

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 03.10.97.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 09.04.99 Bulletin 99/14.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : MERIAL SOCIETE PAR ACTIONS SIMPLIFIEE — FR, THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST — GB et UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN — CA.

⑦2 Inventeur(s) : ALLAN GORDON, MEEHAN BRIAN, CLARK EDWARD, ELLIS JOHN, HAINES DEBORAH, HASSARD LORI, HARDING JOHN, CHARREYRE CATHERINE ELISABETH et CHAPPUIS GILLES EMILE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤4 NOUVEAUX CIRCOVIRUS PORCINS, VACCINS ET REACTIFS DE DIAGNOSTICS.

⑤7 L'invention concerne de nouvelles souches de circovirus porcin isolées à partir de prélèvements pulmonaires ou ganglionnaires provenant d'élevage atteints par le syndrome de dépérissement généralisé de post-sevrage (en anglais PMWS). Elle concerne des préparations purifiées de ces souches, des vaccins classiques atténués ou inactivés, des vaccins vivants recombinants, des vaccins plasmidiques et des vaccins de sous-unités, ainsi que des réactifs et méthodes de diagnostic. Elle concerne aussi des fragments d'ADN pouvant être utilisés pour la production de sous-unités dans un vecteur d'expression in vitro ou comme séquences à intégrer dans un vecteur d'expression in vivo de type virus ou plasmide.



La présente invention est relative à de nouvelles souches de circovirus porcin (PCV pour *Porcine CircoVirus*) responsables du syndrome PMWS (*Porcine Multisystemic Wasting Syndrome* ou *Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome* encore appelé syndrome de dépérissement généralisé de post-sevrage), à des réactifs et méthodes permettant leur détection, à des méthodes de vaccination et à des vaccins, ainsi qu'à des méthodes de production de ces réactifs et vaccins.

Le PCV a été à l'origine détecté comme contaminant non cytopathogène dans des lignées cellulaires de reins de porcs PK/15. Ce virus a été classé parmi les Circoviridae avec le virus de l'anémie du poulet (CAV pour *Chicken Anemia Virus*) et le virus PBFVDV (*Pscittacine Beak and Feather Disease Virus*). Il s'agit de petits virus (de 15 à 24 nm) non enveloppés dont la caractéristique commune est de contenir un génome sous forme d'un ADN simple brin circulaire de 1,76 à 2,31 kb. On a d'abord pensé que ce génome codait pour un polypeptide d'environ 30 kDa (Todd et al., Arch Virol 1991, 117: 129-135). Des travaux récents ont toutefois montré une transcription plus complexe (Meehan B. M. et al., 1997, 78: 221-227). Par ailleurs, on ne connaît pas d'homologies significatives de séquence nucléotidique ni de déterminants antigéniques communs entre les trois types de circovirus connus.

Le PCV issu des cellules PK/15 est considéré comme n'étant pas pathogène. On en connaît la séquence d'après B. M. Meehan et al., J Gen Virol 1997 (78) 221-227. Ce n'est que très récemment que des auteurs ont pensé que des souches de PCV pourraient être pathogènes et associées au syndrome PMWS (Gupi P. S. Nayar et al., Can Vet J, vol. 38, 1997: 385-387 et Clark E. G., Proc Am Assoc Swine Prac 1997: 499-501). Nayar et al. ont détecté de l'ADN de PCV chez des porcs présentant le syndrome PMWS par des techniques de PCR. Aucune souche sauvage de PCV n'a toutefois été isolée et purifiée à ce jour.

Le syndrome PMWS détecté au Canada, aux Etats-Unis et en France

se caractérise au plan clinique par une perte progressive de poids et par des manifestations telles que tachypnée, dyspnée et jaunisse. Au plan pathologique, il se traduit par des infiltrations lymphocytaires ou granulomateuses, des lymphadénopathies et, plus rarement, par des hépatites et néphrites lymphocytaires ou granulomateuses (Clark E. G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 1997: 499-501 ; La Semaine Vétérinaire n° 26, supplément à La Semaine Vétérinaire 1996 (834) ; La Semaine Vétérinaire 1997 (857): 54 ; Gupi P. S. Nayar et al., Can Vet J , vol. 38, 1997: 385-387).

10 La déposante a réussi à isoler trois souches nouvelles de PCV à partir de prélèvements pulmonaires ou ganglionnaires provenant d'élevages situés au Canada, aux Etats-Unis (Californie) et en France (Bretagne), ci-après dénommés circovirus selon l'invention. Ces virus ont été mis en évidence dans des lésions de porcs atteints du syndrome PMWS, mais pas chez des porcs sains.

15 L'invention concerne tout circovirus porcin susceptible d'être isolé d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment de lésions, d'un porc malade présentant le syndrome PMWS, notamment en suivant la méthode décrite dans les exemples.

20 La présente invention a plus particulièrement pour objet des préparations purifiées de trois souches, qui ont été déposées auprès de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Royaume-Uni) le jeudi 2 octobre 1997:

- 25 - n° d'accès provisoire V97100219 (appelé ici Imp.1008PCV)
- n° d'accès provisoire V97100218 (appelé ici Imp.1010PCV)
- n° d'accès provisoire V97100217 (appelé ici Imp.999PCV).

30 L'invention entend considérer les circovirus porcins isolés d'un porc malade et/ou les circovirus ayant une parenté sérologique significative avec les souches de l'invention et/ou les circovirus ayant une hybridation croisée

avec les souches de l'invention.

Les souches virales isolées d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment d'une lésion, d'un porc présentant le syndrome PMWS peuvent être avantageusement propagées sur des lignées cellulaires telles que notamment des lignées cellulaires de rein de porc, en particulier cellules PK/15 indemnes de contamination (en particulier pour PCV, ainsi que pour pestivirus, adénovirus porcin et parvovirus porcin) en vue de leur multiplication ou spécifiquement pour la production d'antigène, entier (e.g. virus) et/ou sous-unités (e.g. polypeptides).

De manière très remarquable et inattendue, ces isolats se sont révélés très productifs en culture sur cellules PK/15, ce qui présente des avantages indéniables pour la production de virus ou d'antigène, en particulier pour la production de vaccin inactivé.

La présente invention a aussi pour objet les préparations de circovirus isolés après passages sur cellules, notamment lignées cellulaires, e.g. PK/15, cultivées in vitro en étant infectées par l'un au moins des circovirus selon l'invention ou de tout circovirus porcin susceptible d'être isolé d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment de lésions, d'un porc présentant le syndrome PMWS. Elle a aussi pour objet les surnageants ou extraits de culture, éventuellement purifiés par des techniques standards, et de manière générale toute préparation antigénique obtenue à partir des cultures in vitro.

L'invention a aussi pour objet les principes actifs immunogènes et les vaccins contenant au moins un antigène tel que défini supra.

Il peut s'agir de principes actifs immunogènes à base de virus entiers atténués, ou vaccins préparés avec ces principes actifs, l'atténuation étant effectuée selon les méthodes usuelles, e.g. par passage sur cellules, de préférence par passage sur des cellules de porc, notamment lignées, telles que PK/15 (par exemple de 50 à 150, notamment de l'ordre de 100, passages). Ces vaccins comprennent en général un véhicule ou diluant

acceptable sur le plan vétérinaire, éventuellement un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire ainsi qu'éventuellement un stabilisateur de lyophilisation.

Ces vaccins comprendront de préférence de 10^3 à 10^6 TCID₅₀.

5 Il peut aussi s'agir de principes actifs immunogènes ou de vaccins à base d'antigène de circovirus selon l'invention, à l'état inactivé. Le vaccin comprend en outre un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire, avec éventuellement en plus un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire.

10 Les circovirus selon l'invention, avec les fractions qui peuvent être présentes, sont inactivés selon les techniques connues de l'homme du métier. L'inactivation sera effectuée de préférence par voie chimique, e.g. par exposition de l'antigène à un agent chimique tel que formaldéhyde (formol), paraformaldéhyde, β -propiolactone ou éthylène imine ou ses dérivés. La méthode d'inactivation préférée sera ici l'exposition à un agent chimique et en particulier à l'éthylène imine ou à la β -propiolactone.

15 De préférence, les vaccins inactivés selon l'invention seront adjuvés, avantageusement en étant présentés sous forme d'émulsions, par exemple eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau, selon les techniques bien connues de l'homme du métier. Le caractère adjuvant pourra aussi provenir de l'incorporation au principe actif d'un composé adjuvant usuel.

20 Parmi les adjuvants qui peuvent être utilisés, on peut citer à titre d'exemple l'hydroxyde d'alumine, les saponines (e.g. Quillaja saponin ou Quil A ; voir Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, édité par Michael F. Powel et Mark J. Newman, Plenum Press, New-York and London, p 210), l'Avridine[®] (Vaccine Design p 148), le DDA (Diméthylidioctadécylammonium bromide, Vaccine Design p 157), le
25 Polyphosphazene (Vaccine Design p 204), ou encore des émulsions huile-dans-l'eau à base d'huile minérale, de squalane (e.g. émulsion SPT, Vaccine Design p 147), de squalène (e.g. MF59, Vaccine Design p 183), ou eau-dans-l'huile à base d'huile métabolisable (de préférence selon WO-A-94 20071)
30 ainsi que les émulsions décrites dans US-A-5 422 109. On peut aussi choisir

des associations d'adjuvants, par exemple Avridine* ou DDA associé à une émulsion.

Ces vaccins comprendront de préférence de 10^6 à 10^8 TCID₅₀.

5 Les adjuvants du vaccin vivant pourront être choisis parmi ceux donnés pour le vaccin inactivé. On préférera les émulsions. A celles indiquées pour le vaccin inactivé, on peut rajouter celles décrites dans WO-A-9416681.

10 Comme stabilisateur de lyophilisation, on peut citer à titre d'exemple le SPGA (Bovarnik et al., J. Bacteriology 59, 509, 950), des hydrates de carbone tels que sorbitol, mannitol, amidon, saccharose, dextran ou glucose, des protéines telles que albumine ou caséine, des dérivés de ces composés, ou des tampons tels que de phosphates de métaux alcalins.

Les vaccins selon l'invention pourront comprendre un ou des principes actifs (antigènes) d'un ou de plusieurs (2 ou 3) des circovirus selon l'invention.

15 L'invention prévoit aussi d'associer la vaccination contre le circovirus porcin à une vaccination contre d'autres pathogènes du porc, en particulier ceux pouvant être associés au syndrome PMWS. Le vaccin selon l'invention pourra donc comprendre une autre valence correspondant à un autre pathogène du porc.

20 La déposante a en outre obtenu le génome de 1768 paires de bases (pb) du circovirus californien, identifiée SEQ ID NO: 1.

25 La présente invention a donc pour objet un fragment d'ADN contenant tout ou partie de cette séquence. Il va de soi que l'invention recouvre automatiquement les séquences équivalentes, c'est-à-dire les séquences ne changeant pas la fonctionnalité ni la spécificité de souche de la séquence décrite ni des polypeptides codés par cette séquence. Seront bien entendu incluses les séquences différant par dégénérescence du code.

30 L'invention recouvre également les séquences équivalentes en ce sens qu'elles sont capables de s'hybrider à la séquence supra dans des conditions de stringence élevées et/ou ont une forte homologie avec les souches de l'invention.

Ces séquences et leurs fragments pourront avantageusement être utilisés pour l'expression in vitro ou in vivo de polypeptides à l'aide de

vecteurs appropriés.

Pour l'expression de sous-unités in vitro, comme moyen d'expression on aura de préférence recours à E. coli ou au baculovirus (US-A-4 745 051). On intègre la ou les séquences codantes ou leurs fragments dans le génome du baculovirus (e.g. le baculovirus Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus AcNPV) et ce dernier est ensuite propagé sur cellules d'insectes, e.g. Spodoptera frugiperda Sf9 (dépôt ATCC CRL 1711). On peut encore produire les sous-unités dans des cellules eucaryotes telles que levures (e.g. Saccharomyces cerevisiae) ou cellules de mammifères (e.g. CHO, BHK).

L'invention a aussi pour objet les polypeptides qui seront produits in vitro par ces moyens d'expression, puis éventuellement purifiés selon les techniques classiques. Elle a aussi pour objet un vaccin de sous-unité comprenant au moins un polypeptide tel qu'ainsi obtenu, ou fragment, dans un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire et éventuellement un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire.

Pour l'expression in vivo en vue de la réalisation de vaccins vivants recombinants, on insère la ou les séquences codantes ou leurs fragments dans un vecteur d'expression approprié dans des conditions permettant l'expression du ou des polypeptides. Comme vecteurs appropriés, on peut utiliser des virus vivants, de préférence capables de se multiplier chez le porc, non pathogènes pour le porc (naturellement non pathogène ou rendu tel), selon les techniques bien connues de l'homme du métier. On pourra notamment utiliser des herpèsvirus du porc tels que le virus de la maladie d'Aujeszky, l'adénovirus porcin, des poxvirus, notamment virus de la vaccine, avipox, canarypox, swinepox. On peut aussi utiliser comme vecteurs des ADN plasmidiques (WO-A-90 11092, WO-A-93 19813, WO-A-94 21797, WO-A-95 20660).

L'invention a donc aussi pour objet les vecteurs et les vaccins vivants recombinants ou plasmidiques (vaccins polynucléotidiques ou ADN) ainsi

réalisés, les vaccins comprenant en outre un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire.

5 La présente invention a aussi pour objet une méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez le porc vis-à-vis des circovirus selon l'invention. Elle a en particulier pour objet une méthode de vaccination efficace chez le porc.

Cette méthode prévoit l'administration au porc, en une ou plusieurs fois, d'un vaccin supra. Il est aussi possible de combiner plusieurs types de vaccins supra dans un même protocole de vaccination.

10 Cette méthode prévoit non seulement l'administration aux porcs adultes, mais aussi aux jeunes ou aux femelles gestantes. La vaccination de ces dernières permet de conférer une immunité passive aux nouveau-nés (anticorps maternels).

15 La présente invention offre aussi la possibilité de diagnostiquer la présence des circovirus selon l'invention chez le porc. Elle a donc pour objet des tests de diagnostic et méthodes y relatives mettant en oeuvre les réactifs qui vont être décrits ci-après.

20 La connaissance des séquences des différents circovirus permet de définir des séquences communes qui permettent de produire des réactifs aptes à reconnaître l'ensemble des circovirus porcins connus.

L'homme du métier pourra aussi choisir des fragments des séquences correspondant à des régions présentant peu ou pas d'homologie avec la séquence correspondante du circovirus PK/15 afin de pouvoir effectuer un diagnostic spécifique.

25 Les alignements de séquences permettent à l'homme du métier de choisir un réactif conforme à ses souhaits.

30 Un premier réactif consiste dans les séquences d'ADN divulguées ici et leurs fragments, qui seront notamment utilisés comme sondes ou amorces dans des techniques d'hybridation ou de PCR ("Polymerase Chain Reaction") bien connues.

Un deuxième réactif consiste dans les polypeptides codés par ces séquences à partir du virus ou exprimés à l'aide d'un vecteur (voir supra), ou synthétisés par voie chimique selon les techniques classiques de synthèse peptidique.

5 Un troisième et quatrième réactifs consistent dans des anticorps respectivement polyclonaux et monoclonaux qui pourront être produits selon les techniques usuelles à partir du virus, des polypeptides ou fragments, extraits ou codés par les séquences d'ADN.

10 Ces deuxième, troisième et quatrième réactifs pourront être utilisés dans une méthode de diagnostic, objet de l'invention, dans laquelle l'on recherche, dans un échantillon de fluide physiologique (sang, plasma, sérum, etc.) ou prélèvement de tissu (ganglions, foie, poumons, reins, etc.) provenant d'un porc à tester, la présence d'un antigène spécifique d'un circovirus selon l'invention, en cherchant à détecter soit l'antigène lui-même, 15 soit des anticorps dirigés contre cet antigène.

Les antigènes et anticorps selon l'invention pourront être utilisés dans toutes les techniques de diagnostic de laboratoire connues.

20 Toutefois, on préférera les mettre à profit dans des techniques pouvant être mises en œuvre directement sur le terrain par le vétérinaire, l'éleveur ou le propriétaire de l'animal. L'homme du métier dispose de l'ensemble des techniques de laboratoire et du terrain et est donc parfaitement en mesure de les adapter à l'utilisation de cet antigène et/ou des anticorps comme réactif(s) de diagnostic.

25 Les techniques de diagnostic qui seront préférentiellement utilisées dans le cadre de la présente invention sont le Western Blot, l'immunofluorescence, l'ELISA et l'immunochromatographie.

30 En ce qui concerne la mise en œuvre de méthodes par immunochromatographie, le spécialiste pourra se reporter notamment à Robert F. Zurk et al., Clin. Chem. 31/7, 1144-1150 (1985) ainsi qu'aux brevets ou demandes de brevet WO-A-88/08 534, WO-A-91/12528, EP-A-

291 176, EP-A-299 428, EP-A-291 194, EP-A-284 232, US-A-5 120 643, US-A-5 030 558, US-A-5 266 497, US-A-4 740 468, US-A-5 266 497, US-A-4 855 240, US-A-5 451 504, US-A-5 141 850, US-A-5 232 835 et US-A-5 238 652.

5 Ainsi, l'on cherche de préférence à détecter les anticorps spécifiques dans l'échantillon par test indirect, par compétition ou par déplacement. Pour ce faire, on utilise l'antigène lui-même comme réactif de diagnostic, ou un fragment de cet antigène, conservant la reconnaissance des anticorps.

10 Le marquage peut avantageusement être un marquage à la peroxydase ou un marquage particulière, de préférence à l'or colloïdal.

 On peut aussi chercher à détecter l'antigène lui-même dans l'échantillon à l'aide d'un anticorps marqué spécifique de cet antigène. Le marquage est avantageusement comme décrit ci-dessus.

15 Par anticorps spécifique de l'antigène utilisable notamment en compétition ou déplacement ou pour la détection de l'antigène lui-même, on entend anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques de l'antigène, fragments de ces anticorps, de préférence fragments Fab ou F(ab)'₂.

20 Un autre aspect de l'invention est la production d'anticorps, polyclonaux ou monoclonaux, spécifiques de l'antigène conforme à l'invention, ces anticorps pouvant être ensuite utilisés notamment comme réactifs de diagnostic pour la détection de l'antigène dans un échantillon de fluide physiologique ou dans un prélèvement de tissu, ou même pour la détection d'anticorps présents dans un tel échantillon ou prélèvement. L'invention inclut aussi les fragments immunologiquement fonctionnels de ces
25 anticorps, en particulier les fragments F(ab) et F(ab)'₂.

30 Des anticorps pourront être préparés par les techniques usuelles. On peut notamment se référer à *Antibodies, A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, USA où à J.W. Goding, *Monoclonal Antibodies : Principles and Practice*, Academic Press Inc., dont les contenus sont incorporés ici par référence.

On pourra notamment procéder, comme cela est connu en soi, à la fusion de cellules spléniques de souris immunisées par l'antigène ou par au moins l'un de ses fragments, avec des cellules myélomateuses adéquates.

5 L'invention a également pour objet une préparation, de préférence pure ou partiellement purifiée, ou même brute d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques de l'antigène, notamment anticorps de souris ou de lapin.

10 La présente invention permet également de déterminer des épitopes d'intérêt notamment sur la base des séquences d'ADN décrites ici, que ce soient des épitopes d'intérêt vaccinal ou des épitopes d'intérêt en diagnostic.

15 A partir de la séquence d'ADN du génome du circovirus selon l'invention, l'homme du métier est à même de déterminer des épitopes selon les méthodes connues par exemple programme informatique approprié ou PEPSCAN. Les épitopes sont des régions immunodominantes de protéines et sont à ce titre des régions exposées à la surface des protéines. Ils peuvent être donc reconnus par des anticorps et ainsi être particulièrement employés dans le domaine du diagnostic soit pour la préparation d'anticorps à des fins de diagnostic soit pour la réalisation de peptides correspondants utilisables à titre de réactifs de diagnostic.

20 Au minimum, un épitope est un peptide ayant de 8 à 9 acides aminés. On préférera en général un minimum de 13 à 25 acides aminés.

25 L'homme du métier est donc en mesure, en utilisant l'une ou plusieurs de ces techniques ainsi que les autres techniques disponibles, de trouver des épitopes pour la mise en oeuvre de peptides ou d'anticorps à des fins de diagnostic.

L'invention a également pour objet un kit de diagnostic comportant cet antigène et/ou des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques de cet antigène. Il s'agit en particulier de kits de diagnostic correspondants aux techniques de diagnostic décrites plus haut.

30 L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples

de réalisation non limitatifs, pris en référence au dessin, dans lequel :

Figure 1 : Séquence d'ADN du génome de la souche 999PCV de 1768 pb

Figure 2 : Alignements de la séquence de la figure 1 avec la séquence de la souche PK/15

5 Liste des séquences SEQ ID

SEQ ID N° 1 Séquence d'ADN du génome de la souche 999PCV de 1768 pb

EXEMPLES

10 **Exemple 1 : Culture et isolement des souches de circovirus porcins:**

Des échantillons de tissus ont été récoltés en France, au Canada et aux USA à partir de poumons et de ganglions lymphatiques de porcelets. Ces porcelets présentaient des signes cliniques typiques du syndrome de dépérissement généralisé de post-sevrage. Pour faciliter l'isolement des virus, les échantillons de tissus ont été congelés à -70°C immédiatement après autopsie.

15 Pour l'isolement viral, des suspensions contenant environ 15% d'échantillon de tissu ont été préparées dans un milieu minimum contenant des sels d'Earl (EMEM, BioWhittaker UK Ltd., Wokingham, UK), de la pénicilline (100 UI/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml)(milieu MEM-SA), par broyage des tissus avec du sable stérile au moyen d'un mortier et d'un pilon stériles. Cette préparation broyée a été alors reprise dans du MEM-SA, puis centrifugée à 3000 g pendant 30 minutes à + 4°C pour récolter le surnageant.

25 Préalablement à l'ensemencement des cultures de cellules, un volume de 100 µl de chloroforme a été ajouté à 2 ml de chaque surnageant et mélangé en continu pendant 10 minutes à température ambiante. Ce mélange a alors été transféré dans un tube de microcentrifugeuse, centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes, puis le surnageant a été récolté. Ce surnageant a été

ensuite utilisé comme inoculum pour les expériences d'isolement viral.

Toutes les études d'isolement viral ont été réalisées sur des cultures de cellules PK/15, connues pour être non contaminées par le circovirus porcin (PCV), les pestivirus, les adénovirus porcins et le parvovirus porcin (Allan G. *et al.* Pathogenesis of porcine circovirus experimental infections of colostrum-deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.* 1995. **44.** 49-64).

L'isolement des circovirus porcins a été réalisé selon la technique suivante:

10 Des monocouches de cellules PK/15 ont été dissociées par trypsination (avec un mélange trypsine-versène) à partir de cultures confluentes, et reprises en milieu MEM-SA contenant 15% de sérum foetal de veau non contaminé par du pestivirus (= milieu MEM-G) sous une concentration finale d'environ 400,000 cellules par ml. Des fractions aliquotes de 10 ml de cette
15 suspension cellulaire ont alors été mélangées avec des fractions aliquotes de 2 ml des inoculums décrits ci-dessus, et les mélanges finaux ont été aliquotés en volumes de 6 ml dans deux flacons Falcon de 25 cm². Ces cultures ont alors été incubées à +37°C pendant 18 heures en atmosphère contenant 10% de CO₂.

20 Après incubation, le milieu de culture des monocouches semi-confluentes a été traité avec 300 mM de D-glucosamine (Cat # G48175, Sigma-Aldrich Company Limited, Poole, UK) (Tischr I. *et al.*, *Arch. Virol.* 1987 **96** 39-57), puis l'incubation a été poursuivie pendant une période supplémentaire de 48-72 heures à +37°C. A la suite de cette dernière
25 incubation, l'un des deux Falcons de chaque inoculum a subi 3 cycles successifs de congélation/décongélation. Les cellules PK/15 du Falcon restant ont été traitées avec une solution de trypsine-versène, resuspendues dans 20 ml de milieu MEM-G, puisensemencées dans des Falcons de 75 cm² à une concentration de 400,000 cellules/ml. Les flacons fraîchementensemencés
30 ont alors été "surinfectés" par addition de 5 ml du lysat correspondant

obtenu après les cycles de congélation/décongélation.

Exemple 2 : Préparation des échantillons de culture cellulaire pour détection des circovirus porcins par immunofluorescence ou par hybridation *in situ*.

5 Un volume de 5 ml de la suspension "surinfectée" a été prélevé et ensemencé dans une boîte de Petri de 55 mm de diamètre contenant une lamelle de verre stérile et dégraissée. Les cultures en flacons et sur lamelles de verre ont été incubées à +37°C et traitées à la glucosamine comme décrit dans l'exemple 1. Les cultures sur lamelles de verre ont été récoltées de 24
10 à 48 heures après le traitement à la glucosamine et fixées, soit avec de l'acétone pendant 10 minutes à température ambiante, soit avec 10% de formaldéhyde tamponné pendant 4 heures. Suite à cette fixation, toutes les lamelles de verre ont été stockées à -70°C, sur gel de silice, avant leur utilisation pour les études d'hybridation *in situ* et les études de marquage
15 immunocytochimique.

Exemple 3 : Techniques de détection de séquences PCV par hybridation *in situ*

20 L'hybridation *in situ* a été réalisée sur les tissus prélevés sur les porcs malades et fixés au formaldéhyde et également sur les préparations de cultures de cellules inoculées pour l'isolement viral (voir exemple 2) et fixées sur lamelles de verre.

25 Des sondes génomiques complètes correspondant aux circovirus porcins PK/15 (PCV) et au virus de l'anémie infectieuse du poulet (chicken anemia virus = CAV) ont été utilisées. Le plasmide pPCV1, contenant la forme répliquative du génome PCV clonée sous la forme d'un insert unique de 1,7 kilopaires de bases (kpb) (Meehan B. *et al.* Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. J. Gen. Virol. 1997. 78. 221-227) a été utilisé comme source d'ADN viral spécifique pour PCV. Un plasmide
30 analogue, pCAA1, contenant la forme répliquative 2,3 kpb du circovirus aviaire

CAV a été utilisé comme contrôle négatif. Les stocks de glycérols respectifs de ces deux plasmides ont été utilisés pour la production et la purification des plasmides selon la technique de lyse alcaline (Sambrook J. *et al.* Molecular cloning : A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989) afin qu'ils servent ensuite de matrices pour la préparation des sondes. Les sondes circovirus représentatives des génomes complets du PCV et de CAV ont été produites à partir des plasmides purifiés décrits ci-dessus (1 μ g pour chaque sonde) et d'amorces hexanucléotidiques au hasard en utilisant un kit commercial de marquage non radioactif ("DIG DNA labelling kit" , Boehringer Mannheim, Lewes, UK) selon les recommandations du fournisseur.

Les sondes marquées à la digoxigénine ont été reprises sous un volume de 50-100 μ l d'eau stérile avant leur utilisation pour l'hybridation *in situ*.

Les échantillons de tissus de porcs malades, inclus dans la paraffine et fixés au formaldéhyde, ainsi que les préparations de cultures de cellules infectées, fixées au formaldéhyde, ont été préparées pour la détection des acides nucléiques PCV selon la technique suivante :

Des sections de 5 μ m d'épaisseur ont été découpées à partir des blocs de tissus inclus dans la paraffine, déparaffinés, puis réhydratés dans des solutions successives d'alcool à concentration décroissante. Les sections de tissus et les cultures de cellules fixées au formaldéhyde ont été incubées respectivement pendant 15 minutes et 5 minutes à +37°C dans une solution de protéinase K à 0,5% en tampon Tris-HCl 0,05M, EDTA 5 mM (pH 7,6). Les lames ont été alors placées dans une solution de glycine à 1% en eau distillée autoclavée, pendant 30 secondes, lavées deux fois avec un tampon PBS (phosphate buffer saline) 0,01 M (pH 7,2), et enfin lavées pendant 5 minutes en eau distillée stérile. Elles ont été finalement séchées à l'air libre et mises en contact avec les sondes.

Chaque préparation tissu/sonde a été recouverte avec une lamelle propre et dégraissée, puis placée dans un four à +90°C pendant 10 minutes,

mise ensuite en contact avec un bloc de glace pendant 1 minute, et enfin incubée pendant 18 heures à +37°C. Les préparations ont été ensuite immergées brièvement dans un tampon sel de sodium-citrate (SSC) 2X (pH 7,0) pour éliminer les lamelles protectrices, puis lavées 2 fois pendant 5 minutes en tampon SSC 2X et enfin lavées 2 fois pendant 5 minutes en tampon PBS.

Après ces lavages, les préparations ont été immergées dans une solution d'acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M (pH 7,5) (tampon maléique) pendant 10 minutes, puis incubées dans une solution de 1% de réactif bloquant (Cat # 1096176, Boehringer Mannheim UK, Lewis, East Sussex, UK) en tampon maléique pendant 20 minutes à +37°C.

Les préparations ont alors été incubées avec une solution au 1/250 d'un anticorps monoclonal anti-digoxigénine (Boehringer Mannheim), dilué en tampon bloquant, pendant 1 heure à +37°C, lavées en PBS et enfin incubées avec un anticorps biotynilé anti-immunoglobuline de souris pendant 30 minutes à +37°C. Les préparations ont été lavées en PBS et l'activité peroxydase endogène a été bloquée par un traitement avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,5% en PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Les préparations ont été lavées une nouvelle fois en PBS et traitées avec un substrat 3-amino-9-diéthylcarbazole (AEC) (Cambridge Bioscience, Cambridge, UK) préparé extemporanément.

Après un dernier lavage à l'eau de ville, les préparations ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline, "bleuies" sous eau de ville, et montées sous lamelles microscopiques avec un liquide de montage (GVA Mount, Cambridge Bioscience, Cambridge, UK). Les contrôles d'expérience ont inclus l'utilisation d'une sonde négative non pertinente (CAV) et d'une sonde positive (PCV) sur des échantillons provenant de porcs malades et de porcs non malades.

Exemple 4 : Technique de détection du PCV par immunofluorescence

Le criblage initial de toutes les préparations de culture cellulaire fixées

à l'acétone a été réalisé par une technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) utilisant une dilution au 1/100 d'un pool de sérums de porcs adultes. Ce pool de sérums comprend des sérums de 25 truies adultes d'Irlande du Nord et est connu pour contenir des anticorps contre une grande variété de virus porcins, y compris PCV : parvovirus porcine, adénovirus porcine, et virus PRRS. La technique IFI a été réalisée par un contact du sérum (dilué en PBS) avec les cultures cellulaires pendant une heure à +37°C, suivi de deux lavages en PBS. Les cultures de cellules sont alors colorées avec une dilution au 1/80 en PBS d'un anticorps de lapin anti-immunoglobuline de porc conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine pendant une heure, puis lavées en PBS et montées en tampon glycérol préalablement à l'observation microscopique sous éclairage ultra-violet.

Exemple 5 : Résultats de l'hybridation *in situ* sur les tissus de porcs malades

L'hybridation *in situ*, utilisant une sonde génomique PCV, réalisée sur des tissus prélevés sur des porcelets français, canadiens et californiens présentant des lésions de dépérissement généralisé et fixés au formaldéhyde, a révélé la présence d'acides nucléiques PCV associés aux lésions, dans plusieurs des lésions étudiées. Aucun signal n'a été observé lorsque la sonde génomique PCV a été utilisée sur des tissus prélevés sur des porcs non malades ou lorsque la sonde CAV a été utilisée sur les tissus de porcs malades. La présence d'acide nucléique PCV a été identifiée dans le cytoplasme et le noyau de nombreuses cellules mononucléaires infiltrant les lésions dans les poumons des porcelets californiens. La présence d'acide nucléique PCV a également été mise en évidence dans les pneumocytes, les cellules épithéliales bronchiques et bronchiolaires, et dans les cellules endothéliales des petites artérioles, veinules et vaisseaux lymphatiques.

Chez les porcs malades français, la présence d'acide nucléique PCV a été détectée dans le cytoplasme de nombreux lymphocytes folliculaires et dans les cellules mononucléaires intrasinusoïdales des ganglions

lymphatiques. L'acide nucléique PCV a également été détecté dans des syncytia occasionnels. En fonction de ces résultats de détection, des échantillons de poumons de porcs californiens, de ganglions lymphatiques mésentériques de porcs français, et d'organes de porcs canadiens ont été choisis aux fins d'isolement des nouvelles souches de circovirus porcin.

Exemple 6 : Résultats de la culture cellulaire des nouvelles souches de circovirus porcin et détection par immunofluorescence

Aucun effet cytopathique (ECP) n'a été observé dans les cultures de cellules inoculées avec les échantillons prélevés sur les porcelets français (souche Imp.1008), californiens (souche Imp.999) et canadiens (souche Imp.1010) montrant des signes cliniques du syndrome du dépérissement généralisé. Cependant, l'immuno-marquage des préparations provenant des cultures de cellules inoculées, après fixation à l'acétone et avec un pool de sérums polyclonaux de porcs, a révélé une fluorescence nucléaire chez de nombreuses cellules dans les cultures inoculées à partir des poumons de porcelets californiens (souche Imp.999), à partir des ganglions lymphatiques médiastinaux des porcelets français (souche Imp.1008), et à partir d'organes des porcelets canadiens (souche Imp.1010).

Exemple 7 : Extraction de l'ADN génomique des circovirus porcins

Les formes répliquatives des nouvelles souches de circovirus porcin (PCV) ont été préparées à partir de cultures de cellules PK/15 infectées (voir exemple 1) (10 Falcons de 75 cm²) récoltées après 72-76 heures d'incubation et traitées à la glucosamine, comme décrit pour le clonage de la forme répliquative du CAV (Todd. D. *et al.* Dot blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe. J. Clin. Microbiol. 1991. **29**. 933-939). L'ADN double brin de ces formes répliquatives a été extrait selon une modification de la technique de Hirt (Hirt B. Selective extraction of polyoma virus DNA from infected cell cultures. J. Mol. Biol. 1967. **36**. 365-369),

comme décrit par Molitor (Molitor T.W. *et al.* Porcine parvovirus DNA: characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates. *Virology*. 1984. **137**. 241-254).

5 Exemple 8 : Carte de restriction de la forme répliquative du génome de la souche Imp.999 de circovirus porcin.

L'ADN (1-5 μ g) extrait selon la technique de Hirt a été traité par la nucléase S1 (Amersham) selon les recommandations du fournisseur, puis cet ADN a été digéré par différentes enzymes de restriction (Boehringer Mannheim, Lewis, East Sussex, UK) et les produits de la digestion ont été
10 séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% en présence de bromure d'éthidium comme décrit par Todd *et al.* (Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent. *J. Gen. Virol.* 1990. **71**. 819-823). L'ADN extrait des cultures de la souche Imp.999 possède un site unique
15 EcoRI, 2 sites SacI et ne possède pas de site PstI. Ce profil de restriction est donc différent du profil de restriction présenté par la souche PCV PK/15 (Meehan B. *et al.* Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. 1997. **78**. 221-227) qui possède au contraire un site PstI et ne possède pas de site EcoRI.

20

Exemple 9 : Clonage du génome de la souche Imp.999 de circovirus porcin

Le fragment de restriction d'environ 1,8 kpb généré par digestion de la forme répliquative double brin de la souche PCV Imp.999 avec l'enzyme de restriction EcoRI a été isolé après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%
25 (voir exemple 3) en utilisant un kit commercial Qiagen (QIAEXII Gel Extraction Kit, Cat # 20021, QIAGEN Ltd., Crawley, West Sussex, UK). Ce fragment de restriction EcoRI-EcoRI a été ensuite ligaturé avec le vecteur pGEM-7 (Promega, Medical Supply Company, Dublin, Ireland), préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction et déphosphorylé, en suivant les
30 techniques standards de clonage (Sambrook J. *et al.* Molecular cloning : A

Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Les plasmides obtenus ont été transformés dans une souche hôte *Escherichia coli* JM109 (Stratagene, La Jolla, USA) selon les techniques standards. Le fragment de restriction EcoRI-EcoRI de la souche PCV Imp.999 a également été cloné dans le site EcoRI du vecteur pBlueScript SK+ (Stratagene Inc. La Jolla, USA). Parmi les clones obtenus pour chaque souche hôte, au moins 2 clones contenant les fragments de la taille attendue ont été sélectionnés. Les clones obtenus ont alors été cultivés et les plasmides contenant le génome complet de la souche Imp.999 ont été purifiés en petit volume (2 ml) ou en grand volume (250 ml) selon les techniques standards de préparation et de purification des plasmides.

Exemple 10 : Séquençage de l'ADN génomique (forme répliquative double brin) de la souche PCV Imp.999.

La séquence nucléotidique de 2 clones EcoRI Imp.999 (clones pGEM-7/2 et pGEM-7/8) a été déterminée selon la technique des didéoxynucléotides de Sanger en utilisant le kit de séquençage "AmpliTaq DNA polymerase FS" (Cat # 402079 PE Applied Biosystems, Warrington, UK) et un appareil de séquençage automatique Applied BioSystems ABI373A selon les recommandations du fournisseur. Les réactions de séquences initiales ont été faites avec les primers universels M13 "forward" et "reverse". Les réactions de séquences suivantes ont été générées selon la technique de "marche sur l'ADN". Les oligonucléotides nécessaires à ces séquençages ultérieurs ont été synthétisés par Life Technologies (Inchinnan Business Park, Paisley, UK).

Les séquences générées ont été assemblées et analysées au moyen du logiciel MacDNASIS version 3.2. (Cat # 22020101, Appligene, Durham, UK). Les différents cadres ouverts de lecture ont été analysés au moyen de l'algorithme BLAST disponible sur le serveur du "National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

La séquence complète (fragment EcoRI-EcoRI) obtenue à partir du clone

pGEM-7/8 (SEQ ID N° 1) est présentée sur la figure N° 1.

Exemple 11 : Analyse de la séquence de la souche PCV Imp.999.

5 Lorsque la séquence générée à partir de la souche Imp.999 a été utilisée pour une recherche d'homologie vis-à-vis des séquences contenues dans la banque de données GenBank, la seule homologie significative qui ait été détectée est une homologie d'environ 76 % (au niveau acide nucléique) avec la séquence de la souche PK/15 (Numéros d'accès Y09921 et U49186) (voir figure N° 2).

10 Au niveau acides aminés, la recherche d'homologie de la traduction des séquences dans les 6 phases avec les banques de données (algorithme BLAST X sur le serveur NCBI) a permis de mettre en évidence une homologie de 94 % avec le cadre ouvert de lecture correspondant à la réplicase théorique du virus BBTV similaire aux circovirus de plantes (numéro d'identification GenBank 1841515) codée par la séquence GenBank U49186.

15 Aucune autre séquence contenue dans les banques de données ne montre d'homologie significative avec la séquence générée à partir de la souche PCV Imp.999.

20 L'analyse des séquences obtenues à partir de la souche Imp.999 cultivée à partir de lésions prélevées sur des porcelets californiens présentant des signes cliniques du syndrome de dépérissement généralisé montre clairement que cet isolat viral est une nouvelle souche de circovirus porcin.

Exemple 12 : Caractère infectieux du génome PCV cloné à partir des nouvelles souches.

25 Le plasmide pGEM-7/8 contenant le génome complet (forme réplivative) de l'isolat Imp.999 a été transfecté dans des cellules PK/15 selon la technique décrite par Meehan B. *et al.* (Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anemia agent : sequence analysis of the cloned
30 replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments.

Arch. Virol. 1992. **124**. 301-319). L'analyse par immunofluorescence (voir exemple 4) réalisée sur le premier passage après transfection sur cellules PK/15 non contaminées a montré que le plasmide du clone pGEM7/8 était capable d'induire la production de virus PCV infectieux. La disponibilité d'un clone contenant un matériel génétique PCV infectieux permet toute manipulation utile sur le génome viral afin de produire des virus PCV modifiés (soit atténués chez le porc, soit défectifs) utilisables pour la production de vaccins atténués ou recombinés, ou pour la production d'antigènes pour des trousse de diagnostic.

10

Exemple 13 : Production des antigènes PCV par culture *in vitro*

La culture des cellules PK/15 non contaminées et la multiplication virale sont réalisées selon les mêmes modalités qu'à l'exemple 1. Les cellules infectées sont récoltées après trypsination après 4 jours d'incubation à 37 °C et numérotées. Le passage suivant est inoculé avec 400 000 cellules infectées par ml.

15

Exemple 14 : Inactivation des antigènes viraux

En fin de culture virale, les cellules infectées sont récoltées et lysées par ultrasons (Branson Sonifier) ou à l'aide d'un broyeur colloïdal de type rotor-stator (UltraTurrax, IKA). La suspension est ensuite centrifugée à 3700 g pendant 30 minutes. La suspension virale est inactivée par 0,1 % d'éthylène imine pendant 18 heures à +37°C ou par 0,5 % de bêta-propiolactone pendant 24 heures à +28°C. Si le titre du virus avant inactivation est insuffisant, la suspension virale est concentrée par ultrafiltration en utilisant une membrane avec un seuil de coupure de 300 kDa (Millipore PTMK300). La suspension virale inactivée est conservée à +5°C.

20

25

30

Exemple 15 : Préparation du vaccin sous forme d'émulsion à base d'huile minérale.

Le vaccin est préparé selon la formule suivante :

- suspension de circovirus porcin inactivé : 250 ml
- 5 - Montanide® ISA 70 (SEPPIC): 750 ml

La phase aqueuse et la phase huileuse sont stérilisées séparément par filtration. L'émulsion est préparée par mélange et homogénéisation des ingrédients à l'aide d'un émulseur à turbine Silverson.

- 10 Une dose de vaccin contient environ $10^{7.5}$ DICT50. Le volume d'une dose de vaccin est de 0,5 ml pour administration par voie intradermique, et de 2 ml pour administration par voie intramusculaire.

Exemple 16 : Préparation du vaccin sous forme d'émulsion à base d'huile métabolisable.

- 15 Le vaccin est préparé selon la formule suivante :

- suspension de circovirus porcin inactivé : 200 ml
- Dehymuls HRE 7 (Henkel) : 60 ml
- Radia 7204 (Oleofina) : 740 ml

- 20 La phase aqueuse et la phase huileuse sont stérilisées séparément par filtration. L'émulsion est préparée par mélange et homogénéisation des ingrédients à l'aide d'un émulseur à turbine Silverson.

Une dose de vaccin contient environ $10^{7.5}$ DICT50. Le volume d'une dose de vaccin est de 2 ml pour administration par voie intramusculaire.

25

30

Résultats d'immunofluorescence indirecte vis-à-vis des souches de virus PCV US et française et du contaminant PK/15 avec un sérum hyperimmun (PCV-T), un panel d'anticorps monoclonaux F99, préparés à partir de PK/15 et un sérum hyperimmun préparé à partir de la souche canadienne (PCV-C)

5

VIRUS				
	PK/15	USA	France	
10	PCV-T antiserum	> 6 400	200	800
	PCV-C antiserum	200	≥ 6,400	≥ 6,400
	F99 1H4	> 10 000	< 100	100
	F99 4B10	> 10 000	< 100	< 100
	F99 2B7	> 10 000	100	< 100
15	F99 2E12	> 10 000	< 100	< 100
	F99 1C9	> 10 000	< 100	100
	F99 2E1	≥ 10 000	< 100	< 100
	F99 1H4	> 10 000	100	< 100

20

* inverse de la dernière dilution du sérum ou de l'anticorps monoclonal qui donne une réaction positive en immunofluorescence indirecte.

REVENDICATIONS

1. Préparation purifiée de circovirus porcine susceptible d'être isolé d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment de lésions, d'un porc malade présentant le syndrome PMWS.

5

2. Préparations purifiées de circovirus porcine déposés auprès de l'ECACC, sous les références suivantes:

- n° d'accès provisoire V97100219

- n° d'accès provisoire V97100218

10

- n° d'accès provisoire V97100217.

3. Préparation de circovirus porcine produit et isolé de cellules en culture cellulaire in vitro, ces cellules ayant été infectées par un circovirus porcine susceptible d'être isolé d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment de lésions, d'un porc présentant le syndrome PMWS.

15

4. Préparation de circovirus porcine selon la revendication 3, produit sur, et isolé d'une lignée cellulaire de rein de porc, en particulier de cellules PK/15 indemnes de contamination par PCV.

20

5. Préparation de circovirus porcine isolé d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment de lésions, provenant d'un porc présentant le syndrome PMWS.

25

6. Extrait ou surnageant de culture, éventuellement purifié, recueilli d'une culture cellulaire in vitro de cellules que l'on a infectées à l'aide d'un circovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

30

7. Préparation antigénique, éventuellement purifiée, recueillie d'une culture cellulaire in vitro de cellules que l'on a infectées à l'aide d'un

circovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

5 8. Vaccin comprenant une préparation antigénique selon la revendication 7, ou un surnageant ou extrait de cultures selon la revendication 6.

10 9. Vaccin selon la revendication 8, caractérisé en ce que le vaccin comprend de l'antigène entier vivant atténué, dans un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire et éventuellement un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire ainsi qu'éventuellement un stabilisateur de lyophilisation.

15 10. Vaccin selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'antigène est inactivé et le vaccin comprend en outre un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire et éventuellement un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire.

20 11. Vaccin selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend un ou des antigènes d'un ou de plusieurs des circovirus tel que défini aux revendications 1 à 6.

25 12. Vaccin selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une autre valence correspond à un autre pathogène du porc.

13. Fragment d'ADN contenant la séquence SEQ ID NO:1.

14. Polypeptide codé par le fragment selon la revendication 15.

30 15. Vecteur d'expression in vitro comprenant, intégré dans son

génomique, une séquence ou fragment d'ADN selon la revendication 13, de manière à pouvoir être exprimée in vitro.

5 **16.** Vecteur d'expression selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi coli et baculovirus, le baculovirus étant propagé sur des cellules d'insecte après intégration de la séquence ou fragment d'ADN.

10 **17.** Polypeptides produits par un vecteur d'expression selon la revendication 15 ou 16, éventuellement purifiés.

15 **18.** Vaccin de sous-unité, comprenant au moins un polypeptide selon la revendication 17 dans un diluant ou véhicule acceptable sur le plan vétérinaire, et éventuellement un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire.

20 **19.** Vecteur d'expression in vivo comprenant, intégré dans son génome, un fragment d'ADN selon la revendication 13, de manière à pouvoir l'exprimer in vivo.

25 **20.** Vecteur d'expression selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les virus vivants capables de se multiplier chez le porc sans être pathogène pour cet animal, et les plasmides.

30 **21.** Vecteur d'expression selon la revendication 20, caractérisé en ce que le vecteur viral est choisi parmi les herpès virus du porc, tel que le virus de la maladie d'Aujeszky, l'adénovirus porcin, les poxvirus, notamment le virus de la vaccine, l'avipox, le canarypox, le swinepox.

35 **22.** Vaccin vivant ou plasmidique, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur d'expression selon l'une des revendications 19 à 21 dans un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire.

23. Sonde ou amorce comprenant tout ou partie de la séquence selon la revendication 13.

5 24. Anticorps polyclonaux ou monoclonaux préparés à partir du circovirus selon l'une des revendications 1 à 6, des polypeptides selon la revendication 14 ou 17 ou leurs fragments

10 25. Méthode de détection du circovirus porcin, dans lequel, dans un échantillon de fluide physiologique ou un prélèvement de tissu d'un porc à tester, on recherche la présence d'un antigène en cherchant à détecter soit l'antigène lui-même soit des anticorps dirigés contre cet antigène.

Figure N°1

1 GAATTCAACC TTAACCTTTT TTATCTGTGA gTATTCAAAG GGTATAaAgA
 51 TTTTGTGGT CCCCCTCCC GGGGAACAA AGTCgTCAAT ATTAAATCTC
 101 ATCATGTCCA CCGCCCAGGA GGGCGTTCTG ACTGTGGTAg CCTTGACAgT
 151 ATATCCGAAG GTGCGGGAGA rGCGGGTGT GAAAATGCCA TTTTTCCTTC
 201 TCCAACGGTA GCGGTGGCGG GGGTGGACmA nCCAcgGGCG GCGGCGGAWG
 251 ATCTGGCCAA GATGGCTGCG GGGGCGGTGT CTTCTTCTGC GGTAACGCCT
 301 CCTTGATAC GTCATAgCTG AAAACGAAAG AAGTGCCTG TAaGTATTAC
 351 CAGCGCACTT CGGCAGCGGC AGCACCTCGG CAGCaCCTCA GCAGCAACAT
 401 GCCCAGCAAG AAGAATGGAA GAAGCGGACC CCAACCACAT AAAAGGTGGG
 451 TGTTACGCT GAATAATCCT TCCGAAGACG AGCGCAAGAA AATACGGGAG
 501 CTCCCaATCT CCCTATTTGA TTATTTTATT GTTGGCGAGG AGGGTwwTGA
 551 gGAAnGACgA ACACCTCACC TCCAGGGGT CGctAATTTT GTGAAGAaGc
 601 aaACTTtTAA TAAAGTGAAG TGGTATTTGG GTGCCCGCTG CCACATCGAG
 651 AAAGCCaAG GAACTGATCA GCAGAATAAA GAATATTGCA GTAAAgAAGG
 701 CAACTACTT ATTGAATGTG GAGCTCCTCG ATCTCAAGGA CAACGGAGTG
 751 ACCTGTCTAC TGCTGTGAGT ACCTTGTGG AGAGCGGGAG TCTGGTGACC
 801 GTTGcAGAGC AGCACCTGT AACGTTTGT AGAAATTTCC GCGGGCTGGC
 851 TGAActTTTG AAAGTGAGCG GGAAAATGCA GAAGCGTGAT TGGAAGACCA
 901 ATGTACACGT CATTGTGGGG CCACCTGGGT GTGGTAAAAG CAAATGGGCT
 951 GCTAATTTTG CAGACCCGGA AACCACATAC TGGAAACCAC CTAGAAACAA
 1001 GTGGTGGGAT GGTTACCATG GTGAAGAAGT GGTGTATTAT GATGACTTTT
 1051 ATGGCTGGCT GCCGTGGGAT GATCTACTGA GACTGTGTGA TCGATATCCA
 1101 TTGACTGTAG AGACTAAAGG TGGAActGTA CNNNNNNGG CCCGCAGTAT
 1151 TCTGATTACC AGCAATCAGA CCCCgtGGGA ATGGTACTCC TCAACTGCTG
 1201 TCCCAGctGT AGAAGCTCTC TATCGGAGGA ttACTTCCTT GGTATTTtGG
 1251 AaGAATGCTA CAGAACAATC CACGGAGGAA GGGGGCCAGT TnGTCACCCT

2/6

Figure N°1 (suite)

1301 TTCCCCCCA TGCCcTGAAT TTCCATaTGA AATAAATTAC TGAGTCTTTT
1351 TTATCACTTC GTAATGGTTT TTATTATTCA TTTAGGGTTT AAGTGGGGGG
1401 TCTTTAAGAT TAAATTCTCT GAATTGTACA TACATGGTTA CACGGATATT
1451 GTAGTCCTGG TCGTATATAC TGTTTTCGAA CGCAGTGCCG AGGCCTACGT
1501 GGTCCACATT TCTAGAGGTT tGTAGCCTCA gCCAAAGctG ATTCCTTTTG
1551 TTATTTGGTT GGAAGTAATC AATAGTGGAG TCAAGAACAG GTTTGGGTGT
1601 GAAGTAACGG GAGTGGTAGG AGAAGGGTTG GGGGATTGTA TGGCGGGAGG
1651 AGTAGTTTAC ATATGGGTCA TAGGTTAGGG CTGTGGCCTT TGTTACAAAG
1701 TTATCATcTA GAATAACAGC AGTGGAGCCC ACTCCCCTAT CACCCTGGGT
1751 GATGGGGGAG CAGGGCCA

INSTITUT NATIONAL

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

de la

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

PROPRIETE INDUSTRIELLE

FA 550840
FR 9712382

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	NAYAR ET AL: "DETECTION AND CHARACTERIZATION OF PORCINE CIRCOVIRUS ASSOCIATED WITH POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME IN PIGS" CANADIAN VETERINARY JOURNAL, vol. 38, juin 1997, pages 385-386, XP002068396 * le document en entier * ---	1,3-12, 24,25
D,X	CLARK: "POST-WEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME" PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 1 - 4 mars 1997, QUEBEC CITY, QUEBEC, pages 499-501, XP002068397 * le document en entier, et surtout p.500, dernier alinéa * ---	1,3-12, 24,25
D,A	MEEHAN ET AL: "SEQUENCE OF PORCINE CIRCOVIRUS DNA: AFFINITIES WITH PLANT CIRCOVIRUSES" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 78, no. 1, janvier 1997, pages 221-227, XP002068398 * le document en entier * ---	1-25
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K C12N
D,A	TODD ET AL: "COMPARISON OF THREE ANIMAL VIRUSES WITH CIRCULAR SINGLE-STRANDED DNA GENOMES" ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 117, 1991, pages 129-135, XP002068399 * page 129 * * abrégé * -----	1-25
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
17 juin 1998		Sitch, W
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 1503 (3.92) (P04C13)