passages en aveugle, la détection de l'antigène viral se serait révélée positive par immunofluorescence indirecte (Institut Hassan II, Dr Fassi-Fihri). La recherche du virus à partir des échantillons de

**Evolution des titres en anticorps neutralisants
de J 0 à J 98 après l'épreuve virulente.**

Tableau XXIII : Evolution des titres en anticorps anti-AHSV-4 détectés par séroneutralisation pour les huit animaux (les titres sont exprimés en log DCP50).

(NT : non testé).

	J 0	J 7	J 14	J 21	J 28	J 35	J 42	J 49
âne A2	0,00	0,00	1,38	1,62	2,10	2,34	2,58	1,86
âne B2	0,00	0,00	1,50	2,10	2,22	2,22	2,22	1,86
âne R2	0,00	0,00	1,14	1,86	2,46	2,58	3,18	2,10
âne X	0,00	0,00	1,14	1,74	2,34	2,46	2,46	2,22
mulet β	0,00	0,00	1,74	2,94	2,46	3,18	3,06	2,34
mulet K2	0,00	0,00	1,98	1,98	2,34	2,94	2,70	1,98
mulet I2	0,00	0,00	1,98	1,98	2,46	2,58	2,70	1,98
mulet V	0,00	1,74	2,58	2,58	2,46	2,70	2,70	2,10

	J 56	J 63	J 70	J 77	J 84	J 91	J 98
âne A2	1,86	NT	1,86	1,62	1,74	1,74	1,38
âne B2	1,86	1,86	1,62	1,74	1,86	1,74	1,74
âne R2	2,10	NT	1,86	1,86	1,86	1,86	NT
âne X	2,22	NT	1,74	1,74	1,86	1,74	1,86
mulet β	2,10	NT	1,74	1,86	1,86	1,74	1,86
mulet K2	1,98	1,62	1,62	1,74	1,62	1,74	1,86
mulet I2	1,98	NT	1,98	1,86	1,74	1,86	1,74
mulet V	2,10	2,10	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74

sang prélevés aux jours 5, 7, 9, 11 et 13 par inoculation aux oeufs embryonnés s'est avérée négative.

L'ELISA de capture d'antigène n'a pas permis de détecter le virus dans le sang. Cependant, les résultats obtenus à partir de sang inoculé expérimentalement indiquent que le tissu sanguin serait à l'origine de nombreuses réactions non spécifiques qui rendent la lecture ininterprétable.

Détection du segment S7

Le tableau XXIV résume les résultats obtenus après transcription inverse-PCR du segment 7.

Tableau XXIV : Tableau synoptique des résultats de la détection à partir du sang d'ânes et de mulets infectés avec une souche sauvage de virus de la peste équine sérotype 4.

Les produits d'amplification obtenus par RT-PCR à l'aide des amorces P1 et P2 (segment cible S7) sont hybridés avec la sonde interne SI marquée à la digoxigénine et révélés par chimioluminescence. Les échantillons dont les résultats sont indiqués dans une cellule ombrée dans le tableau ont été testés deux fois à partir de deux prises de sang différentes.

RT-PCR	J 1	J 3	J 5	J 7	J 9	J 11	J 13	J 15	J 17	J 19
âne A2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
âne B2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
âne R2	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
âne X	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
mulet β	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
mulet K2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
mulet I2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
mulet V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

RT-PCR	J 21	J 23	J 25	J 27	J 29	J 31	J 33	J 35	J 37	J 39
A2	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
B2	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
R2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
X	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
β	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
I2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
V	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-

RT-PCR	J 41	J 43	J 45	J 47	J 49	J 51	J 53	J55	J57
A2	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B2	-	+	+	-	-	+	-	-	-
R2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
X	-	-	-	-	-	-	-	+	-
β	-	+	+	+	-	+	-	-	-
K2	+	+	-	+	-	-	-	-	-
I2	-	+	-	+	-	-	-	+	-
V	-	-	+	-	-	-	-	+	-

Aucun produit d'amplification n'a été détecté à partir des onze échantillons de sang des ânes témoins. Par contre, les échantillons de sang se sont avérés positifs à partir de J5 et J7 pour les muets (J5 pour les muets K2, I2 et V et J7 pour β) et plus tardivement pour les ânes (J7 pour l'âne R2, J11 pour A2, R2 et X et J13 pour B2). Les produits d'amplification sur gel étaient fortement visibles ainsi que l'intensité et la taille des spots après hybridation moléculaire et révélation de J13 à J35-J37. A partir de J39-J41 et jusqu'à J57, la fréquence de détection et l'intensité des signaux de révélation ont diminué traduisant peut-être une réduction de la quantité d'ARN génomique cible dans le sang. A partir de J49, tous les prélèvements de sang sont devenus négatifs. Cependant, la RT-PCR s'est avérée positive de façon irrégulière pour quelques échantillons de J49 à J57. A J57, tous les prélèvements étaient négatifs.

Une seconde épreuve virulente ayant été effectuée sur ces mêmes animaux à J58, il ne nous a malheureusement pas été possible de prolonger cette étude et d'obtenir les résultats de la RT-PCR pour les jours suivants.

2. Etude des polymorphismes de restriction des produits d'amplification des gènes S7 et S10

2.1. Profils de restriction des produits d'amplification des gènes S7

2.1.1. Choix des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction ont été sélectionnées à partir de l'étude des sites de restriction, à l'aide du logiciel Microgenie, Sequence Software (Beckman) de la séquence nucléotidique publiée par Roy *et al.* (1991) du segment S7 de la souche sauvage espagnole AHSV-4 (tableau XXV).

Tableau XXV : Liste des huit enzymes sélectionnées et localisation de leurs sites de restriction à partir de la séquence nucléotidique du segment S7 de la souche espagnole AHSV-4 (Roy *et al.*, 1991).

Enzymes de restriction (site de restriction)	Nombre de sites de restriction attendus	Taille (en pb) des fragments hydrolysés
<i>AsnI</i> (ATTAAT)	3	432; 348; 273; 126
<i>Bam</i> HI (GGATCC)	1	1087; 92
<i>Hin</i> fI (GANTC)	1	1030; 149
<i>Hph</i> I (GGTGA)	3	444; 397; 258; 80
<i>Pvu</i> II (CAGCTG)	0	-
<i>Sac</i> I (GAGCTC)	2	759; 292; 128
<i>Sph</i> I (GCATGC)	1	1122; 57
<i>Cfo</i> I (GCGC)	5	511; 243; 158; 150; 97; 20

2.1.2. Résultats des polymorphismes de restriction

La fig. n° 24 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J et K) présente les profils de restriction des produits de transcription inverse-PCR obtenus à partir des ARN extraits de cultures de cellules infectées respectivement par les neuf sérotypes de virus équinestique.

Les profils de restriction des segments S7 amplifiés des souches AHSV-9 Cameroun et Sénégal ont aussi été déterminés.

La synthèse de l'analyse et de la comparaison de ces polymorphismes de restriction est résumée dans le tableau XXVI.

Les profils de restriction du segment S7 de la souche AHSV-4 E (souche sauvage espagnole) obtenus à l'aide des huit enzymes sélectionnées sont identiques aux profils théoriques définis par la carte de restriction déterminée après analyse de la séquence nucléotidique de ce segment.

De même, les souches AHSV-4 SA (Afrique du sud) et M (Maroc) présentent des profils de restriction identiques à celui de la souche AHSV 4 E (Espagne). Le profil global de la souche AHSV-4 USDA diffère de ceux des autres souches de même sérotype par les quatre enzymes *Asn* I, *Hinf* I, *Hph* I et *Cfo* I.

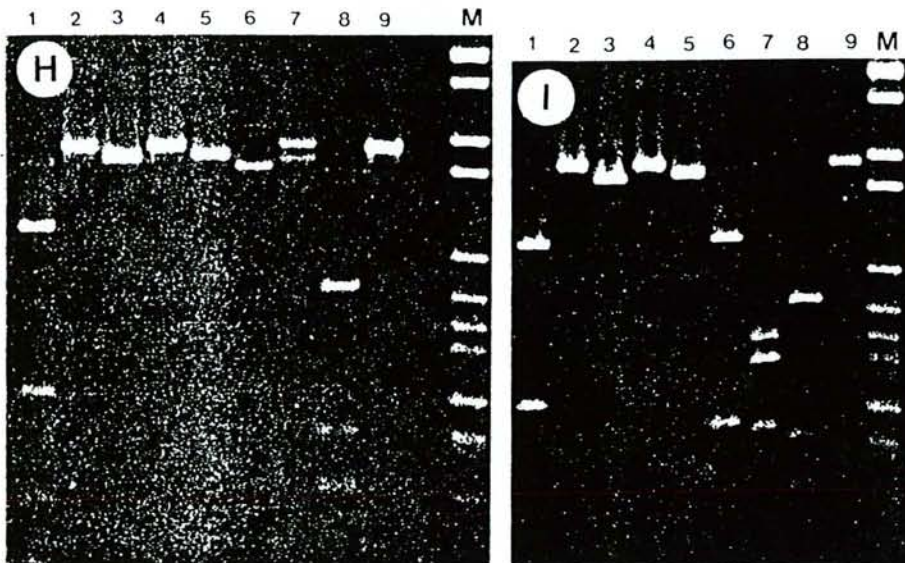
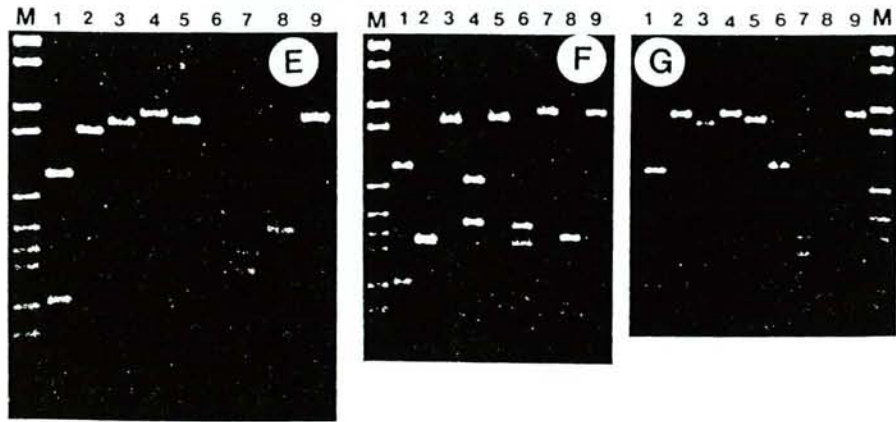
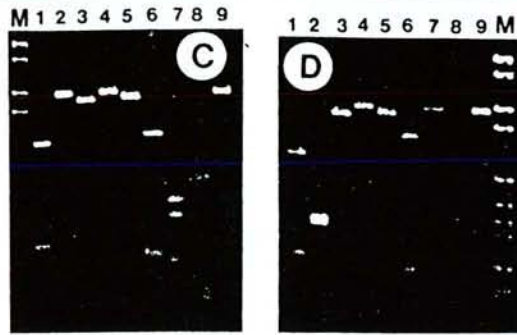
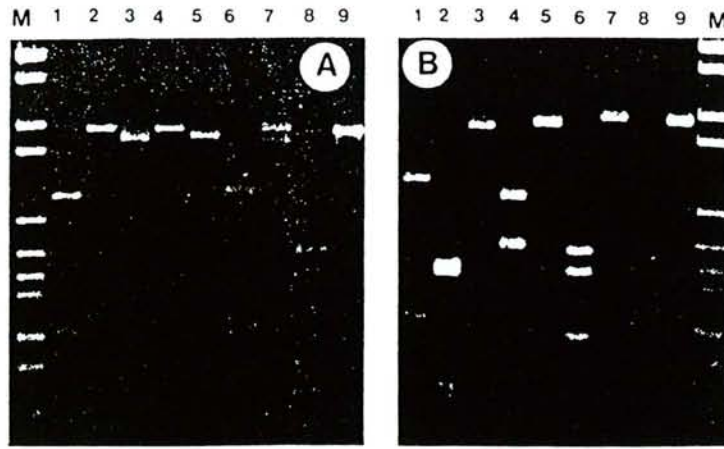
Les enzymes *Bam* HI et *Sac* I clivent les ADNc des neuf sérotypes viraux de façon similaire et génèrent respectivement deux et trois fragments d'hydrolyse.

Seuls les segments amplifiés à partir des ARN S7 des virus de la peste équine sérotype 9 (SA, USDA, C et S) ne sont pas hydrolysés par *Sph* I. Les profils des fragments amplifiés des huit autres sérotypes viraux sont identiques.

L'enzyme *Asn* I génère deux fragments de même taille pour les sérotypes -1, -3, -6 et -8, deux bandes de tailles différentes pour les sérotypes -4 (USDA) et -9 (USDA, SA, S et C) et trois fragments pour les sérotypes AHSV -5 et -2. *Asn* I donne des profils différents pour les souches AHSV-7 (USDA) et AHSV-4 (SA, M et E).

L'enzyme *Hph* I n'hydrolyse pas l'ADNc de AHSV-2, -4 (USDA) et -5. Elle donne le même profil pour AHSV-3, -4 (SA, M et E), -6, -8 et -9 (souches USDA, SA, S et C) ainsi que pour AHSV-1 et -7.

Pvu II génère deux fragments de mêmes tailles par hydrolyse des produits d'amplification de AHSV-2, -5 et -9 (USDA, SA, S et C) mais elle ne clive pas les ADNc amplifiés des autres sérotypes .



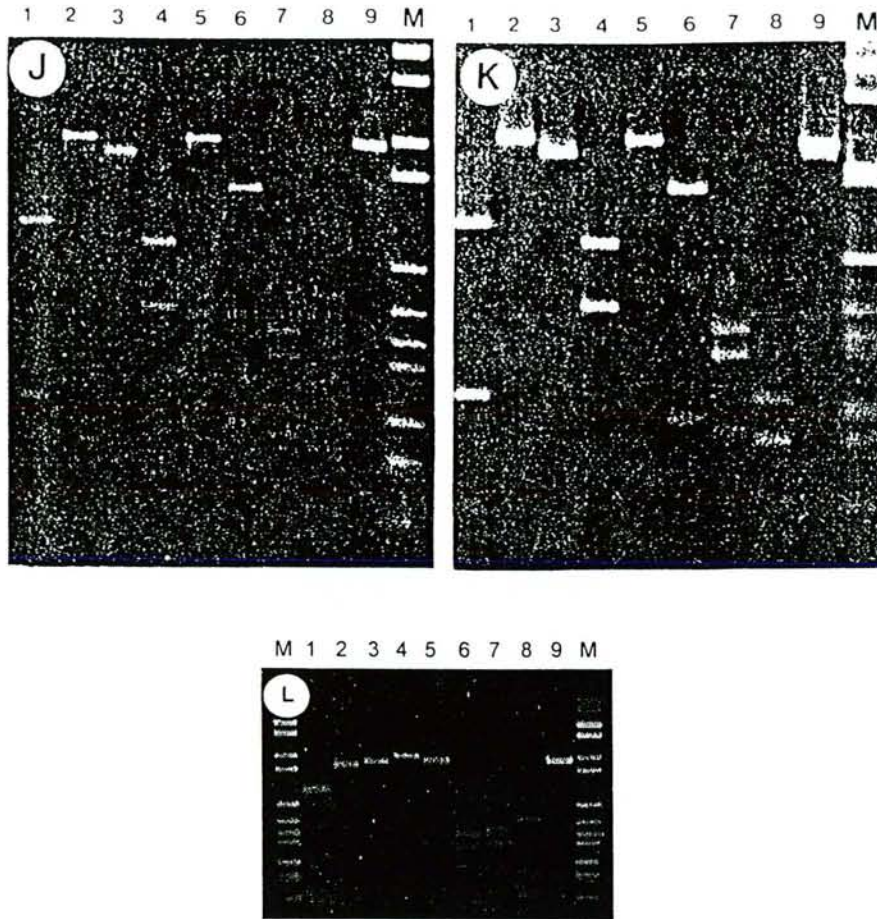


Fig. n° 24 : Profils de restriction des produits de RT-PCR des segments S7 des virus des neuf sérotypes : A : AHSV-1 (USDA) ; B : AHSV-2 (USDA) , C : AHSV-3 (USDA) ; D : AHSV-4 (USDA) ; E : AHSV-4 (Afrique du sud) ; F : AHSV-5 (USDA) ; G : AHSV-6 (USDA) ; H : AHSV-7 (USDA) ; I : AHSV-8 (USDA) ; J : AHSV-9 (USDA) ; K : AHSV-9 (Afrique du sud) hydrolysés par les endonucléases de restriction suivantes : Puits 1 : *Sac* I ; Puits 2 : *Hinf* I ; Puits 3 : *Bam* HI ; Puits 4 : *Pvu* II ; Puits 5 : *Sph* I ; Puits 6 : *Asn* I ; Puits 7 : *Hph* I ; Puits 8 : *Cfo* I. Puits 9 : Produit de RT-PCR non hydrolysé. La taille des fragments est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M).

Tableau XXVI : Comparaison des profils de restriction des produits d'amplification des segments S7 des neuf sérotypes de virus de la peste équine.

Les souches AHSV-4 USDA, E (Espagne), M (Maroc) et SA (Afrique du sud) appartiennent au sérotype 4 et AHSV-9 USDA, SA (Afrique du sud), S (Sénégal) et C (Cameroun) sont de sérotype 9.

Enzymes de restriction	Sérotypes avec le même profil	Sérotypes présentant un profil spécifique
<i>Asn I</i>	- 1, 3, 6, 8 - 2, 5 - 4 USDA, 9 USDA, SA, S et C	- 7 - 4 (SA, M, E)
<i>Bam HI</i>	Les neuf sérotypes ont le même profil	
<i>Hinf I</i>	-1, 3, 6, 7, 8, 9 USDA, SA, S et C - 4 USDA, 2, 5	- 4 (SA, M, E)
<i>Hph I</i>	- 3, 4 (SA, M et E) 6, 8, 9 USDA, SA, S et C. - 2, 4 USDA, 5 -1, -7	
<i>Pvu II</i>	-1, 3, 4 (SA, M, E, USDA), 6, 7, 8 - 2, 5, 9 SA, USDA, S et C	
<i>Sac I</i>	même profil pour les neuf sérotypes	
<i>Sph I</i>	-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	- 9 SA, USDA, S et C
<i>Cfo I</i>	-1, 3, 6, 7, 8, 9, USDA - 4 USDA, 5	- 2 - 4 (SA, M, E) - 9 SA, S et C

Les ADNc des segments S7 des sérotypes AHSV-1, -3, -6, -7, -8, -9 (USDA) ont le même profil par *Cfo I*. Les gènes S7 des deux sérotypes AHSV-4 (USDA) et -5 ont des profils identiques entre eux mais qui diffèrent de ceux des autres sérotypes. Les produits d'amplification des souches AHSV-2, -4 (SA, M et E) et -9 (SA, S et C) ont des profils spécifiques. Le polymorphisme des profils de restriction des segments S7 amplifiés des

souches du sérotype -9 (USDA, SA, S et C) repose sur la présence, pour la souche AHSV-9 USDA d'un produit d'hydrolyse d'environ 550 pb qui n'est pas retrouvé dans les profils des souches AHSV-9 (SA, S et C).

2.2. Profils de restriction des produits d'amplification des gènes S10

2.2.1. Choix des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction ont été sélectionnées, à l'aide du même logiciel que pour le segment S7, en fonction des sites de restriction du segment S10 du virus de la peste équine sérotype 3 (Van Staden and Huismans, 1991). Les enzymes utilisées, leur nombre de sites de restriction théorique et la taille des fragments obtenus après hydrolyse du segment S10 sont indiqués dans le tableau XXVII.

Tableau XXVII : Endonucléases de restriction utilisées pour l'hydrolyse du segment génomique S10, nombre de sites et tailles théoriques des fragments obtenus.

Enzymes de restriction (site de restriction)	Nombre de sites attendus	Taille (en pb) des fragments hydrolysés
<i>Hinf</i> I (GANTC)	4	332 ; 168 ; 127 ; 109 ; 22
<i>Pvu</i> II (CAGCTG)	0	-
<i>Sph</i> I (GCATGC)	0	-
<i>Hph</i> I (GGTGA)	1	618 ; 140
<i>Cfo</i> I (GCGC)	0	-
<i>Rsa</i> I (GTAC)	3	315 ; 254 ; 109 ; 80

2.2.2. Résultats des polymorphismes de restriction

Les électrophorétiques obtenus par hydrolyse des ADNc amplifiés à partir des segments 10 des neuf sérotypes du virus de la peste équine sont présentés fig. n° 25 et 26.

Le tableau XXVIII résume les profils des produits d'amplification des différents sérotypes étudiés obtenus avec chacune des six enzymes de restriction.

Les profils de restriction obtenus à partir de l'ADNc du segment S10 du virus de la peste équine sérotype 3 sont identiques aux profils théoriques définis, à partir de la séquence nucléotidique de Van Staden and Huisman (1991) pour les six enzymes sélectionnées.

Le polymorphisme de restriction des ADNc des segments S10 est plus important que pour les segments S7. Le tableau XXIX présente les comparaisons des polymorphismes de restriction des ADNc des segments S10 des neuf sérotypes entre eux.

Les trois souches AHSV-4 (SA, E et M) ont des profils de restriction identiques qui ne diffèrent de celui de AHSV-4 USDA que par une enzyme (*Sph I*).

Les deux souches AHSV-9 USDA et AHSV-9 S ont des profils identiques. Les deux souches AHSV-9 (USDA et SA) présentent un profil différent par l'enzyme *Hinf I*. La souche AHSV-9 USDA présente un profil similaire à celui de la souche AHSV-4 USDA. Le profil de AHSV-9 USDA, sur l'ensemble des six enzymes, ne diffère ainsi que par une enzyme (*Sph I*) de ceux des trois souches AHSV-4 (SA, E, M).

Le profil des sérotypes AHSV-3 et AHSV-7 ne diffère que par une enzyme (*Hinf I*).

Les autres sérotypes ont tous des profils de restriction différents par au moins deux enzymes.

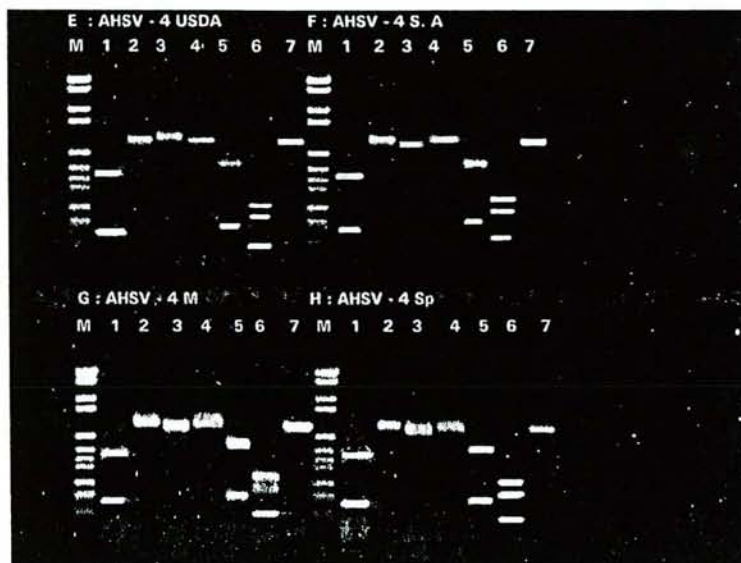
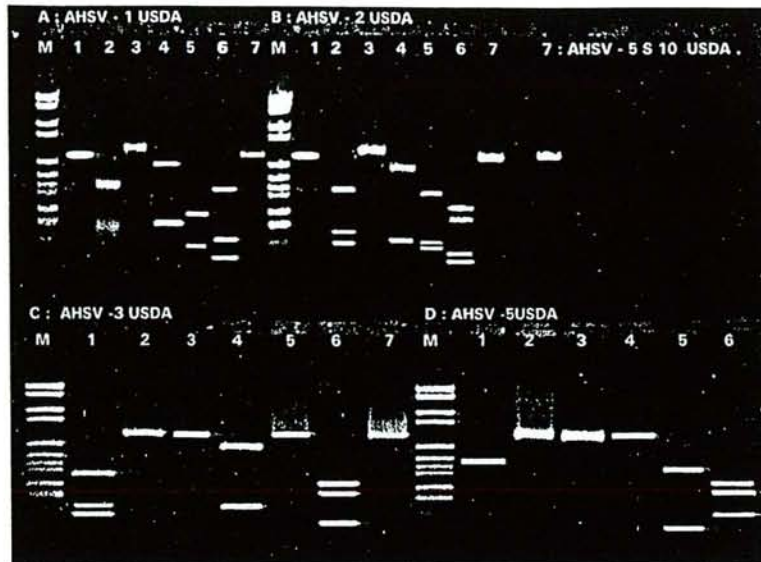


Fig. n° 25 : Profils de restriction des produits de RT-PCR des segments S10 des virus des sérotypes : A : AHSV-1 (USDA) ; B : AHSV-2 (USDA) , C : AHSV-3 (USDA); D : AHSV-5 (USDA) ; E : AHSV-4 (USDSA) ; F : AHSV-4 (Afrique du sud) ; G : AHSV-4 (Maroc) et H : AHSV-4 (Espagne) hydrolysés par les endonucléases de restriction suivantes : Puits 1 : *Hinf* I ; Puits 2 : *Pvu* II ; Puits 3 : *Sph* I ; Puits 4 : *Hph* I; Puits 5 : *Cfo* I et puits 6 : *Rsa* I. Puits 7 : produit de RT-PCR non hydrolysé. La taille des fragments est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M).

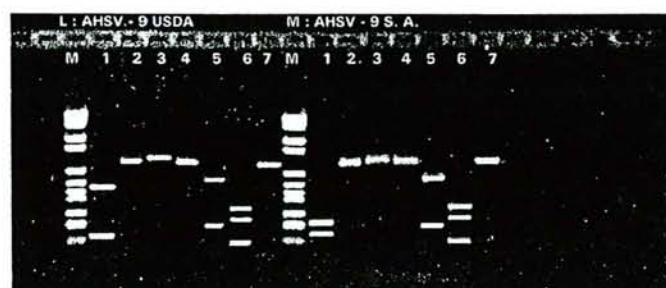
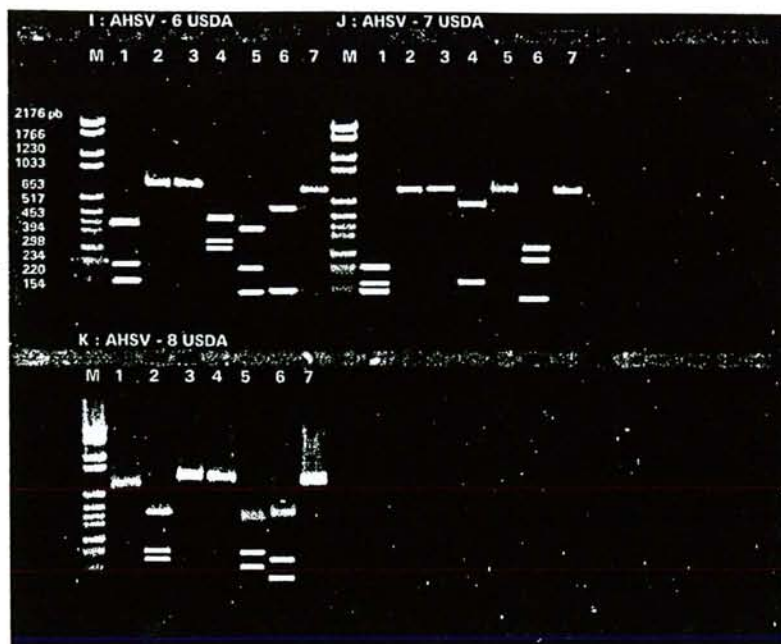


Fig. n° 26 : Profils de restriction des produits de RT-PCR des segments S10 des virus des sérotypes : I : AHSV-6 (USDA) ; J : AHSV-7 (USDA) ; K : AHSV-8 (USDA) ; K : AHSV-8 (USDA) ; L : AHSV-9 (USDA) et M : AHSV-9 (Afrique du sud) hydrolysés par les endonucléases de restriction suivantes : Puits 1 : *Hinf* I ; Puits 2 : *Pvu* II ; Puits 3 : *Sph* I ; Puits 4 : *Hph* I ; Puits 5 : *Cfo* I et puits 6 : *Rsa* I. Puits 7 : produit de RT-PCR non hydrolysé. La taille des fragments est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M).

Tableau XXVIII : Comparaison pour chacune des six enzymes, des profils de restriction des produits d'amplification des segments S10 de 13 souches de virus équine.

Enzymes de restriction	Sérotypes dont les ADNc présentent les mêmes profils	Sérotypes dont les ADNc présentent un profil spécifique
<i>Hinf I</i>	- 2, 8, 1 - 7, 9 SA - 4 (SA, E, M, USDA), 9 USDA	- 3 - 5 - 6
<i>Pvu II</i>	- 2, 8, 1 - 3, 4 (USDA, SA, M, E), 5, 6, 7, 9 (SA et USDA)	
<i>Sph I</i>	- 4 (SA, E, M) - 1, 2, 3, 4 (USDA), 5, 6, 7, 8, 9 (USDA, SA)	
<i>Hph I</i>	- 4 (USDA, SA, E, M), 9 (USDA, SA), 8, 5 -1, 2, 3, 7	- 6
<i>Cfo I</i>	- 2, 6, 8 - 3, 7 - 4 (USDA, SA, E, M), 9 (USDA, SA), 5	- 1
<i>Rsa I</i>	- 1, 8 - 2, 3, 4 (USDA, SA, E, M), 7, 9 (USDA, SA)	- 5 - 6

Tableau XXIX : Tableau synoptique des comparaisons des polymorphismes de restriction des ADNc des segments S10 des neuf sérotypes entre eux.

Les enzymes qui génèrent des profils différents entre deux ADNc de deux sérotypes ou souches sont précisées pour chaque couple de sérotypes ou de souches comparés. + : signifie que les ADNc de deux sérotypes sont identiques pour l'ensemble des six enzymes. *Hinf I* : H, *Pvu II* : P, *Sph I* : S, *Hph I* : Hp, *Cfo I* : C, *Rsa I* : R.

AHSV	1	2	3	4 (SA, M, E)	4 USDA	5	6	7	8	9 USDA S	9 SA
1	+										
2	C, R	+									
3	H,P,S, C,R	H, P,C	+								
4 (SA,M,E)	H, P, S Hp, C,R	H, P, S Hp,C	H,S Hp,C	+							
4 USDA	H,P, Hp,C,R	H,P, Hp,C	H, Hp,C	Sph I	+						
5	H,P, Hp,C,R	H,P, Hp,C,R	H, Hp,C,R	H,S,R	H,R	+					
6	H,P, Hp,C,R	H, P, Hp,R	H, Hp,C,R	H,S, Hp,C,R	H,Hp,C ,R	H,Hp,C ,R	+				
7	H,P,C, R	H,P,C	Hinf 1	H, Hp,C	H, Hp,C	H, Hp,C,R	H, Hp,C,R	+			
8	Hp,C	Hp,R	H,P, Hp,C,R	H,P,C,R	H,P,C, R	H,P,S, C,R	H,P, Hp,R	H,P, Hp,C,R	+		
9 USDA, S	H,P, Hp,C,R	H,P, Hp,C	H, Hp,C	Sph I	+	H,R	H,Hp,C ,R	H,Hp,C	H,P,C, R	+	
9 SA	H,P, Hp,C,R	H,P, Hp,C	H, Hp,C	H,S	Hinf I	H,R	H,Hp,C ,R	Hp,C	H,P,C, R	Hinf I	+

3. DETERMINATION DE LA SEQUENCE DU GENE S10 DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE

Les protéines NS3/NS3A, codées par le gène S10 du virus de la peste équine, s'avèrent conservées entre les neuf sérotypes (Van Staden and Huismans, 1991) alors que les gènes S10 semblent moins conservés comme le polymorphisme de restriction l'illustre. Nous avons déterminé, afin de préciser ces degrés de variation, les séquences nucléotidiques des segments S10 des virus équinepestiques 4 USDA et 4 Maroc 1990, après clonage des produits d'amplification des ARN db dans le phagemide Bluescript ou directement à partir des produits d'amplification purifiés.

3.1. Clonage du gène S10

Le clonage du génome viral a été réalisé en trois étapes principales : synthèse de l'ADN complémentaire et amplification, clonage dans Bluescript et analyse des clones.

3.1.1. Amplification génique du gène S10

L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir des amorces P3 et P4 et les hétéroduplex ainsi obtenus amplifiés par PCR selon le protocole décrit précédemment. La spécificité du produit d'amplification est vérifiée par l'étude des profils de restriction à l'aide des six enzymes sélectionnées.

3.1.2. Purification du produit d'amplification

La concentration d'ADN purifié obtenu est de 2,8 µg/µl. Une électrophorèse de contrôle permet de vérifier la taille du produit obtenu. Une partie de ce matériel (300 ng sous un volume de 10 µl par séquence) est utilisée pour le séquençage automatique.

3.2. Clonage du gène S10 dans le plasmide Bluescript

Après correction des extrémités par le fragment de Klenow, l'ADNc est inséré dans le vecteur Bluescript au niveau du site de clonage multiple localisé dans la partie N terminale du gène Lac Z. Après transfection des bactéries

compétentes avec les plasmides recombinés, 10% des colonies se sont révélées incapables de dégrader le substrat X-gal et présentaient une couleur blanche.

3.2.1. Analyse des clones

Les clones ont été analysés afin de déterminer la taille des inserts et de confirmer leur origine virale.

3.2.2. Analyse de la taille des inserts

Pour chacun des deux clonages, l'ADN plasmidique a été extrait d'environ 70 colonies bactériennes de phénotype "recombinant". La présence d'insert à l'intérieur des plasmides a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% en comparant leur distance de migration à celle du plasmide non recombiné. Huit plasmides ont été sélectionnés et la présence d'inserts a été confirmée après hydrolyse par l'enzyme de restriction *Pvu* II (dont les deux sites de restriction sont situés de part et d'autre du site de clonage *Eco*RV (fig. n° 6)) et analyse sur gel d'agarose à 1% (fig. n° 27). Nous avons ainsi retenu deux clones, appelés respectivement 21 et 29, pour chacun des deux inserts, AHSV-4 USDA et AHSV-4 M 90.

3.2.3. Contrôle de l'origine virale des inserts

L'origine virale des inserts a été déterminée par amplification de l'insert à l'aide des amorces P3 et P4.

3.3. Détermination des séquences des inserts

3.3.1. Analyse des séquences en nucléotides

La séquence des inserts a été déterminée selon la technique de Sanger *et al.* (1977). La séquence nucléotidique a été établie (à l'aide des amorces des extrémités terminales P3 et P4 et d'amorces internes P5, P6 et P7) à partir des deux brins d'ADNc clonés dans Bluescript ou purifiés après RT-PCR.

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel PC/GENE

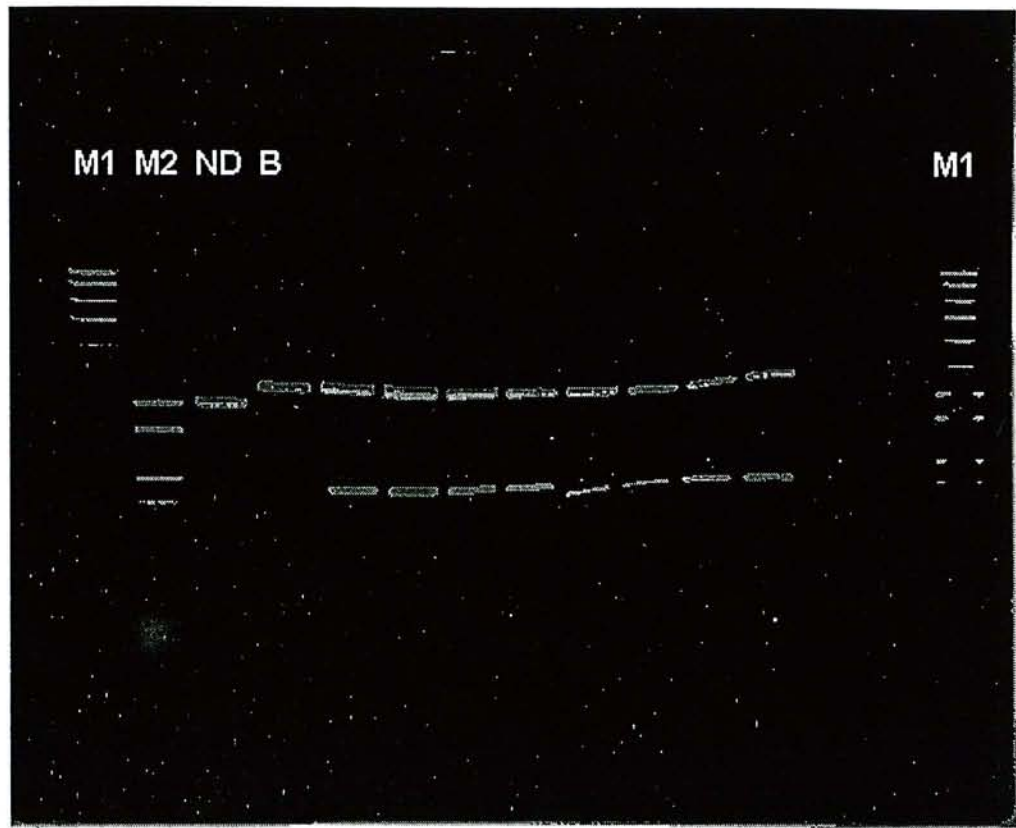


Fig. n° 27 : Analyse de la taille des inserts. Chaque plasmide recombiné est hydrolysé à l'aide de l'enzyme de restriction *Pvu* II puis analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. La taille des fragments est évaluée par comparaison avec la migration de fragments d'ADN obtenus par digestion de l'ADN du phage SPP 1 hydrolysé par l'endonucléase de restriction *Eco*RI (M1) et de fragments obtenus par digestion de l'ADN du plasmide pBR328 par les enzymes de restriction *Bgl* I et *Hinf* I (M2). Puits ND : ADN du plasmide Bluescript non hydrolysé. Puits B : ADN du plasmide Bluescript hydrolysé par *Pvu* II.

Intelligenetics, version février 1991) installé sur un micro-ordinateur Victor "V386S". Nous avons ainsi déterminé les séquences des gènes S10 des virus de la peste équine 4 USDA (souche vaccinale) et 4 M 90 (souche sauvage isolée au Maroc en 1990)(fig. n° 29).

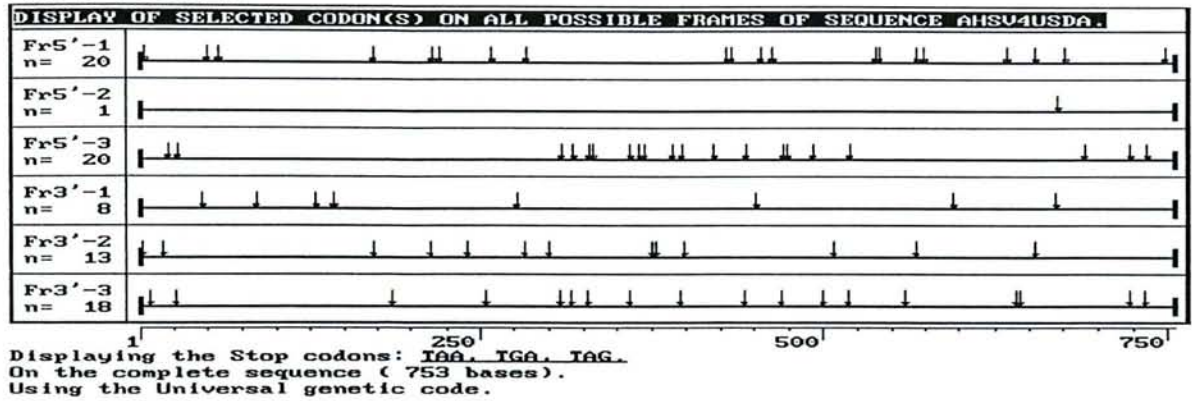
La composition en bases du gène S10 du virus équine 4 USDA pour les 753 nucléotides est : 30,9 % de A, 26,4 % de T, 26,2 % de G et 16,3 % de C. Celle de AHSV-4 M 90 pour les 747 nucléotides est : 30,7 % de A, 25,3 % de T, 26,6 % de G et 17,3 % de C. Tous les sites de restriction préalablement identifiés par analyse enzymatique (pour les six enzymes *Hinf* I, *Pvu* II, *Sph* I, *Hph* I, *Cfo* I et *Rsa* I) sont retrouvés au niveau des deux séquences par analyse informatique (tableau XXX). Les deux séquences en nucléotides de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M présentent 94,5 % de similitude.

Tableau XXX : Identification des sites de restriction des six enzymes *Hinf* I, *Pvu* II, *Sph* I, *Hph* I, *Cfo* I et *Rsa* I dans les séquences nucléotidiques des gènes S10 de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M à l'aide du programme "RESTRI" du logiciel PC/GENE.

Enzymes de restriction (site de restriction)	Localisation des sites de restriction AHSV-4 USDA	Localisation des sites de restriction AHSV-4 M
<i>Hinf</i> I (GANTC)	22 ; 65 ; 139 ; 149 ; 590	5 ; 48 ; 122 ; 132 ; 573
<i>Pvu</i> II (CAGCTG)	-	-
<i>Sph</i> I (GCATGC)	-	38
<i>Hph</i> I (GGTGA)	-	-
<i>Cfo</i> I (GCGC)	211	194
<i>Rsa</i> I (GTAC)	136 ; 505	119 ; 173 ; 488

L'analyse des cadres de lecture respectifs des séquences AHSV-4 USDA et AHSV-4 M à l'aide des programmes "TRANSLAT" et "DISPCOD" a permis d'identifier deux cadres de lecture ouverts (ou ORF-open reading frame) de plus de 200 pb dans les phases de lecture 2 (AHSV-4 USDA) et 1 (AHSV-4 M) (fig. n° 28 et annexe 1).

AHSV-4 USDA :



AHSV-4 Maroc :

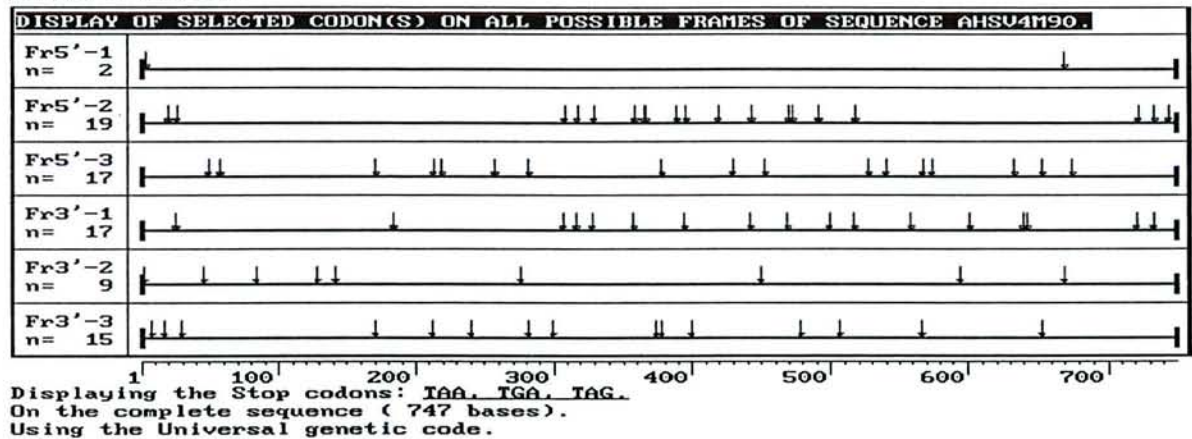


Fig. n° 28 : Analyse des cadres de lecture ouverts (ORF) des séquences nucléotidiques AHSV-4 USDA et AHSV-4 Maroc.

Les ORF sont recherchés dans les trois cadres de lecture et dans les deux sens opposés. Les codons stop sont seuls représentés par une flèche ↓ sur ce schéma.

Ces deux cadres de lecture contiennent plusieurs codons pouvant être des codons d'initiation de la traduction. Les positions des deux codons d'initiation susceptibles d'être à l'origine de la traduction des protéines NS3 et NS3A (fig. n° 29), sont similaires à celles décrites pour les codons d'initiation des segments S10 des virus de la peste équine de sérotypes 1, 3, 4, 8 et 9 (Van Staden and Huisman, 1991 ; De Sa *et al.*, 1994) (tableau XXXI). Une séquence consensus TATA box, promoteur de la transcription, est identifiée de la position 1 à la position 15 (5' GTTAAATTATCCT... 3') pour la séquence de AHSV-4 USDA.

Tableau XXXI : Comparaison de la position des codons supposés d'initiation de la traduction des protéines NS3 et NS3A des virus de la peste équine 4 USDA et 4 M avec celles des codons d'initiation des segments S10 des virus 1, -3, -4, -8 et -9.

Ces séquences ont été publiées par Van Staden and Huismans (1991) et De Sa *et al.* (1994).

virus	position du premier codon ATG	position du deuxième codon ATG
AHSV-4 USDA	20-22	53-55
AHSV-4 M	19-21	52-54
AHSV-1	20-22	50-52
AHSV-3	20-22	50-52
AHSV-4	20-22	53-55
AHSV-8	20-22	50-52
AHSV-9	19-21	52-54

Un site répété direct, d'une longueur de dix nucléotides et dont la séquence est " 5'...CTTAAAGATC...3' " a été localisé, à l'aide du programme "REPEATS", aux position 212-221 et 316-325 de la séquence de AHSV-4 USDA (fig. n° 29). Aucun site répété n'est détecté dans la séquence de AHSV-4 M.

3.3.2. Analyse des séquences déduites en acides aminés

La séquence en acides aminés a été déduite de la séquence en nucléotides à l'aide du programme "TRANSLAT" du logiciel PC/GENE (fig. n° 29).

AHSV-4 USDA

La protéine susceptible d'être codée par l'ORF dont le codon d'initiation est à la position 20-22 et le codon stop à la position 671-673 dans la phase de lecture 2, serait constituée de 217 acides aminés et aurait une masse molaire de 23 506 Da.

Deux résidus cystéine, situés aux positions 123 et 162, ont pu être identifiés.

La séquence a été analysée, à l'aide du programme "PROSITE", pour la recherche de sites de glycosylation (Asn-X-Ser ; Asn-X-Thr). Deux sites potentiels ont été identifiés aux positions 9 et 57.

AHSV-4 USDA (numéro d'accès à la banque de données EMBL: Z48734 "USAH")

1 GTT TAA ATT ATCCCT TGTC **ATG** AAT CTA GCT GCA ATC GCC AAG AAT TAT AGT **ATG** 55
M N L A A I A K N Y S M 12
⇒ORF 1 ⇒ ORF 2

56 CAT AAT GGA GAG TCG GGG GCG ATC GTC CCT TAT GTG CCA CCA CCA TAC AAT GTT 109
H N G E S G A I V P Y V P P P Y N V 30

110 GCG AGT GCT CCG ACG TTT TCT CAG GGT ACG AGT CAA ATG GAG TCC GTG TCG CTT 163
31 A S A P T F S Q G T S Q M E S V S L 48

164 GGG ATA CTT AAC CAA GCC ATG TCA AAT ACA ACT GGT GCG AGT GGG GCG CTT AAA 217
49 G I L N Q A M S N T T G [↑] A S G A L K 66

218 GAT GAA AAA GCA GCA TTT GGT GCT ATG GCG GAAGCA TTA CGT GAT CCA GAA CCC 271
67 D E K A A F G A M A E A L R D P E P 84

272 ATA CGT CAG ATT AAA AAG CAG GTG GGT ATC AGA ACT TTA AAA AAC TTA AAG ATG 325
85 I R Q I K K Q V G I R I L K N L K M 102

326 GAG TTA GTA ACA ATG CGT CGA AAG AAA TCG GCA TTA AAA ATA ATG ATT TTC ATC 379
103 E L V I M R R K K S A L K I M I F I 120

380 AGT GGG TGC GTG ACG TTA GCT ACA TCG ATG GTT GGG GGA TTG AGT ATT GTT GAT 433
121 S G C* V T L A T S M V G G L S I V D 138
[↑]

434 GAC GAT ATA TTA GAA AAT TAT AAG ACA AAT GAT TGG TTA ATG AAA ACC ATA CAT 487
139 D D I L E N Y K T N D W L M K T I H 156

488 GGG CTG AAT TTG TTA TGT ACT ACA GTT TTG TTA GCG GCG GGC AAG ATT TCT GAT 541
157 G L N L L C* T T V L L A A G K I S D 174
[↑]

542 AAA ATA CAA GAG GAG ATT TCA CGC ACT AAG CGT GAC ATT GCA AAA AGA GAG TCT 595
175 K I Q E E I S R I K R D I A K R E S 192

596 TAC GTA TCG GCG GCG AGT ATG TCG TGG AGT GGA GAT ACT GAG ATA TTA TTA CAA 649
193 Y V S A A S M S W S G D T E I L L Q 210


```

541 AAA ATG CAA GAG GAG ATT TCA CGG ACT AAA CGT GAC ATT GCG AAA AGA GAG TCT 594
175 K M Q E E I S R I K R D I A K R E S 192

595 TAC GTG TCA GCG GCG AGT ATG TCG TGG AGT GGA GAT ACT GAG ATG TCA TTA CAG 648
193 Y V S A A S M S W S G D T E M S L Q 210

649 GGA ATT AAG TAT GGC GAG AGC TAG TAT GAC CTC CAC GAG CGG AAA ATC CAT CGT 702
211 G I K Y G E S 217

703 GTTGGATGGATGGAACGCCTAGATCGTTTTCTAGCCGGGATAACG 747

```

Fig. n° 29 : Séquences en nucléotides et en acides aminés déduits, des segments S10 des virus de la peste équine sérotype 4 souche vaccinale USDA et 4 Maroc.

Les séquences en nucléotides ont été déterminées par la méthode de Sanger *et al.* (1977). Les séquences en acides aminés ont été déduites à l'aide du programme "TRANSLAT" du logiciel "PC/ GENE". La localisation des deux premiers codons d'initiation de la traduction du cadre de lecture ouvert dans les phases de lecture 2 (AHSV-4 USDA) et 1 (AHSV-4 M) sont précisées (ORF1 et ORF2). Les sites potentiels de glycosylation sont soulignés. Les sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C sont doublement soulignés. Les sites potentiels de phosphorylation par la caséine kinase II sont indiqués en caractères gras. Les résidus cystéine sont indiqués par un astérisque. Les sites potentiels de clivage par des signalases cellulaires sont indiqués par une flèche (\hat{I} sites dont le score théorique est < 5 , \uparrow sites dont le score théorique est > 5).

Différents sites de phosphorylation par la protéine kinase C et la caséine II kinase ont été prédits respectivement aux nucléotides 96, 106, 173, 183 et 41 et 135.

La recherche des sites potentiels de clivage par des signalases cellulaires a été effectuée à l'aide du programme "PSIGNAL" du logiciel PC/GENE, suivant la méthode de Von Heijne (1986) et en choisissant un score supérieur ou égal à 5 (fig. n° 29). Un site a été décrit à la position 170-171 (score 6,83). Les deux autres sites présentent des scores nettement inférieurs (score 3,41 pour le site à la position 129-130 et 2,11 pour le site à la position 60-61).

AHSV-4 M

De même, la protéine susceptible d'être codée par l'ORF dont le codon d'initiation est à la position 19-21 et le codon stop à la position 670-672 dans la phase de lecture 1, serait constituée de 217 acides aminés.

La séquence en acides aminés de cette protéine présente 94,5 % de similitude avec celle de AHSV-4 USDA. Tous les sites décrits pour la protéine NS3 de AHSV-4 USDA sont présents dans la séquence primaire de la protéine NS3 de AHSV-4 M (fig. n° 29) à l'exception des sites potentiels de glycosylation. En effet, la protéine NS3 de AHSV-4 M ne possède qu'un seul site éventuel de glycosylation localisé à la position 9.

3.4. Comparaison de la séquence du génome des différentes souches de virus équinestique

Lorsque ce travail a débuté, seules les séquences des gènes S10 des virus de la peste équine sérotypes 3 et 9 (Van Staden and Huisman, 1991) étaient publiées. Depuis, les séquences génomiques des virus équinestiques 1, 4 (souches SA et E) et 8 ont été rapportées (De Sa *et al.*, 1994). Les souches AHSV-1, -3, -4 (SA), -8 et -9 proviennent du laboratoire d'Onderstepoort (Afrique du sud) où elles ont subi trois à quatre passages sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés puis de nombreux passages en cultures de cellules au laboratoire de l'USDA (Etats Unis d'Amérique). La souche AHSV-4 E est la souche sauvage isolée en Espagne en 1987. La souche AHSV-4 USDA est la souche vaccinale (atténuée par une centaine de passages sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés) et la souche AHSV-4 M est une souche virulente isolée en 1990 au Maroc. Nous avons déterminé les séquences des gènes S10 de ces deux isolats.

Nous présentons donc la comparaison des séquences en nucléotides et en acides aminés de ces deux souches avec celles des gènes S10 des autres souches de virus équinestique ainsi qu'avec celles du virus de la BT sérotype 1.

3.4.1. Comparaison des séquences en nucléotides

La similitude moyenne entre la séquence de AHSV-4 USDA et celle de AHSV-4 SA est de 92,4 % (tableau XXXII). Avec la séquence de la souche sauvage espagnole de même sérotype 4, la similitude est de 93,7 %.

Les degrés de similitude entre les séquences de AHSV-4 USDA et les sérotypes -1, -3, -8 et -9 sont respectivement de 69,2 %, 76,2 %, 70,1 %, et 94,6 %. La grande similitude entre AHSV-4 USDA et AHSV-9 conforte l'identité des profils de restriction précédemment décrite (chapitre 5.2.2.2).

La séquence de AHSV-4 M présente une forte similitude (99,3 %) avec la séquence de la souche virulente espagnole (tableau XXXII) ainsi qu'avec les séquences de AHSV-4 SA (92,2 %), AHSV-4 USDA (94,6 %) et AHSV-9 (95,5 %).

L'alignement des séquences en nucléotides des gènes S10 des virus de la peste équine sérotypes 1, 3, 4 (E), 4 (SA), 4 (M), 4 (USDA), 8 et 9 à l'aide du programme "CLUSTAL", révèle que le pourcentage total de nucléotides identiques de la séquence consensus entre les huit séquences comparées est de 46,4 % (fig. n° 30). L'alignement indique que les extrémités terminales 5' et 3' des gènes sont conservées mais que les régions internes présentent une plus grande diversité. Les gènes des virus équinestiques 1 et 8 présentent, par rapport aux séquences des six autres virus, une insertion de huit nucléotides, située entre les nucléotides 465 et 466 de la séquence de AHSV4 USDA et un nucléotide supplémentaire (C) à la position 314-315. Par contre les gènes S10 de ces deux virus présentent une délétion de trois nucléotides (localisée entre les nucléotides 107 et 111 de AHSV-4 USDA).

Les séquences de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M ne présentent respectivement que 57,1 % et 57,8 % de similitude moyenne avec celle du segment S10 du virus de la BT sérotype -1 (tableau XXXII).

3.4.2. Comparaison des séquences en acides aminés

La comparaison des séquences en acides aminés montre une similitude moyenne de 92,4 % entre les séquences de AHSV-4 USDA et AHSV-4 SA (tableau XXXII). Le degré de similitude entre la séquence de AHSV-4 USDA et celle de la souche sauvage espagnole AHSV-4 E est de 94 % et de 94,5 % avec celle de AHSV-4 M. Le degré de similitude observé avec la séquence de AHSV-9 est de 94,5 %. Par contre, avec les séquences des virus des autres sérotypes, les similitudes sont moins importantes et sont respectivement de 65,4 % avec AHSV-1, 74,7 % avec AHSV-3 et 65,4 % avec AHSV-8.

Tableau XXXII : Pourcentage de similitude en nucléotides (a) et en acides aminés (b) entre les différentes séquences du segment 10 des virus de la peste équine et du virus de la bluetongue sérotype -1 (BTV-1).

	AHSV-1	AHSV-3	AHSV-4 USDA	AHSV-4 M	AHSV-4 SA	AHSV-4 E	AHSV-8	AHSV-9	BTV-1
AHSV-1	-								
AHSV-3	71,4 ^a 65,4 ^b	-							
AHSV-4 USDA	69,2 65,4	76,23 74,7	-						
AHSV-4 M	70,5 65,4	76,3 75,6	94,6 94,5	-					
AHSV-4 SA	69,4 65,4	76,7 76	92,4 92,6	92,2 93,5	-				
AHSV-4 E	67,9 65,4	75,6 74,7	93,7 94	99,3 99,1	91,3 92,6	-			
AHSV-8	97,9 97,7	71,8 65	70,1 65,4	70,8 65,4	70,1 65,4	68,8 65	-		
AHSV-9	69,7 65,9	76 75,1	94,6 94,5	95,5 95,4	92 94	95,2 94,5	70,2 65,9	-	
BTV-1	58 27,5	56,1 25,8	57,1 26,7	57,8 25,8	56,1 27,2	62,8 25,8	57,1 29,4	59,7 25,8	-

Fig. n° 30 : Alignement des séquences en nucléotides des gènes S10 des virus de la peste équine de sérotypes 1, 3, 4 (E), 4 (SA), 8, 9 et AHSV-4 USDA et -4 M à l'aide du programme "CLUSTAL".

The alignment was done on 8 Nucleic acid sequences.

Character to show that a position in the alignment is perfectly conserved: '*'
 Character to show that a position is well conserved: '.'

Alignment

```

1F10      GTTTAAATTATCCCTTGTCATGAATCTTGCTAGCATCTCCCAAAGCTATA      50
8F10      GTTTAAATTATCCCTTGTCATGAATCTTGCTAGCATCTCCCAAAGCTATA      50
3F10      GTTTAAATTATCCCTTGTCATGAGTCTAGCTACGATCGCCGAAAATTATA      50
9F10      GTTTAAATTAT-CCCTTGTCATGAATCTAGCTGCAATCGCCGAAAATTATA      49
AHSV4M90  GTTTAAATTA-TCCTTGTCATGAATCTAGCTACAATCGCCAAGAATTATA      49
AHSV4USDA GTTTAAATTATCCCTTGTCATGAATCTAGCTGCAATCGCCAAGAATTATA      50
SAAHSV4USD GTTTAAATTATCCCTTGTCATGAATCTAGCTGCAATCGCCAAGAATTATA      50
AHSV4NS3SP -----CTTGTCATGAATCTAGCTACAATCGCCAAGAATTATA      37
                *****.***.***.  ***.* *.*. ****
    
```

```

1F10      TGTCACATAATGAGAATGAAAGATCAATTGTACCATACATTCCGCCACCG      100
8F10      TGTCACATAATGAGAATGAAAGATCAATTGTACCATACATTCCGCCACCG      100
3F10      TGATGCATAATGGAAATCAGAGAGCAATTGTACCGTATGTTCCACCCCT      100
9F10      GTATGCATAATGGAGAGTCCGGGGCGATCGTCCCTTATGTGCCACCACCA      99
AHSV4M90  GCATGCATAATAGAGAGTCCGGGGCGATCGTCCCTTATGTGCCACCACCA      99
AHSV4USDA GTATGCATAATGGAGAGTCCGGGGCGATCGTCCCTTATGTGCCACCACCA      100
SAAHSV4USD GTATGCATAATGGAGAGTCCGGGGCGATTGTCCCTTATGTGCCACCACCA      100
AHSV4NS3SP GCATGCATAATGGAGAGTCCGGGGCGATCGTCCCTTGTGTGCCACCACCA      87
                . . .*****.....* . .*.*.*** ** **.*. .*.*** **
    
```

```

1F10      TATCATC---CGACGGCTCCGGCGCTTGCTGTATCCGCCAGTCAAATGGA      147
8F10      TATCATC---CGACGGCTCCGGCGCTTGCTGTATCCGCCAGTCAAATGGA      147
3F10      TATGCGTATGCAAATGCTCCGACGCTTGGTGGTCAGGCGGGTGAAATGGA      150
9F10      TACAATTTTCGCAAGTGCTCCGACGTTTTCTCAGCGTACGAGTCAAATGGA      149
AHSV4M90  TACAATTTTCGCAAGTGCTCCGACGTTTTCTCAGCGTACGAGTCAAATGGA      149
AHSV4USDA TACAATGTTGCGAGTGCTCCGACGTTTTCTCAGGGTACGAGTCAAATGGA      150
SAAHSV4USD TATAATTTTCGCGAGCGCTCCGACGTTTTCTCAGCGTACGAGTCAAATGGA      150
AHSV4NS3SP TACAATTTTCGCAAGTGCTCCGACGTTTTCTCAGCGTACGAGTCAAATGGA      137
                ** .      *.* *****.** **.* * .. .* .** *****
    
```

```

1F10      GACCATGTTCGCTTGGGATACTTAACCAAGCAATGTCAAGTTCAGCTGGTG      197
8F10      GACCATGTTCGCTTGGGATACTTAACCAAGCAATGTCAAGTTCAGCTGGTG      197
3F10      GTCCATGTTCGCTTGGGATACTTAATCAAGCCATGTCAAGTACAACCTGGTG      200
9F10      GTCCGTGTTCGCTTGGGATACTTAACCAAGCCATGTCAAGTACAACCTGGTG      199
AHSV4M90  GTCCGTGTTCGCTTGGGATACTTAACCAAGCCATGTCAAGTACAACCTGGTG      199
AHSV4USDA GTCCGTGTTCGCTTGGGATACTTAACCAAGCCATGTCAAAATACAACCTGGTG      200
SAAHSV4USD GTCCGTGTTCGCTTGGGATACTTAACCAAGCCATGTCAAGTACAACCTGGTG      200
    
```


1F10	TTAAATTTTATTATGTACCACGATGCTGCTGGCAGCGAATAAAAATATCGGA	546
3F10	TTAAATTTGTTATGTACCACAATGCTGCTAGCAGCGAATAAAAATATCGGA	546
3F10	TTGAATTTGCTGTGTACCACATATGTTGTTAGCGGCTGGAAAAATATCAGA	540
3F10	CTGAATTTGTTATGTACTACAGTTTTGTTAGCTGCGGGTAAGATTTCTGA	539
AHSV4M90	CTGAATTTGTTATGTACTACAGTTTTGTTAGCGGCGGGTAAGATTTCCGA	539
AHSV4USDA	CTGAATTTGTTATGTACTACAGTTTTGTTAGCGGCGGGCAAGATTTCTGA	540
SAAHSV4USD	CTGAATTTGTTATGTACCACAGTTTTGTTGGCGGCGGGTAAGATTTCTGA	540
AHSV4NS3SP	CTGAATTTGTTATGTACTACAGTTTTGTTAGCGGCGGGTAAGATTTCTGA	527

*.*****. *.***** **..* . ** *.**.***... **.***.* **

1F10	AAAGGTGAGAGAAGAGATTGCGAGGACAAAAAGAGACATCGCGAAAAGAC	596
3F10	AAAAGTGAGAGAAGAGATTGCGAGGACAAAAAGAGACATCGCGAAAAGAC	596
3F10	TAAAATACAGGAGGAGATCTCACGCACAAAGCGGGATATAGCGAAGAGAG	590
3F10	TAAAATACAAGAAGAAATTCACGGACTAAACGTGACATTGCGAAAAGAG	589
AHSV4M90	TAAAATGCAAGAGGAGATTCACGGACTAAACGTGACATTGCGAAAAGAG	589
AHSV4USDA	TAAAATACAAGAGGAGATTCACGGACTAAGCGTGACATTGCAAAAAGAG	590
SAAHSV4USD	TAAAATACAAGAGGAGATTCACGAACAAAGCGTGATATTGCGAAAAGAG	590
AHSV4NS3SP	TAAAATGCAAGAGGAGATTCACGGACTAAACGTGACATTGCGAAAAGAG	577

..**..* . **.***.*** .*. * **.***.*** ** **.***.***

1F10	AATCGTACGTATCAGCTGCGACGATGTCTTGGGATGGCGATAGCGTAACT	646
3F10	AATCGTACGTATCAGCTGCGACGATGTCTTGGGATGGCGATAGCGTAACT	646
3F10	AATCATATGTTTCCGCGGCTAGTATGTCTTGGAGTGGGGATACGAGCGTT	640
3F10	AGTCTTACGTATCAGCGGCGAGTATGTCTGTTGGAATGGAGATACTGAGATG	639
AHSV4M90	AGTCTTACGTGTGTCAGCGGCGAGTATGTCTGTTGGAATGGAGATACTGAGATG	639
AHSV4USDA	AGTCTTACGTATCGGCGGCGAGTATGTCTGTTGGAATGGAGATACTGAGATA	640
SAAHSV4USD	AGTCTTACGTATCTGCGGCGAGTATGTCTGTTGGAATGGAGATACTGAAGTA	640
AHSV4NS3SP	AGTCTTACGTGTGTCAGCGGCGAGTATGTCTGTTGGAATGGAGATACTGAGATG	627

*. **.*** **.*** **.***.* **.***.***.***.***.*** **..* .

1F10	CAATTACGAGATGTA AAAATATGGAGACTAGC-GGATAGACCTCCAAAAGC	695
3F10	CTATTACGAGATGTA AAAATGTGGAGACTAGC-GGATAGACCTCCAAAAGC	695
3F10	CTATTTAAAAGAGGTA AAAATATGGCGA-CAGCTAGAATGACCTCCATTTGT	689
3F10	TTATTACAGGGA ACTAAGTATGGCGA-AAGCTAGTTGACCTCCATGAGC	688
AHSV4M90	TTATTACAGGGA ATTAAGTATGGCGA-GAGCTAGTATGACCTCCACGAGC	688
AHSV4USDA	TTATTACAAGGA ATTAAGTATGGCGA-GAGCTAGTATGACCTCCACGAGC	689
SAAHSV4USD	TTATTGCAAGGA ATTAAGTATGGCGA-TAGCTAGTACGACCTCCACAAGC	689
AHSV4NS3SP	TCATTACAGGGA ATTAAGTATGGCGA-AAGCTAGAATGACC-----	667

. ..*... **..*** ** **.***.*** **..* .

1F10	GGGATTCCACTGGTGTGTCAGTGGATAACCGCCTAGATCGTGTCTTAGGG	745
3F10	GGGATTCCGCTGGTGTGTCAGTGGATAACCGCCTAGATCGTGTCTTAGGG	745
3F10	GGGAGATCCACAGTGTGGGTGGATCAAACACCTAGATCGTTTTCTAGGG	739
3F10	GGAAAAATCCATCGTGTGGATGGATGGAACGCCTAGATCGTTTTCTAG--	736
AHSV4M90	GGAAAAATCCATCGTGTGGATGGATGGAACGCCTAGATCGTTTTCTAG--	736
AHSV4USDA	TGAAAAATCCATCGTGTGGATGGATGGAACGCCTAGATCGTTTTCTAGGG	739
SAAHSV4USD	GGAAAAATCCATCGTGTGGATGGATGGAACGCCTAGATCGTTTTCTAGGG	739
AHSV4NS3SP	-----	667

1F10	AGCCGGGATAACGACTTAC	764
3F10	AGCCGGGATAACGACTTAC	764
3F10	AGCCGGGATAACGACTTAC	758
3F10	--C-----	737
AHSV4M90	--CCGGGATAACG-----	747
AHSV4USDA	AGCCGGGATAACGA-----	753
SAAHSV4USD	AGCCGGCATAACGACTTAC	758
AHSV4NS3SP	-----	667

Consensus length: 769
Identity : 357 (46.4%)
Similarity: 188 (24.4%)

La séquence en acides aminés de AHSV-4 M est pratiquement identique à celle de AHSV-4 E (99,1 % d'identité). De même, cette séquence s'avère proche de celles de AHSV-4 SA (93,5 %) et de AHSV-9 (95,4 %).

Les pourcentages de similitude entre les séquences de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M et celle du segment S10 du virus de la BT sérotype 1 ne sont respectivement que de 26,7 % et 25,8 %.

L'alignement des séquences en acides aminés des gènes S10 de AHSV-1, -3, -4 E, -4 M, -4 USDA, -4 SA, -8 et -9 permet de déterminer des régions de grande similitude entre certaines régions des protéines codées par ces huit gènes (fig. n° 31). 80% des acides aminés situés entre les positions 46 et 90 de AHSV-4 USDA et 77% de ceux situés entre les acides aminés 152 et 201 sont identiques pour les huit séquences comparées.

Parmi les deux résidus cystéine identifiés dans les séquences de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M, seule la cystéine à la position 162 s'avère conservée dans les huit séquences des virus équineptiques (fig. n° 31). La cystéine 123, présente dans les séquences de AHSV-3, -4 E, -4 SA, -4 USDA, -4 M et -9, est remplacée par une asparagine (N) dans AHSV-1 et -8. Cependant, ces deux séquences, à la position 121, présentent chacune un résidu cystéine. Seule, la séquence de AHSV-8, à la position 124, possède un troisième résidu cystéine supplémentaire.

Parmi les deux sites potentiels de glycosylation prédits dans AHSV-4 USDA (positions 9 et 57), seul le site 9 est conservé dans quatre séquences (AHSV-4 E, -4 SA, -4 M et -9) alors que le site 57 n'est conservé dans aucune autre séquence. Par contre, AHSV-1 et -8 présentent, à la position 123, un site de glycosylation potentiel (NVT) commun. AHSV-3, sur l'ensemble de sa séquence, ne présente aucun site potentiel de glycosylation (De Sa *et al.*, 1994).

Le site de clivage par des signalases cellulaires présentant un score théorique supérieur à 5, est conservé dans les séquences de AHSV-3, -4 E, -4 SA, -4 M, -4 USDA et -9.

Les sites de phosphorylation situés aux positions 96, 173 et 183 dans la séquence de AHSV-4 USDA sont conservés dans les huit séquences.

AHSV-4 USDA	D	P	E	P	I	R	Q	I	K	K	Q	V	G	I	R	<u>I</u>	L	K	N	L	100	
AHSV-4 M	≡	
AHSV-4 E	≡	
AHSV-1	K	.	.	R	Q	≡	.	.	T	.		
AHSV-3	H	.	.	L	.	.	≡	.	.	H	.		
AHSV-4 SA	≡		
AHSV-8	K	.	.	R	Q	≡	.	.	T	.		
AHSV-9	≡		

AHSV-4 USDA	K	M	E	L	V	<u>T</u>	M	R	R	K	K	S	A	L	K	I	M	I	F	I	120
AHSV-4 M	A	≡	
AHSV-4 E	A	≡	
AHSV-1	.	V	.	.	S	G	L	I	.	.	.	I	M	.	.	
AHSV-3	.	I	.	.	A	S	.	.	.	R	Y	A	I	.	R	V	V	.	.	M	
AHSV-4 SA	A	≡	T	.	L	.	
AHSV-8	.	V	.	.	S	G	L	K	K	.	.	I	M	.	.	
AHSV-9	A	≡	

AHSV-4 USDA	S	G	C*	V	T	L	A	T	S	M	V	G	G	L	S	I	V	D	D	D	140		
AHSV-4 M	E		
AHSV-4 E	E		
AHSV-1	C	A	N	.	.	M	.	.	.	L	.	.	.	M	E	.		
AHSV-3	M	A	.	.	.	T	.	I	.	.	.	N	E		
AHSV-4 SA	N	E	
AHSV-8	C	A	N	.	.	M	.	.	.	L	.	.	.	M	E	.		
AHSV-9	Q		

↑↑

AHSV-4 USDA	I	L	E	N	Y	K	T	N	D	W	L	M	K	T	I	H	G	157
AHSV-4 M	.	.	R	D	N	
AHSV-4 E	.	.	R	G	N	
AHSV-1	.	A	K	H	L	A	F	D	G	K	G	.	.	V	S	.	.	V	.	.	.	
AHSV-3	.	Y	.	D	L	S	.	.	.	G	D	G	.	.	S	
AHSV-4 SA	.	.	.	D	K	A	
AHSV-8	.	A	K	H	L	A	F	D	G	K	G	.	.	V	S	.	.	V	.	.	.	
AHSV-9	.	.	D	D	K	E	

AHSV-4 USDA	L	N	L	L	C*	T	T	V	L	L	A	A	G	K	I	<u><u>S</u></u>	D	K	I	Q	177	
AHSV-4 M	≡	.	.	M	.	
AHSV-4 E	≡	.	.	M	.	
AHSV-1	M	N	.	.	≡	E	.	V	R	
AHSV-3	M	≡	
AHSV-4 SA	≡	
AHSV-8	M	N	.	.	≡	E	.	V	R	
AHSV-9	≡	

↑

AHSV-4 USDA	E	E	I	S	R	<u>T</u>	K	R	D	I	A	K	R	E	S	Y	V	S	A	A	197
AHSV-4 M	≡
AHSV-4 E	≡
AHSV-1	.	.	.	A	.	≡	Q
AHSV-3	≡
AHSV-4 SA	≡
AHSV-8	.	.	.	A	.	≡	Q
AHSV-9	≡
AHSV-4 USDA	S	M	M	W	S	G	D	T	E	I	L	L	Q	G	I	K	Y	G	E	S	217
AHSV-4 M	M	S
AHSV-4 E	M	S
AHSV-1	T	.	.	.	D	.	.	S	V	T	Q	.	R	D	V	D	
AHSV-3	S	V	.	.	K	E	V	D	.
AHSV-4 SA	N	V	D
AHSV-8	T	.	.	.	D	.	.	S	V	T	.	.	R	D	V	.	C	.	.	D	
AHSV-9	N	M

Fig. n° 31 : Alignement des séquences en acides aminés déduites des séquences en nucléotides des gènes S10 des virus équinestiques -1, -3, -4 USDA, -4 SA, -4 E, -4 M, -8 et -9.

Les sites de glycosylation sont soulignés. Les sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C sont doublement soulignés. Les sites potentiels de phosphorylation par la caséine kinase II sont encadrés. Les résidus cystéine sont indiqués par un astérisque. Les sites potentiels de clivage par des signalases cellulaires sont indiqués par une flèche (↑ sites dont le score théorique est < 5, ↗ sites dont le score théorique est > 5).

DISCUSSION

DISCUSSION

1. DEVELOPPEMENT DE L'AMPLIFICATION EN CHAINE PAR POLYMERASE POUR LA DETECTION DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE

Le diagnostic individuel de l'infection par le virus de la peste équine s'effectue classiquement soit par isolement viral suivi d'une identification sérologique, soit par la détection directe à l'aide de tests ELISA du virus ou par la détection des anticorps. La première méthode est fastidieuse et le délai de réponse parfois incompatible avec les exigences des autorités sanitaires vétérinaires. La deuxième méthode est plus rapide mais manque de sensibilité. La dernière méthode sérologique s'avère particulièrement tardive.

Il nous a donc semblé utile de développer une technique de diagnostic sensible et spécifique en tentant d'appliquer la méthode PCR à la détection du virus équine.

1.1. Spécificité de la réaction RT-PCR

1.1.1. Choix des séquences cibles

Le gène S7 dont la séquence nucléotidique est très conservée entre les neuf sérotypes (et qui code pour la protéine VP7 qui possède des déterminants antigéniques spécifiques de groupe) a été choisi comme séquence cible pour l'amplification génique (Oellermann *et al.*, 1970 ; Bremer *et al.*, 1990 ; Roy *et al.*, 1991).

Le gène S10, quant à lui, s'avère beaucoup moins conservé entre les sérotypes (Bremer *et al.*, 1990). Ces données font de ce gène une cible intéressante pour l'étude des polymorphismes de restriction des produits d'amplification.

1.1.2. Choix des amorces

Les segments génomiques des *Orbivirus* ont la caractéristique d'avoir des séquences terminales communes (Mertens and Sangar, 1985). Les six nucléotides des extrémités 5' et 3' des dix segments génomiques des *Orbivirus* sont identiques (respectivement 5' GUUAAA... et ...ACUUAC 3'). De plus, les séquences des dix nucléotides terminaux des segments homologues de différents sérotypes au sein du séro groupe bluetongue sont similaires. En se fondant sur la parenté taxonomique et génétique des virus de la BT et de la peste équine, nous avons émis l'hypothèse que ces identités de séquences des extrémités terminales pouvaient être retrouvées pour le virus de la peste équine. En effet, quand nous avons débuté ce travail, seules les séquences nucléotidiques du gène 7 de AHSV-4 et des gènes 10 de AHSV-3 et 9 étaient déterminées (Roy *et al.*, 1991 ; Van Staden and Huismans, 1991). La forte similitude des séquences terminales (95% en 5' et 100% en 3') des gènes 10 des sérotypes 3 et 9 renforçait notre hypothèse. Nous avons donc choisi d'utiliser comme amorces nucléotidiques (pour la transcription inverse et l'amplification génique) les vingt premiers et vingt derniers nucléotides des gènes 7 et 10.

Afin de vérifier la spécificité des amorces employées et afin d'optimiser les paramètres de la réaction PCR, nous avons, dans un premier temps, utilisé comme matrice l'ARN génomique extrait du virus purifié. Dans un deuxième temps, les conditions de la PCR ayant été définies, nous avons amplifié l'ARN viral à partir de cultures de cellules infectées puis à partir d'échantillons biologiques.

a) Segment S7

Les amorces P1 et P2 choisies pour effectuer la réaction de RT-PCR ont permis l'obtention d'un fragment amplifié à partir de l'ARN extrait du virus de la peste équine sérotype 4 purifié (fig. n° 12) mais aussi à partir d'acides nucléiques totaux extraits de cultures de cellules infectées par les neuf sérotypes de virus équinestique (fig. n° 17). Le fragment obtenu a une taille d'environ 1170 pb. La spécificité de ce produit PCR a été vérifiée par "nested-PCR" (fig. n° 16) et par hybridation avec une sonde interne de 265 pb (fig. n° 18).

Les gènes S7 des neuf sérotypes du virus équinestique ont été amplifiés ce qui confirme que les amorces choisies s'avèrent être spécifiques

de groupe. Aucun produit d'amplification n'a été obtenu avec les 24 sérotypes du virus de la BT et les sérotypes -1, -2, -3, -4 et -7 du virus de la EHD (tableau XV).

La spécificité de groupe des séquences nucléotidiques des extrémités 5' et 3' du gène S7 est ainsi vérifiée. Les séquences nucléotidiques terminales du gène S7 de AHSV-9 ont récemment été déterminées par Wade-Evans *et al.* (1993). Ces séquences présentent 100% de similitude par rapport aux extrémités terminales du gène S7 de AHSV-4 (tableau XXXIII).

Tableau XXXIII : Pourcentage de similitude des séquences en nucléotides des extrémités terminales 5' et 3' des gènes S7 de AHSV-4, AHSV-9, EHDV-1 et BTV-1 .

	AHSV-9		EHDV-1		BTV	
AHSV-4	100 (5')	100 (3')	85 (5')	55 (3')	70 (5')	65 (3')
AHSV-9			85 (5')	55 (3')	70 (5')	65 (3')
EHDV-1					60 (5')	60 (3')

Les amorces sélectionnées n'amplifient aucun des segments génomiques S7 des 24 sérotypes du virus de la BT et des sérotypes 1, 2, 3, 4 et 7 du virus de la maladie hémorragique du cerf (dont 7 sérotypes sont aujourd'hui connus). Ces résultats expérimentaux sont en accord avec la comparaison des séquences nucléotidiques terminales du gène S7 de BTV-1 (Wade Evans *et al.*, 1990) et de EHDV-1 par rapport à celles de AHSV. L'analyse théorique des degrés de similitude des séquences (tableau XXXIII) indique que ceux-ci sont trop faibles pour permettre, à 55°C, une hybridation des amorces P1 et P2.

Pour la détection par RT-PCR du virus de la bluetongue, Wade-Evans *et al.* (1990) ont choisi des amorces qui correspondent aux 20 nucléotides des extrémités terminales 5' et 3' du gène S7 de BTV sérotype 1. Ces amorces ont permis l'amplification des segments S7 des 24 sérotypes du virus de la BT, mais aucune amplification n'a été observée à partir des surnageants de cultures de cellules infectées avec d'autres *Orbivirus* dont le virus de la peste équine et le virus de la maladie hémorragique du cerf (EHDV). Ces données confirment l'intérêt du choix du segment S7 dont les séquences nucléotidiques des extrémités terminales 5' et 3' s'avèrent être conservées entre les sérotypes d'un même séro groupe.

Il aurait été intéressant de vérifier la spécificité des amorces P1 et P2 vis à vis d'un autre *Orbivirus* qui infecte les équidés : le virus de l'encéphalose équine (qui n'existe qu'en Afrique du sud). Nous n'avons malheureusement pas pu obtenir de souche. Cependant, d'après les résultats des travaux réalisés par Viljoen and Huismans (1989), une amplification non spécifique avec ce virus semble peu probable. En effet, ces auteurs ont montré par des études d'hybridation moléculaire, que le virus de l'encéphalose équine est génétiquement plus proche du virus de la bluetongue que du virus de la peste équine.

Aucun produit d'amplification n'est détecté à partir des génomes des principaux virus qui infectent les équidés. De même, aucune réaction faussement positive n'est observée à partir de cellule de cheval (fig. n° 17).

Confirmation du choix d'un segment génomique conservé

Récemment, plusieurs auteurs ont développé des réactions d'amplification génique à partir de différents segments génomiques du virus de la peste équine. Les séquences cibles sont constituées par les gènes qui sont conservés entre les sérotypes. Ainsi, Mizukoshi *et al.* (1994) ont réalisé une RT-PCR à partir du segment génomique M5 qui code pour la protéine NS1. Sakamoto *et al.* (1994b) ont choisi d'amplifier une partie du fragment génomique L3 qui code pour la protéine VP3. Enfin, Stone-Marschat *et al.* (1994) ont amplifié une région du segment génomique S8 (qui code pour la protéine NS2). Ce segment est très conservé à l'intérieur d'un sérotype mais présente une faible homologie entre les sérogroupes AHSV, BTV et EHDV (Van Staden *et al.*, 1991).

b) Segment S10

Les études d'hybridations croisées effectuées par Bremer *et al.* (1990) indiquent que le segment S10, qui pourtant, code pour les protéines non structurales NS3 et NS3A, est curieusement peu conservé entre les sérotypes viraux. Van Staden and Huismans (1991) ont cependant montré que ce fragment possède les séquences terminales communes aux *Orbivirus* (Mertens and Sangar, 1985). L'amplification des gènes S10 de chaque sérotype à l'aide des amorces P3 et P4 confirme la présence des séquences communes au sein du groupe du virus équine. La détermination récente des séquences en nucléotides des gènes S10 des

virus équine -1, -4 et -8 (De Sa *et al.*, 1994) et celle des gènes de AHSV-3 et -9 (Van Staden and Huismans, 1991) permettent de confirmer que la similitude des séquences terminales des gènes S10 de ces cinq sérotypes est de 95 à 100% (tableau XXXIV).

Tableau XXXIV : Pourcentages de similitude des séquences nucléotidiques des extrémités terminales 5' et 3' des gènes S10 de AHSV-1, AHSV-3, AHSV-4, AHSV-8, AHSV-9 et BTV-1.

	AHSV-8	AHSV-3	AHSV-4	AHSV-9	BTV-1
AHSV-1	100 (5') 100 (3')	100 (5') 100 (3')	100 (5') 95 (3')	95 (5') 100 (3')	55 (5') 60 (3')
AHSV-8		100 (5') 100 (3')	100 (5') 95 (3')	95 (5') 100 (3')	55 (5') 60 (3')
AHSV-3			100 (5') 95 (3')	95 (5') 100 (3')	55 (5') 60 (3')
AHSV-4				95 (5') 95 (3')	55 (5') 55 (3')
AHSV-9					50 (5') 60 (3')

Avec les amorces P3 et P4, aucun produit d'amplification n'est obtenu à partir des génomes des 24 sérotypes du virus de la BT et des sérotypes 1, 2, 3, 4 et 7 du virus de la maladie hémorragique du cerf (dont 7 sérotypes sont aujourd'hui connus).

Les conditions de stringence utilisées pendant la RT-PCR, liées principalement à la température d'hybridation des amorces (50°C), sont suffisamment élevées pour que la réaction d'amplification soit spécifique.

1.2. Sensibilité de la réaction PCR

La sensibilité du test PCR a été évaluée à 3,1 pg d'ARN cible ce qui, par un calcul théorique, correspond à $2,5 \cdot 10^6$ particules virales. Après "nested-PCR", le seuil de sensibilité est de 0,31 fg d'ARN cible ce qui correspond à 250 particules virales.

Ces données sont tout à fait en accord avec les valeurs publiées dans la littérature concernant la détection des segments génomiques des virus de la peste équine ou de la BT (tableau XXXV). En effet, les nombres de

particules virales minimales détectées varient, selon les auteurs, d'un facteur $1,2 \cdot 10^3$ (de 6 à 7200).

La PCR nichée augmente d'un facteur 10^4 le seuil de sensibilité (250 particules virales) par rapport à la RT-PCR avec visualisation sur gel d'agarose du fragment amplifié ($2,5 \cdot 10^6$ particules virales). Cette valeur est proche du taux théorique d'amplification (10^5) publié par Belak and Ballagi-Pordany (1993).

Tableau XXXV : Seuils de sensibilité de la RT-PCR effectuée sur les virus de la BT et de la peste équine, rapportés par différents auteurs.

Technique utilisée	Séquence cible	Seuil de sensibilité (nombre de copies d'ARN viral)	Références
RT-PCR + sonde	BTV 251pb du segment S10	50	Akita <i>et al.</i> , 1992
RT-PCR	BTV segment S7 complet	6 (après 60 cycles)	Wade-Evans <i>et al.</i> , 1990
RT-PCR + sonde	BTV 250 pb du segment M6	7200	Dangler <i>et al.</i> , 1990
RT-PCR	AHSV 423 pb du segment S8	100	Stone-Marschat <i>et al.</i> , 1994

La détermination d'un seuil de sensibilité théorique étant délicate et difficilement exploitable, l'expression d'un seuil de sensibilité exprimé en DCP50% est plus adaptée qu'en unité de mesure de masse. Les DCP50% sont, en effet, une mesure du pouvoir infectieux dont la corrélation avec le nombre de particules virales et donc de génomes viraux n'est pas nécessairement proportionnelle.

La quantité minimale de virus exprimée en DCP 50% est de 75. Or, le flacon de culture cellulaire initialement inoculé avec 8 DCP ne présentait aucun effet cytopathique au moment de la congélation (48h post inoculation). En fait 10 000 fois plus de DCP ($8 \cdot 10^4$) ont été nécessaires pour la mise en évidence du virus sur cultures cellulaires en 48h (présence d'un effet cytopathique). Ces données montrent que la RT-PCR est capable de détecter le virus avant même l'apparition d'un effet cytopathique sur les cellules inoculées.

Le seuil de détection de l'ELISA par immunocapture (qui s'avère être plus sensible que l'inoculation aux cultures de cellules) est selon les auteurs respectivement de $2,5 \cdot 10^3$ (Laviada *et al.*, 1992) et $1,4 \cdot 10^3$ DCP50% (Hamblin *et al.*, 1991b). La RT-PCR améliore donc théoriquement la sensibilité de détection du virus équine de 18 à 30 fois par rapport à l'ELISA.

1.3. Détection du virus de la peste équine à partir d'échantillons biologiques

L'intérêt de la PCR a été évalué à partir d'échantillons cliniques tant il est vrai que les données relatives à la sensibilité et à la spécificité obtenues à partir d'acides nucléiques extraits de virus purifié ou de cultures de cellules infectées peuvent s'avérer surévaluées.

1.3.1. A partir d'échantillons nécropsiques

Pour les 37 échantillons analysés, une bonne corrélation est obtenue entre l'isolement viral et la RT-PCR à l'exception des échantillons 1, 6, 31, 34 et 37. La spécificité est satisfaisante puisque tous les échantillons non infectés sont négatifs.

Les échantillons marocains n°1 et 6 (Kenitra et Missour) proviennent de chevaux décédés après avoir présenté un tableau clinique qui évoquait la forme oedémateuse de la peste équine et pendant une période et dans une région où sévissait la maladie. De même en ce qui concerne les prélèvements camerounais n° 31, 34 et 37, ils proviennent d'un effectif de chevaux dont les sérums ante-mortem se sont avérés positifs par la méthode de fixation du complément et qui ont présenté un tableau clinique qui permettait d'évoquer la forme cardiaque de la peste équine. De plus, à partir d'un prélèvement (n° 35) de l'un des chevaux, le virus de la peste équine sérotype 9 a pu être isolé.

Ainsi, ces résultats divergents entre l'isolement viral et la RT-PCR pour ces cinq échantillons peuvent s'expliquer, à la lumière des données épidémiologiques, cliniques et/ou virologiques, par une plus grande sensibilité de la RT-PCR que l'isolement viral. Différents facteurs peuvent expliquer l'impossibilité à isoler le virus des échantillons nécropsiques :

- la faible quantité de particules virales dans les échantillons qui ne peut pas être détectée par inoculation aux cultures cellulaires (cinq passages en aveugle ont été nécessaires pour isoler le virus de l'échantillon n°35),

- un délai trop long entre la mort de l'animal et le prélèvement biopsique responsable de la perte du pouvoir infectieux du virus,

- l'état de putréfaction avancée de certains échantillons (notamment les prélèvements du Cameroun) responsable de la perte du pouvoir infectieux du virus et d'un effet toxique sur les cellules.

1.3.2. A partir d'échantillons biologiques

La sensibilité et la spécificité de la RT-PCR ont été comparées à celles de l'isolement viral et de l'ELISA pour capture d'antigène à partir d'un ensemble de 76 échantillons biologiques. La RT-PCR est effectuée en une seule étape (transcription inverse et PCR simultanées) à l'aide des amorces P1 et P2 (le segment cible est le gène S7).

Les données obtenues à partir des trois échantillons n° 43, 45 et 63 ne sont pas prises en compte (tableau XX) à cause de la trop faible quantité du matériel biologique utilisable. Moins de 10 µl de chaque échantillon étaient disponibles pour l'extraction des acides nucléiques et amplification. Il ne nous a pas été possible d'obtenir de matériel biologique supplémentaire pour ces trois échantillons.

Ainsi, sur 73 échantillons analysés, 46 échantillons sont à la fois positifs par RT-PCR et ELISA, 24 sont à la fois négatifs par ELISA et RT-PCR. Trois échantillons s'avèrent positifs par RT-PCR mais négatifs par ELISA et, par RT-PCR aucun faux négatif (par rapport à l'ELISA) n'est observé (tableau XX).

Les échantillons n° **5**, **14** et **72** sont négatifs en ELISA et positifs en RT-PCR.

Les échantillons n° 5 et 14

Ces deux échantillons correspondent à des rates prélevées en Andalousie sur des chevaux brutalement décédés en 1989, année où de nombreux cas de peste équine ont été recensés dans cette région du sud de l'Espagne. En effet, dans le cadre des mesures de lutte contre la peste équine, les autorités nationales espagnoles avaient exigé que tout cheval

mort de façon suspecte soit déclaré aux services vétérinaires régionaux et que soit systématiquement effectuée à partir de prélèvements nécropsiques. la détection du virus équine. Pour l'un de ces chevaux, aucun signe clinique n'a été observé et pour le second les symptômes ne correspondaient pas à ceux classiquement rencontrés dans un cas de peste équine. Les deux chevaux avaient été vaccinés quelques semaines auparavant avec un vaccin atténué monovalent contenant la souche AHSV-4 SA (vaccin fourni par le laboratoire d'Onderstepoort en Afrique du sud). Les dates des injections vaccinales n'ont cependant pas pu être déterminées avec précision.

Le laboratoire national espagnol d'Algete n'ayant pas isolé le virus de la peste équine sur cultures cellulaires, ces deux échantillons ont été répertoriés "rates non infectées" (témoins négatifs) et nous furent envoyés avec les 74 autres échantillons biologiques (tableau XIII) pour détection en aveugle du virus de la peste équine. Or, ces deux échantillons se sont avérés être négatifs en ELISA et positifs en RT-PCR. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la divergence des résultats :

- les chevaux étaient en période d'incubation et présentaient une très faible quantité de virus, suffisante pour sa détection par PCR mais insuffisante par ELISA,

- les chevaux présentaient une virémie post-vaccinale au moment de leur mort (due à une cause inconnue : intoxication, coup de chaleur, entérotoxémie,...). La RT-PCR aurait amplifié le segment S7 du virus vaccinal. Le profil de restriction du produit amplifié est d'ailleurs identique à celui de la souche AHSV-4 SA (tableau XXVI).

Aucune ambiguïté ne peut être soulevée concernant l'absence de virus équine dans les dix-huit autres échantillons spléniques (1 à 4, 6 à 13 et 15 à 20) qualifiés de témoins négatifs par les espagnols. Il s'agissait d'échantillons prélevés sur cadavres de chevaux décédés quelques années avant 1987 (année d'apparition des premiers foyers de peste équine) où situés dans des régions non infectées (nord de l'Espagne). Par contre, pour ces deux échantillons n° 5 et 14, les quelques données épidémiologiques et cliniques dont nous disposons, nous autorisent à émettre un doute quant à la qualification (sans doute hâtive) par nos collègues espagnols de prélèvements non infectés. Ainsi, les résultats divergents entre l'ELISA et la RT-PCR peuvent-ils être en faveur de la grande sensibilité de la RT-PCR.

L'échantillon n° 72

Cet échantillon, négatif par ELISA et positif par RT-PCR, est un surnageant de culture de cellules infectée par le virus de la Bluetongue sérotype 1.

Un fragment d'environ 1170 pb a été amplifié et pourrait correspondre au segment génomique S7 homologue du sérotype 1 du virus de la bluetongue dont la taille est de 1156 pb (Wade Evans *et al.*, 1990). En effet, ce virus, prototype du genre *Orbivirus* présente de nombreuses similarités (génétique et antigénique) avec le virus de la peste équine. Par exemple, l'homologie de la protéine VP7 de BTV avec celle de AHSV a de nombreuses fois été démontrée (Gould, 1988b ; Roy, 1989 ; Holmes, 1991 ; Iwata *et al.*, 1991). L'hybridation croisée de leur génome a été décrite pour la première fois par Verwoerd and Huisman (1969) et Roy *et al.* (1991) ont montré que le fragment S7 du virus de la BT sérotype 10 possède les séquences terminales communes aux *Orbivirus*. Cependant, la comparaison des 20 nucléotides des extrémités 3' et 5' du segment 7 de BTV-1 (Wade Evans *et al.*, 1990) et de AHSV-4 (Roy *et al.*, 1991) ne révèle que 70% de similitude en 5' et 65% de similitude en 3'. Les amorces sélectionnées à partir de la séquence du gène S7 de AHSV-4 ne peuvent pas, en théorie, s'hybrider à 55°C aux extrémités du fragment 7 de BTV-1. Nous avons vérifié la spécificité de nos amorces utilisées pour la RT-PCR vis à vis des 24 sérotypes de la bluetongue et nous n'avons obtenu aucun produit d'amplification (tableau XVI). Enfin, Wade Evans *et al.* (1990), qui ont réalisé l'amplification du fragment S7 de certains sérotypes de la bluetongue (dont le sérotype 1), n'obtiennent pas d'amplification avec le génome du sérotype 4 de la peste équine. Ainsi, la similitude des séquences nucléotidiques des extrémités terminales 5' et 3' du gène S7 de la souche de BTV-1 utilisée par les espagnols pour infecter la culture de cellule pourrait expliquer ce résultat.

Afin de vérifier l'identité de ce produit d'amplification, nous l'avons envoyé à Alison Wade Evans (laboratoire de Pirbright, Grande Bretagne) qui dispose des segments S7 de BTV sérotype 1 et AHSV sérotype 9 clonés en totalité dans le phagemide Bluescript et utilisés comme sondes radioactives. La sonde AHSV-9 s'hybride avec le produit amplifié alors que la sonde BTV donne un signal très faible. L'hypothèse de la contamination de l'échantillon par de l'ADN complémentaire du segment S7 du virus équine préablement amplifié est probable, bien que le témoin négatif eau (sans

matrice) n'ait pas été contaminé et que toutes les précautions de manipulation (Kwok and Higuchi, 1992) aient été respectées.

Conclusion

Des résultats identiques ont été obtenus pour 70 échantillons sur 73 (95,8 %) avec les deux techniques RT-PCR et ELISA. Les informations relatives aux échantillons n° 5 et 14 seraient en faveur d'une meilleure sensibilité de la RT-PCR. Cependant, le risque de faux positifs évoqué dans le cas de l'échantillon n° 72 illustre une des limites de la technique RT-PCR.

La détection du génome du virus équinestique à partir d'un mélange d'insectes infectés par le virus avec AHSV-4 (échantillon n° 61) confirme l'intérêt de la RT-PCR dans l'étude de la prévalence du virus dans une population d'insectes.

1.3.3. A partir du tissu sanguin

La capacité de la RT-PCR à détecter le virus de la peste équine dans le sang de chevaux virémiques a été étudiée et l'influence de l'anticoagulant utilisé a été évaluée.

a) Comparaison de la sensibilité de l'isolement viral et RT-PCR

La détection par isolement du virus est tout à fait conforme aux données publiées par Laegreid *et al.* (1993). En effet, le virus de la peste équine 4 E/PI est détecté plus précocement dans le sang (entre J1 et J3 post-infection jusqu'à la mort) alors que le 9 PI est détecté plus tardivement (à partir de J6)(tableau XXI). Cette précocité de AHSV-4 est liée à la virulence de cette souche qui provoque une forme pulmonaire à évolution suraiguë alors que la souche AHSV-9 induit une forme cardiaque ou mixte à évolution aiguë. Nous retrouvons ainsi les données de Laegreid *et al.* (1993) qui indiquent que, chez des chevaux n'ayant jamais été infectés par le virus équinestique, les manifestations cliniques de la maladie et la durée de la virémie sont uniquement déterminés par le phénotype de la souche virale.

Souche AHSV-4 E/PI

La comparaison des résultats de l'isolement du virus par l'équipe américaine et par nous-mêmes (tableau XXI) indique que pour les chevaux 49 et 54 (inoculés avec AHSV-4 E/PI) le virus a été détecté plus précocement (à J1) par l'équipe du Dr Laegreid que par notre laboratoire (J3). Cependant, la disparité des résultats de l'isolement viral obtenus dans les deux laboratoires est sans doute due au délai qui a séparé le prélèvement et l'inoculation aux cultures de cellules et aux conditions d'acheminement des échantillons depuis les Etats Unis. En effet, la recherche virale effectuée par l'équipe américaine a été réalisée dans des conditions optimales. Les sangs ont été traités et inoculés aux cellules immédiatement après le prélèvement sur les animaux.

Une parfaite corrélation est observée entre la détection du segment génomique S7 par RT-PCR et hybridation moléculaire et l'isolement du virus. La RT-PCR, pour les trois chevaux, s'avère positive du premier jour (J1) jusqu'à J6, jour de décès des trois animaux (fig. n° 23).

Souche AHSV-9 PI

Concernant les échantillons des chevaux 46, 56 et 58, nous avons détecté plus précocement le virus par isolement viral (à J3 pour le cheval 46, J6 pour les animaux 56 et 58) que l'équipe américaine (respectivement J8, J12 et J8 pour les mêmes chevaux)(tableau XXI). Cependant, nous avons dû effectuer plusieurs passages en aveugle avant qu'un effet cytopathique ne soit observé alors que les américains n'ont procédé qu'à un seul passage en culture de cellules. Ces données permettent de conclure que le virus est présent, pendant les huit jours post-infection, en faibles quantités dans le sang. Ces résultats sont en accord avec ceux de Laegreid *et al.* (1993) qui, avec la même souche, ne détectent le virus (par isolement en culture de cellules) dans le sang de sept chevaux infectés expérimentalement qu'à partir du dixième jour post-inoculation pour six animaux et à partir du septième jour pour un animal. Les titres viraux, au huitième jour, étaient de l'ordre de 30 DCP50/ml, ont atteint 10⁴ DCP50/ml le onzième jour pour être non décelables le quinzième jour.

La faible virulence du virus de la peste équine 9 PI est illustrée par le cas du cheval 58 qui a manifesté un tableau clinique modéré avec un pronostic favorable et pour lequel le virus n'a été isolé, après un passage,

par l'équipe américaine, que deux fois, à J8 et J14. Nous avons isolé le virus, après cinq passages, à J6, 7, 9, 10, 12 et 13. Pour les chevaux 46 et 56, les résultats de la RT-PCR indiquent une meilleure sensibilité de cette technique que l'isolement du virus.

Par contre, aucun produit d'amplification n'a pu être détecté directement à partir du sang du cheval 58. La RT-PCR s'est révélée uniquement positive à partir des cultures de cellules inoculées avec les échantillons sanguins.

Deux hypothèses peuvent expliquer ces réactions faussement négatives : la faible quantité du virus dans le sang et la présence d'inhibiteurs de la réaction PCR. La faible quantité du virus dans le sang est confirmée par le nombre élevé (quatre à cinq) de passages nécessaires pour isoler le virus et la faible virulence de la souche (sans doute corrélée avec le titre viral sanguin) est illustrée par la survie de l'animal 58. La présence éventuelle d'inhibiteurs de la réaction RT-PCR dans le sang de cet animal, serait susceptible d'expliquer ces réactions faussement négatives. De nombreux composants du sang inhibent l'amplification d'ADN. Leur nature n'est pas connue à l'exception des noyaux porphyrine de l'hème qui entrent dans la composition de la molécule d'hémoglobine (Higuchi, 1989 ; Barker *et al.*, 1992). Ces molécules se fixeraient sur la Taq polymérase et inhiberaient l'activité enzymatique (Higuchi, 1989).

b) Influence de l'anticoagulant utilisé

L'inhibition de la Taq polymérase par l'héparine (Beutler *et al.*, 1990 ; Holodniy *et al.*, 1991 ; Izraeli *et al.*, 1991 ; Wang *et al.*, 1992) ou d'un agent chelateur comme l'EDTA (Innis *et al.*, 1990) a été rapportée dans la littérature.

Afin d'évaluer cet effet inhibiteur de l'anticoagulant utilisé, chaque échantillon de sang a été prélevé en deux exemplaires, l'un prélevé sur tube contenant de l'EDTA, l'autre de l'héparinate de sodium.

Aucune différence significative dans les résultats de la RT-PCR, en fonction de l'anticoagulant utilisé, n'a été constatée (tableau XXII) pour les échantillons des chevaux 46, 49, 50, 54 et 56. Les prélèvements de sang ont subi deux lavages avant de nous être expédiés. La présence de produits d'amplification à partir de sang hépariné lavé confirme les travaux de Beutler *et al.* (1990). Ces auteurs ont en effet montré que le lavage des hématies avant extraction des acides nucléiques suffisait pour éliminer les inhibiteurs

de la RT-PCR. De plus, Panaccio *et al.* (1993) ont montré que le type de sel utilisé avait une influence inhibitrice : l'héparinate de lithium ou de fluorure inhibent la PCR alors que le sel de sodium ne possède pas cet effet.

Conclusion

La RT-PCR a permis la détection du virus de la peste équine dans le sang en 48 heures alors que l'isolement du virus en culture de cellules a nécessité un délai minimum de 15 jours (résultats obtenus dans notre laboratoire). Ce délai a certainement été augmenté par les mauvaises conditions de conservation des échantillons (transport, congélations et décongélations successives). Dans les conditions optimales dans lesquelles travaillait l'équipe américaine, l'isolement viral et l'identification par séroneutralisation ont nécessité un délai minimal de 10 jours.

Depuis, la seule publication qui décrive l'utilisation de la RT-PCR dans la détection du virus équine dans le sang de chevaux infectés (Stone-Marshat *et al.*, 1994), corrobore nos résultats. Ces auteurs ont choisi d'amplifier le gène S8. Alors que la précocité de détection du virus dans le sang par RT-PCR et isolement viral étaient identiques pour les échantillons prélevés à huit chevaux inoculés avec une souche hautement virulente de AHSV-4, la RT-PCR a permis de détecter le gène S8 plus précocement que l'isolement viral à partir du sang de chevaux inoculés avec une souche avirulente du virus de la peste équine sérotype 4.

La RT-PCR s'avère être une méthode utile pour la détection précoce du virus équine dans le sang, en particulier pour des chevaux infectés par des souches peu virulentes et dont le diagnostic, par ailleurs, est souvent délicat.

2. INTERETS ET LIMITES DU POLYMORPHISME DE RESTRICTION DES PRODUITS D'AMPLIFICATION

Les amorces P1 et P2 (segment S7) et P3 et P4 (segment S10) sont spécifiques du groupe AHSV. Il nous a semblé utile de disposer d'outils permettant d'identifier les variations génétiques des produits amplifiés. La RT-PCR fournissant rapidement une grande quantité de matériel, l'hydrolyse par les endonucléases de restriction des segments S7 s'avère constituer une méthode rapide d'étude du polymorphisme génétique des produits amplifiés.

L'analyse du polymorphisme de restriction des produits d'amplification des segments S7 à l'aide des huit enzymes a révélé des différences d'électrophorétiques pour un segment qui, lors d'études d'hybridation moléculaire (Bremer *et al.*, 1990), s'avèrait être conservé entre les sérotypes. Nous avons donc étudié ces variations pour un autre segment (S10), moins conservé entre les sérotypes.

Justification du choix de ces segments

Les segments L2 et M6 codent respectivement pour les protéines VP2 et VP5 qui possèdent des déterminants antigéniques spécifiques de type. Ces segments peuvent être de bons candidats pour une différenciation de type fondée sur le polymorphisme de restriction. Cependant, le degré de variation entre les segments L2 de différentes souches d'un même sérotype pourrait masquer les variations spécifiques de type. Sakamoto *et al.* (1994a) ont ainsi comparé les séquences des gènes L2 des souches virulentes et atténuées du virus équine sérotype 4. Ces auteurs ont observé 9% de différences sur la totalité de la séquence (de 3229 pb) en nucléotides. Les variations génétiques entre les souches d'un même sérotype pouvant être importantes, il semble nécessaire de choisir des séquences qui codent pour des protéines moins soumises aux pressions de sélection comme le sont VP7 (segment S7) et NS3 (segment S10).

2.1. Segment S7

Sur les huit enzymes sélectionnées, six (*Asn* I, *Hinf* I, *Hph* I, *Pvu* II, *Sph* I et *Cfo* I) permettent la mise en évidence de mutations entre les différents segments S7 par la création ou la disparition de leurs sites de restriction spécifiques (tableau XXVI).

Le profil de restriction de l'ADN complémentaire amplifié du segment S7 de la souche sauvage AHSV-4 E (Espagne) est identique au profil théorique attendu d'après la séquence en nucléotides déterminée par Roy *et al.* (1991). Les souches AHSV-4 SA (Afrique du sud) et M (Maroc) présentent des profils de restriction identiques à celui de la souche AHSV-4 E. Le profil global de la souche vaccinale AHSV-4 USDA diffère de ceux des autres souches de même sérotype par les quatre enzymes *Asn* I, *Hinf* I, *Hph* I et *Cfo* I.

Les ADN complémentaires des gènes S7 des virus des neuf sérotypes présentent un polymorphisme général. La comparaison des profils obtenus permet de regrouper les souches en fonction de l'identité ou de la diversité de leur profils.

Polymorphisme inter-sérotypique

Les sérotypes AHSV-3, -6 et -8 présentent des électrophorétiques similaires. Le profil du sérotype -1 ne diffère de ceux de ces trois sérotypes que par l'enzyme *Hph* I. Les sérotypes -2 et -5 ont des profils qui ne diffèrent que par le seul site de restriction de *Cfo* I. Les sérotypes -1 et -7 diffèrent par le site de restriction de l'enzyme *Asn* I. Les sérotypes AHSV-4, -7 et -9 présentent chacun des profils qui leur sont spécifiques et différents par au moins deux sites de restriction de ceux des autres sérotypes.

Polymorphisme intra-sérotypique

Les profils des différents souches analysées de sérotype -4 sont identiques pour les trois souches dont les origines géographiques sont l'Espagne (AHSV-4 E), le Maroc (AHSV-4 M) et la République d'Afrique du Sud (AHSV-4 SA). Cette conservation de profil intra-sérotypique 4 n'est pas retrouvée pour la souche vaccinale AHSV-4 USDA dont le profil diffère par quatre enzymes de ceux des autres souches. De même, les trois souches originaires du Sénégal, du Cameroun et de l'Afrique du sud (AHSV-9 S, C et SA) présentent des profils identiques. Le profil de la souche vaccinale AHSV-9 USDA diffère de ceux des trois autres souches par l'enzyme *Cfo* I. Ces deux souches AHSV-4 USDA et AHSV-9 USDA ont été atténuées par une centaine de passages sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés. Les souches AHSV-4 E, -4 M, -9 S et -9 C sont des souches sauvages alors que les souches AHSV-4 SA et AHSV-9 SA ont subi de nombreux passages en culture de cellules mais leur degré de pathogénicité résiduelle n'est pas connu. Les variations génétiques observées entre les deux souches AHSV-4 USDA et AHSV-9 USDA et les autres souches des sérotypes respectifs 4 et 9, pourraient être la conséquence de mutations causées par le grand nombre de passages sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés qu'elles ont subies pour obtenir l'atténuation de leur virulence. Cette hypothèse est surtout probable pour la souche AHSV-4 USDA dont le degré de variabilité

génétique, illustré par son polymorphisme de restriction au sein de son sérotype, est le plus important.

2.2. Segment S10

La spécificité du produit d'amplification obtenu à partir de la souche AHSV-3 USDA est vérifiée par comparaison avec les profils théoriques attendus (tableau XXIX) (Van Staden and Huismans, 1991). Le polymorphisme de restriction des ADN complémentaires des gènes S10 des souches des neuf sérotypes est plus important que pour le segment S7.

Polymorphisme inter-sérotypique

L'ADNc du segment S10 de chaque sérotype présente un électrophorètype qui lui est spécifique à l'exception, toutefois, des ADNc des virus de la peste équine de sérotypes (3 et 7) et (4 et 9). En effet, les profils des différents sérotypes diffèrent par au moins deux enzymes de restriction à l'exception des profils de AHSV-3 et -7 qui ne diffèrent que par l'enzyme *Hinf* I et de AHSV-4 et -9 dont certaines souches présentent, soit des profils identiques (AHSV-4 USDA et -9 USDA), soit différents par la seule enzyme *Sph* I (AHSV-4 SA, M et E et AHSV-9 USDA) (tableau XXIX). La variabilité nucléotidique du gène S10 qui code pour les protéines non structurales NS3 et NS3A, est plus élevée entre les sérotypes au sein du sérogroupe AHSV que celle des gènes S10 des virus des sérogroupe Bluetongue (Gould, 1988a) et Encéphalose Equine (Viljoen and Huismans, 1989). Aucune des six enzymes utilisées ne permet d'obtenir un profil identique pour tous les sérotypes du groupe AHSV.

Au sein de ce groupe, nos résultats sont en accord avec ceux de Bremer *et al.* (1990) qui ont montré que le seul sérotype hétérologue avec lequel le gène S10 de AHSV-3 hybridait, dans des conditions de forte stringence, était le gène S10 de AHSV-7.

Cette variabilité génétique, illustrée par le polymorphisme de restriction, a été décrite précédemment par Bremer *et al.* (1990) par l'utilisation de sondes moléculaires. Van Staden and Huismans (1991) ont montré que les variations des séquences en nucléotides correspondant à des régions hautement conservées en acides aminés entre les protéines NS3 de AHSV-3 et -9, seraient essentiellement causées par des mutations du troisième nucléotide de chaque codon. De Sa *et al.* (1994) ont récemment

confirmé cette variabilité génétique par comparaison des séquences nucléotidiques des gènes S10 des virus équineptiques des sérotypes 1, 3, 4, 8 et 9. Ces auteurs ont, par ailleurs, montré qu'il existait une forte similitude entre les gènes S10 de AHSV-4 et AHSV-9 dont certaines souches ont des profils de restriction similaires. La comparaison des profils de restriction des ADNc des gènes S7 permet cependant une différenciation des virus de ces deux sérotypes, le degré de variabilité génétique de ces segments étant plus important que ceux des segments S10.

Polymorphisme intra-sérotypique

La comparaison des profils de restriction des segments S10 des quatre souches de virus de sérotype 4 indique un fort degré de conservation entre ces isolats. En effet, les trois souches AHSV de sérotype 4 (M, E et SA) ont des profils de restriction identiques. Le profil de la souche AHSV-4 USDA ne diffère de ceux des trois autres souches que par une seule enzyme, *Sph I*.

De même, les profils des deux souches AHSV-9 SA et AHSV-9 S (Sénégal) sont identiques. Le profil de la souche AHSV-9 USDA ne diffère de ceux des deux autres souches que par une seule enzyme, *Hinf I*.

La centaine de passages sur cerveaux de souris nouveau-nés nécessaires à l'atténuation du pouvoir pathogène de ces deux souches AHSV-4 USDA et -9 USDA pourrait expliquer les variations génétiques, illustrées par leur polymorphisme de restriction, de ces souches au sein de leur sérotype respectif.

2.3. Intérêt du polymorphisme de restriction

L'étude des profils de restriction a permis de vérifier la spécificité des segments S7 amplifiés et de mettre à jour des variations génétiques inter-sérotypes. En effet, la comparaison simultanée des profils de restriction des fragments S7 et S10 permet la différenciation de chacun des sérotypes. Par exemple, les sérotypes -3, -6 et -8 dont les profils des segments S7 sont indifférenciables, présentent des variations génétiques spécifiques de type illustrées par le polymorphisme de restriction de leurs segments génomiques S10. De la même façon, les souches AHSV-4 USDA et AHSV-9 USDA qui présentent un profil de restriction identique de leurs fragments S10, sont différenciées par les profils du fragment génomique S7 (tableau XXXVI).

Tableau XXXVI : Synthèse du polymorphisme des profils de restriction des segments S7 et S10 des souches virales des neuf sérotypes.

Sérotypes présentant des profils S7 identiques ou voisins	Sérotypes présentant des profil S10 identiques ou voisins
-1, -7	-1
-3, -6, -8	-2
-2, -5	-3, -7
-4	-4, -9
-9	-5
	-6
	-8

Ainsi, tous les sérotypes dont les profils de restriction de l'un des deux gènes S7 ou S10 sont similaires, peuvent être différenciés entre eux par la comparaison des profils de l'autre segment.

Cependant, il serait nécessaire de disposer d'un plus grand nombre de souches de chacun des neuf sérotypes afin de confirmer une corrélation entre la diversité génétique mise en évidence par le polymorphisme de restriction (plus simple et plus rapide que le séquençage) et le sérotype mais aussi, de préciser l'importance des variations génétiques intra-sérotype.

En effet, le réassortiment éventuel de segments génomiques lors d'infection simultanée par deux virus de sérotypes différents (O'Hara *et al.*, 1995) et le fait que la spécificité de type soit essentiellement supportée par le segment L2 sont susceptibles de limiter l'intérêt du typage des virus par le polymorphisme de restriction. Cependant, aucune donnée n'a été publiée à l'heure actuelle, sur la possibilité de réassortiment de gènes *in vivo*.

Malheureusement, l'éloignement géographique des pays infectés et la rétention des souches par certains laboratoires rendent difficile leur obtention. De plus, leur importation doit faire l'objet d'autorisations spéciales qui pénalisent les échanges d'isolats de ce virus exotique.

En conclusion, l'étude des profils de restriction présente un grand intérêt pour le suivi épidémiologique des souches. Ce type de variation ne pouvant pas être détectée par des techniques sérologiques courantes telles que la séroneutralisation, la RT-PCR suivie de l'étude des polymorphismes de restriction s'avère être un outil intéressant pour le suivi génétique et épidémiologique des souches.

3. APPLICATION DE LA PCR A L'ETUDE DE LA VIREMIE CHEZ LES ANES ET LES MULETS

La RT-PCR s'étant avérée un outil particulièrement sensible et rapide pour la détection du génome viral dans le sang de chevaux infectés par le virus équine, nous avons utilisé cette méthode pour tenter de déterminer la durée moyenne de la virémie chez les ânes et les mulets dont le rôle dans l'épidémiologie de la maladie est sans doute important (Mellor, 1993).

3.1. Détection du virus ou de son génome

La RT-PCR a permis de détecter le génome viral dans les sangs d'ânes et de mulets infectés expérimentalement jusqu'au 55ème jour après l'infection (3 animaux sur 8). Les limites maximales de détection du génome dans le temps sont pour les cinq autres animaux de J45 à J51. Les résultats obtenus permettent de constater la détection du génome viral plus précocement chez le mulet que chez l'âne. En effet, la RT-PCR est positive à partir de J5 chez les mulets et seulement à partir de J11 chez les ânes. Cependant, le faible nombre d'animaux dans chacune des deux espèces impose de ne tirer aucune conclusion définitive. Aucun produit d'amplification spécifique ou non spécifique n'a pu être détecté à partir des échantillons témoins de sang de onze ânes non infectés par le virus de la peste équine. La détection du virus par isolement en cultures de cellules et par inoculation aux oeufs embryonnés s'est avérée négative pour les prélèvements testés (de J5 à J 13) pour les huit animaux. Cependant, ainsi que les résultats des sérologies l'attestent (Tableau XXIII), ces huit animaux ont bien été inoculés avec le virus équine.

L'absence de confirmation de la virémie après une épreuve virulente est surprenante mais plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Venter *et al.* (1992) ont inoculé douze ânes, répartis en trois groupes de quatre animaux, avec les virus des sérotypes AHSV-1, -3 et -5. La virémie s'est avérée de courte durée (durée maximale de huit jours), la détection du virus par isolement en culture de cellules intermittente et les titres du virus faibles (inférieurs à 10^2 DCP50/ ml). Les données relatives à la virémie chez les zèbres sont tout à fait similaires avec des titres viraux de l'ordre de $10^{0,5}$ DCP50/ml (Lubroth, 1992).

Les conditions de transport et de conservation des échantillons (du Maroc en Grande Bretagne et en France) ont peut être provoqué une chute des titres viraux. Cependant, le laboratoire de Biopharma (Rabat, Maroc), qui depuis 1989, a une solide expérience de l'isolement de ce virus, a bénéficié de prélèvements de bonne qualité mais n'a pas pu détecter le virus.

La recherche du virus dans le sang de ces huit animaux a été réalisée par l'isolement viral sur cultures de cellules et par l'ELISA d'immunocapture. Or, l'isolement du virus à partir de sang s'avère difficile notamment lorsque les titres viraux sont faibles (Laegreid, 1994). Le virus, présent sans doute en faible quantité, a pu être neutralisé par les anticorps et les complexes immuns ainsi formés n'ont pas pu être détectés par les techniques d'isolement classiques. De plus, l'utilisation de la technique ELISA pour la détection du virus équinestique dans le sang ne donne pas entière satisfaction à cause de son manque de sensibilité (Laegreid, 1994). En effet, une étude réalisée par Hamblin *et al.* (1992) sur des poneys infectés expérimentalement avec le virus de la peste équine a montré que l'ELISA ne détectait l'antigène AHSV que dans le sang de deux animaux infectés sur quatre. Par ailleurs, tous les échantillons de sang se sont avérés positifs par inoculation intracérébrale aux souriceaux nouveau-nés. Selon Du Plessis *et al.* (1990) et Hamblin *et al.* (1991b), un passage sur cultures de cellules est nécessaire pour augmenter la sensibilité de détection du virus équinestique dans le sang par la technique ELISA. Toutes ces données incitent à expliquer ces résultats par une insuffisance de sensibilité des techniques de l'isolement viral.

Un travail similaire sur la virémie du virus de la BT a été effectué par Mac Lachlan *et al.* (1994). Des veaux ont été inoculés expérimentalement avec 10^5 DCP50 (trois veaux) et 5×10^3 DCP50 (deux veaux) de virus de la BT sérotype 10 (deux veaux servirent de témoins). Le sang des animaux a été prélevé chaque semaine pendant 24 semaines. Le virus fut recherché par inoculation à des oeufs embryonnés ou à des insectes vecteurs (*Culicoides variipennis*) ou par détection de son génome par l'utilisation de la RT-PCR. Le virus de la BT a été détecté dans le sang par PCR jusqu'à la 20ème semaine, pendant deux à huit semaines par inoculation aux oeufs et pendant deux semaines par inoculation aux vecteurs. Ainsi, à partir des mêmes échantillons biologiques, la RT-PCR s'est avérée beaucoup plus sensible que les méthodes classiques d'isolement du virus.

3.2. Conséquences pathogéniques

Les données que nous avons obtenues (détection du génome viral dans le sang jusqu'au 55^{ème} jour après infection) sont en accord avec la pathogénèse de la peste équine mais aussi celle de la bluetongue. La virémie prolongée qui suivrait, chez les ânes et les mulets, l'infection par le virus équinestique, pourrait être la conséquence d'une fixation du virus aux hématies. Les hématies ainsi infectées sont ingérées par l'insecte vecteur qui, à son tour amplifie le virus et le transmet aux espèces sensibles (Mellor, 1993). La longue période (55 jours) pendant laquelle le génome viral est détectable dans le sang est inférieure à la durée de vie des hématies (120 jours). Cependant, chez les bovins, le génome du virus de la BT est détecté pendant une durée voisine de la durée moyenne de vie des globules rouges (Mac Lachlan *et al.*, 1994). Les ânes et les mulets ayant subi une deuxième épreuve virulente au jour 58, nous n'avons malheureusement pas pu continuer la détection du génome du virus équinestique après J57.

La différence considérable entre la durée pendant laquelle le virus de la BT est détecté par isolement du virus à des oeufs embryonnés (8 semaines) et la durée pendant laquelle le génome viral est détecté par RT-PCR (pendant 20 semaines) pourrait, selon Mac Lachlan *et al.* (1994), être expliquée par une réduction de la durée de vie des hématies à la surface desquelles le virus de la BT est fixé ou par une diminution du pouvoir infectieux des particules virales fixées sur les globules rouges. Brewer and Mac Lachlan (1992) ont montré que les particules virales sont présentes dans des invaginations de la membrane des hématies à l'abri du système immunitaire. De plus, les particules virales associées aux membranes des hématies ressemblent morphologiquement à des cores viraux (particules virales ne possédant pas les deux protéines de surface VP2 et VP5) qui sont peu infectieux pour les cellules de mammifères mais qui le sont pour les cellules d'insectes (Mac Lachlan *et al.*, 1994).

Wade Evans *et al.* (1995) ont montré que le sang d'ânes et de chevaux contenait des protéases capables de cliver la protéine VP2 du virus de la peste équine et que ce clivage augmentait le pouvoir infectieux des particules virales pour les cellules d'insectes. Ainsi, les données obtenues pour le virus de la BT sont susceptibles d'être extrapolées au virus équinestique.

Les résultats obtenus par RT-PCR à partir des prélèvements de sang des ânes et des mulets indiquent que le segment génomique S7 est présent

dans le sang jusqu'à J55 mais ces résultats ne nous permettent cependant pas de conclure à la présence de virus infectieux. Il serait nécessaire, à cette fin, d'inoculer les prélèvements de sang positifs par RT-PCR, à des souriceaux nouveau-nés, à des chevaux ou à des insectes vecteurs.

3.3. Conséquences épidémiologiques

En partant de l'hypothèse que le génome détecté provienne de particules virales intactes et infectieuses, les résultats que nous avons obtenus pourraient confirmer le rôle que jouerait l'âne dans la transmission de la maladie. En effet, au cours des dernières épizooties qui ont sévi en Espagne de 1987 à 1990, les asins ont été suspectés d'être impliqués dans la survie du virus pendant l'hiver (Rodriguez *et al.*, 1993). De même, les ânes et les mulets, fort nombreux au Maroc, sont susceptibles d'être responsables du maintien du virus équinestique dans ce pays de 1989 à 1991.

L'hypothèse que les ânes et les mulets puissent jouer le rôle de réservoir du virus entre les périodes épizootiques est-elle en accord avec l'histoire de ces épizooties ?

L'importation de zèbres infectés en provenance de Namibie est à l'origine des premiers foyers de peste équine dans la région de Madrid (Espagne) en septembre 1987 (Rodriguez *et al.*, 1993). En 1988, la maladie frappe le sud de l'Espagne et y perdure jusqu'en 1990. La survie de *Culicoides imicola* infectés pendant la période hivernale, selon Lubroth (1992), serait susceptible d'expliquer le maintien de la maladie de 1988 à 1990 dans le sud de l'Espagne où règne un climat hivernal très doux, mais en aucun cas le passage du virus de la région de Madrid vers le sud de l'Espagne en 1988. En effet, un climat hivernal plus rigoureux dans la région de Madrid ne permet pas aux insectes de survivre pendant l'hiver. En revanche, si les asins ont joué le rôle de réservoir du virus, il est possible de supposer que le virus ait été transmis à bas bruit d'âne à âne par l'intermédiaire des *Culicoides imicola* infectés et qu'à la suite de mouvement d'asins vers le sud de l'Espagne, ces animaux aient contaminé des *Culicoides* présents dans cette région pendant l'hiver. Un cycle ininterrompu, dans le sud de l'Espagne et du Portugal, se serait alors installé entre hôtes vertébrés et invertébrés. Comme l'attestent les résultats de capture d'insectes à partir des pièges, la population de *Culicoides imicola* augmente du mois de mai aux mois d'octobre et novembre (avec un pic en septembre)

puis diminue considérablement pendant les six mois suivants (Rawlings and Mellor, 1994). Or, en Andalousie, la maladie réapparut pendant le mois d'octobre 1988 puis éclata de façon spectaculaire, en 1989, en juillet, août et septembre, période d'activité maximale des insectes. En 1990, seule la région de Malaga a été touchée par l'épizootie qui est intervenue entre les mois de septembre et novembre. Mellor (1993) a montré que les *Culicoïdes imicola* étaient capables de survivre pendant la période hivernale au sud de l'Espagne et du Portugal. L'association de la présence des insectes vecteurs en hiver et d'une virémie persistante chez l'âne serait la cause du caractère enzootique de la maladie en Espagne. Par contre, l'épizootie qui a touché Madrid en 1987 s'est naturellement éteinte avec la disparition des *Culicoïdes imicola* en hiver. Si l'âne avait été seul en cause dans la survie du virus pendant l'hiver, la maladie aurait dû réapparaître l'année suivante (Mellor, 1993).

Au Maroc, l'étude des foyers de peste indique que leurs dates d'apparition coïncident avec la période de forte activité des *Culicoïdes imicola*. Le premier foyer est apparu en octobre 1989 dans la province de Tétouan puis, après la saison hivernale, la peste a éclaté, en s'étendant vers le sud du pays, du mois d'août au mois de décembre 1990 et en 1991, du mois de juillet au mois d'octobre 1991.

Dans l'hypothèse où la détection du segment génomique S7 dans le sang correspondrait à la présence du virus infectieux (ce qui reste à démontrer), l'âne et le mulet auraient, selon nos résultats, une durée de virémie d'environ 55 jours qui s'avère ainsi trois fois plus longue que la durée maximale connue de la virémie chez le cheval qui est de 18 jours (Mellor, 1993). Barnard *et al.* (1994) a d'ailleurs rapporté que la durée de la virémie chez le zèbre pourrait dépasser les 27 jours classiquement décrits et serait de 40 jours. Ces données étayaient l'hypothèse que les ânes et les mulets, dont la sensibilité au virus équine est beaucoup plus proche de celle du zèbre que de celle du cheval, pourraient jouer le rôle de réservoir du virus pendant la saison de non activité des insectes vecteurs, rôle que joue le zèbre en Afrique du sud ainsi que cela a été décrit par Barnard *et al.* (1994) dans le parc national Kruger (Afrique du sud).

Sellers and Mellor (1993) ont étudié les conditions climatiques et la répartition des populations d'insectes vecteurs au cours de différentes épizooties de bluetongue (en 1979-1980 en Turquie), de peste équine en Espagne (1987-1990) et de maladie hémorragique des cervidés en Colombie britannique (en 1987-1988). Les conditions nécessaires qui, selon

ces auteurs, permettent aux *Culicoides* de demeurer actifs pendant la saison hivernale sont les suivantes : la moyenne journalière des températures maximales correspondant aux mois les plus froids doit être supérieure à 12,5 °C et un total de 40 jours ou moins avec des températures maximales inférieures à 13°C sont nécessaires. Ces conditions sont réunies dans le sud de l'Espagne et au Maroc. Ainsi, l'association entre une longue durée de virémie chez des équidés et la capacité de survie d'une population d'insectes vecteurs pendant la saison froide serait susceptible d'expliquer la persistance de la peste équine dans la péninsule ibérique et au Maroc en dépit des mesures de prophylaxie employées.

Nous pouvons, dans l'hypothèse où les échantillons de sang d'ânes et de mulets, dans lesquels le génome viral est détecté pendant 55 jours, restent toujours infectieux, proposer le modèle épidémiologique suivant :

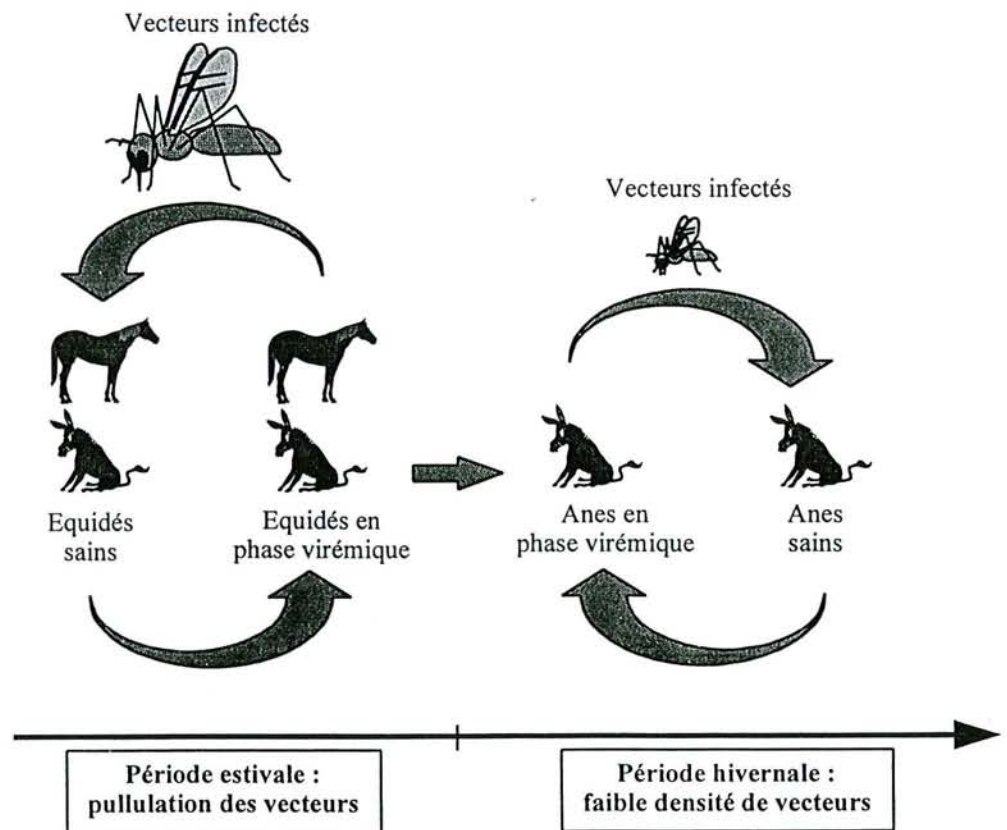


Fig. n° 32 : Hypothèse d'un modèle épidémiologique de transmission de la peste équine.

La persistance d'une faible population de moucheron (*Culicoïdes imicola, obsoletus, pulicaris, variipennis...*, tous susceptibles de transmettre la peste équine) pendant l'hiver combinée à la présence d'animaux virémiques permettrait au virus de continuer à circuler pendant les périodes froides. Le cheval pourrait être infecté en hiver, mais aurait peu de chance de transmettre le virus à cause de sa courte période de virémie.

4. DETERMINATION ET ANALYSE DE LA SEQUENCE DU GENE S10 DU VIRUS DE LA PESTE EQUINE

Alors que les protéines NS3/NS3A codées par le gène S10 du virus de la peste équine s'avèrent conservées entre les neuf sérotypes (Van Staden and Huisman, 1991), les gènes S10 semblent moins conservés comme le confirment les résultats des études d'hybridation moléculaire (Bremer *et al.*, 1990) dans lesquelles le gène S10 du virus sérotype 3 ne s'hybridait qu'avec lui-même et avec le gène homologue du sérotype 7.

La comparaison des séquences en nucléotides des gènes S10 devraient permettre de préciser le degré de variation (qualifié de surprenant par De Sa *et al.* (1994)) de ces segments géniques entre les sérotypes du virus de la peste équine mais aussi au sein d'un même sérotype. Quand nous avons débuté ce travail, seule les séquences des gènes des virus de sérotype 3 et 9 (Van Staden and Huisman, 1991) avaient été déterminées. Nous avons donc initialement choisi de déterminer la séquence en nucléotides du segment S10 d'un virus de sérotype 4 (sérotype responsable des épizooties espagnoles, portugaises et marocaines) et notamment de la seule souche vaccinale (AHSV-4 USDA) dont nous disposons. Par la suite, nous avons pu obtenir l'isolat sauvage, nommé AHSV-4 M 90 (virus isolé au Maroc en 1990) dont nous avons aussi déterminé la séquence du gène S10. De Sa *et al.* (1994) ont publié, pendant l'été 1994, les séquences des gènes S10 des virus équinestiques 1, 4 et 8.

4.1. Analyse des séquences en nucléotides et en acides aminés

4.1.1. Analyse des séquences en nucléotides

La composition en bases des deux séquences des gènes S10 de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M 90 sont similaires. Les tailles des deux segments ne diffèrent que de six nucléotides (747 nucléotides pour AHSV-4 M et 753 nucléotides pour AHSV-4 USDA).

a) Recherche des cadres ouverts de lecture

A l'aide du programme "TRANSLAT" de PC/GENE, deux cadres de lecture ouverts ont été mis en évidence dans chacune des deux séquences. Pour la séquence de AHSV-4 USDA, les codons d'initiation de la traduction des deux cadres de lecture (ORF1 et ORF2) sont respectivement situés aux positions 20-22 et 53-55 dans la phase de lecture 2 et le codon stop, commun aux deux cadres de lecture, est situé entre les positions 671-673. Ces cadres codent pour deux protéines de 217 et 206 acides aminés. Pour la séquence de AHSV-4 M 90, les deux cadres débutent aux positions 19-21 52-54 dans la phase de lecture 1 et s'achèvent au codon stop localisé aux positions 670-672. Ils codent, de même, pour deux protéines constituées respectivement de 217 et 206 acides aminés.

En fait, pour les deux séquences, plusieurs cadres de lecture de plus de 200 pb dans les phases de lecture 2 et 3 (pour AHSV-4 USDA) ou 1 et 2 (AHSV-4 M 90) sont mis en évidence (annexe 1) et, au sein de chaque cadre, plusieurs méthionines sont susceptibles d'initier la traduction. Cependant, les études de traduction *in vitro* du segment S10 du virus de la BT sérotype 1 indiquent qu'il code pour deux protéines dont l'une serait la forme tronquée de l'autre (Mertens *et al.*, 1984 ; Roy, 1989). Les masses molaires des deux protéines (25 et 24 kDa) correspondent à celles des protéines déduites à partir des deux premiers codons d'initiation de la traduction situés aux positions 20-22 et 59-61 de la séquence du gène S10 de BTV sérotype 1 (Gould, 1988a). Ces deux codons ne sont pas dans un environnement optimal défini selon les critères de Kozak (1981, 1984) qui exigent une purine en position -3 et une guanine G en +4 (la séquence consensus de Kozak est GCC(A/G)CCATGG). Wu *et al.* (1992), en exprimant NS3 et NS3A à partir de deux plasmides recombinants dans

lesquels le gène S10 comprenant les deux premiers ATG ou délété du premier ATG (l'insert débute trois nucléotides avant le deuxième ATG) a été cloné, ont montré que ces deux protéines étaient bien exprimées chacune à partir de ces deux codons d'initiation. Les contextes peu favorables de ces deux ATG sont susceptibles d'expliquer le faible rendement de l'expression de ces protéines.

En ce qui concerne le virus de la peste équine, les segments S10 de AHSV-1, -3, -4, -8 et -9 (Van Staden and Huismans, 1991 ; De Sa *et al.*, 1994) présentent tous deux codons d'initiation de la traduction dont les contextes sont peu favorables (tableau XXXVII). Les séquences nucléotidiques qui encadrent le premier ATG sont identiques pour les huit séquences actuellement connues (...CTTGTCATGA...). L'environnement du deuxième codon est plus variable entre les séquences mais, comme l'ATG initial, s'avère peu conforme à la séquence consensus de Kozak.

Ainsi, bien que les deux premiers ATG de chacune des huit séquences des gènes S10 des souches du virus de la peste équine ne soient pas dans un contexte tout à fait conforme aux critères de Kozak (1981, 1984), les résultats des études d'expression des protéines codées par le gène homologue S10 du virus de la BT (Wu *et al.*, 1992), la similarité entre les masses molaires des protéines obtenues *in vitro* et celles des produits d'expression prédits (Grubman and Lewis, 1992) et la position favorable pour l'initiation de la traduction de ces ATG en position terminale 5' (Kozak, 1991), constituent les principaux arguments qui autorisent à considérer ces deux ATG comme initiateurs de la traduction des protéines NS3 et NS3A.

Tableau XXXVII : Environnements du premier et du deuxième ATG des séquences connues des segments S10 des virus de la peste équine.

virus	contexte du premier codon ATG	contexte du deuxième codon ATG
AHSV-4 USDA	-3 +4 CTTGTCATGA	-3 +4 TATAGTATGC
AHSV-4 M 90	CTTGTCATGA	TATAGCATGC
AHSV-4 E	CTTGTCATGA	TATAGCATGC
AHSV-1	CTTGTCATGA	AGCTATATGT
AHSV-3	CTTGTCATGA	TATATGATGC
AHSV-4 SA	CTTGTCATGA	TATAGTATGC
AHSV-8	CTTGTCATGA	AGCTATATGT
AHSV-9	CTTGTCATGA	TATAGTATGC

b) Comparaison des séquences en nucléotides de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M avec celle des autres virus équinestiques

Nous avons comparé les séquences en nucléotides des gènes S10 des souches AHSV-4 USDA et -4 Maroc 90 avec les six séquences connues des virus équinestiques -1, -3, -4 Espagne, -4 "South Africa", -8 et -9 et celle du virus de la BT sérotype1.

Les deux séquences AHSV-4 USDA et AHSV-4 M présentent une forte divergence avec la séquence de BTV-1 (respectivement 42,9 et 47,2 %) (tableau XXXVIII). Cette faible similitude est aussi observée pour les six autres séquences de virus équinestique dont les similitudes avec la séquence du segment S10 de BTV-1 varient de 56,1 % (AHSV-3 et AHSV-4 SA) à 62,8 % (AHSV-4 E)(tableau XXXII).

Tableau XXXVIII : Pourcentage de divergence en nucléotides entre les séquences complètes (a) et les régions codantes (b) des gènes S10 des virus de la peste équine et du virus de la BT sérotype 1.

AHSV	1	3	4 USDA	4 M 90	4 SA	4 E	8	9	BTV-1
AHSV-4 USDA	30,8^a 32,6^b	23,8 25,2	-	5,4 6	7,6 8,1	6,3 6,3	29,9 31,7	5,4 5,7	42,9
AHSV-4 M	29,5 31,2	23,7 24,5	5,4 6	-	7,8 8,4	0,7 0,6	29,2 30,4	4,5 4,6	47,2
AHSV-4 SA	30,6 32,7	23,3 24,8	7,6 8,1	7,8 8,4	-	8,7 8,6	29,9 32,6	8 8,4	43,9
AHSV-4 E	32,1 31,3	24,4 24,6	6,3 6,3	0,7 0,6	8,7 8,6	-	31,2 30,6	4,8 4,6	37,2

Les pourcentages de similitude en nucléotides entre les séquences de virus de différents sérotypes au sein du groupe AHSV varient de 67,9 % pour le plus faible (entre AHSV-1 et AHSV-4 USDA) à 97,9 % entre AHSV-1 et AHSV-8 (tableau XXXII). Ces degrés de similitude confortent ainsi l'hypothèse d'un niveau de conservation de la séquence en nucléotides du segment S10 au sein du sérotype AHSV. Ces résultats sont en accord avec ceux de Van Staden and Huismans (1991) et de De Sa *et al.* (1994) qui rapportent que les variations de séquences des segments S10, bien que plus importantes entre les sérotypes du groupe AHSV qu'entre les segments homologues des sérotypes au sein des groupes BTV, EEV ("Equine

Encephalosis Virus") et Palyam, sont significatives entre les quatre groupes d'*Orbivirus* AHSV, EEV, BTV et Palyam.

Les extrémités terminales non codantes 5' et 3' ont des longueurs respectives de 18 (pour AHSV-4 USDA et AHSV-4 M) et 80 nucléotides (pour AHSV-4 USDA) et 75 (AHSV-4 M). Les longueurs de ces régions non codantes sont du même ordre de grandeur que celles des autres séquences des autres virus équinestiques (88 bases à l'extrémité 3' non codante pour AHSV-3 et -4, 91 pour AHSV-1 et -8). Le pourcentage d'identité entre les 66 premiers nucléotides des extrémités terminales 3' non codantes (fig. n° 30) des virus équinestiques -1, -3, -4 USDA, -4 M, -4 SA, -8 et -9 est de 60 %. Selon Gould (1988a), ces longues extrémités terminales 3' conservées pourraient comporter des sites de fixation de protéines impliquées dans la réplication et/ou dans le processus d'encapsidation.

Comparaison des séquences des segments S10 entre les sérotypes

Les deux séquences AHSV-4 USDA et AHSV-4 M présentent des pourcentages de divergence similaires avec les séquences connues des virus des sérotypes -1 (respectivement 30,8 et 29,5 %), -3 (23,8 et 27,7 %), -8 (29,9 et 29,2 %) et -9 (5,4 et 4,5 %)(tableau XXXVIII). Ces pourcentages de divergence sont d'ailleurs voisins de ceux observés entre les séquences des segments S10 des souches AHSV-4 SA et AHSV-4 E et celles des mêmes virus équinestiques de sérotypes -1 (30,6 et 32,1 % de divergence avec respectivement AHSV-4 SA et AHSV-4 E), -3 (23,3 et 24,4 %), -8 (29,9 et 31,2 %) et -9 (8 et 4,8 %). Les quatre séquences des segments S10 des souches de sérotype 4 (AHSV-4 USDA, AHSV-4 M, AHSV-4 SA et AHSV-4 E) présentent des pourcentages de divergence faibles avec la séquence du virus de sérotype 9 (respectivement 5,4 %, 4,5 %, 8 % et 4,8 %). Ces données confirment les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude du polymorphisme de restriction des ADNc des segments S10. En effet, les électrophorétiques des ADNc des gènes des virus de la peste équine sérotypes 4 et 9 se sont avérés identiques ou, pour certaines souches, très proches. Par contre, les virus équinestiques -1 USDA et -8 USDA présentent des électrophorétiques différents par deux enzymes (*Hph I* et *Cfo I*) alors que les séquences des segments S10 des souches séquencées sont proches (97,9 %). Leurs séquences nucléotidiques sont les seules à présenter une insertion de huit nucléotides et une délétion de trois nucléotides. Cependant, les souches vaccinales AHSV-1 USDA et AHSV-8 USDA ont subi une

centaine de passages sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés. Des mutations ponctuelles des séquences des sites de restriction de ces deux enzymes et/ou les variations génétiques induites par l'atténuation du pouvoir virulent de ces deux souches peuvent expliquer cette faible corrélation entre le polymorphisme de restriction (témoin imparfait de parenté génétique) et la similitude des séquences nucléotidiques des segments S10 de ces deux souches.

Les divers degrés de similitude entre les séquences des gènes S10 des virus de différents sérotypes (similitude forte entre AHSV-4 et -9, faible entre AHSV-4 et -1 par exemple) (tableau XXXII), permettent de regrouper les sérotypes de la façon suivante : a) AHSV-1 et -8, b) AHSV-4 et -9, c) AHSV-3. Ainsi, les pourcentages de divergence de la séquence du segment S10 entre AHSV et BTV (tableau XXXVIII) mais aussi EEV, EHDV et Palyam (Van Staden and Huismans, 1991) d'une part et entre les sérotypes au sein du séro groupe AHSV d'autre part, permettent de suggérer que les *Orbivirus* AHSV, BTV, EHDV, EEV et Palyam dérivent d'un ancêtre commun. L'analyse phylogénétique effectuée par la comparaison des séquences nucléotidiques des segments L2, M5 et M6 qui codent pour les protéines de capsid externe, permet d'évoquer cette notion d'une origine commune (Iwata *et al.*, 1992b) pour des virus dont les hôtes vertébrés et invertébrés, les mécanismes pathogéniques des maladies qu'ils provoquent et les modes de transmission sont similaires. Cependant, les protéines structurales VP2 et VP5 et donc les séquences en nucléotides des gènes qui les codent, ont évolué en fonction des hôtes qu'ils infectent mais aussi sous l'influence de la pression de sélection des systèmes immunitaires de ces hôtes. Ainsi, au sein d'un même séro groupe, les variations génétiques de ces segments entre les différents sérotypes ne permettent pas d'évaluer avec précision le degré d'évolution des virus entre eux. La comparaison des séquences en nucléotides des segments qui codent pour des protéines moins soumises de par leurs fonctions, aux influences des systèmes de protection directe de l'hôte (comme les protéines non structurales NS3/NS3A), permet de mieux cerner l'histoire de l'évolution génétique des virus entre les séro groupes et au sein d'un même séro groupe.

La comparaison des séquences en nucléotides du segment L3 (qui code pour la protéine majeure du core, VP3) des virus des groupes AHSV, BTV, EEV et Palyam (Gould *et al.*, 1992 ; Iwata *et al.*, 1992a) confirme l'hypothèse d'une origine commune de ces virus qui ont ensuite évolué au sein de leur séro groupe.

Au sein du groupe AHSV, la comparaison des séquences des régions codantes des segments S10 des virus équineptiques -4 USDA et -4 M 90 avec celles des autres souches aboutit au dendrogramme suivant :

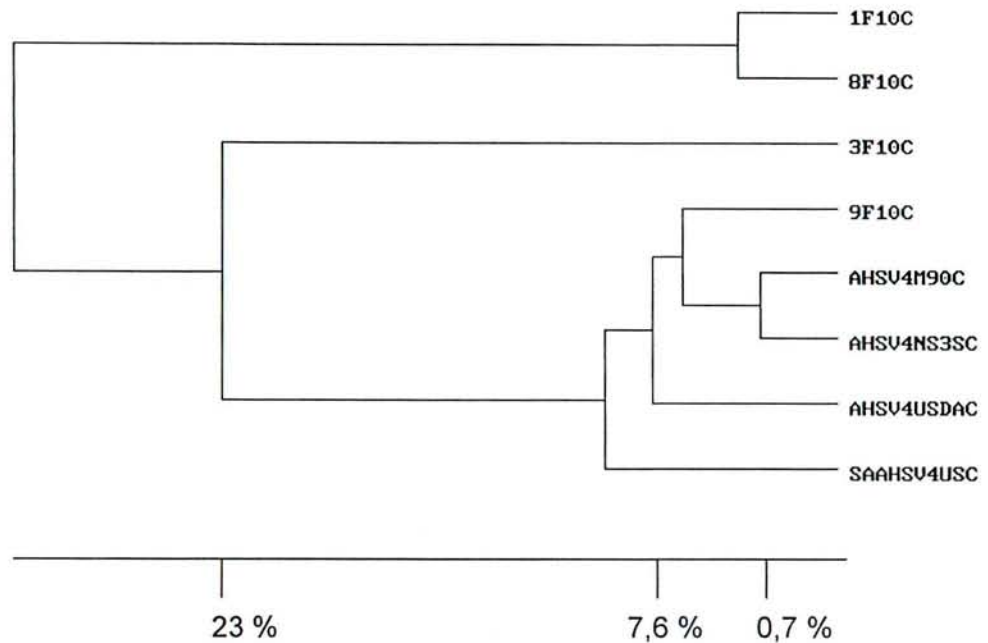


Fig. n° 33 : Dendrogramme résultant de l'alignement multiple des séquences en nucléotides des régions codantes des gènes S10 de AHSV-1, -3, -4 USDA, -4 SA, -4 M 90, -4 E, -8 et -9.

Les trois groupes aisément identifiables AHSV(-1 et -8), AHSV(-4 et -9) et AHSV-3, ont pu évoluer à partir d'un virus commun. A la notion de sérotype, fondée sur les propriétés antigéniques de la protéine VP2 et sur laquelle repose la division du sérotype AHSV, peut être ajouté le concept de génotype fondé, cette fois, sur la similitude des séquences de régions conservées du génome viral. Les études récentes de O'Hara *et al.* (1995) ont montré que, *in vitro*, les virus de sérotypes -3 et -8 étaient capables d'échanger leurs segments génomiques et notamment, leurs segments S10. Ainsi, il est possible de suggérer que les virus dont les séquences des segments S10 sont proches (AHSV-1 et -8) et (AHSV-4 et -9) possèdent des segments S10 communs et des segments L2 (qui contrôlent la spécificité de la réaction de neutralisation par des anticorps) spécifiques. La diversité du matériel génétique des *Orbivirus* pourrait être expliquée par ces échanges génomiques dont la fréquence, *in vivo*, n'est pas connue.

c) Comparaison des séquences des segments S10 des souches de sérotype 4

Afin de préciser le degré de conservation des séquences en nucléotides des segments S10 au sein d'un même sérotype et d'un même génotype, nous avons choisi deux souches de sérotype 4, l'une vaccinale (AHSV-4 USDA), l'autre virulente (AHSV-4 Maroc). Deux séquences de deux autres souches ont été déterminées récemment : AHSV- Espagne et AHSV-4 Afrique du sud (De Sa *et al.*, 1994).

Les pourcentages de divergence entre les séquences varient de 8,7 % pour les séquences les moins conservées (entre AHSV-4 E et AHSV-4 SA) à 0,7 % pour les plus conservées (AHSV-4 M et AHSV-4 E)(tableau XXXVIII). La séquence AHSV-4 M présente 99,3 % (tableau XXXII) de similitude avec la souche AHSV-4 E. Bien que la séquence des seuls segments S10 ne permette évidemment pas de conclure quant à l'identité de l'ensemble du génome entre ces deux souches, cette similitude peut sans doute être interprétée comme témoignant d'une forte parenté antigénique entre ces deux souches. En fait, la peste équine, apparue en 1987 en Espagne, a frappé le Maroc en 1989. Les données épidémiologiques et l'évolution de l'épizootie permettent de suggérer que le virus marocain est le même que le virus espagnol (Mellor, 1993). Le fort degré de conservation entre les séquences des segments S10 des deux souches (les pourcentages de divergence ne sont que de 0,7 % sur l'ensemble des segments et de 0,6 % pour les régions codantes) confirme cette hypothèse. L'identité des deux séquences des souches AHSV-4 E et AHSV-4 M traduit la stabilité génétique du segment S10 du virus équine pendant trois ans (de 1987, année d'isolement du virus équine -4 E à 1990, année d'isolement de AHSV-4 Maroc).

En ce qui concerne la séquence de la souche AHSV-4 USDA, le pourcentage de divergence avec celle de la souche AHSV-4 SA est de 7,6 % pour l'ensemble du segment S10 et de 8,1 % entre les régions codantes (tableau XXXII). Ce pourcentage élevé s'avère surprenant car les deux clones AHSV-4 USDA et AHSV-4 SA proviennent, sans doute, de la même souche. L'équipe de De Sa *et al.* (1994) a obtenu cette souche AHSV-4 SA des Dr. James et Carol House ("Foreign Animal Disease Center, USDA, New York) qui l'ont eux-mêmes reçue en 1968 du laboratoire d'Onderstepoort (Afrique du sud) où elle avait subi quelques passages sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés puis de nombreux passages en

cultures de cellules. Or, la souche vaccinale AHSV-4 USDA dont nous disposons nous a été fournie par les Dr. James et Carol House qui nous ont précisé l'avoir reçue du Dr. Erasmus (laboratoire d'Onderstepoort). Cette souche a été isolée en 1968 et a été atténuée par une centaine de passages sur cerveaux de souriceaux nouveau-nés. Ainsi, l'histoire de ces deux souches et, surtout, la rareté des souches de virus équine disponibles, nous incitent à considérer que ces deux clones sont issus de la même souche isolée en Afrique du sud en 1968. L'origine de la divergence entre ces deux séquences pourrait être due, soit à l'atténuation du virus sur souriceaux nouveau-nés (AHSV-4 USDA), soit à l'adaptation du virus à un système cellulaire, soit à la différence du nombre de passages en cultures de cellules. L'analyse des quarante-huit substitutions nucléotidiques entre les séquences des régions codantes de AHSV-4 USDA et AHSV-4 SA indique que 73 % d'entre elles portent sur le troisième nucléotide des codons mutés et peuvent n'avoir aucun effet sur la séquence primaire en acides aminés des produits d'expression de ces gènes.

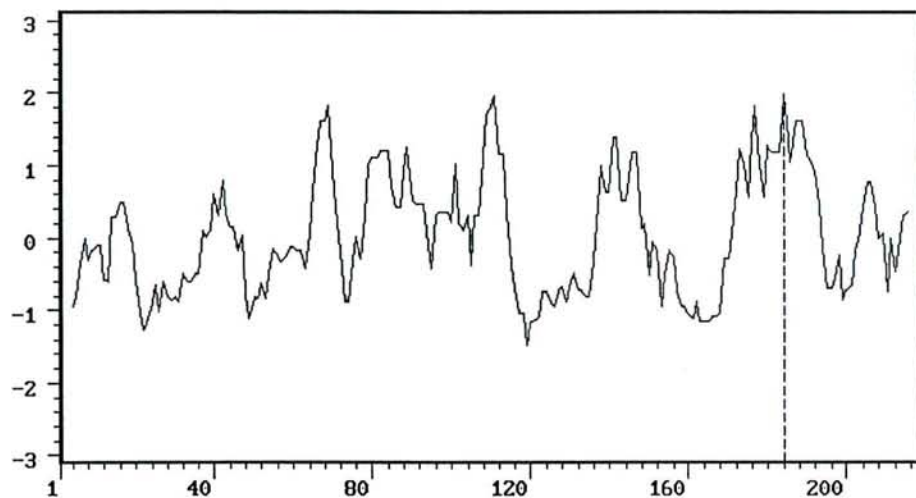
Nous avons répertorié onze substitutions communes aux séquences des régions codantes de AHSV-4 USDA et AHSV-4 SA dans les régions codantes par rapport aux séquences homologues des souches sauvages AHSV-4 E et AHSV-4 M. Il est possible que les pourcentages de substitution nucléotidiques des régions codantes des segments S10 des souches atténuées par rapport aux séquences des souches sauvages (de l'ordre de 6 % pour AHSV-4 USDA par rapport aux séquences des souches sauvages AHSV-4 M et AHSV-4 E et de l'ordre de 8,5 % pour AHSV-4 SA) puissent être corrélés à l'atténuation du pouvoir virulent des souches virales. O'Hara *et al.* (1995) ont en effet, montré que, chez la souris, le segment S10 serait impliqué (seul ou associé aux segments 2, 5 et 6) dans le déterminisme du pouvoir neurovirulent des souches virales AHSV-3 et AHSV-8. L'échange entre les deux souches AHSV-3 (virulente pour la souris) et AHSV-8 (avirulente) du seul segment S10 est suffisant pour qu'un virus réassortant obtenu (ayant les neuf segments L1 à S8 issus du parent avirulent et le segment S10 originaire du parent avirulent), présente un phénotype virulent dans le modèle "souris". De même, Laegreid *et al.* (1995) ont montré, cette fois chez le cheval, que le segment S10 était un déterminant majeur dans la virulence. L'étude des séquences en acides aminés des protéines codées par ces segments est indispensable pour corréliser une variation génétique à un éventuel effet biologique.

4.1.2. Analyse et comparaison des séquences en acides aminés

a) Analyse des séquences en acides aminés

Les séquences en acides aminés déduits des séquences nucléotidiques des gènes de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M sont constituées de 217 acides aminés. La similitude de leurs séquences primaires en acides aminés (94,5 %)(tableau XXXII) confère aux prédictions de leurs structures secondaires une forte identité.

Les profils d'hydrophobicité et d'hydrophilicité des deux protéines sont identiques (fig. n° 34 et n° 35).



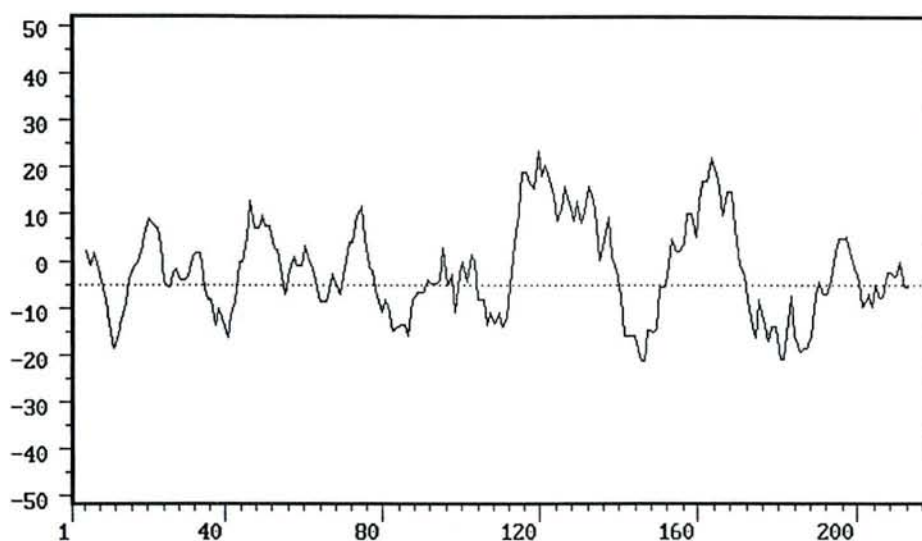
Hydrophilicity profile of protein sequence AHSV4M90.
Computed using an average group length of 6 amino acids.

Fig. n° 34 : Profil d'hydrophilicité de la séquence primaire en acides aminés de la protéine NS3 de AHSV-4 Maroc (réalisée avec le programme ANTIGENE du logiciel PC/GENE).

La région de plus grande hydrophilicité est indiquée par la ligne pointillée. Le profil d'hydrophilicité de la séquence de AHSV-4 USDA est identique.

Trois régions hydrophiles sont identifiées entre les acides aminés 80-100, 138-149 et 171-191 (fig. n° 34) et ont des structures secondaires prédites en hélice α (fig. n° 36). L'analyse effectuée avec le programme PEPTIDESTRUCTURE (logiciel UWGC de l'Université du Wisconsin - "Genetics Computer Group" -) indique que ces trois régions hydrophiles

pourraient correspondre à des sites antigéniques notamment les régions 138-139 et 171-191.



Hydrophobic index of AHSV4M90 from amino acid 1 to amino acid 217.
Computed using an interval of 9 amino acids. (GRAVY = -1.92).

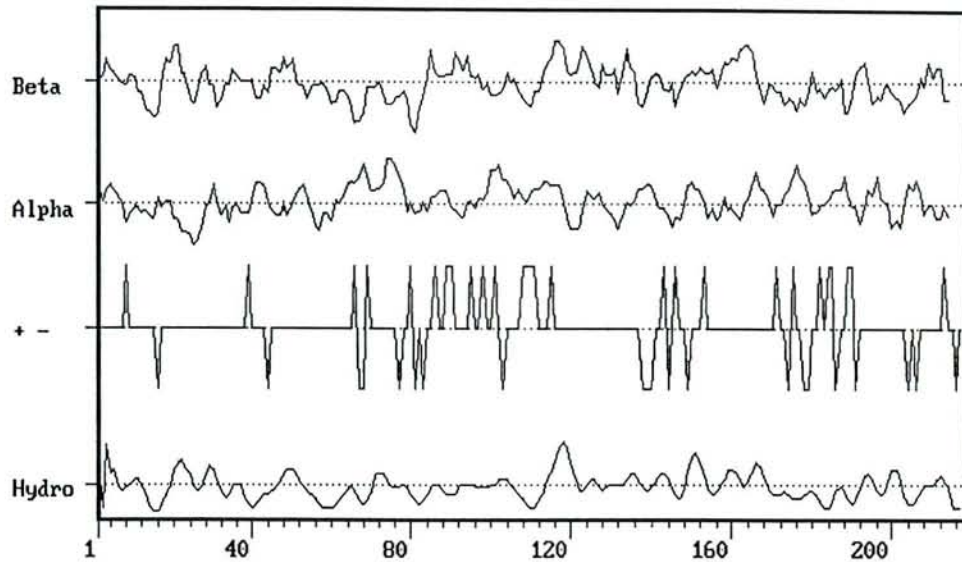
Fig. n° 35 : Profil d'hydrophobicité de la séquence primaire en acides aminés de la protéine NS3 de AHSV-4 Maroc (réalisée avec le programme SOAP de PC/GENE).

Le profil obtenu pour la protéine NS3 de AHSV-4 USDA est similaire.

Les protéines NS3 de AHSV-4 USDA et AHSV-4 Maroc s'avèrent très hydrophobes sur la majorité de leur longueur (41 % de leurs acides aminés sont hydrophobes). L'analyse de ces séquences à l'aide du programme SOAP indique que NS3 est une protéine membranaire intégrée.

Trois régions hydrophobes sont identifiées entre les acides aminés 112-137, 155-170 et 192-203. Le premier et le deuxième domaine hydrophobe ont des structures secondaires prédites en hélice α (fig. n° 36) et pourraient correspondre à des domaines transmembranaires. Une région de sept acides aminés (de 1 à 7) est prédite à l'extrémité N-terminale (fig. n° 35).

Deux sites de N-glycosylation sont prédits aux position 9-11 et 57-59 pour AHSV-4 USDA (fig. n° 29).



Plot of secondary structure curves for sequence AHSV4M90.
From position 1 to 217.

Fig. n° 36 : Prédiction de la structure secondaire de NS3 de AHSV-4 Maroc à l'aide du programme NOVOTNY de PC/GENE.

La prédiction obtenue pour la séquence primaire de AHSV-4 USDA est identique.

A l'extrémité terminale, une séquence de 14 acides aminés hydrophobes et polaires (de 157 à 170) est suivie d'une courte séquence d'acides aminés hydrophiles. Cette structure en hélice α est hydrophobe, rompue par une lysine (171) et pourrait correspondre à la séquence d'un peptide signal. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse de la séquence effectuée avec le programme PSIGNAL. Les protéines NS3 seraient des glycoprotéines de classe II, globulaires, hydrophobes sur la majorité de leur longueur.

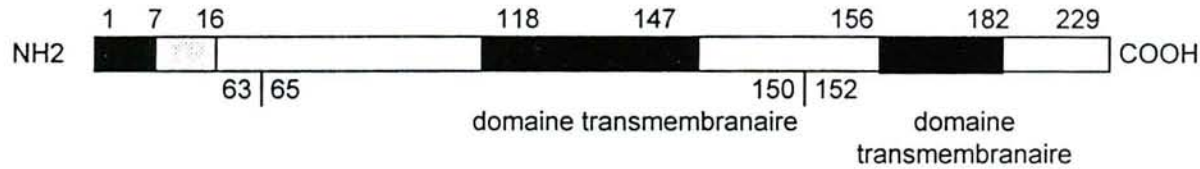
Ainsi, ce peptide signal, permettrait l'insertion de NS3 dans la membrane du réticulum endoplasmique. Le peptide signal serait ensuite clivé au niveau de la région hydrophile par une signalase cellulaire présente dans la lumière du réticulum endoplasmique (Wu *et al.*, 1992). La séquence primaire de l'extrémité N-terminale de la protéine NS3 mature n'est actuellement pas connue. Cependant, si le polypeptide est clivé au niveau de l'acide aminé 170, la masse molaire déduite du polypeptide obtenu (18 kDa) ne correspond pas aux masses molaires des produits d'expression du segment S10 synthétisés *in vitro* (24 kDa pour NS3 et 23 kDa pour NS3A) (Van Staden and Huismans, 1991). Les masses molaires déduites des séquences primaires complètes des protéines NS3 de AHSV-4 Maroc et AHSV-4 USDA sont respectivement de 23 693 Da et 23 506 Da. Or, Wu *et*

al. (1992) ont montré que les protéines glycosylées NS3 et NS3A du virus de la BT sérotype 10, de masses molaires respectives de 29 et 30 kDa, avaient des masses molaires de 26 et 24 kDa sous formes non glycosylées après digestion par l'endoglycosidase F (qui clive les chaînes polyosidiques des glycoprotéines). Les masses molaires des protéines non glycosylées sont identiques aux masses molaires prédites à partir de la séquence complète du gène S10 de BTV-10. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que le peptide signal potentiel n'est pas clivé après ancrage de la protéine dans la membrane du réticulum endoplasmique. La protéine NS28 (homologue des protéines NS3 de AHSV et BTV) codée par le segment S10 du rotavirus (rotavirus simien SA11) contient dans sa séquence primaire un peptide signal potentiel dont Both *et al.* (1983) ont montré qu'il n'était pas clivé lors de la translocation du polypeptide à travers la membrane du réticulum endoplasmique rugueux. De même, la protéine p62 du virus Sindbis (du genre *Alphavirus*) est insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique mais le peptide signal n'est pas clivé. La région N-terminale est dans la lumière du réticulum, la région C-terminale dans le compartiment cytoplasmique (Bonatti and Blobel, 1979). La similitude de structure entre les protéines NS3 de BTV, NS28 du rotavirus et NS3 de AHSV est résumée sur la figure n° 37.

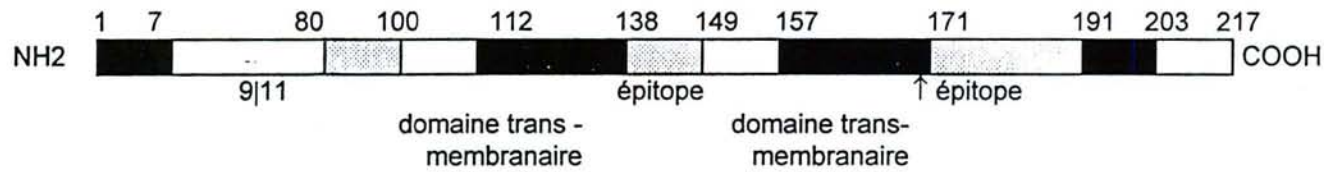
Les deux domaines hydrophobes transmembranaires de NS3 de BTV sont sensiblement situés aux mêmes positions que ceux des domaines de NS3 de AHSV-4 (118-147 et 156-182 pour BTV et 112-137 et 157-170 pour AHSV).

L'absence de clivage du peptide signal peut aussi être proposé pour la protéine NS3 du virus de la peste équine. Ses deux principales régions hydrophobes (localisées aux mêmes positions que celles de la protéine NS3 de BTV (Roy, 1992a)) lui permettent un ancrage membranaire.

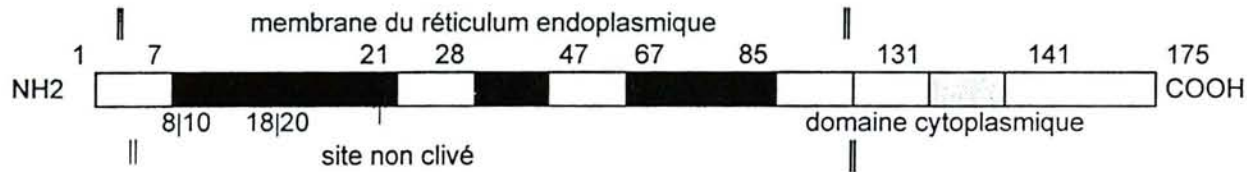
BTV-10



AHSV-4 Maroc



NS28



□ région hydrophile.

■ région hydrophobe.

↑ Site de clivage potentiel par une signalase cellulaire (peptide signal).

| Site de glycosylation.

Fig. n° 37 : Représentation schématique de la structure et des propriétés antigéniques comparées des protéines NS3 du virus BTV-10, NS28 du rotavirus (SA11)(d'après Estes, 1990) et de la protéine NS3 du virus de la peste équine sérotype 4 (souche Maroc 1990).

b) Comparaison des séquences en acides aminés de la protéine NS3 des virus équinepestiques et de la BT

Les pourcentages de similitude entre la séquence en acides aminés de NS3 de AHSV-4 USDA et les séquences en acides aminés des protéines homologues NS3 des virus de la BT de sérotypes 1, 2, 10, 11 et 17 varient de 26,7 % (BTV-1) à 29,2 % (BTV-2, 10 et 17)(tableau XXXIX).

Par contre, les pourcentages de similitude en acides aminés au sein du groupe AHSV (tableau XXXII) varient de 65 % entre les virus de sérotypes 3 et 8 à 95,4 % (entre les sérotypes 4 et 9). Les séquences en acides aminés s'avèrent donc très divergentes entre les virus des deux groupes BTV et AHSV (bien que les structures et les fonctions supposées de leurs protéines soient similaires) et renforcent ainsi l'hypothèse précédemment évoquée de l'évolution des *Orbivirus* à partir d'un ancêtre commun. Les protéines NS3 s'avèrent plus conservées au sein du groupe BTV (les pourcentages de divergence entre les séquences primaires des protéines NS3 des virus de la BT sérotypes -1, -2, -10, -11, -13, -17 varient de 2 à 32 %) qu'au sein du groupe AHSV (les pourcentages de divergence varient de 4,6 à 35 %).

Tableau XXXIX : Pourcentage de similitude entre les séquences en acides aminés des protéines NS3 du virus équinepestique 4 USDA et celles de BTV-1, -2, -10, -11 et -17.

	AHSV-4 USDA
BTV-1	26,7%
BTV-2	29,2
BTV-10	29,2
BTV-11	28,2
BTV-17	29,2

De même, la comparaison des pourcentages de similitude entre les acides aminés identiques et similaires confirme la faible conservation de NS3 entre certains sérotypes. Ainsi, les pourcentages de similitude entre acides aminés identiques et similaires (dont les remplacements sont susceptibles de ne pas modifier l'activité biologique de la protéine) sont uniquement de 79,7 % entre les séquences des sérotypes 8 et 4 (AHSV-8 et -4 Maroc) alors qu'ils atteignent 98,2 % entre les sérotypes 8 et 1 (tableau XL).

Tableau XL : Pourcentage de similitude entre les séquences en acides aminés des protéines NS3 des virus de la peste équine de sérotypes 1, 3, 4, 8 et 9.

a : % d'identité.

b : % des acides aminés similaires.

c : % cumulé des acides aminés identiques (a) et similaires (b).

	AHSV-1	AHSV-3	AHSV-4 USDA	AHSV-4 M	AHSV-4 SA	AHSV-4 E	AHSV-8	AHSV-9
AHSV-1	-							
AHSV-3	65,4 ^a 16,1 ^b 81,5 ^c	-						
AHSV-4 USDA	65,4 14,7 80,1	74,7 9,2 83,9	-					
AHSV-4 M	65,4 16,1 80,1	75,6 9,2 84,8	94,5 1,8 96,3	-				
AHSV-4 SA	65,4 15,2 80,6	76 8,8 84,8	92,6 1,8 94,4	93,5 2,3 95,8	-			
AHSV-4 E	65,4 16,1 81,5	74,7 9,2 83,9	94 1,8 95,8	99,1 0 99,1	92,6 2,3 94,9	-		
AHSV-8	97,7 0,5 98,2	65 15,7 80,7	65,4 14,3 79,7	65,4 15,7 81,1	65,4 14,7 80,1	65 15,7 80,7	-	
AHSV-9	65,9 14,7 80,6	75,1 9,2 84,3	94,5 0,9 95,4	95,4 0,9 96,3	94 1,8 95,8	94,5 0,9 95,4	65,9 14,3 80,2	-

L'alignement multiple des séquences en acides aminés de la protéine NS3 des différents sérotypes permet d'obtenir le dendrogramme suivant :

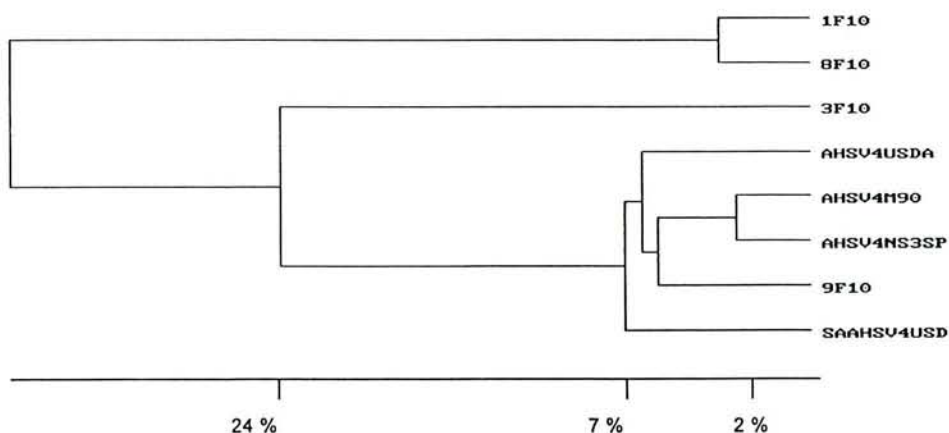


Fig. n° 38 : Dendrogramme obtenu par alignement multiple (à l'aide du programme CLUSTAL de PC/GENE) des séquences en acides aminés des protéines NS3 des virus des sérotypes 1, 3, 4, 8 et 9.

Ce dendrogramme est similaire à celui obtenu par alignement multiple des séquences nucléotidiques (fig. n° 33). Les groupes de souches qui ont été identifiés (AHSV(-1 et -8), AHSV(-4 et -9) et AHSV-3) sont confirmés sur la base, cette fois, des similitudes des séquences en acides aminés.

Au sein du groupe AHSV(-4 et -9), les pourcentages de similitude en acides aminés identiques et similaires varient peu : de 95,4 % (entre AHSV-9 et AHSV-4 USDA et AHSV-4 E) à 96,3 % (AHSV-9 et AHSV-4 Maroc)(tableau XL).

L'identité entre les souches espagnoles et marocaines, révélée par la similitude de leurs séquences nucléotidiques, est confirmée par le fort degré de similitude entre leurs séquences en acides aminés (99,1 %).

Le pourcentage de similitude entre les séquences en acides aminés identiques et similaires des souches AHSV-4 USDA et AHSV-SA n'est que de 94,4 % alors que ces deux souches ont sans doute la même origine. Ainsi, sous réserve de l'exactitude de la séquence en nucléotides déterminée par De Sa *et al.* (1994), la divergence que la séquence en acides aminés de NS3 de AHSV-4 SA présente par rapport aux séquences des autres souches de sérotype 4 (et notamment par rapport à la séquence de AHSV-4 USDA) pourrait être due au mode d'atténuation de cette souche par passage en culture de cellules et confirmerait le rôle de NS3 dans le déterminisme de la virulence.

4.2. Rôle de NS3 et conséquences sur la virulence

La comparaison des séquences en acides aminés des huit souches permet de définir des régions hautement conservées et des régions variables (fig. n° 39).

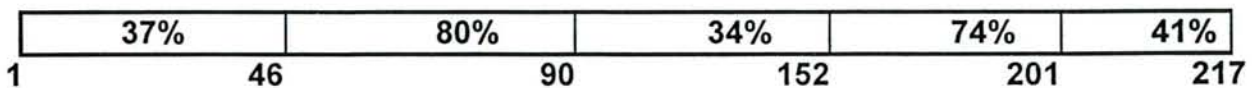


Fig. n° 39 : Représentation schématique de l'alignement des séquences en acides aminés des virus de la peste équine 1, 4 SA, 4 E, 4 USDA, 4 M, 8 et 9 et indication des pourcentages d'identité entre les acides aminés de différentes régions des gènes S10.

Ainsi, 80 % des acides aminés situés entre les positions 46 et 90 sont conservés entre les huit séquences (fig. n° 39). Seule, la séquence de

AHSV-4 USDA possède un site potentiel de glycosylation (57-59). Van Staden and Huismans (1991) ont observé que ce domaine est aussi conservé chez les virus des groupes BTV et Palyam. La conservation de ce domaine entre les protéines NS3 homologues de différents *Orbivirus* nous incite à supposer que cette région pourrait représenter un site catalytique potentiel et/ou structural de NS3.

Le domaine situé entre les positions 138-149 ne présente que 16 % d'acides aminés identiques entre les huit séquences. Les séquences de AHSV-1 et -8 présentent dans cette région variable, une insertion du motif (FDG) qui ne semble pas être associé à une fonction particulière. Cette région hydrophile 138-149 est prédite comme étant un site antigénique potentiel. La protéine NS3 est d'ailleurs très immunogène et cette propriété a été exploitée par Laviada *et al.* (1993) qui ont développé un test ELISA qui permet la différenciation entre les animaux infectés (ou vaccinés avec un vaccin atténué) et les animaux vaccinés avec un vaccin inactivé.

Seules, les séquences primaires des deux souches virulentes AHSV-4 Espagne et AHSV-4 Maroc présentent aux positions 143 et 147 les acides aminés arginine (R) et asparagine (N). Dans une autre région hydrophile (171-191), ces deux séquences sont les seules à présenter, en position 176, une méthionine (M), les six autres séquences ayant une isoleucine (I) ou une valine (V). Ces substitutions, observées uniquement dans les séquences primaires des protéines NS3 des souches virulentes, doivent être rapprochées du rôle potentiel de NS3 dans la pathogenèse du virus équinepestique.

Wu *et al.* (1992) et Hyatt *et al.* (1993) ont montré que la protéine NS3 du virus de la BT, sous forme glycosylée ou non, était transportée au niveau de la membrane cellulaire et était responsable de la libération de particules chimériques (et sans doute des particules virales) hors de la cellule. En effet, les particules chimériques (constituées par l'assemblage spontané des protéines VP2, VP3, VP5 et VP7 exprimées en système eucaryote) sont associées au cytosquelette par l'intermédiaire des protéines VP2 et VP5 et interagissent avec les protéines NS3/NS3A présentes à la surface de vésicules de transport cytoplasmiques et dans la membrane cellulaire. Elles sont ensuite libérées par bourgeonnement hors de la cellule.

Bien qu'il n'existe aucune publication sur le rôle de la protéine NS3 du virus de la peste équine, il est néanmoins raisonnable d'extrapoler au virus équinepestique les données obtenues pour le virus de la BT. NS3 interviendrait

ainsi dans la morphogénèse et la libération des particules virales hors de la cellule (Roy, 1992a ; Van Staden *et al.*, 1995). O'Hara *et al.* (1995) ont montré que chez la souris, la protéine NS3 était impliquée dans la neurovirulence. Mais surtout, Laegreid *et al.* (1995) ont récemment montré que NS3 serait un déterminant majeur de la virulence chez le cheval. Ces auteurs ont étudié la virulence d'un virus réassortant (obtenu *in vitro*) comprenant les 9 premiers segments d'une souche faiblement virulente AHSV-4/PI et le segment S10 de la souche hautement virulente AHSV-4 Espagne. Le pouvoir virulent du réassortant est identique à celui de AHSV-4 Espagne. De plus, la cinétique de libération du virus réassortant hors de la cellule est similaire à celle du virus virulent. En effet, en microscopie électronique après coloration négative, 24 heures après l'infection de cellules Vero par le virus équine sérotype 4 (Espagne), les particules virales bourgeonnent à la surface de la membrane cellulaire. Après infection des cellules par le virus équine 4/PI peu virulent, les particules virales restent localisées dans le cytoplasme et aucune image de bourgeonnement à la surface de la membrane cellulaire n'est observée. Par contre, les images obtenues 24 heures après infection des cellules dans les mêmes conditions expérimentales par le virus réassortant, sont identiques à celles observées pour AHSV-4 Espagne. La virulence apparaît, dans un modèle homologue, déterminée en partie au moins, par le segment S10. Récemment, Van Staden *et al.* (1995) ont rapporté que NS3 de AHSV provoquerait une altération de la perméabilité de la membrane cellulaire qui serait à l'origine de la mort de la cellule.

Les mutations qui seraient susceptibles de modifier l'activité biologique des protéines NS3/NS3A pourraient atténuer la virulence. Les substitutions que nous avons identifiées par comparaison des séquences des souches virulentes AHSV-4 Maroc et Espagne par rapport à celles des six souches atténuées et notamment à celle de la souche vaccinale AHSV-4 USDA, sont localisées dans une région hydrophile exposée et pouvant être impliquée dans la fonction de NS3/NS3A.

Conclusion

Il serait nécessaire de confirmer que ces mutations sont bien corrélées avec les variations du pouvoir virulent en déterminant les séquences en nucléotides d'autres souches sauvages et en les comparant avec celles de souches atténuées. Ensuite, des expériences de recombinaison génétique

des régions potentiellement impliquées dans les mécanismes de la virulence (associées éventuellement à des expériences de mutagenèse dirigée) pourraient permettre de déterminer la localisation précise des déterminants moléculaires de la virulence et confirmeraient l'influence éventuelle de ces mutations. De plus, l'infection simultanée de cellules d'insecte par des baculovirus permettant, d'une part, l'expression des protéines NS3/NS3A à partir de segments S10 de souches virulentes ou atténuées et, d'autre part, l'assemblage de particules chimériques pourraient permettre de préciser la fonction de ces protéines.

CONCLUSION

CONCLUSION

La peste équine constitue l'un des risques sanitaires majeurs chez les équidés. Les conséquences économiques sont désastreuses pour la filière chevaline lorsqu'un pays est déclaré infecté. Les techniques de diagnostic classiquement utilisées ne s'avèrent pas suffisamment sensibles comme l'a illustré l'apparition de la peste équine en Espagne en 1987.

Nous avons développé un test couplé de transcription-inverse et d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) permettant la détection du virus équinestique (AHSV) à partir d'échantillons cliniques. Les amorces que nous avons choisies permettent d'amplifier le segment génomique S7 des neuf sérotypes connus du virus de la peste équine. Aucune amplification non spécifique n'est obtenue à partir d'autres acides nucléiques utilisés comme matrices. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de la RT-PCR pour un diagnostic de groupe AHSV.

La spécificité de la RT-PCR a été vérifiée vis à vis des virus les plus couramment rencontrés chez les équidés ainsi que vis à vis d'autres *Orbivirus* tels que les 24 sérotypes du virus de la bluetongue (BTV) et les sérotypes 1, 2, 3, 4 et 7 du virus de la maladie hémorragique du cerf (EHDV).

L'utilisation d'une sonde moléculaire, synthétisée par PCR, a permis de vérifier la spécificité de produits amplifiés de faible concentration et la "nested-PCR" d'améliorer la sensibilité de la détection du virus équinestique. Ainsi, la sensibilité de détection de la RT-PCR a été évaluée à 3,1 pg d'ARN viral ce qui correspond à $2,5 \cdot 10^6$ particules virales. Après "nested-PCR", le seuil de sensibilité s'est avéré être de 0,31 fg soit 250 particules virales. La RT-PCR améliore théoriquement la sensibilité de détection du virus équinestique de 18 à 30 fois par rapport au test ELISA. L'intérêt de la technique RT-PCR pour la détection du virus équinestique a été évalué à partir d'échantillons biologiques et sa sensibilité et sa spécificité ont été comparées avec celles de l'isolement viral et d'un test ELISA. Une corrélation satisfaisante a été obtenue entre les résultats de la PCR et ceux des deux autres méthodes.

La détection précoce de chevaux infectés, avant l'apparition d'anticorps spécifiques, repose sur l'isolement du virus en cultures de cellules. Depuis 1991, des tests ELISA ont été développés afin de diminuer le délai de réponse et surtout d'augmenter la sensibilité des tests de diagnostic. La virémie des animaux infectés est difficilement décelable par l'utilisation des

cultures cellulaires à cause du faible titre du virus dans le sang. L'isolement du virus nécessite bien souvent de réaliser plusieurs passages en aveugle sur les cellules, ce qui affecte considérablement le délai de réponse. La RT-PCR a donc été appliquée à la détection du virus de la peste équine dans le sang de chevaux inoculés expérimentalement et comparée avec la technique d'isolement viral.

La technique RT-PCR s'est avérée, par rapport aux techniques conventionnelles de diagnostic, satisfaisante quant à sa sensibilité et à sa spécificité. Même si l'isolement et l'identification du virus demeure nécessaire pour un diagnostic de certitude, la rapidité de réponse d'autres tests (ELISA et RT-PCR) est primordiale afin de mettre en oeuvre le plus tôt possible les mesures de prophylaxies qui s'imposent face à une suspicion de peste équine. S'il est vrai que la technique ELISA est plus rapide que la RT-PCR, son manque de sensibilité à partir des prélèvements sanguins est un sérieux handicap à l'utilisation de ce test pour le dépistage précoce de la maladie (dès le début de la virémie). La RT-PCR est une méthode utile pour la détection précoce du virus équine dans le sang en particulier pour les chevaux infectés par des souches peu virulentes et dont le diagnostic, par ailleurs, est souvent délicat.

La RT-PCR a permis d'étayer l'hypothèse selon laquelle les ânes et les mulets pourraient jouer le rôle de réservoir du virus pendant la saison froide. Il serait nécessaire, cependant, de déterminer si les échantillons de sang dans lesquels le segment S7 est détecté sont infectieux pour les vecteurs et/ou les espèces cibles.

En ce qui concerne l'intérêt de la RT-PCR appliquée à la biologie clinique vétérinaire et à l'épidémiologie, plusieurs études sont actuellement en cours ou seraient susceptibles d'être entreprises dans notre laboratoire. Ainsi, la détermination et la comparaison des séquences nucléotidiques des segments génomiques L2 et M6 (qui codent respectivement pour les protéines structurales spécifiques de type VP2 et VP5) de virus de différents sérotypes, pourraient permettre de détecter des séquences conservées entre souches d'un même sérotype afin de sélectionner des amorces permettant une technique RT-PCR spécifique de type. De plus, le développement de méthodes immunoenzymatiques ("Enzyme Linked Oligosorbent Assay" ou ELOSA) pour une détection en plaques des produits d'amplification permettrait le traitement de grands nombres d'échantillons. Enfin, la RT-PCR, appliquée à la détection du virus équine à partir de prélèvements constitués de mélanges de différentes populations d'insectes,

permettrait de garantir l'absence de circulation du virus dans une région donnée.

L'étude du polymorphisme de restriction des segments S7 et S10 amplifiés a mis en évidence des variations inter-sérotypes. La comparaison simultanée des profils de restriction des produits d'amplification des segments S7 et S10 permet de différencier les sérotypes entre eux. La RT-PCR complétée par l'analyse des profils de restriction se révèle être un outil intéressant pour le suivi épidémiologique des souches virales. Cependant, il serait nécessaire de disposer d'un grand nombre de souches de chacun des neuf sérotypes afin de confirmer une corrélation entre la diversité génétique mise en évidence par le polymorphisme de restriction (plus simple et plus rapide que le séquençage) et le sérotype mais aussi, de préciser l'importance des variations génétiques intra-sérotype.

Nous avons déterminé les séquences en nucléotides des segments S10 de deux souches de sérotype 4, l'une vaccinale (AHSV-4 USDA), l'autre virulente (AHSV-4 Maroc). La quasi-identité entre les séquences des segments S10 des souches espagnoles et marocaines confirme l'origine commune des virus responsables des épizooties qui ont frappé ces deux pays. Les séquences de ces deux souches ont été comparées avec celles de six autres souches de sérotype 1, 3, 4, 8 et 9. Les souches peuvent être groupées en fonction du degré de similitude de leurs séquences. Ainsi, la notion de sérotype pourrait être complétée par celle de génotype fondée sur la similitude des séquences de régions conservées de segments génomiques. La détermination des séquences des segments homologues des virus des sérotypes 2, 5, 6 et 7 est indispensable pour définir les parentés génétiques de tous les virus du groupe AHSV.

L'analyse des séquences primaires et les prédictions de la structure secondaire des produits de traduction des gènes S10 de AHSV-4 USDA et AHSV-4 Maroc nous ont permis de conclure que NS3 est une protéine membranaire ayant deux principaux domaines hydrophobes. La comparaison des séquences en acides aminés des protéines N3/NS3A des souches virulentes et vaccinales nous a permis d'identifier des régions variables entre les acides aminés 138-149 et 171-191. Ces mutations pourraient modifier la fonction biologique de NS3 qui semble impliquée dans le déterminisme de la virulence. Cette hypothèse devra être confirmée en comparant les séquences en nucléotides et en acides aminés de nombreuses autres souches virulentes et atténuées. Si une corrélation était effectivement mise en évidence entre des substitutions d'acides aminés et la

variation du pouvoir virulent, il serait nécessaire alors de préciser le mécanisme précis par lequel l'activité biologique de NS3 détermine le pouvoir virulent du virus de la peste équine.



ANNEXE

ANNEXE

Annexe 1 : Analyse des cadres de lecture ouverts (ORF) des séquences de AHSV-4 USDA et AHSV-4 M90 effectuées à l'aide du programme "TRANSLAT". Les ORF sont recherchés dans les trois cadres de lecture.

ORF statistics for DNA sequence AHSV4USDA.

Total number of bases: 753.

- Using the Universal genetic code.
- The initiation codon(s) are: AUG/ATG only.
- The minimal size for an ORF is set to 10 amino acids.

List of possible ORF.
=====

Reading frame 1.

[1]	From	502 (ATG)	to	537 ([TTC]TGA),	size =	36 bp.	/	12 aa.
[2]	From	709 (ATG)	to	747 ([GGA]TAA),	size =	39 bp.	/	13 aa.

Total number of ORF greater than 10 residues in this frame is: 2.

Reading frame 2.

[1]	From	20 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	651 bp.	/	217 aa.
[2]	From	53 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	618 bp.	/	206 aa.
[3]	From	146 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	525 bp.	/	175 aa.
[4]	From	182 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	489 bp.	/	163 aa.
[5]	From	242 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	429 bp.	/	143 aa.
[6]	From	323 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	348 bp.	/	116 aa.
[7]	From	338 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	333 bp.	/	111 aa.
[8]	From	368 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	303 bp.	/	101 aa.
[9]	From	407 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	264 bp.	/	88 aa.
[10]	From	473 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	198 bp.	/	66 aa.
[11]	From	614 (ATG)	to	670 ([AGC]TAG),	size =	57 bp.	/	19 aa.
[12]	From	713 (ATG)	to	751 ([AAC]GA),	size =	39 bp.	/	13 aa.

Total number of ORF greater than 10 residues in this frame is: 12.

Reading frame 3.

[1]	From	60 (ATG)	to	308 ([CTT]TAA),	size =	249 bp.	/	83 aa.
[2]	From	87 (ATG)	to	308 ([CTT]TAA),	size =	222 bp.	/	74 aa.
[3]	From	105 (ATG)	to	308 ([CTT]TAA),	size =	204 bp.	/	68 aa.
[4]	From	219 (ATG)	to	308 ([CTT]TAA),	size =	90 bp.	/	30 aa.
[8]	From	660 (ATG)	to	689 ([AGC]TGA),	size =	30 bp.	/	10 aa.

Total number of ORF greater than 10 residues in this frame is: 5.

* OPEN READING FRAME STATISTICS *

ORF statistics for DNA sequence AHSV4M90.

Total number of bases: 747.

- Using the Universal genetic code.
- The initiation codon(s) are: AUG/ATG only.
- The minimal size for an ORF is set to 10 amino acids.

List of possible ORF.
=====

Reading frame 1.

•	1\$	From	19 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	651 bp.	/	217 aa.
•	2\$	From	52 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	618 bp.	/	206 aa.
•	3\$	From	145 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	525 bp.	/	175 aa.
•	4\$	From	181 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	489 bp.	/	163 aa.
•	5\$	From	241 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	429 bp.	/	143 aa.
•	6\$	From	322 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	348 bp.	/	116 aa.
•	7\$	From	337 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	333 bp.	/	111 aa.
•	8\$	From	367 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	303 bp.	/	101 aa.
•	9\$	From	406 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	264 bp.	/	88 aa.
•	10\$	From	472 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	198 bp.	/	66 aa.
•	11\$	From	544 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	126 bp.	/	42 aa.
•	12\$	From	613 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	57 bp.	/	19 aa.
•	13\$	From	637 (ATG)	to	669 (*AGCSTAG),	size =	33 bp.	/	11 aa.
•	14\$	From	712 (ATG)	to	747 (*ACG\$),	size =	36 bp.	/	12 aa.

Total number of ORF greater then 10 residues in this frame is: 14.

Reading frame 2.

•	1\$	From	86 (ATG)	to	307 (*CTTSTAA),	size =	222 bp.	/	74 aa.
•	2\$	From	218 (ATG)	to	307 (*CTTSTAA),	size =	90 bp.	/	30 aa.
•	4\$	From	659 (ATG)	to	721 (*GCCSTAG),	size =	63 bp.	/	21 aa.
•	5\$	From	674 (ATG)	to	721 (*GCCSTAG),	size =	48 bp.	/	16 aa.

Total number of ORF greater then 10 residues in this frame is: 4.

Reading frame 3.

• 2\$ From 708 (ATG) to 746 (*AAC\$G), size = 39 bp. / 13 aa.

Total number of ORF greater than 10 residues in this frame is: 1.

List of ORF in decreasing size order.

=====

- 1\$ N1- 1 : size = 651 bp. / 217 aa., from base 19 to base 669.
- 2\$ N1- 2 : size = 618 bp. / 206 aa., from base 52 to base 669.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ACHA P.N., SZYFRES P. (1989) Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. 2° éd., Office International des Epizooties.

AKITA G. Y., CHINSANGARAM J., OSBURN B. I., IANCONESCU M., KAUFMAN R. (1992). Detection of bluetongue virus serogroup by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4, 400-405.

Arrêté du 22 avril 1974, *Journaux Officiels de la République Française* des 13 et 14 mai 1974, 5131.

Arrêté du 8 juin 1990, *Journal Officiel de la République Française* du 10 juillet 1990, 38141.

BARKER RH., BANCHONGAKSORN T., COURVAL J. M., SUWONKERD W., RIMWUNGTRAGOON K., WIRTH D. F. (1992) A simple method to detect *Plasmodium falciparum* from blood samples using the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Med. Hyg.*, 46(4), 416-426.

BARNARD B.J.H., BENGIS R., KEET D. and DEKKER E.H. (1994) Epidemiology of African horsesickness : duration of viraemia in zebra (*Equus burchelli*). *Ondestepoort J. Vet. Res.*, 61, 391-393.

BECKER F.E. (1930) Tick-borne infections in Colorado. II. A survey of the occurrence of infections transmitted by the wood tick. *Colorado Med.*, 27, 87-95.

BELAK S., BALLAGI-PORDANY A (1993). Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Com.*, 17, 55-72.

BEUTLER E., GELBART T. and KUHL W. (1990) Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 9, 166.

BIRNBOIM H.C., DOLY J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.

- BLACKBURN N.K. SEARL E.L., PHELPS R.J.** (1985) Viruses isolated from *Culicoïdes (Dipt cerat)* caught at the veterinary research farm Mazowe, Zimbabwe. *J. Entomol. Soc. Afr.*, 48, 331-336.
- BONATTI S. and BLOBEL G.** (1979) Absence of a cleavable signal sequence in Sinbis virus glycoprotein pE2. *J. Biol. Chem.*, 254, 12261-12264.
- BORDEN E.C., SHOPE R.E., MURPHY F.A.** (1971) Phycosichemical and morphological relationships of some arthropod-borne viruses to bluetongue virus - a new taxonomic group : physicochemical and serological studies. *J. Gen. Virol.* , 13, 261-271.
- BORKOVEC L.** (1966) La peste équine (en Algérie). *Veterinarstvi*, 16, 123-126.
- BOTH G.W., SIEGMAN L.J., BELLAMY R. and ATKINSON P.H.** (1983) Coding assignment and nucleotide sequence of Simian SA11 gene segment 10 : location of glycosylation sites suggest that the signal peptide is not cleaved. *J. Virology*, 48 (2), 335-339.
- BREESE S.S., OZAWA Y.** (1969) Intracellular inclusions resulting from infection with African horse sickness virus. *J. Virology*, 4 (1), 109-112.
- BREMER C.W.** (1976) A gel electrophoretic study of the protein and nucleic acid components of African Horsesickness virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 43(4), 193-200.
- BREMER C.W., HUISMANS H. and VAN DIJK A.A.** (1990) Characterization and cloning of the African Horsesickness virus genome. *J. Gen.Virol.*, 71, 793-799.
- BREWER A.W., MAC LACHLAN N.J.** (1992) Ultrastructural characterization of the interaction of bluetongue virus with bovine erythrocytes *in vitro*. *Vet. Pathol.*, 29, 356-359.

BROWN C.C. and MEBUS C.A. (1992) The pathology of African horse sickness. In : Bluetongue, African Horse sickness and related Orbiviruses. Edited by Walton T.E. and Osburn B.I., 832-834.

BURRAGE T.G. and LAEGREID W.W. (1994) African Horse Sickness : pathogenesis and immunity. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 17, 314, 275-285.

BURRAGE T.G., ROSALIE T., STONE-MARSHAT M. and LAEGREID W.W. (1993) Neutralizing epitopes of African Horsesickness virus are located on VP2. *Virology*, 196, 199-803.

BURROUGHS J.N., O'HARA R.S., SMALE C.J., HAMBLIN C., WALTON A., ARMSTRONG R. and MERTENS P.P.C. (1994) Purification and properties of virus particles, infectious sub-viral, particles, cores and VP7 crystals of African horsesickness virus serotype 9. *J. Gen. Virol.*, 75, 1849-1847.

BURROUGHS J.N., SMALE C.J., HAMBLIN C., ARMSTRONG R., O'HARA R.S. and MERTENS P.P.C. (1992) Purification and protein composition of virus particles, infectious sub-viral particles, cores and VP7 crystals of African horse sickness virus serotype 9. In : Bluetongue, African Horse sickness and related Orbiviruses. Edited by Walton T.E. and Osburn B.I., 498-507.

CASALS J. (1959) Antigenic classification of arthropod-borne viruses. *Proc 6th Int. Congress Trop. Malaria*, 5, 34-37.

CHASTEL C., MAIN A.J., COUATARMANAC'H A. (1984) Isolation of Eyach virus (*Reoviridae*, Colorado tick fever group) from *Ixodes ricinus* and *I. ventallor* ticks in France. *Arch. Virol.*, 82, 161-171.

CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. (1987) A single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.

CHUMA T., LE BLOIS H., SANCHEZ-VIXCAINO J.M., DIAZ-LAVIADA M. and ROY P. (1992) Expression of the major core antigen VP7 of African Horse Sickness Virus by a recombinant baculovirus and its use as a group-specific diagnostic reagent. *J. Gen. Virol.*, 73, 925-931.

Code zoosanitaire de l'OIE (1992), 135-141.

DANGLER C. A., DE MATTOS C. A., DE MATTOS C. C., OSBURN B. I. (1990) Identifying bluetongue virus ribonucleic acid sequences by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 28, 281-292.

DARDIRI A.H., OZAWA Y. (1969) Immune and serologic response of dogs to neurotropic and viscerotropic african horse-sickness viruses. *J. A. V. M. A.*, 155(2), 400-407.

DE SA R., ZELLNER M. and GRUBMAN M.J. (1994) Phylogenetic analysis of segment 10 from African horsesickness virus and cognate genes from other orbiviruses. *Virus Research*, 33, 157-165.

Décret du 7 décembre 1966, *Journal Officiel de la République Française* du 9 décembre 1966, 10796.

Décret n° 67-1056 du 20 novembre 1967, *Journal Officiel de la République Française* du 3 décembre 1967, 11758-11786.

Directive 90/426/CEE (1990), *Journal Officiel des Communautés Européennes*, L224 du 18 août 1990, 42-50.

Directive 92/35/CEE (1992), *Journal Officiel des Communautés Européennes*, L157, du 10 juin 1992, 19-27.

DU PLESSIS D.H., VAN WYNGAARDT W. and BREMER C. (1990) An indirect sandwich ELISA utilizing F(ab')₂ fragment for the detection of African Horse Sickness Virus. *J. Virol. Methods*, 29, 279-290.

DU TOIT R.M. (1944) The transmission of bluetongue and horse sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, 19, 7-16.

DUBOURGET P., PREAUD J.M., DETRAZ F., LACOSTE A.C., ERASMUS B.J. and LOMBARD M. (1992) Development, production and quality control of an industrial inactivated vaccine against African Horse Sickness virus serotype 4. In : Bluetongue, African Horse sickness and related Orbiviruses. Edited by Walton T.E. and Osburn B.I., 874-886.

EATON B.T., CRAMERI G.S. (1989) The site of bluetongue virus attachment to glycoporphins from a number of animal erythrocytes. *J. Gen.Virol.*, 70, 3347-3353.

EATON B.T., HYATT A.D. and BROOKES S.M. (1990) The replication of Bluetongue virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 162, 89-118.

EATON B.T., HYATT A.D. and WHITE J.R. (1988) Localization of the nonstructural protéin NS1 in bluetongue virus particles. *Virology*, 163, 527-537.

ERASMUS B.J., YOUNG E., PIETERSE L.M., BOSHOFF S.T. (1978) The susceptibility of zebra and elephants to African horse sickness virus. In : *Equine Infectious Diseases* (Bryans J.T., Gerber H., eds) *Vet. Publ.*, N.J., 4th edn, 409-413.

ESTES M.K. (1990) Rotaviruses and their replication. *Virology*, Second Edition, Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe *et al.*, Raven Press, Ltd, New York, 1329-1352.

FENNER F. (1976) Classification and nomenclature of viruses, second report of the international committee on taxonomy of viruses. *Intervirology*, 7, 1-115.

FLORIO C., STEWART M.O., MUGRAGE E.R. (1944) The experimental transmission of Colorado tick fever. *J. Exp. Med.*, 80, 165-188.

GRUBMAN M. J., LEWIS S. A. (1992) Identification and characterization of the structural and nonstructural proteins of the African horsesickness virus and determination of the genome coding assignments. *Virology*, 186, 444-451.

GORMAN B.M., TAYLOR J., WALKER P.J. and YOUNG P.R. (1978) The isolation of recombinants between related orbiviruses. *J. Gen. Virol.*, 41, 333-342.

GOULD A.R (1988a) Nucleotide sequence of the Australian Bluetongue Virus serotype 1 RNA segment 10. *J. Gen.Virol.*, 69, 945-949.

GOULD A.R. (1988b) The use of recombinant DNA probes to group and type orbiviruses. A comparison of Australian and South African isolates. *Arch. Virol.*, 99, 205-220.

GOULD A.R., HYATT A.D. (1994) The *Orbivirus* genus. Diversity, structure, replication and phylogenetic relationships. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 17(3/4), 163-188.

GOULD A.R., MC COLL K.A., and PRITCHARD L.I. (1992) Phylogenetic relationships between Bluetongue viruses and other Orbiviruses. In: *Bluetongue, African Horse sickness and related Orbiviruses*. Edited by Walton T.E. and Osburn B.I, 452-460.

HAMBLIN C., ANDERSON E.C., MELLOR P.S., GRAHAM S.D., MERTENS PPC and BURROUGHS J.N. (1992) The detection of African horse sickness virus antigens and antibodies in young equidae. *Epidemiol. Infect.*, 108, 193-201.

HAMBLIN C., GRAHAM S.D., ANDERSON E.C., CROWTHER J.R. (1990) A competitive ELISA for the detection of group-specific antibodies to African horse sickness virus. *Epidemiol. Infect.*, 104, 303-312.

HAMBLIN C., MELLOR P.S., GRAHAM S.D., HOOGHUIS H., MONTEJANO R.C., CUBILLO M.A. and BONED J. (1991a) Antibodies in horses, mules and donkeys following vaccination against African horse sickness. *Epidemiol. Infect.*, 106, 365-371.

HAMBLIN C., MERTENS P.P.C., MELLOR P.S., BURROUGHS J.N. and CROWTHER J.R. (1991b) A serogroup specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and identification of African Horse Sickness Viruses. *J. Virol. Methods*, 31, 285-292.

HIGUCHI R. (1989) Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications*. Perkin-Elmer/Cetus, May 1989.

HOLMES I.H. (1979) Viral gastroenteritis. *Progr. Med. Virol.*, 25, 1-36.

HOLMES I.H. (1991) Classification and nomenclature of viruses. Family *Reoviridae*. In : Fifth Report of the international Committee on taxonomy of viruses. Edited by Francki R.I.B., Fauquet C. M., Knudson D.L. and Brown F. *Arch. Virol.*, suppl. 2, 186-199.

HOLODNIY M., KIM S., KATZENSTEIN D., KONRAD M., GROVES E. and MERIGNAN T. (1991) Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 676-679.

HOUSE C., HOUSE J.A. and MEBUS C.A. (1992) A review of African Horse Sickness with emphasis on selected vaccines. *A. N. Y. Acad. Sci.*, 653, 228-232.

HOUSE C., MIKICIUK P.E., BERNINGER M.L. (1990) Laboratory diagnosis of African horse sickness : comparison of serological techniques and evaluation of storage methods of samples for virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2, 44-50.

HOWELL P.G. (1962) The isolation and identification of further antigenic types of African horsesickness virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 29, 139-149.

HUISMANS H. and ELS H.J. (1979) Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. *Virology*, 92, 397-406.

HUISMANS H., VAN DIJK A.A., ELS H.J. (1987) Uncoating of parental blue-tongue to core and subcore particles in infected L-cells. *Virology*, 157, 180-188.

HYATT A.D., BROOKES S.M., GOULD A.R. and EATON B.T. (1992) Morphogenesis of bluetongue viruses : development of a model for the site of virus synthesis, translocation and release from infected tissue culture cells. In : Bluetongue, African Horse sickness and related Orbiviruses. Edited by Walton T.E. and Osburn B.I., 358-368.

HYATT A.D., GOULD A.R., COUPAR B. and EATON B.T. (1991) Localization of the non-structural protein NS3 in bluetongue virus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, 72, 2263-2267.

HYATT A.D., ZHAO Y. and ROY P. (1993) Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A. *Virology*, 193, 592-603.

INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J. (1990) PCR protocols : a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., 3-12.

IWATA H., CHUMA T. and ROY P. (1992a) Characterization of the genes encoding two of the major capsid proteins of epizootic haemorrhagic disease virus indicates a close genetic relationship to bluetongue virus. *J. Gen. Virol.*, 73, 915-92.

IWATA H., HIRASAWA T. and ROY P. (1991) Complete nucleotide sequence of segment 5 of epizootic haemorrhagic disease virus ; the outer capsid protein VP5 is homologous to the VP5 protein of bluetongue virus. *Virus Research*, 20, 273-281.

IWATA H., YAMAGAWA M. and ROY P. (1992b) Evolutionary relationships among the gnat-transmitted orbivirus that cause African horsesickness, bluetongue, epizootic haemorrhagic disease as evidenced by their capsid protein sequences. *Virology*, 191, 251-261.

IZRAELI S., PFLEIDERER C. and LION T. (1991) Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res.*, 19, 6051.

JOKLIK W.K. (1983) The members of the family *Reoviridae*. In : Joklik W.K., ed. *The Reoviridae*. New York : Plenum press, 1-7.

- KAPULER A.M.** (1970) An extraordinary temperature dependence of the reovirus transcriptase. *Biochemistry*, 9, 4453-4457.
- KARABATSOS N.** (1985) International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates, 3rd ed. San Antonio, Texas : The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- KNUDSON D.V.** (1981) Genome of Colorado tick fever, *Virology*, 112, 361.
- KOWALIK T.F. and LI J.K.K.** (1989) Sequence analysis and structure predictions of double stranded RNA segment S1 and VP7 from United States prototype bluetongue virus serotypes 13 and 10. *Virology*, 172, 189-195.
- KOWALIK T.F., LI J.K.K., CHUANG R.Y., DOI R.H. and OSBURN B.I.** (1990) The complete nucleotide and deduced amino acid sequence of the gene encoding the major inner capsid protein, VP7, of bluetongue virus serotype 17. *Nucleic Acids Res.*, 18, 5302.
- KOZAK M.** (1981) Possible role of flanking nucleotides in recognition site of the AUG initiation codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.*, 9, 5233-5252.
- KOZAK M.** (1984) Compilation and analysis sequences upstream from the translation start in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 12, 857-872.
- KOZAK M.** (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.*, 266, 19867-19870.
- KWOK S., HIGUCHI R.** (1992) Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237-238.
- LAEGREID W.W.** (1994) Diagnosis of African Horse Sickness Virus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 17, 297-303.
- LAEGREID W.W., BURRAGE T.G., STONE-MARSCHAT M. and SKOWRONEK A.** (1992) Electron microscopic evidence for endothelial infection by African Horsesickness virus. *Vet. Pathol.*, 29, 554-556.

LAEGREID W.W., BURRAGE T.G., STONE-MARSCHAT M., SKOWRONEK A. and HUSSEIN A. (1995) The S10 gene of African Horse Sickness virus is a major virulence determinant. Proceedings of the Fifth International Symposium on double-stranded RNA viruses, 19-23 avril, Jerba, 47.

LAEGREID W.W., SKOWRONEK A., STONE-MARSCHAT M. and BURRAGE T.G. (1993) Characterization of virulence variants of African Horsesickness virus. *Virology*, 195, 836-839.

LANE R.S., EMMONS R.W., DEVLIN V., DONDERO D.V., NELSON B.C. (1982) Survey for evidence of Colorado tick fever virus outside of the known endemic area in California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 837-843.

LAVIADA M.D., ARIAS M. and SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (1993) Characterization of African horsesickness virus serotype 4-induced polypeptides in Vero cells and their reactivity in Western immunoblotting. *J. Gen. Virol.*, 74, 187-87.

LAVIADA M.D., BABIN M., DOMINGUEZ J. and SANCHEZ-VIXCAINO J.M. (1992) Detection of African Horse Sickness Virus in infected spleens by a sandwich ELISA using two monoclonal antibodies specific for the VP7. *J. Virol. Methods*, 38, 229-242.

LE BLOIS H., FAYARD B., URAKAWA T. and ROY P. (1991) Synthesis and characterization of chimaeric particles between Epizootic haemorrhagic disease virus and bluetongue virus : functional domains are conserved on the VP3 protein. *J. Virol.*, 65, 4821-4831.

LE BLOIS H., MERTENS P.P.C., FRENCH T., BURROUGHS J.N., ROY P. (1992) The expressed VP4 protein of bluetongue virus is the guanylyl transferase. *Virology*, 189, 757-761.

LEE J. and ROY P. (1987) The complete sequence of the NS1 gene (M6 RNA) of U.S. Bluetongue virus serotype 10. *Nucleic Acids Res.*, 15, 7207-7208.

- LEFEVRE P.C., DESOUTTER D.** (1988) La fièvre catarrhale du mouton. I.E.M.V.T. Etudes et synthèses de l'I.E.M.V.T. Edit : I.E.M.V.T., 115 p.
- LEW B.** (1911) The transmission of African horse sickness to the dog by feeding. *Vet. J.*, 67, 402-408.
- LIU H.M., BOOTH T.F., ROY P.** (1992) Interactions between blue tongue virus core and capsid proteins translated *in vitro*. *J. Gen. Virol.*, 73, 2577-2584.
- LUBROTH J.** (1992) The complete epidemiologic cycle of African horse sickness : our incomplete knowledge. In : *Bluetongue, African Horse Sickness virus and related Orbivirus*. Edited by Walton TE and Osburn BI, CRC Press., 197-204.
- LUBROTH J.** (1988) African horse sickness and the epizootic in Spain 1987. *Equine Pract.*, 10, 26-33.
- MAC LACHLAN N.J., NUNAMAKER R.A., KATZ J.B., SAWYER M.M., AKITA G.Y., OSBURN B.I. and TABACHNICK W.J.** (1994) Detection of Bluetongue virus in the blood of inoculated calves : comparison of virus isolation, PCR assay and *in vitro* feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch. Virol.*, 136, 1-8.
- MANIATIS T., FRITSCHÉ F., SAMBROOK J.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory. Second edition.
- MANUAL OF STANDARDS FOR DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES** (1992) African Horsesickness Second edition. Office International des Epizooties, 91-99.
- MARTINEZ-TORRECUADRADA J.L., IWATA H., VENDEO A., CASAL I. and ROY P.** (1994) Expression and characterization of the two outer capsid proteins of African Horsesickness virus : the role of VP2 in virus neutralization. *Virology*, 202, 348-359.
- MATTHEWS R.E.F.** (1979) The classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 11, 133-135.

MEBUS C.A., UNDERDAHI N.R., RHODES M.B., TWIEHAUS M.J. (1969) Calf diarrhea (Scours) reproduced with a virus from a field outbreak. Research Bull. Univer. Nebraska, 233, 1-16.

MELLOR P.S. (1990) The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. Current Topics in Microbiology and Immunology, 162, 143-161.

MELLOR P.S. (1991) African horse sickness in Europe. In : Proc. Mtg. Soc. Vet. Epidem. Prev. Med. (Thrusfield M.V., ed) Univ. London, 17-19 april 1991, 27-32.

MELLOR P.S. (1993) African horse sickness : transmission and epidemiology. Vet. Res., 24, 199-212.

MELLOR P.S. (1994) Epizootiology and vectors of African Horse Sickness Virus. Comp. Imm. Microbiol., 17, 314, 287-296.

MELLOR P.S., BONED J., HAMBLIN C., GRAHAMS. (1990a) Isolations of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. Epidemiol. Infect., 105, 447-454.

MELLOR P.S., HAMBLIN C., GRAHAM S.D. (1990b) The occurrence of African horse sickness in Saudi Arabia. Vet. Rec., 127, 41-42.

MERTENS P.P.C. (1994) Orbiviruses and Coltiviruses. Encyclopedia of Virology, Academic Press Ltd, 941-956.

MERTENS P.P.C., BROWN F. and SANGAR D.V. (1984) Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins they encode. Virology, 135, 207-217.

MERTENS P.P.C., BURROUGHS J.N., ANDERSON J. (1987) Purification and properties of virus particles infectious subviral particles and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. Virology, 157, 375-386.

MERTENS P.P.C., MARTIN L. A., WADE-EVANS A., HAMBLIN C., MEYER A., O'HARA R., BURROUGHS N. (1994) African Horse sickness virus in Europe. Second annual report. Volume 1, p 6.

MERTENS P.P.C., SANGAR D.V. (1985) Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses. *Virology*, 140, 55-57.

M' FADYEAN J. (1900) African horsesickness. *J. Comp. Path.*, 13, 1-20.

MIRCHAMSY H. and TASLIMI H. (1963) Adaptation of horse sickness virus to tissue culture. *Nature (London)*, 198, 704-706.

MIZUKOSHI N., SAKAMOTO K., IWATA A., TSUCHIYA T., UEDA S., APIWATNAKORN B., KAMADA M. and FUKUSHO A. (1993) The complete nucleotide sequence of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) segment 4, which encodes the minor core protein VP4. *Virus Res.*, 28, 299-306.

MIZUKOSHI N., SAKAMOTO K., IWATA A., TSUCHIYA T., UEDA S., WATANABE T., KAMADA M. and FUKUSHO A. (1992) The complete sequence of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) RNA segment 5 and its predicted polypeptide compared with NS1 of bluetongue virus. *J. Gen. Virol.*, 73, 2425-2428.

MIZUKOSHI N., SAKAMOTO K., IWATA A., UEDA S., KAMADA M. and FUKUSHO A. (1994) Detection of African horsesickness virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers for segment 5 (NS1 gene). *J. Vet. Med. Sci.*, 56(2), 347-352.

MONTILLA D.R. and MARTI P. (1968) La peste équine. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 70, 647-662.

MORNET et GILBERT (1968) Les maladies animales à virus. La peste équine. L'expansion éditeur, n°476, 195 p.

NEL L.H., PICARD L.A., ROY P. and HUISMANS H. (1992) Studies on the nucleic acid sequence and expression of african horse sickness virus and epizootic haemorrhagic disease virus NS1-encoding genes. In : *Bluetongue, African Horse sickness and related Orbiviruses*. Edited by Walton T.E. and Osburn B.I., 369-375.

NEVILL E.M. (1971) Cattle and *Culicoides* biting midges as possible overwintering hosts of bluetongue virus. Onderstepoort J. Vet. Res., 38, 65-72.

OELLERMANN R.A., ELS H.J. and ERASMUS B.J. (1970) Characterization of African Horsesickness virus. Arch. Ges. Virusforsch., 29, 163-174.

O'HARA R.S., PULLEN L., MARTIN L.A. and MERTENS P.P.C. (1995) Identification of the genome segments controlling and modulating the neurovirulence of African Horse Sickness Virus. Proceedings of the Fifth International Symposium on double-stranded RNA viruses, 19-23 avril, Jerba, 32.

OZAWA Y. (1967) Studies on the replication of African horse sickness virus in two different cell line cultures. Arch. Ges. Virusforsch., 21, 155-169.

OZAWA Y. and HAZRATI A. (1964) Growth of African horsesickness virus in monkey kidney cell line cultures. Am. J. Vet. Res., 25, 505-511.

OZAWA Y., MODJITABAI A., HOPKIN I.G., HAZRATI A., KAVEH P. (1966) Sequential cellular changes produced by african horsesickness virus in monkey kidney cells. Am J. Vet. Res., 27, 558-565.

PANACCIO M., GEORGESZ M. and LEW A.M. (1993) FoIT PCR : A simple PCR protocol for amplifying DNA directly from whole blood. Biotechniques, 14(2), 238-243.

PLATEAU E. (1989) African Horse Sickness in Spain. Epidémiologie et santé animale, 16, 95-102.

PRASAD B.V.V., YAMAGUCHI S. and ROY P. (1992) Three dimensional structure of single shelled BTV. J. Virol., 66, 2135-2142.

PURDY M, PETRE J. and ROY P. (1984) Cloning the bluetongue virus L3 gene. J. Virol., 51, 754-759.

PURDY M.A, GHIASI H., RAO C.D., ROY P. (1985) Complete sequence of bluetongue virus L2 RNA that codes for the antigen recognized by neutralizing antibodies. *J. Virology*, 55, 826-830.

RANZ A.I., MIGUET J.G., ANAYA C., VENTEO A., CORTES E., VELA C. and SANZ A. (1992) Diagnostic methods for african horsesickness virus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Vet. Microbiol.*, 33, 143-153.

RAWLINGS P., MELLOR P.S. (1994) African Horse Sickness and the overwintering of *Culicoïdes spp.* in the Iberian peninsula. *Rev. Sci. Techn. Off. Int. Epiz.*, 13 (3), 753-761.

REED L.J., MUENCH H. (1938) Simple method of estimating 50 percent end points. *Am. J. Hyg.*, 27, 493.

RODRIGUEZ M., HOOGHUIS H., CASTANO M. (1993) Current status of the diagnosis and control of African horse sickness. *Vet. Res.*, 24, 189-197.

ROY P. (1989) Bluetongue virus genetics and genome structure. Review article. *Virus Research*, 13, 179-206.

ROY P. (1992a) Bluetongue virus proteins. *J. Gen. Virology*, 73, 3051-3064.

ROY P. (1992b) From genes to complex structures of bluetongue and their efficacy as vaccines. *Vet. Microbiol.*, 33, 155-168.

ROY P. and GORMAN B.M. (1990) Bluetongue virus. Current topics in Microbiology and Immunology. Heidelberg : Springer-Verlag, vol 162, 200 p

ROY P., FUKUSHO A., RITTER D.G., LYONS D. (1988) Evidence for genetic relationships between RNA and DNA viruses from the sequence homology of a putative polymerase gene of bluetongue virus with that of vaccinia virus : conservation of RNA polymerase genes from diverse species. *Nucleic Acids Res.*, 16, 11759-11767.

ROY P., HIRASAWA T., FERNANDEZ M., BLINOV V.M., SANCHEZ-VIXCAINO R. (1991) The complete sequence of the group-specific antigen, VP7, of African horsesickness disease serotype 4 reveals a close relationship to bluetongue virus. *J. Gen.Virol.*, 72, 1237-1241.

ROY P., MARSHALL J.J.A. and FRENCH T.J. (1990) Structure of Bluetongue virus genome and its encoded proteins. *Current topics in Microbiology and Immunology*. Heidelberg : Springer-Verlag, vol 162, 200 p, 43-87.

ROY P., MERTENS P.P.C. and CASAL I. (1994) African horse sickness virus structure. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 17, 314-273.

SABIN A.B. (1959) Reoviruses. *Science*, 130, 1387-1389.

SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., EHRLICH H.A. and ARNHEIM N. (1985) Enzymatic amplification of β globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. *Science*, 230, 1350-1354.

SAKAMOTO K., MIZUKOSHI N., APIWATNAKORN B., IWATA A., TSUCHIYA T., UEDA S., IMAGAWA H., SUGIURA T., KAMADA M. and FUKUSHO A. (1994a) The complete sequences of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) RNA segment 2 and 6 which encode outer capsid protein. *J. Vet. Med. Sci.*, 56(2), 321-327.

SAKAMOTO K., PUNYAHOTRA R., MIZUKOSHI N., UEDA S., IMAGAWA H., SUGIURA T., KAMADA M. and FUKUSHO A. (1994b) Rapid detection of African horsesickness by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using the amplicon for segment 3 (VP3 gene). *Arch. Virol.*, 136, 87-97.

SANGER F., NICKLEMM S. and COUSON A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.

SELLERS R.F., MELLOR P.S. (1993) Temperature and the persistence of viruses in *Culicoides spp.* during adverse conditions. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 12 (3), 733-755.

SELLNER L.N., COELLEN R.J., and MACKENZIE J.S. (1992) Reverse-transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucl. Acids Res.*, 20, 1487-1490.

SKOWRONEK A.J., LAFRANCO L., STONE-MARSCHAT M.A., BURRAGE T.G., REBAR A.H. and LAEGREID W.W. (1995) Clinical pathology and hemostatic abnormalities in experimental African horsesickness. *Vet. Pathol.*, 32, 112-121.

SOUTHERN E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.

STONE-MARSCHAT M., CARVILLE A., SKOWRONEK A., LAEGREID W. W. (1994) Detection of African Horse Sickness Virus by Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 697-700.

TESSLER J. (1972) Detection of African Horse Sickness viral antigens in tissues by immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med.*, 36, 167-169.

THEILER A. (1908) The immunization of mules with polyvalent serum and virus. In : Transvaal Dept. Agric. Rept. Govt. Vet. Bacteriol, 1906-1907, 192-213.

THEILER A. (1910) The susceptibility of the dog to African horse sickness. *J. Comp. Path. Therap.*, 23, 315-325.

THEILER A. (1930) African horse sickness. In : A system of bacteriology in relation to medicine, 7, 362-375, London, H. M. S. O.

THERON J., UITENWEERDE J.M., HUISMANS H. and NEL L.H. (1994) Comparison of the expression and phosphorylation of the non-structural protein NS2 of three different orbiviruses : evidence for the involvement of an ubiquitous cellular kinase. *J. Gen.Virol.*, 75, 3401- 3411.

THOMAS C.P., BOOTH T.F. and ROY P. (1990) Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells : it binds the single-stranded RNA species. *J. Gen. Virol.*, 71, 2073-2083.

TRAVASSOS da ROSA A. P., TESH R.B., PINHEIRO F.P., TRAVASSOS da ROSA J.F., PERALTA P.H. and KNUDSON D.L. (1984) Characterization of the Changuinola serogroup viruses (*Reoviridae* : Orbivirus), Intervirology, 21, 38.

TYLER K. and FIELDS B. (1990) Virology, Second edition, edited by FIELDS B.N. Raven Press. Ltd., New York, 1271-1327.

URBANO P. and URBANO F.G. (1994) The *Reoviridae* family. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 17 (3/4), 157-161.

VAN STADEN V. and HUISMANS H. (1991) A comparison of the genes which encode non-structural protein NS3 of different orbiviruses. J. Gen. Virol., 72, 1073-1090.

VAN STADEN V., STOLTZ M.A. and HUISMANS H. (1995) Expression of nonstructural protein NS3 of African horsesickness virus (AHSV) : evidence for a cytotoxic effect of NS3 in insect cells and characterization of the gene products in AHSV infected Vero cells. Arch. Virol., 140, 289-306.

VAN STADEN V., THERON J., GREYLING B.J., HUISMANS H., NEL L.H. (1991) A comparison of the nucleotide sequences of cognate NS2 genes of three different orbiviruses. Virology, 185, 500-504.

VAN WYNGAARDT W., DU PLESSIS D.H., VAN WYNGAARDT S. and VERSCHOOR J.A. (1992) Production and properties of monoclonal antibodies against African horse sickness virus serotype 3. Onderstepoort J. Vet.Res., 59, 129-133.

VENTER G.J., WILLIAMS R. and NEVILL E.M. (1992) The value of donkeys as sentinels for African horse sickness. In : Bluetongue, African Horse sickness and related Orbiviruses. Edited by Walton T.E. and Osburn B.I., 825-831.

VERWOERD D. and HUISMANS H. (1969) On the relationship between Bluetongue, African Horsesickness and Reovirus : hybridization studies. Onderstepoort J. Vet. Res., 36 (2), 175-180.

VERWOERD D.W. (1970) Diplornaviruses : a newly recognised group of double-stranded RNA-viruses. Progress in Medical Virology, Karger & Co, Basel, 12, 5.

VILJOEN G. J., HUISMANS H. (1989) The characterization of equine encephalosis virus and the development of genomic probes. J. Gen. Virol., 70, 2007-2015.

VON HEIJNE G.A. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acids Res., 14, 4683-4690.

VREEDE F.T., HUISMANS H. (1994) Cloning, characterization and expression of the gene that encodes the major neutralization-specific antigen of African horsesickness virus serotype 3. J. Gen. Virol, 75, 3629-3633.

WADE EVANS A., MARCHI P.R., BURROUGHS J.N., MELLOR P.S., MERTENS P.P.C. and RAWLINGS P. (1995) Infectivity of African Horse Sickness virus in *Culicoides* is enhanced by proteolytic cleavage of VP2 by serum proteases. Proceedings of the Fifth international symposium on ds-RNA viruses, 19 au 23 mars, Djerba, Tunisie.

WADE EVANS A., MERTENS P., BOSTOCK C. J. (1990) Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. J. Virol. Methods, 30, 15-24.

WADE EVANS A.M, WOOLHOUSE T., O'HARA R. and HAMBLIN C. (1993) The use of African horse sickness virus VP7 antigen synthesised in bacteria and anti-VP7 monoclonal antibodies in a competitive ELISA. J. Virol. Methods, 45, 179-188.

WALTON T.E., OSBURN B.I. (1992) Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses, 1992. Proceedings of the Second International Symposium. Edited by Walton T.E., Osburn B.I.

WANG J.T., WANG T.H., SHEU J.C., LIN S.M., LIN J.T., and CHEN D.S. (1992) Effects of anticoagulants and storage of blood samples on efficacy of the polymerase chain reaction assay for hepatitis C virus. J. Clin. Microbiol., 30, 750-753.

WILLIAMS R. (1987) A single dilution enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of antibodies to African horsesickness virus. Onderstepoort J. Vet. Res., 54, 67-70.

WILLIAMS R., DU PLESSIS D.H., VAN WYNGAARDT W. (1993) Group-reactive ELISAs for detecting antibodies to African horsesickness and equine encephalosis viruses in horse, donkey and zebra sera. J. Vet. Diagn. Invest., 5, 3-7.

WU X., CHEN S.Y., IWATA H., COMPANS R. and ROY P. (1992) Multiple glycoproteins synthesized by the smallest RNA segment (S10) of Bluetongue virus. J. Virology, 66(12), 7104-7112.

YU Y., FUKUSHO A. and ROY P. (1987) Nucleotide sequence of the VP4 core protein gene (M4 RNA) of US bluetongue virus serotype 10. Nucleic Acids Res., 15, 7206.

YU Y., FUKUSHO A., RITTER D.G. and ROY P. (1988) Complete nucleotide sequence of the group-reactive antigen VP7 gene of bluetongue virus. Nucleic Acids Res., 16, 1620.



PRINCIPALES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications internationales

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S., CRUCIERE C. 1993. Diagnosis and molecular epidemiology of the African horse sickness virus by the polymerase chain reaction and restriction patterns. *Veterinary Research*, 24 (5), 385-393.

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S., CRUCIERE C. 1993. Diagnosis of the African horse sickness virus serotype 4 by one-tube, one-manipulation RT-PCR reaction from infected organs. *J.Virol.Methods*, 46 (2), 179 - 188.

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S., WADE-EVANS A. and CRUCIERE C. 1995. Application of the polymerase chain reaction to the detection of African Horse sickness viruses. *J. Virol. Methods*, 53,47-54.

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. and CRUCIERE C. 1995. Differentiation of African horse sickness viruses by polymerase chain reaction and segments 10 restriction patterns. *Vet. Microbiol.*, sous presse.

MOULAY S., ZIENTARA S., SAILLEAU C. and CRUCIERE C. 1995. Detection of African Horsesickness viruses by dot blot hybridization using a digoxigenin labelled probe. *Mol. Cell. Probes*, 9, 233-237.

Publications nationales et actes de colloque

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. 1994. Utilisation de l'amplification en chaîne par polymérase pour la détection du virus de la peste équine. *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. 11èmes journées scientifiques du Réseau Biotechnologies animales de l'UREF (Université des réseaux d'expression française). Editions John Libbey Eurotext, 189 -197.*

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. 1994. La détection du virus de la peste équine par utilisation de l'amplification en chaîne par polymérase. *Pratique Vétérinaire Equine*, 26 (1), 9-14.

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. 1994. Evolution des méthodes de diagnostic du virus de la peste équine. *Compte-rendu des XXèmes journées de la Recherche Chevaline, CEREOPA, Paris, 58 - 68.*

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. and CRUCIERE C. 1994. Utilisation de l'amplification en chaîne par polymérase pour la détection du virus de la peste équine. *Résumés et conclusions de la conférence scientifique de l'Office International des Epizooties à Gaborone (Botswana) du 20 au 23 avril 1994, 49.*

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. and CRUCIERE C. 1994. Development of the polymerase chain reaction for the detection of African horse sickness viruses. Proceedings of the Seventh International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo, 8 au 11 juin 1994. Edited by Nakajima H. and Plowright W., 297-298.

HAMBLIN C., CRUCIERE C., CUBILLO M.A., DIAZ-LAVIADA M., HOOGHUIS H., MERTENS P.P.C., PLATEAU E., RUBIO C., SANCHEZ-VIZCAINO J.M., WADE-EVANS A. and ZIENTARA S. 1995. African horse sickness in Europe : Development and validation of diagnostic assays. Proceedings of the Seventh International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo, 8 au 11 juin 1994. Edited by Nakajima H. and Plowright W., 328.

Communications internationales

ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. and CRUCIERE C. The polymerase chain reaction for the diagnosis of the African horse sickness virus. Communication affichée, IX International Congress of Viruses, Glasgow, 8-13 août 1993.

ZIENTARA S. The polymerase chain reaction for the diagnosis of the African horse sickness virus. Communication orale, Congrès Scientifique International de l'OIE sur la lutte contre la fièvre aphteuse, la peste équine et la péripneumonie contagieuse bovine, Gaborone (Botswana), 20-23 avril 1994.

ZIENTARA S. Detection of African Horsesickness virus in the blood of inoculated donkeys and mules by RT-PCR. Communication affichée, Vème Symposium International sur les virus à ARN double brin, Djerba, Tunisie, 19-23 mars 1995.

ZIENTARA S. New advances in African Horse Sickness. Communication orale, Virus Assembly Symposium, Marrakech, 13 avril 1995.

Communications nationales

ZIENTARA S. Le diagnostic direct par PCR du virus AHSV. Communication affichée, Congrès de l'Association Vétérinaire Equine Française, Bordeaux, 8 et 9 décembre 1993.



Nom, Prénom : ZIENTARA Stéphan

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le - 1 OCT. 1995 n° 341

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



RESUME

L'agent responsable de la peste équine est un virus appartenant au genre *Orbivirus* de la famille des *Reoviridae*. Son génome est constitué de dix segments d'ARN double brin.

Nous avons développé un test couplé de transcription-inverse et d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) permettant la détection du virus équine à partir d'échantillons cliniques. Les neuf sérotypes viraux connus de AHSV pouvant être détectés, cette méthode peut être utilisée pour un diagnostic de groupe.

La spécificité de la RT-PCR a été vérifiée vis à vis des virus les plus couramment rencontrés chez les équidés ainsi que vis à vis d'autres *Orbivirus* tels que les 24 sérotypes du virus de la bluetongue (BTV) et les sérotypes 1, 2, 3, 4 et 7 du virus de la maladie hémorragique du cerf (EHDV). L'étude du polymorphisme de restriction des segments S7 et S10 amplifiés a permis de mettre en évidence des variations inter-sérotypes permettant une différenciation partielle des sérotypes entre eux. La RT-PCR complétée par l'analyse des profils de restriction se révèle être un outil intéressant pour le suivi génotypique des souches virales. L'utilisation d'une sonde moléculaire, synthétisée par PCR, a permis de vérifier la spécificité de produits amplifiés de faible concentration et la PCR nichée ou "nested-PCR" d'améliorer à la fois la spécificité et la sensibilité de la détection du virus équine.

La détection par RT-PCR de l'ARN viral a permis d'estimer la durée de la virémie chez le cheval mais surtout chez les ânes et les mulets dont le rôle dans l'épidémiologie de la maladie est peu connu.

Les séquences nucléotidiques des segments S10 (qui codent pour les protéines NS3/NS3A) des virus de sérotype 4, souche vaccinale (USDA) et souche sauvage isolée au Maroc en 1990, ont été déterminées et comparées avec les séquences des gènes S10 des virus de sérotypes -1, -3, -4 (souche espagnole), -8 et -9 afin d'étudier les variations génétiques entre ces gènes homologues de virus de différents sérotypes. Les parentés génétiques entre les souches AHSV(-1 et -8) et AHSV(-4 et -9) ont été confirmées. La comparaison des séquences en acides aminés des produits de traduction des gènes S10 des souches virulentes et vaccinales a permis d'identifier des mutations susceptibles de modifier la fonction biologique de la protéine NS3 qui serait impliquée dans le déterminisme de la virulence.

MOTS CLES

Amplification génique - Clonage - Epidémiologie - Hybridation moléculaire
- Peste équine - Séquençage - Polymorphisme de restriction -