

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 741 631**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **95 14064**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 5/10, 15/86, 15/85, 15/35, 1/00, C 12 P 21/02,  
A 61 K 48/00, G 01 N 33/68, 33/53, C 07 K 14/01

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 23.11.95.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 30.05.97 Bulletin 97/22.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : CNEVA LABORATOIRE CENTRAL  
DE RECHERCHES AVICOLE ET PORCINE — FR.

⑦2 Inventeur(s) : LE GALL RECULE GHISLAINE,  
JESTIN VÉRONIQUE, CHAGNAUD PATRICE et  
JESTIN ANDRE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire :

⑤4 ADN RECOMBINANT CODANT POUR LES PROTEINES DE CAPSIDE DU PARVOVIRUS DU CANARD.

⑤7 Sous un premier aspect, l'invention réside dans des  
molécules d'ADN recombinant comprenant les séquences  
d'ADN codant pour les protéines VP2 et VP3 du parvovirus  
du canard, ou de fragments ou des dérivés de ces séquen-  
ces codant pour des polypeptides pouvant induire une ré-  
ponse immunitaire.

Selon un deuxième aspect, l'invention concerne les mo-  
lécules d'ADN recombinant nu ou constituant un vecteur  
d'expression ou un microorganisme ou une cellule ainsi  
transformés.

Sous d'autres aspects, la présente invention comprend  
les protéines de capsid VP2 et VP3 préparées par génie  
génétiq.

Les produits mentionnés et les préparations les conte-  
nant trouvent des applications comme vaccins, sérums et  
réactifs de diagnostic.

FR 2 741 631 - A1



### ***Domaine de l'invention***

La présente invention concerne des séquences d'ADN, les molécules d'ADN recombinant et les procédés pour la production des ADN recombinants et des protéines de capsid du parvovirus du canard ou de polypeptides équivalents, les produits obtenus et les préparations les contenant, plus particulièrement pour des buts de diagnostic, de vaccination, d'immunothérapie ou de thérapie génique.

### ***Arrière-plan technologique***

Le parvovirus du canard DPV est l'agent causal (Jestin, 1990, Fournier, 1991, Jestin et coll., 1991) d'une maladie apparue en France en 1988-1989 (Jestin, 1990, Drouin et coll., 1991), dénommée successivement "syndrome de malabsorption, mortalité, déplumement, reptation : SMMDR", puis "maladie de Derzsy", en raison d'une part des nombreuses analogies avec cette maladie décrite depuis 1964-1965 chez l'oie (Derzsy, 1967) et depuis 1972 chez le canard (Gaudry et Tetkoff, 1973) et d'autre part de l'importance des communautés antigéniques entre le parvovirus de la maladie de Derzsy dénommé parvovirus de l'oie (GPV) et le parvovirus de canard. (Jestin, 1990, Jestin et coll., 1991), enfin désignée "parvovirose du canard" pour insister sur les critères la différenciant de la maladie de Derzsy. En effet, l'évolution de ces deux maladies est liée à la fois à l'âge où les animaux la contractent et à leur immunité : les canetons de moins de 2 semaines sans immunité ou présentant une immunité médiocre sont pleinement sensibles et manifestent une forme aiguë conduisant à une mortalité élevée, alors que les animaux plus âgés présentent, selon les différentes combinaisons des 2 paramètres précités, tout un gradient de manifestations plus ou moins sévères allant de la forme chronique caractérisée par de la prostration, un arrêt de croissance, des défauts d'emplumement, une mortalité plus ou moins faible, à l'absence de symptômes en passant par une seule perte de poids (Coudert et coll., 1972, Coudert et coll., 1973, Jestin, 1990, Jestin et coll., 1993).

Mais la parvovirose diffère de la maladie de Derzsy par le fait qu'elle ne touche pas l'oie (Fournier, 1991) et qu'elle induit des manifestations nerveuses d'une part (Plassiart, 1991), des formes aiguës d'une sévérité accrue d'autre part (Jestin, 1990, Fournier, 1991, Jestin et coll., 1991). De plus le parvovirus du canard présente quelques différences antigéniques avec le GPV et son niveau de réplication en culture et dans les organes est beaucoup plus élevé (Fournier, 1991, Jestin et coll., 1991, Jestin et coll., 1995a).

Pour prévenir la parvovirose du canard, des moyens de prophylaxie médicale ont été mis en place sur le terrain. Ils consistent à administrer par voie sous-cutanée au caneton d'1 jour un vaccin associant extemporanément une valence correspondant au virus atténué GPV et une valence correspondant au virus inactivé DPV en adjuvant aqueux. La même intervention est réalisée entre 14 et 21 jours d'âge (préférentiellement à 14 jours) (Recommandations du fabricant). Par ailleurs, afin que le caneton bénéficie d'une immunité maternelle dans les premiers jours de sa vie, les reproducteurs reçoivent un rappel avant l'entrée en ponte consistant en l'administration par voie sous-cutanée d'un vaccin bivalent (associant les valences GPV et DPV) en adjuvant huileux (Fournier et Gaudry, 1992, Jestin et coll., 1992, Jestin et

coll., 1993). Bien que ce protocole vise à procurer une immunité maternelle protégeant le caneton dans sa première semaine de vie et à l'immuniser activement en relais, la qualité de la protection apportée aux canetons de 2 à 3 semaines est incertaine (Jestin et coll., 1993). De plus l'immunité acquise peut ne pas se maintenir à un niveau suffisant pendant toute la période de réceptivité du caneton qui est d'environ 35 jours (Jestin et Coll., 1993). Ces failles peuvent expliquer les formes chroniques qui sont toujours observées sur le terrain dans un certain nombre de cas et qui sont responsables de pertes économiques (Balloy, 1995).

Il y a donc besoin d'améliorer la stratégie vaccinale. Le recours aux techniques de génie génétique peut apporter une solution à condition de disposer de données sur la structure moléculaire de ce virus. Une étude biochimique et génomique de ce virus réalisée récemment (Le Gall - Reculé et Jestin, 1994) apporte les éléments suivants.

Le virus DPV est classé dans les parvovirus autonomes ; il a une taille de 22-23 nm et une densité de 1.39 à 1.42 en CsCl. Les particules virales sont constituées de 3 protéines de capsid de 91, 78 et 58 kDa en SDS-PAGE et d'un ADN simple brin de 5 300 bases présentant des extrémités palindromiques en forme d'épingles à cheveux. La moitié des virions présentent un brin d'ADN de polarité positive, l'autre moitié un brin d'ADN de polarité négative. Une carte de restriction du génome a été aussi établie.

Alors que le génome de la plupart des parvovirus de mammifères a été séquencé, il n'existe aucune publication concernant la séquence nucléotidique du parvovirus du canard. Cette absence de données bloque toute mise au point de molécules d'ADN recombinantes comprenant des séquences codant pour des protéines immunogènes à intérêt diagnostique et vaccinal.

#### ***Résumé de l'invention***

Sous un premier aspect, l'invention réside dans des molécules d'ADN recombinant comprenant les séquences d'ADN codant pour les protéines VP2 et VP3 du parvovirus du canard, ou de fragments ou des dérivés de ces séquences codant pour des polypeptides pouvant induire une réponse immunitaire.

Selon un deuxième aspect, l'invention concerne les molécules d'ADN recombinant nu ou constituant un vecteur d'expression ou un microorganisme ou une cellule ainsi transformés.

Sous d'autres aspects, la présente invention comprend les protéines de capsid VP2 et VP3 préparées par génie génétique.

Les produits mentionnés et les préparations les contenant trouvent des applications comme vaccins, sérums et réactifs de diagnostic.

#### ***Description des figures et des tableaux***

Figure 1 : Stratégie de clonage de fragments d'ADN bicaténaire du virus DPV dans le vecteur pBluescript (pBS SK). Le clone pDPV2 a été construit par ligation du fragment de 2950 bp généré par la digestion de l'ADN du DPV par *Bgl*III, dans le pBS SK digéré par *Bam*HI et *Eco*RV. Les abréviations utilisées pour désigner les sites de restriction sont : BH, *Bam*HI ; B, *Bgl*III ; E, *Eco*RV ; H ; *Hind*III ; K, *Kpn*I.

- Figure 2 : Séquence nucléotidique de la partie d'intérêt du fragment cloné du génome du DPV. Ce fragment inclut la totalité de la fenêtre de lecture droite. La séquence en acides aminés déduite pour le premier cadre de lecture est indiquée sous la séquence nucléotidique. Le codon d'initiation de la VP2 (ACG) est en position 670, celui de la VP3 (ATG) est en position 829.
- 5 Le premier codon stop (TAA) se termine au nucléotide 2433.

Figure 3 : Organisation du génome (brin de polarité positive) dans les 3 cadres de lecture, dans la portion correspondant environ aux unités 44 à 91 de la carte de restriction.

Figure 4 : Alignement des séquences en acides aminés des protéines de capsidie du DPV et de parvovirus de mammifères.

- 10 Les séquences suivantes étaient disponibles dans la banque de données SWISS-PROT 26 (08-93) :
- COAT PAVBO (Parvovirus bovin BPV, souche non mentionnée)  
 COAT PAVHB (Parvovirus humain B19, souche AU)  
 COAT ADVG (Parvovirus de la maladie aléoutienne du vison ADV, souche G)
- 15 COAT PAVPN (Parvovirus porcin PPV, souche NADL-2)  
 COAT PAVC7 (Parvovirus canin CPV, souche 780929)  
 COAT MUMIV (Parvovirus murin MVM, souche prototype)
- Les références de la séquence AAV2 utilisée sont mentionnées dans la description détaillée de l'invention, en matériel et méthode.
- 20 Les séquences ADV-G, MVM (p) ont été modifiées comme décrit en matériel et méthode. Les acides aminés figurant en caractères gras montrent une identité avec ceux du DPV. Les motifs d'aa très conservés au sein des parvovirus sont encadrés, de même que la région riche en glycine chez les parvovirus des mammifères.

- Figure 5 : Alignement de la séquence en acides aminés des protéines de capsidie du DPV et du parvovirus de l'oie
- 25 Ce dernier représenté sous l'abréviation "GOOSEPAR", correspond à la souche SHM 319 (ATCC). La séquence prise en compte est celle publiée par Brown et coll.(1995), arrêtée à l'acide aminé 674. Celui-ci précède un signal d'arrêt dont l'existence est remise en cause par ces mêmes auteurs. La séquence du DPV est désignée dans cette figure sous l'abréviation
- 30 "DPV1P".

- Figure 6 : Analyse par Western-blot des protéines recombinantes de DPV à l'aide d'un antisérum spécifique du DPV
- A) Lysat total de cellules Sf9 infectées par le baculovirus sauvage AcMNPV (ligne 2) et le baculovirus recombinant AcDPV114 (ligne 3) ; marqueur de poids moléculaire (ligne 1)
- 35 B) Virions purifiés sur gradient de CsCl (ligne 2) ; marqueur de poids moléculaire (ligne 1).

Figure 7 : Etude en immunofluorescence : (A) de cellules Sf9 infectées par le baculovirus recombinant (AcDPV114), (B) de cellules infectées par du baculovirus sauvage (AcMNPV).

- Figure 8 : Morphologie en microscopie électronique des capsides vides recombinantes de DPV (A) et des particules virales de DPV purifiées sur gradient de chlorure de césium (B).
- 40 L'échelle représente 100 nm.

Tableau 1 : Anticorps spécifiques du DPV chez des canards inoculés avec le baculovirus recombinant (AcDPV114) en adjuvant huileux.

Il n'a pas été détecté d'anticorps, que ce soit par ELISA ou par séroneutralisation (SN), chez les canards ayant reçu le baculovirus sauvage en adjuvant huileux.

Les canards contact ne présentaient pas d'anticorps ELISA (SN non réalisée).

Il n'a pas été retrouvé d'anticorps ELISA (SN non réalisée) lors du contrôle pratiqué juste avant la 1ère inoculation (contrôle A).

(1) moyenne d'au moins 3 répétitions ; (écart-type).

(2) moyenne statistique de 3 répétitions exprimée en log<sub>2</sub> par la méthode de Spearman-Kärber (Finney, 1964).

(3) cet individu a reçu 1/5, 1/4 et 3/4 de la dose reçue par les autres sujets, respectivement à la 1ère, 2 de et 3ème inoculation.

B, C, D = contrôles réalisés respectivement juste avant la 3ème inoculation ; puis 2 et 3 semaines après.

15 Tableau 2 : Anticorps spécifiques du DPV chez des canards vaccinés avec le vaccin Parvol.

Il n'a pas été retrouvé d'anticorps juste avant la 1ère inoculation (contrôle A).

B, C, D : contrôles réalisés juste avant le rappel, puis 2 et 3 semaines après.

SN : séroneutralisation (résultats exprimés en log<sub>2</sub>)

m : moyenne de 12 résultats individuels.

## 20 Description détaillée de l'invention

### Matériel et méthode

La souche 89384 de parvovirus du canard (DPV) a été isolée par Jestin et coll.(1991) à partir d'un mélange de foie, rate, coeur provenant de canards de Barbarie atteints de parvovirose. Le virus a été purifié sur gradient de CsCl et l'ADN viral extrait comme décrit par Le Gall - Reculé et Jestin(1994). L'ADN ainsi obtenu était bicaténaire en raison du réappariement des brins positifs et négatifs (Le Gall-Reculé et Jestin, 1994).

### *Clonage moléculaire du gène codant pour les protéines de capsid du parvovirus*

Pour obtenir les clones pDPV2 (figure 1) contenant le gène entier codant pour les protéines de capsid de DPV, les extrémités de l'ADN bicaténaire réhybridé comme mentionné, ont été réparées avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase de *E. coli* comme décrit antérieurement (Le Gall - Reculé et Jestin, 1994), puis l'ADN a été digéré avec la mung bean nucléase pour obtenir des extrémités à bouts francs. Cet ADN ainsi préparé a été digéré avec *Bgl*III (en raison de l'existence d'un site de restriction situé en position 44 de la carte de restriction établie par Le Gall - Reculé et Jestin, 1994). Le fragment résultant de 2 950 bp de l'ADN du DPV, a été cloné dans le vecteur pBluescript préalablement digéré avec *Bam*HI et *Eco*RV. La ligation a été réalisée à 16° C pendant la nuit.

Des bactéries XL1-Blue rendues compétentes ont été transformées avec les plasmides selon le protocole de Sambrook et coll. (1989). L'ADN des plasmides recombinants a été extrait selon la méthode de lyse par ébullition (Sambrook et coll., 1989) et identifié par électrophorèse sur gel d'agarose après digestion avec les enzymes *KpnI*, *BstXI*, *EcoRI*, selon la  
5 carte de restriction établie antérieurement (le Gall - Reculé et Jestin, 1994), de manière à sélectionner les fragments d'ADN les plus longs.

#### *Séquençage de l'ADN codant pour les protéines de capsid*

La séquence nucléotidique des 2 brins a été déterminée par la méthode de Sanger et coll. (1977), appliquée à des matrices plasmidiques circulaires fermées double brin. Une  
10 amorce universelle M13-20, puis des oligonucléotides de synthèse, complémentaires de la séquence du DPV, ont été utilisés. Certaines portions de la séquence ont été confirmées ultérieurement à l'aide d'un séquenceur automatique d'ADN.

#### *Analyse des séquences*

La séquence protéique du DPV, déduite de la séquence nucléique présentée en figure 2,  
15 a été alignée avec 7 séquences de parvovirus de mammifères (Fig 4). Celles-ci provenaient de la banque de données SWISS-PROT Release 26 (08/93) actualisée en fonction de la bibliographie. Ainsi les séquences des parvovirus de la maladie aléoutienne du vison (ADV) et du virus MVM ont été modifiées de manière à prendre en compte les processus d'épissage décrits respectivement par Alexandersen et coll.(1988) ; Astell et coll.(1986). En ce qui  
20 concerne le virus AAV2, la séquence entière du gène codant pour les trois protéines de capsid a été traduite après l'avoir modifiée en fonction des corrections apportées par Cassinotti et coll.(1988), Trempe et Carter (1988), Ruffing et coll.(1994).

Les séquences des parvovirus du chat (FPV), du raton laveur (RPV), de l'entérite du vison (MEV), n'ont pas été prises en compte dans l'alignement car elles montrent une homologie de  
25 plus de 98 % avec le parvovirus canin (CPV) inclus dans l'étude, sur la portion de génome codant pour les protéines de capsid (Parrish et coll., 1988). De même le parvovirus (Lu III), le parvovirus du hamster (H1) n'ont pas été intégrés car ils présentent 80 % d'homologies de séquence avec le parvovirus de la souris (MVM) pris en compte dans l'alignement (Diffoot et coll., 1993).

30 De plus, pendant le temps de rédaction de ce brevet, la séquence partielle du gène codant pour les protéines de capsid d'un parvovirus de l'oie (souche SHM 319 provenant de l'ATCC), a été publiée (Brown et coll., 1995). C'est pourquoi un alignement des séquences en acides aminés du DPV et du parvovirus de l'oie a été réalisé séparément (figure 5).

#### *Construction d'un plasmide recombinant navette*

35 Le gène codant pour les protéines VP2 et VP3 a été amplifié par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant comme matrice d'ADN, le plasmide purifié pDPV2 décrit précédemment et comme amorces, l' oligonucléotide 5'CCCCATGGATGGC TCCTGCTAA3' et l'oligonucléotide reverse 5'CCCCATGGAAAATCAAAGAA3'.

Ces oligonucléotides correspondaient dans leur partie soulignée spécifique du virus DPV, aux nucléotides 670 à 683 et 2455 à 2443 selon la numérotation de la fig 2. Ce procédé a permis de muter le codon ACG d'initiation de la traduction de la VP2 en un codon ATG et d'introduire un site de restriction *NcoI* utile pour le clonage ultérieur. L'amplification a été réalisée selon les conditions détaillées par Jestin et coll. (1995) à la différence qu'après l'étape de dénaturation de 5 minutes à 95° C, il a été effectué 5 cycles de 20 s à 95° C, 30 s à 50° C, 30 s à 75° C, puis 30 cycles supplémentaires de 20 s à 95° C, 30 s à 55,5 ° C et 30 s à 75° C. L'étape d'élongation finale était de 6 min à 75° C. L'ADN amplifié ayant la taille attendue sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium, a été élué, digéré par *NcoI* et cloné au niveau du site *NcoI* du plasmide navette pGmAc3MR (donné par G. Devauchelle : INRA, CNRS UA N84, St Christol - les Alès, France) préalablement déphosphorylé. Les plasmides recombinants possédant un seul insert dans l'orientation correcte ont été sélectionnés après analyse de leurs sites de restriction. Un des plasmides recombinants, dénommé p114, a été retenu après que sa séquence nucléotidique ait été vérifiée à l'aide d'un séquenceur automatique d'ADN.

#### 15 *Cotransfection et identification des baculovirus recombinants*

Les modalités utilisées ont été adaptées du procédé décrit par Summers et Smith, 1987. 500 ng de l'ADN purifié du baculovirus sauvage d'*Autographa californica* (AcMNPV) et 5 µg de l'ADN du plasmide recombinant p114 ont été mélangés avec 1,5 ml de milieu de culture TC 100 et laissés en contact pendant 1h. 40 µl de réactif de transfection DOTAP : N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium méthylsulfate dilués dans 1,5 ml de milieu de culture, ont été ensuite ajoutés au mélange précédent et laissés en contact pendant 15 min à température ambiante. A l'issue de ce temps, cette préparation a servi à transfecter 2 x 10<sup>6</sup> cellules de la lignée cellulaire d'insecte *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9), préalablement maintenues 1h à température ambiante. Les cellules ont alors été incubées à 28° C pendant 6 h, puis le milieu de culture a été renouvelé avec du TC100 supplémenté avec 5 % de sérum de veau foetal. Les cellules ont été incubées pendant 5 jours supplémentaires. Après ce délai, les plages de cellules infectées par des baculovirus recombinants ont été sélectionnées sur la base de l'absence de polyèdre, puis purifiées 2 fois. La pureté des populations recombinantes a été vérifiée en examinant des tapis de cellules Sf9 infectées colorées au rouge neutre et en recherchant l'absence d'inclusions protéiques nucléaires. Les clones obtenus ont été amplifiés de manière à confirmer la présence de l'insert par analyse de leur carte de restriction. A cette fin, l'ADN des baculovirus sauvages et recombinants a été digéré avec *EcoRI* et les fragments générés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

#### *Expression et identification des protéines recombinantes de DPV*

35 Des cellules Sf9 ont été infectées à une m.o.i de 10 PFU/cellule avec les baculovirus recombinants ou sauvages. Les cellules ont été récoltées 48 ou 65 h après l'infection, lavées avec du PBS froid et mises au culot. Les protéines totales correspondant à 2 x 10<sup>5</sup> cellules mises au culot, ont été lysées par chauffage à 95° C pendant 5 min dans un tampon de dénaturation et soumises à une électrophorèse SDS-PAGE sur un gel à 10 %. En vue d'être

analysées par Western-Blot, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose qui a été ensuite bloquée pendant 30 min à température ambiante avec une solution de TBS (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.4), additionnée de 3 % de lait en poudre écrémé et de 0,05 % de tween 20. Un antisérum de canard, spécifique du parvovirus du canard et dilué au 1/100 dans la solution de blocage précitée renouvelée, a été ensuite incubé pendant une nuit à température ambiante avec la membrane ainsi traitée. Après 3 lavages en TBS, la membrane a été incubée avec un conjugué anti-immunoglobuline IgG(H + L) de canard marqué à la peroxydase et dilué au 1/200 en TBS. Après 3 nouveaux lavages, la membrane a été révélée avec une solution de TBS contenant 0,5 mg/ml de 4-chloro-1-naphtol, 17 % (v/v) méthanol et 0,015 % d'eau oxygénée.

#### *immunofluorescence indirecte*

2 x 10<sup>4</sup> cellules Sf9 infectées par les baculovirus sauvages ou recombinants et diluées dans un tampon PBS, ont été dispensées dans chacun des puits d'une lame spéciale pour immunofluorescence et séchées à l'air. Après fixation, les cellules ont été incubées pendant 1 h à 37 ° C soit avec un antisérum de canard spécifique des parvovirus du canard, soit avec un antisérum provenant de canards exempts d'organismes pathogènes spécifiés (E.O.P.S.). Chacun de ces sérums était dilué au 1/50 dans du Tris-HCl 20 mM, pH 8,6. Après lavage au PBS, les cellules ont été incubées pendant 1h à 37 ° C avec un sérum de lapin anti-immunoglobuline IgG (H + L) de canard marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine, dilué au 1/100 dans le Tris-HCl précédent additionné de 0,01 % de bleu d'Evans.

#### *Purification des particules vides de DPV et microscopie électronique*

Les cellules Sf9 infectées par les baculovirus recombinants comme précédemment mentionné, ont été lavées en PBS froid, suspendues dans un tampon Tris-HCl 10mM pH 8 contenant 1 % déoxycholate, 0,1 % SDS, 0,1 mM EDTA. Les cellules ont été alors incubées dans la glace pendant 30 min et centrifugées 12000 g, 10 min, à 4° C. Le surnageant obtenu a été déposé sur un double coussin de saccharose de respectivement 50 et 30 % (poids/vol) et ultracentrifugé à 100 000 g pendant 2 h à 4° C. L'interface a été ensuite diluée en PBS et centrifugée à 200 000 g pendant 2 h à 4° C.

Après reprise du culot en PBS et coloration à l'acide phosphotungstique, la préparation a été examinée au microscope électronique.

A titre de comparaison des virions de DPV sauvage, purifiés sur gradient de CsCl comme décrit antérieurement (Le Gall - Reculé et Jestin, 1994) ont été colorés et examinés de la même façon.

#### *Immunisation de canetons avec les baculovirus sauvages et recombinants*

Dix-neuf canards de Barbarie de 3 semaines d'âge, exempts d'organismes pathogènes spécifiés, ont été répartis en 3 groupes comme suit. Huit et cinq de ces canards appartenant aux 2 premiers groupes ont reçu 3 injections à 2 semaines d'intervalle de cellules Sf9 infectées respectivement soit avec un baculovirus recombinant (RB), soit avec du baculovirus sauvage (WB) et mélangés avec l'adjuvant P (adjuvant huileux inclus dans le vaccin Parvol Rhône Mérieux, France, contre la parvovirose du canard). Les cellules avaient été infectées à une

m.o.i de 15 à 30 PFU/cellule, récoltées 48 à 60 h après et lavées 3 fois dans du PBS froid. La réalisation de l'émulsion avec l'adjuvant était conforme aux recommandations du fabricant. Chaque injection était constituée de  $10^7$  cellules infectées adjuvées sous un volume de 1 ml. Les 6 canards restants constituaient le 3ème groupe et ont été placés en contact étroit avec les 5 canards précédents (CT).

Afin de vérifier l'absence d'anticorps spécifiques avant l'essai, des sérums ont été récoltés juste avant la première inoculation à partir de 10 canetons pris au hasard. Ensuite des sérums ont été récoltés à partir de chacun des canards avant la 3ème injection, puis 2 et 3 semaines après celle-ci, et traités par les tests ELISA et de séroneutralisation.

#### 10 *Immunisation de canetons avec le vaccin du commerce Parvol*

Douze canetons de Barbarie EOPS de 16 jours d'âge ont reçu par voie sous-cutanée 1 dose/0,3 ml du vaccin bivalent (associant la souche GM du parvovirus du canard avec la souche Hoekstra du parvovirus de l'oie), inactivé, en adjuvant huileux : Parvol (Rhône Merieux, France). Ils ont subi un rappel dans les mêmes conditions 4 semaines plus tard. Des 15 sérums ont été récoltés individuellement à partir des prises de sang pratiquées juste avant chacune des vaccinations, puis 2 et 3 semaines après le rappel. Ils ont été analysés selon les techniques ELISA et de séroneutralisation décrites ci-dessous.

#### *Test ELISA Parvovirus*

Le test de référence mis au point dans notre laboratoire et diffusé aux laboratoires de 20 diagnostic, a été utilisé (technique ELISA pour la détection des anticorps vis-à-vis des parvovirus du canard (virus de la maladie Derzsy inclus) : version mise à jour Septembre 1993, CNEVA Ploufragan). En bref, des plaques pour essai immunoenzymatique sont sensibilisées avec les antigènes positifs et négatifs du commerce ajustés aux dilutions recommandées dans un tampon carbonate pH 9,6. Une fois les sérums incubés, la présence d'anticorps liés à 25 l'antigène positif permet la fixation du conjugué à la peroxydase mentionné au paragraphe "Expression et identification des protéines recombinantes de DPV". La réaction est révélée par de l'orthophénylènediamine diluée dans un tampon phosphate/acide citrique pH5 classique, additionné de  $H_2O_2$ . Les résultats sont ajustés à une valeur de référence (= 0,880) du sérum positif qui est sa densité optique (DO) à 490 nm et exprimés sous la forme d'un rapport :

$$30 \quad \frac{DO \text{ échantillon} - 0,190}{0,880 - 0,190} \times 10$$

0,190 correspondant à la valeur du seuil de positivité.

Chacun des sérums mentionnés au paragraphe précédent a été testé au moins 3 fois.

#### 35 *Séroneutralisation*

Les sérums provenant des canards appartenant aux groupes RB et WB ont été traités. Après avoir été décomplémentés, ils ont été dilués de 1/4 en 1/4 à partir de la dilution initiale 1/10 dans du milieu Eagle modifié McPherson- Stocker BHK 21, supplémenté avec 2 % de 40 sérum de canard de Barbarie EOPS et d'antibiotiques. Ils ont été mélangés à raison de 75  $\mu$ l de chacune des dilutions de sérum répétées 3 fois, avec 32 DIC50 (dose infectieuse 50% en

culture cellulaire) de la souche de parvovirus (GM22 Rhône Mérieux - France) et incubés pendant 30 min., à 37° C. Ensuite, 150 µl d'une suspension cellulaire de fibroblastes d'embryon de canard de Barbarie EOPS ( $5 \times 10^5$  cellules/ml) dans le même milieu que précédemment, ont été ajoutés et incubés à 37° C avec 1% CO<sub>2</sub>.

- 5 Après 2 renouvellements des milieux de culture, 24 h et 5 jours après la mise en culture, les cellules ont été observées 8 jours après l'inoculation. Le titre de chaque sérum a été calculé selon la méthode de Spearman-Kärber (Finney, 1964).

## Résultats

### *Clonage et séquence du gène codant pour les protéines de capsid*

- 10 A partir du clone pDPV2, une séquence nucléotidique de 2487 nt a pu être établie sur les 2 brins. Elle est représentée dans la figure 2. Les fenêtres de lecture (ORF) de cette séquence sont indiquées sur la figure 3. Dans le premier cadre de lecture, une grande ORF est présente se situant entre les nucléotides 223 et 2430 et correspondant environ aux unités 48 à 90 de la carte de restriction déjà mentionnée, alors que dans le second cadre de lecture du  
15 même brin, il est mis en évidence une petite ORF entre les nucléotides 725 et 1414. En revanche, il n'a pas été trouvé d'ORF de taille significative (supérieure à 200 nt) sur le brin de polarité négative.

- En ce qui concerne la grande ORF, le premier codon ATG se situe au nucléotide 235 (ce qui correspond environ à l'unité 48 de la carte de restriction). Il apparaît être dans un  
20 contexte favorable pour initier la traduction (GCTATGT), selon la séquence consensus A/GCCATGG établie par Kozak (1986). Le codon ATG suivant se situe au nucléotide 829 (unité 60 environ de la carte de restriction), donc 594 nucléotides en aval du premier. Le deuxième codon est également placé dans un contexte favorable pour initier la traduction étant donné que 6 des 7 nucléotides (AACATGG) sont identiques à ceux de la séquence consensus  
25 de Kozak précipitée. Plus en aval encore, 11 autres codons ATG sont recensés. Entre les deux premiers codons ATG, un codon ACG est observé au nucléotide 670 (unité 57 environ de la carte de restriction).

- L'alignement de la séquence du DPV avec 8 séquences de parvovirus de mammifères, montre que l'homologie maximale (55,6 % d'acides aminés (aa) communs) existe avec la  
30 séquence de l'adeno-associated virus de type 2 (AAV2). Plusieurs régions sont apparues similaires, notamment une région de 29 aa (aa 270 à 298) et une autre de 18 aa (aa 391 à 408). Le pourcentage d'aa conservés avec les autres parvovirus est mentionné dans la figure 4. Les motifs d'acides aminés (PGY, NPY, TPW, et PIW) hautement conservés à la fois chez les parvovirus autonomes et les parvovirus défectifs (Chen et coll., 1986), sont retrouvés dans le  
35 DPV (Fig 4). La portion riche en glycine GGG, présente chez tous les parvovirus autonomes, n'a pas été trouvée chez le DPV. En revanche cette même région correspondant aux aa 205 à 218 du DPV présente la plus forte homologie avec l'AAV2.

L'alignement de la séquence protéique du DPV avec la séquence partielle du parvovirus de l'oie (GPV), révèle une homologie de 87.5% (figure 5). Plusieurs grandes régions sont similaires entre les 2 séquences (notamment dans des zones où chacune des séquences est très homologue avec l'AAV2). Mais l'extrémité aminée de la VP2 (acides aminés 174 à 188) 5 montre des différences importantes.

#### *Expression des protéines de capsid VP2 et VP3 du DPV*

Le gène codant pour la VP2 qui comporte le codon d'initiation de la traduction de la VP3, a été amplifié par PCR à partir du plasmide pDPV2 précité. L'amplifiat digéré par *NcoI* a été cloné avec succès dans le vecteur navette pGmAc3MR et le séquençage de l'insert d'un 10 plasmide recombinant (p114) ne montrait pas de différence par rapport à la séquence correspondante préalablement établie. Ce plasmide a donc été utilisé avec l'ADN du baculovirus sauvage AcMNPV pour cotransfecter des cellules Sf9. L'analyse du profil de restriction généré par *EcoRI* à partir de l'ADN de 3 baculovirus recombinants, a prouvé qu'un fragment de la taille attendue avait bien été inséré dans le gène de la polyédrine de chaque 15 baculovirus sauvage. L'un des 3 clones a été utilisé pour exprimer les protéines recombinantes et a été nommé AcDPV114.

L'analyse par Western-blot des protéines d'un extrait cellulaire total a montré 2 bandes d'intensité approximativement semblables qui correspondaient à 2 protéines exprimées et reconnues par le sérum spécifique anti-DPV (Fig. 6). Leur poids moléculaire relatif de 73 et 59 20 kDa correspondait à celui respectivement de la VP2 et de la VP3 du DPV établi par SDS-PAGE (Le Gall - Reculé et Jestin, 1994). Aucune bande de ces mêmes tailles n'a été observée à partir d'extraits cellulaires Sf9 infectés par le baculovirus sauvage.

L'immunofluorescence a confirmé l'expression des protéines par le baculovirus recombinant (AcDPV114) et a révélé une expression au moins transitoire dans le noyau (Fig. 25 7).

#### *Formation de capsides vides par le baculovirus recombinant*

L'observation en microscopie électronique par coloration négative, de préparations purifiées obtenues à partir de cellules Sf9 infectées avec le baculovirus recombinant (AcDPV114), a montré la présence d'aggrégats constitués de capsides vides de 22 nm ayant 30 une morphologie et une taille identiques à celle des particules virales natives (Fig. 8).

#### *Immunité induite par le baculovirus recombinant*

Par ELISA, des taux d'anticorps (Ac) moyens à élevés ont été observés chez tous les canards immunisés avec les cellules infectées par le baculovirus recombinant (RB) alors que les canards immunisés avec les cellules infectées par le baculovirus sauvage (WB) n'ont pas 35 répondu, de même que les canards placés en contact (tableau 1). Il n'a pas été constaté d'effet rappel chez les canards RB à l'exception d'un canard ayant reçu des doses inférieures comme mentionné dans le tableau 1. Trois semaines après la 3ème inoculation, les taux d'Ac étaient décroissants chez les canards RB.

Par séroneutralisation, tous les canards RB ont également répondu à l'immunisation, avec des taux d'anticorps moyens comparés au titre de 12.9 (log 2) du sérum positif de référence (résultat non présenté), excepté le canard 86-87 qui présentait, 2 semaines après la 3ème inoculation (temps C), un titre très élevé (tableau 1).

#### 5 *Immunité induite par le vaccin Parvol*

Les taux d'Ac présentés par les canards immunisés avec le vaccin Parvol sont mentionnés dans le tableau 2. Le rappel accroît les taux d'anticorps qui sont maximaux 3 semaines après celui-ci.

#### Analyse des résultats

#### 10 *Clonage et séquence du gène codant pour les protéines de capsid du DPV*

Il est établi (Berns, 1990) que le génome des parvovirus de mammifères présente le même type d'organisation : les séquences codantes sont situées dans deux grandes fenêtres de lecture (ORF<sub>2</sub>) dont celle de droite (correspondant à l'extrémité 3' du brin de polarité positive) code pour les protéines de capsid. Nous avons cherché à cloner un grand fragment d'ADN supposé contenir le gène codant pour les protéines de capsid. Un premier clonage avait consisté à cloner le fragment *Hind*III - *Kpn*I de 3500 bp qui s'était révélé correspondre à la bonne ORF sur la base des homologies de séquences constatées avec le gène de l'AAV2 codant pour les protéines de capsid. Néanmoins le précédent fragment ne comportait pas le gène entier à qui il manquait l'extrémité 3', aucun codon stop n'ayant été observé. C'est pourquoi il a été procédé au clonage présentement décrit utilisant l'enzyme de restriction *Bgl*III. Celui-ci a permis de cloner un fragment de 2950 bp incluant toute la fenêtre de lecture escomptée. Cependant il manque la fin du génome en 3', étant donné que les séquences terminales inversées répétées correspondant à l'extrémité palindromique, n'ont pas été observées.

L'analyse des 2487 paires de bases séquencées a mis en évidence une organisation du génome du DPV similaire à celle des parvovirus de mammifères. En effet seul le brin de polarité positive de la partie de génome étudiée du DPV contient des fenêtres de lecture consécutives, dont une grande, correspondant à une région codante, située dans le premier cadre de lecture. D'autre part la plupart des motifs d'acides aminés hautement conservés chez les parvovirus, est présente chez le DPV.

L'analyse du degré d'homologie entre les séquences en acides aminés des protéines de capsid des parvovirus du canard et de l'oie (DPV et GPV respectivement) a montré que les deux virus étaient les plus proches parmi les virus considérés. Alors que le DPV fait partie du groupe des parvovirus autonomes puisqu'il n'a pas été mis en évidence de virus helper tels que adenovirus et herpès virus (Jestin et coll., 1991), la séquence de son gène codant pour les protéines de capsid a montré une plus forte homologie avec le dependovirus AAV2 qu'avec les parvovirus autonomes de mammifères. Ce résultat confirme les conclusions de Brown et coll., 1995, concernant les parentés entre le parvovirus de l'oie et les adeno-associated virus.

Les différences observées entre les séquences protéiques des parvovirus de l'oie et du canard peuvent constituer, au moins pour partie d'entre elles, le support moléculaire des différences antigéniques déjà mentionnées entre ces deux virus. Elles ont des implications importantes aux plans des applications que ce soit à des fins vaccinales, diagnostiques ou d'immunothérapie.

- 5 De la recherche des régions codantes potentielles du DPV, il est ressorti que :
- le second codon ATG en phase (nucléotide 829) pouvait initier une protéine de 534 aa avec un poids moléculaire estimé à 60 kDa proche du poids moléculaire de 58 kDa établi par SDS-PAGE pour la protéine VP3 du DPV (Le Gall - Reculé et Jestin, 1994).
  - le codon ACG (nucléotide 670) qui est un codon inusuel d'initiation de la
- 10 traduction mais est utilisé pour coder la protéine VP2 de l'AAV2 (Beccerra et coll., 1985), pouvait initier la traduction d'une protéine de 587 aa avec un poids estimé de 65,2 kDa compatible avec la valeur expérimentale de 78 kDa correspondant à la protéine VP3 (Le Gall - Reculé et Jestin, 1994). En outre la séquence protéique située à proximité du codon ACG du DPV révélait une forte homologie avec celle entourant le codon ACG de l'AAV2. Enfin, en
- 15 l'absence de codons méthionine dans cette région, il était très vraisemblable que ce codon fût le codon d'initiation de la VP2.

#### *construction retenue*

La construction retenue utilise la séquence du gène codant pour la VP2 et la VP3 et démarrant à partir de la position la plus probable (nt 670) du codon d'initiation (ACG) de la

20 VP2. De plus, dans notre construction, le codon d'initiation de la traduction ACG précité, a été muté en un codon ATG plus favorable pour initier la traduction (Kozak, 1986), en vue d'augmenter les rendements d'expression de la VP2. En effet, dans les particules virales matures d'AAV2, le codon d'initiation de la VP2 est naturellement un codon ACG (Beccerra et coll. 1988), or il est observé de faibles niveaux de VP2.

25 Toute variation dans la séquence placée dans l'environnement du codon ATG muté, consistant à s'approcher de la séquence consensus de Kozak (1986) : A/GCCATGG, est envisageable et ne diverge pas de l'esprit ni de l'objet de la présente invention.

En outre, des constructions utilisant des fragments de la séquence décrite peuvent aboutir à l'expression de polypeptides immunogènes et sont dérivées de la présente invention.

30 Par ailleurs, sur la base des résultats de séroneutralisation croisée (Fournier, 1991), les souches de parvovirus du canard testées constituent un groupe homogène. De plus, les acides nucléiques extraits de 4 souches de parvovirus de canard, montrent des profils de restriction identiques (Jestin, 1995b). Le fait que la souche DPV (GM), utilisée comme antigène dans les tests sérologiques, soit capable de détecter des anticorps induits par notre baculovirus

35 recombinant, obtenu à partir de la séquence de la souche DPV 89834, apporte un nouvel argument aux communautés antigéniques déjà mentionnées. Par conséquent, des constructions moléculaires similaires à celles précitées, réalisées à partir d'ADN extrait d'autres souches de parvovirus du canard, sont considérées découler de la présente invention.

*Obtention de baculovirus recombinants et expression de protéines de capsid recombinantes*

Il est établi que les protéines de capsid de parvovirus obtenues avec le système d'expression en baculovirus, s'autoassemblent pour former des particules vides ressemblant aux  
5 particules virales (Brown et coll., 1991 ; Saliki et coll., 1992 ; Christensen et coll., 1993). Ces  
particules recombinantes sont antigéniquement et immunologiquement identiques aux  
particules virales natives (Kajigaya et coll., 1991 ; Lopez de Turiso et coll., 1992 ; Martinez et  
coll., 1992 ; Saliki et coll., 1992 ; Christensen et coll., 1994 ; Wu et coll., 1994). C'est pourquoi  
ce système d'expression a été choisi.

De plus le fait que Ruffing et coll. (1992) aient montré, après avoir construit plusieurs  
10 baculovirus recombinants exprimant séparément les 3 protéines de capsid de l'AAV2, que des  
capsides vides étaient produites à chaque fois que la protéine VP2 était exprimée ou  
coexprimée avec la VP1 ou la VP3 alors qu'elles n'étaient pas observées quand l'une ou l'autre  
de ces protéines (VP1 ou VP3) était produite seule, confirmait notre choix de la séquence à  
insérer. Par ailleurs, les deux protéines de capsid VP1 et VP2 de l'Aleutian mink disease  
15 parvovirus (ADV) ont été coexprimées par un seul baculovirus recombinant généré à partir du  
cDNA contenant les deux codons d'initiation (Christensen et coll., 1993 ; Wu et coll., 1994).

L'analyse par Western-blot de cellules Sf9 infectées par le baculovirus recombinant  
AcDPV114 a montré que l'expression des 2 protéines VP2 et VP3 a été réussie, puisque les  
produits d'expression étaient reconnus par le sérum monospécifique anti-DPV et présentaient  
20 les tailles correspondant à ces protéines. L'expression de protéines de DPV a été confirmée par  
immunofluorescence et la microscopie électronique a montré que des capsides vides qui  
avaient la morphologie des virus DPV, étaient produites.

Cependant nous avons détecté peu de capsides vides, malgré l'utilisation d'un protocole  
associant 0,1 % SDS et 1 % DOC, recommandé pour solubiliser les protéines de capsides  
25 d'AAV2 accumulées dans les cellules Sf9 sous la forme d'aggrégats difficilement solubles. Chez  
l'AAV2, il n'est pas établi que la VP2 seule, sans la VP3, puisse s'autoassembler puisque la  
présence d'une protéine VP3-like a été observée dans les lysats de cellules Sf9 cotransfectées  
par un baculovirus recombinant exprimant théoriquement seulement la VP2, après mutation du  
codon d'initiation de la VP3 (Ruffing et coll., 1992). Chez le DPV, s'il est démontré par  
30 western-blot, à l'aide d'un sérum de canard spécifique du DPV, que la VP3 est nécessaire à la  
formation de capsides, il n'est pas exclu que les quantités de protéines VP3 constituent un  
facteur limitant. Alors les rendements en capsides pourraient être améliorés en optimisant le  
rapport des protéines VP2/VP3 exprimées ; en effet les protéines VP1, VP2 et VP3 sont dans  
les proportions respectives de 1, 1, 10, chez les virions matures d'AAV2 (Buller et Rose,  
35 1978). Pour y parvenir, il est possible d'utiliser deux baculovirus recombinants dont l'un  
contiendrait la construction présentement utilisée (ou une construction modifiée comme  
explicité ci-après et permettant de n'exprimer que la VP2) et l'autre contiendrait uniquement la  
séquence codant pour le gène de la VP3, c'est-à-dire nt 829 à 2430. Selon cet exemple des  
cellules Sf9 pourraient être coinfectées avec chacun des deux baculovirus recombinants en  
40 concentrations différentes. Dans le cas où la VP3 ne serait pas nécessaire à la formation de

capsides, il est possible d'améliorer les rendements en capsides en augmentant le niveau d'expression de la VP2. A cette fin, il conviendrait d'envisager de placer le codon muté d'initiation de la VP2 dans une configuration respectant mieux la séquence de Kozak (1986) déjà décrite. En effet dans la construction testée le codon ATG muté d'initiation de la VP2 était  
 5 placé, selon la séquence consensus de Kozak, dans un contexte moins favorable (TGGATGG) que le codon ATG d'initiation de la VP3. Avec le même objectif, le codon d'initiation de la VP3 pourrait être muté ainsi que l'ATG en phase immédiatement suivant (nt 853), afin de n'exprimer que la VP2. Toute modification de la construction initiale dans cet esprit relève de la présente invention.

10 Par ailleurs, des constructions dérivées de la présente séquence et codant pour des protéines VP2 (et si nécessaire VP3) tronquées, permettront de définir quelle est la partie de la séquence minimale indispensable à l'expression de capsides vides recombinantes. Ce point étant établi, il sera possible d'envisager d'associer la séquence minimale précédente avec une (ou des) séquence(s) codant pour une (ou des) protéine(s) hétérologue(s) dans le but d'obtenir des  
 15 capsides chimères. De telles constructions sont dérivées de la présente invention.

#### *Immunité induite par le baculovirus recombinant*

L'immunisation de canards avec le baculovirus recombinant adjuvé a induit la synthèse d'anticorps anti-DPV détectés par ELISA et séroneutralisation, alors que des témoins immunisés avec le baculovirus sauvage adjuvé selon les mêmes modalités restaient négatifs.

20 Afin de pouvoir apprécier l'immunité humorale induite par le baculovirus recombinant, il convenait de pouvoir la comparer à celle induite par un vaccin de commerce. Le vaccin du commerce choisi comme référence a donc été le Parvol qui est le seul vaccin prescrit pour stimuler la réponse humorale des canards reproducteurs contre la parvovirose du canard. Afin de contrôler l'activité de chaque lot libéré, un test a été mis au point par le fabricant consistant  
 25 à apprécier les réponses induites 2 et 3 semaines après immunisation de canetons de 2 semaines à raison de 2 injections (1 dose / canard) à 4 semaines d'intervalle. C'est pourquoi présentement des canetons ont été vaccinés selon ce protocole, les données ainsi obtenues servant de référence pour interpréter les résultats de l'essai d'immunisation avec le baculovirus recombinant.

30 De fait les résultats obtenus avec le baculovirus recombinant adjuvé sont au moins aussi bons que ceux obtenus dans le cadre de l'essai d'activité du Parvol. Le type d'adjuvant utilisé est important, en effet des essais d'immunisation avec un autre adjuvant ont été infructueux. Cependant d'autres adjuvants différents de celui incorporé dans le Parvol pourraient conférer une immunité équivalente sinon meilleure.

#### 35 *Applications*

En vue d'une application pratique pour immuniser les reproducteurs, des capsides vides purifiées adjuvées pourraient être administrées après avoir amélioré le rendement de production. En ce qui concerne l'immunisation des canetons, l'insertion des constructions décrites dans un vecteur vivant apparaît plus riche de promesses.

Quel que soit l'âge des canards, l'ADN nu correspondant aux séquences décrites (codant pour le gène de la VP2 et/ou de la VP3) insérées dans un plasmide, peut présenter un très grand intérêt comme vaccin.

Des capsides chimères utilisant les capsides vides de parvovirus du canard pourraient servir à la présentation de protéines hétérologues dans un but de vaccination des espèces animales, des palmipèdes en particulier qui seraient alors immunisés à la fois contre les parvovirus et contre d'autres agents infectieux.

Les anticorps dirigés contre tout ou partie des protéines VP2 et VP3, qu'ils soient monoclonaux ou polyclonaux, qu'ils soient obtenus à partir d'animaux immunisés avec des peptides synthétiques ou avec les protéines recombinantes purifiées ou avec des vecteurs recombinants ou avec de l'ADN nu, peuvent trouver des applications en sérothérapie ou immunothérapie ainsi qu'en diagnostic.

De plus, l'antigénicité des protéines recombinantes obtenues ayant été démontrée en Western-blot, ces protéines ou des sous-fragments possédant des propriétés équivalentes, peuvent trouver des applications à des fins diagnostiques.

Aussi, les capsides vides mentionnées précédemment pourraient être utilisées comme des auxiliaires de transfert d'ADN à des fins de thérapie génique animale ou humaine.

## References

- ALEXANDERSEN S., BLOOM M.E., PERRYMAN S. (1988). Detailed transcription map of Aleutian mink disease parvovirus. *J. Virol.* 62: 3684-3694.
- 5 ASTELL C.R., GARDINER E.M., TATTERSALL P. (1986). DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(i), and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J. Virol.* 57: 656-669.
- BALLOY, D. (1995). La parvovirose du canard. Journée nationale du canard de barbarie. ITAVI. Angers, 27 juin 1995.
- 10 BECERRA S.P., ROSE J.A., HARDY M., BAROUDY B., ANDERSON C.W. 1985. Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7919-7923.
- BECERRA S.P., KOCZOT F., FABISCH P., ROSE J.A. (1988). Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J. Virol.* 62: 2745-2754.
- 15 BERNIS K.I. (1990). Parvoviridae and their replication. In "Virology" (B.M. Fields, D.M. Knipe et al., Eds), 2nd ed., pp 1743-1763. Raven Press, New York.
- BROWN C.S., VAN LENT J.W.M., VLAK J.M., SPAAN W.J.M. (1991). Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J. Virol.* 65: 2702-2706.
- 20 BROWN K.E., GREEN S.W., YOUNG N.S. (1995). Goose parvovirus - an autonomous member of the dependovirus genus. *Virology* 210 : 283-291.
- BULLER R.M.L., ROSE J.A. (1978). Characterization of adeno-associated virus-induced polypeptides in KB cells. *J. Virol.* 25: 331-338.
- 25 CASSINOTTI P., WEITZ M., TRATSCHIN J.D. (1988). Organization of the Adeno-associated virus (AAV) capsid protein gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1. *Virology* 167: 176-184.
- CHEN K.C., SHULL B.C., MOSES E.A., LEDERMAN M., STOUT E.R., BATES R.C. (1986). Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus. *J. Virol.* 60: 1085-1097.
- 30 CHRISTENSEN J., STORGAARD T., BLOCH B., ALEXANDERSEN S., AASTED B. (1993). Expression of Aleutian mink disease parvovirus proteins in a baculovirus vector system. *J. Virol.* 67: 229-238.
- CHRISTENSEN J., ALEXANDERSEN S., BLOCH B., AASTED, B., UTTENTHAL A. (1994). Production of mink enteritis parvovirus empty capsids by expression in a baculovirus vector system: a recombinant vaccine for mink enteritis parvovirus in mink. *J. Gen. Virol.* 75: 149-155.
- 35 COUDERT M., FEDIDA M., DANNACHER G., PEILLON M., LABATUT R., FERLIN P. (1972). La maladie dite : "maladie à virus de l'oison". *Rec. Méd. Vét.*, CXLVIII: 455-470.
- COUDERT M., DANNACHER G., FEDIDA M., PEILLON M. (1973). Prophylaxie de la
- 40 "maladie à virus de l'oison". *Rec. Méd. Vét.*, CXLIX: 197-208.

- DERZSY D. (1967). A viral disease of goslings. I Epidemiological, clinical, pathological and aetiological studies. *Acta Vet. Acad. Scient. Hungarica* 17: 443-448.
- DIFFOOT N., CHEN K.C., BATES R.C., LEDERMAN M. (1993). The complete nucleotide sequence of parvovirus LuIII and localization of a unique sequence possibly responsible for its encapsidation pattern. *Virology* 192: 339-345.
- 5 DROUIN P., TOUX J.Y., L'HOSPITALIER R., GUITTET M., BENNEJEAN G. (1991). D'après les données du réseau national d'observations épidémiologiques en aviculture, Evolution de l'incidence de la maladie de Derzsy en 1989 et 1990. *L'Aviculteur* 521: 36-40.
- FINNEY J.D. (1964). *Statistical method in biological assay*. 2nd ed., Griffin, London, pp525-10 531.
- FOURNIER D (1991). Parvovirose du canard de Barbarie: approche vaccinale et recherches en cours. *L'Aviculteur* 521: 55-58.
- FOURNIER D., GAUDRY D. (1992). Muscovy duck parvovirus (MDP) in France: field vaccination trials. *Proceedings of the 9th International symposium on Waterfowl, Pisa, Italy,* 15 16-18 Sept., 36-41.
- GAUDRY D., TEKTOFF J. (1973). Essential characteristics of three viral strains isolated from muscovy ducks. 5th International WVPA Congress, Munich September 1973, 1400-1417.
- JESTIN V. (1990). Le point sur l'épizootie actuelle de maladie de Derzsy chez le canard de Barbarie. *L'Aviculteur* 516: 77-78.
- 20 JESTIN V., LE BRAS M.O., CHERBONNEL M., LE GALL G., BENNEJEAN G. (1991). Mise en évidence de parvovirus (virus de la maladie de Derzsy) très pathogènes dans les élevages de canard de Barbarie. *Rec. Méd. Vét.*: 167, 849-857
- JESTIN V., LE BRAS M.O., CHERBONNEL M. (1992). Control of muscovy duck parvovirus by vaccination. *European Commission proceedings: New and evolving virus* 25 *diseases of poultry*. Brussels, Belgium, 15-16 Dec., 167-181.
- JESTIN V., LE BRAS M.O., CHERBONNEL M. (1993). Contrôle de la parvovirose du canard par vaccination. *Proceeding 1ères journées de la recherche sur les palmipèdes à foie gras, INRA/ITAVI, Bordeaux, France, 27-28 avril, 119-137.*
- JESTIN V., LE GALL-RECULE G., ARNAULD C., CHERBONNEL M., JESTIN A. 30 (1995a). Detection of muscovy duck parvovirus DNA by the polymerase chain reaction. In : *Immunobiology of viral infections. Proceedings of the 3rd Congress of the European Society for Veterinary Virology, Interlaken 1994, ed. Schwyzer, M., et al., 528-532.*
- JESTIN V., LE GALL-RECULE G., CHERBONNEL M., LE BRAS M.O., LE COQ H., ARNAULD C., GUITTET M. (1995b). Nouveaux tests de diagnostic pour le canard. 1ères 35 *Journées de la recherche avicole, INRA/ITAVI/CNEVA. Angers, 28-30 mars 1995: 183-185.*
- KAJIGAYA S., FUJII H., FIELD A.M., ROSENFELD S., ANDERSON L.J., SHIMADA T., YOUNG N.S. (1991). Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88: 4646-4650.

- KOZAK M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eucaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292.
- LE GALL-RECULE G, JESTIN V. (1994). Biochemical and genomic characterization of muscovy duck parvovirus. *Arch. Virol.* 139: 121-131
- 5 LOPEZ DE TURISO J.A., CORTES E., MARTINEZ C., RUIZ DE YBANEZ R., SIMARRO I., VELA C., CASAL J. I. (1992). Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J. Virol.* 66: 2748-2753.
- MARTINEZ C., DALSGAARD K., LOPEZ DE TURISO J.A., CORTES E., VELA C., CASAL J.I. (1992). Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine* 10: 684-690.
- 10 PARRISH C.R., AQUADRO C.F., CARMICHAEL L.E. (1988). Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses. *Virology* 166: 293-307.
- PLASSIART G. (1991). Lésions histopathologiques de la parvovirose du canard de Barbarie. *L'Aviculteur* 521: 47-48.
- 15 RUFFING M., ZENTGRAF H., KLEINSCHMIDT J.A. (1992). Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of Adeno-associated virus type 2 in insect cells. *Journal of Virology* 66: 6922-6930.
- RUFFING M., HEID H., KLEINSCHMIDT J.A. (1994). Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RDG integrin-binding motif. *J. Gen. Virol.* 75: 3385-3392.
- 20 SALIKI J.T., MIZAK B., FLORE H.P., GETTIG R.R., BURAND J.P., CARMICHAEL L.E., WOOD H.A., PARRISH C.R. (1992). Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunization of dogs. *J. Gen. Virol.* 73: 369-374.
- 25 SAMBROOK J., FRITSH E.F., MANIATIS T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- 30 SRIVASTAVA A., LUSBY E.W., BERNS K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* 45: 555-564.
- SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. (1987). "A manual of methods for baculovirus vectors and insect culture procedures." Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no. 1555. Texas Agricultural Experiment Station, College Station.
- 35 TREMPE J.P., CARTER B.J. (1988). Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *J. Virol.* 62: 3356-3363.
- WU W., BLOOM M.E., BERRY B.D., MCGINLEY M.J, PLATT K.B. (1994). Expression of Aleutian mink disease parvovirus capsid proteins in a baculovirus expression system for potential diagnostic use. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 23-29.

**Revendications**

- 1- ADNs recombinants caractérisés en ce qu'ils codent pour au moins une des protéines entières VP2 et VP3 du parvovirus du canard ou pour au moins une des protéines précitées tronquée, capable ou non de former des capsides, ou pour des peptides, ces protéines ou ces peptides ayant au moins des propriétés antigéniques et/ou immunogéniques.
- 2- Séquence d'ADN codant pour les protéines de capsid VP2 et VP3 du parvovirus du canard telle que mentionnée en figure 2 ou séquences dérivées ou sous-séquences de celle-ci codant pour tout ou partie de ces mêmes protéines, que ces séquence soient seule(s) ou associée(s) à au moins une autre séquence codant pour au moins une protéine hétérologue.
- 10 3- Vecteur comprenant une séquence d'ADN selon les revendications 1 ou 2, en aval d'une région de régulation.
- 4- Microorganisme hôte ou cellule transformés avec au moins une molécule d'ADN recombinant suivant les revendications 1 et/ou 2, ou avec le vecteur revendiqué en 3.
- 5- Procédé de préparation de l'ADN recombinant revendiqué en 1 caractérisé en ce que les microorganismes transformés sont cultivés selon la revendication 4 et que l'ADN revendiqué en 15 1 ou 2, ou des plasmides recombinants intégrant la molécule d'ADN revendiquée en 1 ou 2, sont récupérés.
- 6- Protéine(s) exprimée(s) par un microorganisme ou une cellule selon la revendication 4, capable(s) ou non de former des capsides vides, peptides déduits de la séquence revendiquée 20 en 2 et procédé de préparation des dites protéines, caractérisé en ce que les microorganismes ou cellules sont cultivés selon la revendication 4 et que les protéines sont récupérées.
- 7- Véhicule de transfert d'ADN pour la thérapie génique caractérisé en ce qu'il contient au moins une des protéines revendiquées en 6, susceptible de former des capsides et de protéger l'intégrité de l'ADN à transférer.
- 25 8- Vaccin caractérisé en ce qu'il contient de l'ADN selon les revendications 1 ou 2 et/ou un vecteur selon la revendication 3 et/ou un microorganisme ou un cellule transformés selon la revendication 4 et/ou des protéines ou des peptides selon la revendication 6.
- 9- Anticorps dirigés contre les protéines ou les peptides revendiqués en 6.
- 10- Réactifs de diagnostic utilisant tout ou partie des protéines ou peptides revendiqués en 6 30 et/ou les anticorps revendiqués en 9.

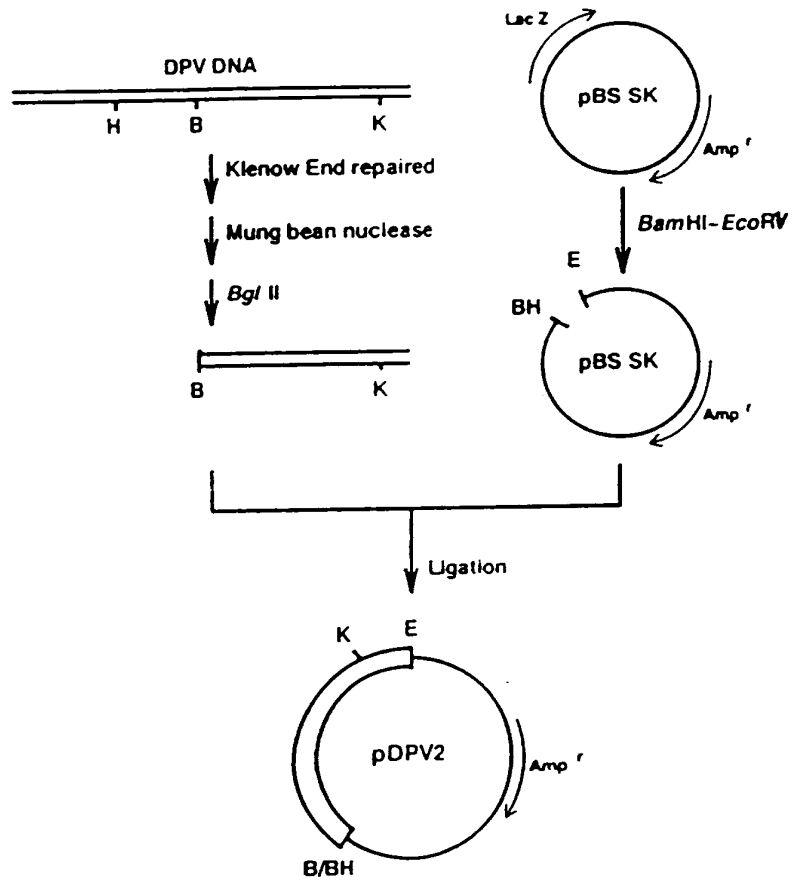


Figure 1

20 40 60 80 100 120  
 CAGGTACCGCTGCTATGCACAGTTTAGATAACTCTATGAATGTTTTTGAATGCCTGGAGTGTGAAAGAGCTAATTTTCCTGAATTCAGAGTCTGGCTGAAAACCTTTTGTAATCAACAT  
 Q V R C A H H S L D N S H N V F E C L E C E R A N F P E F Q S L G E N F C M Q H  
 140 160 180 200 220 240  
 GGGTGGTATGATTGTGCATCTCTGAATGAAGTGAAGATGACATGAATGAAATGAAATGTTTGTCTATTGATGATATGGAGAATGAACAATAAAGGTGATTCAAAATAGCTATGTCT  
 G W Y D C A F C N E L K D D H N E I E H V F A I D D H E N E Q - R - F K I A H S  
 260 280 300 320 340 360  
 ACTTTTTAGAGAAATTTGAAGACTGGTATGAGACTGCAGCCGATCTTGGGGCATTGAAAGCTGGAGCCCCCAGCCAAATCAAACCAGCAATCTCAGTCTGTGTCTACAGACAGA  
 T F L E K F E D W Y E T A A A S W R H L K A G A P K P K S M Q Q S Q S V S T D R  
 380 400 420 440 460 480  
 AAACCCCAACGAAAGACAATAATAGGGGCTTTGTACTTCTGGCTATAAGTATCTTGGCCCTGTAACGGCCTTGATAAAGGGCCACCTGTCAATAAAGCGGACAGCCTCGCGCTTGAG  
 K P Q R K D N N R G F V L P G Y K Y L G P G N G L D K G P P V N K A D S V A L E  
 500 520 540 560 580 600  
 CAGGATAAAGCGTACGACCAGCAGCTCAAGGCAGGAGACAACCCCTATATAAAATTTAATCACCCAGATCAAGAATTTATAGATAATCTGCAAGGTGATACCTCCTTGGAGGCAACCTC  
 H D K A Y D Q Q L K A G D N P Y I K F N H A D Q E F I D N L Q G D T S F G G N L  
 620 640 660 680 700 720  
 GGAAGCGCTATTCACAGCTAAAAAAGAATTTAGAGCCTTTAGGCTAGTAGANGAACTGTAAACAGGCTCCTGCTAAAAAGAGTAGTGGAAACTAACAGATCACTACCCCTATA  
 G K A V F Q A K K R I L E P L G L V E E P V N T A P A K K S S G K L T D H Y P I  
 740 760 780 800 820 840  
 GTAAGAAGCCTAAATATCTGAAGAAAACCTCCTTCACTAGTAAATAGTGGAGGAGGCAAGTGCAGCTGCCACCGAAGGCTCCGAACCTGTGCCAGCACCTAACATGGCAGAGGGA  
 V X K P K L S E E N S P S P S N S G G E A S A A A T E G S E P V A A P N H A E G  
 860 880 900 920 940 960  
 GGAAGCGGAGCTATGGCGACTCTGCAGGGGTCGGATGGTGGTAAATGCTCAGGAAATGGCATTGGGATTCCTCAATGGCTGGGAGACACAGTCAATTACCAAGACTACAAGAACC  
 G S G A H G D S A G G A D G V G N A S G M W H C D S Q W L G D T V I T K T T R T  
 980 1080 1020 1040 1060 1080  
 TGGTCTGCCANGCTACAACAACCATCTACAAGCCATCACAGCGGACAAACCCAGACTCAATACCCAAATATGCTGGATACAGCACCCCTGGGGGACTTTGATTTCAACAGA  
 W V L P S Y N N H I Y K A I T S G T N P D S N T Q Y A G Y S T P W G Y F D F M R  
 1100 1120 1140 1160 1180 1200  
 TTCCACTGCCATTTCTCTCAAGAGACTGGCAAGACTCATCAACACCATTTGGGGATTAGACCGAAGCACTCAAATTCAGATATTCAATGTCCAGTTAAAGAGTCAAGCGCA  
 F H C H F S P R D W Q R L I N N H W G I R P K A L K F K I F M V Q V K E V T T Q  
 1220 1240 1260 1280 1300 1320  
 GACCAGCAAGACTATTGCTAACACCTTACCTCTACAATCCAGATATTCAAGGATATGAACACCAGCTCCCTATGTTCTGGGCTCGGCCAGGAGGGAAGATGCCACCGTTCGCC  
 D Q T K T I A N H L T S T I Q I F T D N E H Q L P Y V L G S A T E G T H P P F P  
 1340 1360 1380 1400 1420 1440  
 TCAGATCTGTATGCTGGCCCCAGTAGGCTACTGCACAATGCACACCAACAGAGTGGAGGAGATTCAATGACAGAAGTGCCTTCTATTGCTTAGAGTACTTCCCCCTCAGATGCTG  
 S D V Y A L P Q Y G Y C T H H T N Q S C A R F N D R S A F Y C L E Y F P S Q H L  
 1460 1480 1500 1520 1540 1560  
 AGAACAGGGAATAATTTGAATTCAGTTTTGACTTTGANGAAGTTCCTTCCATAGCATGTTGCTCATTCACAGGATTTAGACAGGCTAATGAATCCTCTCCTAGATCAGTACCTGTGG  
 R T G M N F E F S F E F E E V P F H S H F A H S Q D L D R L H N P L L D Q Y L W  
 1580 1600 1620 1640 1660 1680  
 AATTTCTGAGGTTAATGGTGGCAGGAATGCACAGTTCAAAAAGCTGTGAAGGAGCATTGTGCAATGGGAGAAATTTGCTTCCAGGACCCAACTTCTAGACCAAGGCTAAGA  
 N F S E V N G G R N A Q F K K A V K G A F G A H G R N W L P G P K L L D Q R V R

Figure 2

1700 1720 1740 1760 1780 1800  
 GCATACAGTGGAGGAACAGATAACTATGCGAACTGGTCAATCTGGAGTAAAGGAAACAAA GTTTTTCTTAAAGACAGAGATATCTCTGCAACCAGGTCCAGTAGCTACTACACATACA  
 A Y S G G T D N Y A N W S I W S K G N K V F L K D R E Y L L Q P G P V A T T H T  
 1820 1840 1860 1880 1900 1920  
 GAAGATCAGGCTTCCAGTGTACCGGCTCAAACATAATAGGAATGCAAAAGACCCCTACAGGTCAGGCAGTACTCTGGCAGGAATTCAGACATCATGGTAAACAGATGAGCAAGAAATA  
 E D Q A S S V P A Q N I I G I A K D P Y R S G S T L A G I S D I H V T D E Q E I  
 1940 1960 1980 2000 2020 2040  
 GCACCAACTAACGGTGTAGGGTGGAGACCTTATGGATTGACCGTAACCAATGAACAAAACACAAACAGCTCCTACAATGCTGAGCTAGAAGTACTGGGAGCACTACCTGGCATGGTC  
 A P T N G V G W R P Y G L T V T N E Q N T T T A P T M A E L E V L G A L P G H V  
 2060 2080 2100 2120 2140 2160  
 TGGCAGAACAGAGATATTACCTGCAGGGTCTATATGGGCTAAAATACCCAAAACAGATGGGAAATTTTCATCCTTCTCCAAACCTGGGAGGTTTTGGTCTCCATAATCCACCTCCCCAG  
 W Q N R D I Y L Q G P I W A K I P K T D G K F H P S P N L G G F G L H N P P P Q  
 2180 2200 2220 2240 2260 2280  
 GTCTTTATAAAAATACTCCTGTTCTCGCAGATCTCCACTAGAGTATGTAATCAGAAGTGAATTTCTTACATTACACAGTATTCAACAGGGCAGTGTACTGTAGAAATGGTCTGGGAA  
 V F I K N T P V P A D P P L E Y V N Q K W N S Y I T Q Y S T G Q C T V E H V W E  
 2300 2320 2340 2360 2380 2400  
 CTCAGAAAAGAAAATCCAAAGAGATGGAACCCCTGAGATCCAAATTAACAGTAACCTTGGAAATAGAACAAGTACTATGTTTCTCCAAATGAGACTGGAGGCTATGTAGAAGATAGGCTG  
 L R K E N S K R W N P E I Q F T S N F G N R T S T H F A F N E T G G Y V E D R L  
 2420 2440 2460 2480  
 ATTGGTACCAGGTATTTGACTCAGAATCTGTAATTTCTGTTATCTTTTGATTTTAAATAAACCATTCTCTGGGCGCAAAAAGTCC  
 I G T R Y L T Q N L - I S V F F - F - I N H P L A R K K S

Figure 2 (Suite)

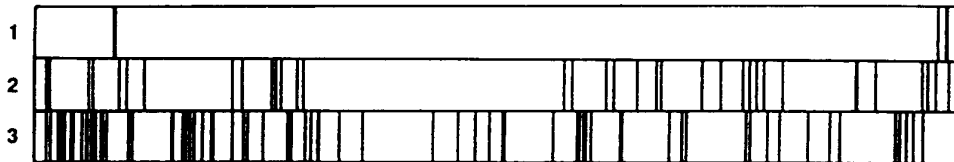


Figure 3



DPV	DIIYLCQPTWAKIPKIDGKFEPS-FMLGGFG-LHRPPPQVFLEKTFVPADPPLEYVNOKWNYSYITQYSTGQCTVENVHEL-RKENSIRWNP-----I-QFT	698
PROTAAV	DVYLQCPWAKIPHTDGHFEPS-FLMGFG-LHRPPPQILIKMTFVFANEFTTFSAAKFASFTQYSTGQVSVKIEHEL-QKENSIRWNP-----I-QYT	701
COAT PAVBO	PISRYMPTWVPRVNRKILLD-TQDGSIP-MSHPPGTIFTKLARIP-----VPGNGDSFLNIYVTGQVSCVVMKV-EKRGTEWNP-----YH-HSA	637
COAT PAVHB	ALHYESQLEKIPHLDDSEKTFQFAALGGWG-LRQPPPQIFLKI--LPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIMTVMTFKLGPRAKATGRWNPQPGVYPPHAA	742
COAT ADVG	FVYFPGQIWDK--KPIKDHKPRRQGNAPFVCIQKPPGQLFVKLIE-NLTDTFNYDENPD--RIKTYGYFTWRGKLVLK-GKLSQVTCWNPVKRELIGEPG	657
COAL PAVPN	FVYFPGQIWDK--ELDTDLKPRLEVTAPFVCIQKPPGQLFVKLIE-NLTDDEFNADSPQ--PRIITYSNFVWKGTLTFT-AKMRSSMNPPIQHTTTAE-	701
COAT PAVC7	FVYFPGQIWDK--EFDTLKPRLEVTAPFVCIQKPPGQLFVKLIE-NLTNEYDSDASAMHSRIVTYSDFVWKGKLVFK-AKLRASHTWNPVYQMSINVD-	694
COAT HUMIV	FVYFPGQIWDK--EILDLEHKPRLEVTAPFVCIQKPPGQLVRLGP-NLTDQYDPNGAT-LSRIVTYGTFFWKGKLTMR-AKLRANTTWNPVYQVSAEDNG	697
DPV	SNFG----NRISDMFAPMETGGYVED-RLIG--TRILTONL-	732
PROTAAV	SNYN----KSNVVDFTVDTHNGVISEP-RPIG--TRILTRNL-	735
COAT PAVBO	THMS----VDAYTINAGVYAGAVQADVMQ--TRFNHKKVL	673
COAT PAVHB	GHLFYVLYDPEATDAKQHRHRSYKPEELMT--AKSRVHPL	781
COAT ADVG	-----VFTKDKYKQ--IPIKNGMFEIGLQYGRSTIKYIY	690
COAL PAVPN	-----NIGMYIPTNIGGIRMFPEYSQLIPRKY	729
COAT PAVC7	-----NQFWYVPSNIGGKIVYEKSLAGRKLY	722
COAT HUMIV	-----NSYMSVTKWLPATGMMQSVPLITRFVARNY	729

Figure 4 (Suite)



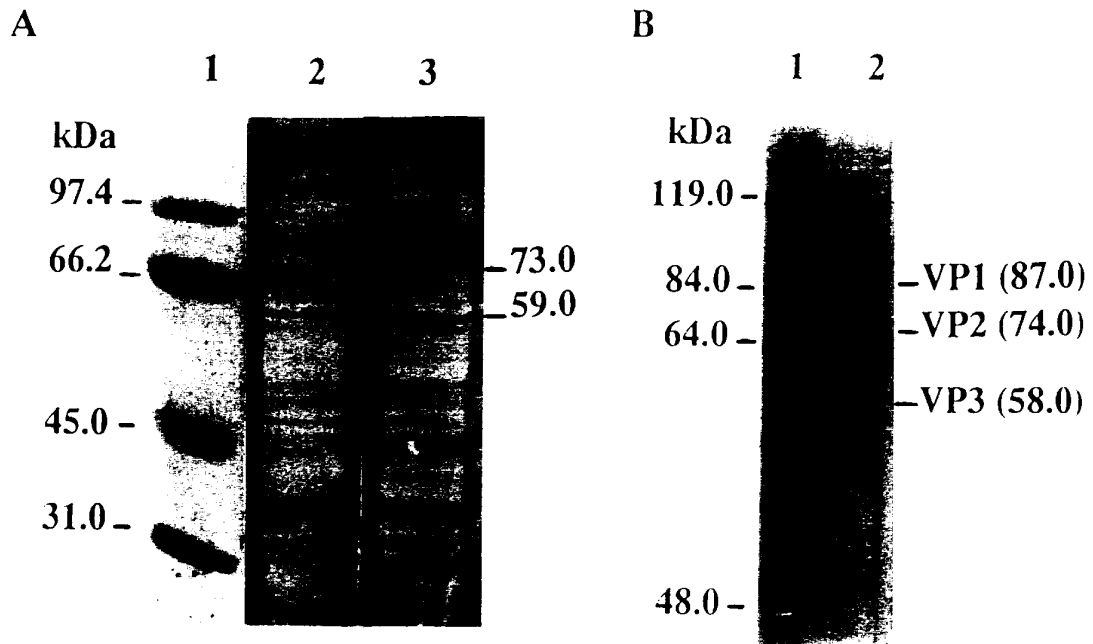
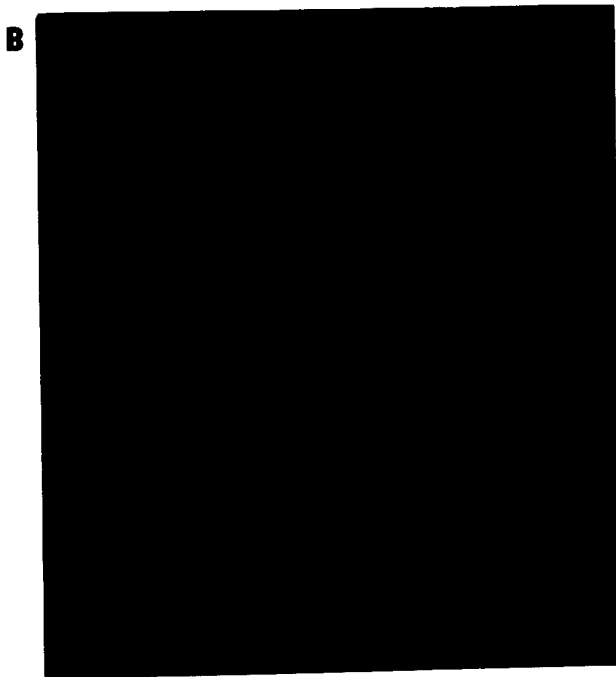
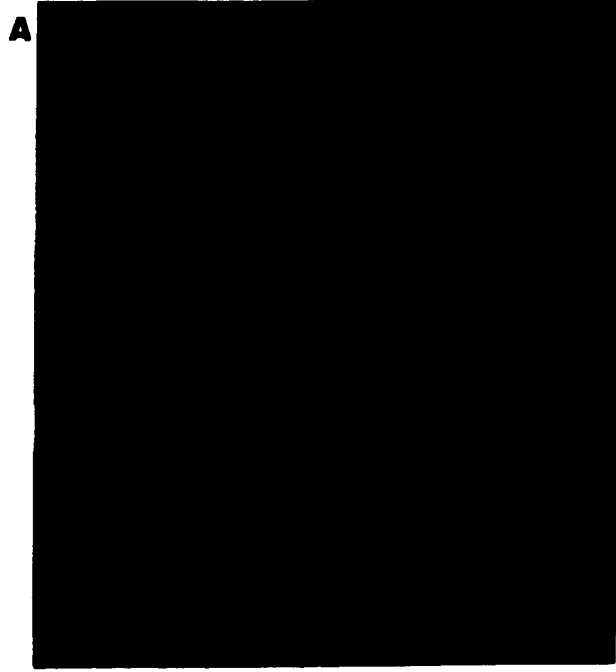


Figure 6



**Figure 7**

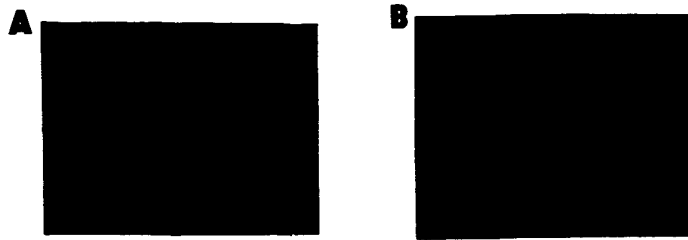


Figure 8

**Tableau 1**

Numéro	B		C		D	
	Elisa <sup>(1)</sup>	SN <sup>(2)</sup>	Elisa	SN	Elisa	SN
22-23	8.8 (0.5)	7.0	9.0 (0.0)	9.0	7.3 (1.2)	9.6
28-29	3.7 (0.6)	6.3	3.0 (0.0)	6.3	0.7 (0.6)	6.3
76-77	5.7 (0.6)	8.3	6.0 (0.0)	8.3	3.7 (0.6)	7.6
78-79	8.4 (1.1)	9.6	7.0 (0.0)	9.6	3.0 (0.0)	8.3
80-81	5.3 (0.6)	7.0	6.3 (0.6)	8.3	3.3 (0.6)	8.3
82-83	7.6 (1.8)	8.3	3.7 (0.6)	7.0	0.7 (0.6)	6.3
84-85	8.6 (0.6)	8.3	8.6 (0.6)	8.3	7.0 (0.0)	8.3
86-87 <sup>(3)</sup>	5.0 (0.0)	7.6	10.6 (0.6)	12.3	8.4 (0.6)	10.3
	6.6	7.8	6.8	8.6	4.3	8.1

**Tableau 2**

m	B		C		D	
	ELISA	SN	ELISA	SN	ELISA	SN
m	0,2	3,0	3,4	6,3	4,3	7,6
minimum/maximum	0/2	0/6	0/9	4/10	0/9	2/12