

AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DU GÈNE PAR PCR (RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE) APPLICATION À LA DÉTECTION DU GÉNOME DU VIRUS DE LA MALADIE D'AUJESZKY

A. JESTIN (1), T. FOULON (2), P. BLANCHARD (1)

*(1) Ministère de l'Agriculture, Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, Station de Pathologie Porcine, BP 53,
22440 PLOUFRAGAN.*

*(2) Ministère de la Recherche et de la Technologie, Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, 7, rue Guy-Môquet,
94802 VILLEJUIF CEDEX.*

Les techniques de détection des génomes des microorganismes par hybridation ont toutes en commun l'inconvénient d'être longues et de manquer de sensibilité.

Les techniques d'amplification enzymatique des gènes sont aujourd'hui au point, elles ont déjà été appliquées avec succès à l'amplification des gènes responsables de maladies génétiques humaines ou de génome de microorganismes pathogènes.

Le principe de l'amplification enzymatique est relativement simple dans sa conception, sa mise au point a été permise grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire de l'enzymologie et de la synthèse chimique des oligonucléotides. Cette amplification rend immédiate la détection d'un gène, en effet les millions d'exemplaires du gène, après copie répétée de la séquence initiale, sont directement visibles dans un gel.

Une séquence du gène codant pour la glycoprotéine gp50 a été choisie et amplifiée par la technique de l'amplification enzymatique.

Des prélèvements provenant d'animaux infectés dans les conditions expérimentales ou en élevage ont été étudiés par cette technique PCR. Relativement aux résultats obtenus par isolement viral et le suivi sérologique des animaux infectés, la technique PCR s'est révélée être très sensible et très spécifique. L'amplification enzymatique du gène par PCR peut être considérée comme une technologie susceptible d'être largement utilisée dans la détection des génomes viraux.

Rapid detection of pseudorabies virus genomic sequences in biological samples from infected pigs using polymerase chain reaction DNA amplification

The presence of the pseudorabies virus (PRV) genome in infected hosts has previously been studied by standard hybridization techniques, which showed the viral genome to be present at very low levels in infected tissues. The recently introduced Polymerase Chain Reaction (PCR) procedure provides an alternative and rapid means of amplifying small quantities of specific DNA sequences.

We are applying this technique to a study of pigs infected by PRV. The sequence selected for amplification consists of 222 bp lying in the gene coding for the glycoprotein gp50. We have used a pair of 20-mer oligonucleotides flanking this sequence as primer.

Nasal samples from experimentally and naturally infected pigs were tested by this PCR technique. When compared to tissue culture and serological test, detection by gel electrophoresis of PCR amplified fragments provided excellent specificity and sensitivity. We conclude that PCR amplification will be a valuable tool for rapid diagnosing PRV infection in pigs, in less than one hour.

INTRODUCTION

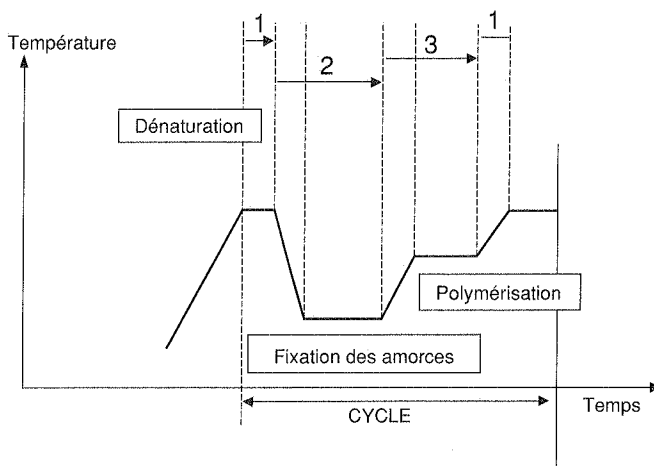
L'isolement viral en culture cellulaire est encore la technique utilisée en routine pour le diagnostic des infections virales. Des méthodes alternatives ont été proposées pour le diagnostic de la maladie d'Aujeszky en phase aiguë chez le porc. Les antigènes viraux peuvent être détectés dans les cellules des cavités nasales par immunofluorescence ou par ELISA (ONNO et al., 1988 ; JESTIN et al., 1989), les génomes viraux peuvent être détectés par la technique d'hybridation de sondes radioactives ou non radioactives (BELAK et LINNE, 1988). L'amplification enzymatique du DNA par la réaction de polymérisation en chaîne (RPC ou PCR) est une nouvelle technologie susceptible d'être utilisée avec succès dans le diagnostic des infections virales. Les applications de cette PCR sont nombreuses. Cette technique a été appliquée avec succès chez l'homme au diagnostic prénatal des maladies génétiques telle l'hémophilie A, l'anémie falciforme (SAIKI et al., 1988), la beta thalassémie, la phénylcétonurie et la déficience en alpha antitrypsine (SAIKI et al., 1985 ; KOGAN et al., 1987 ; SAIKI et al., 1988 ; DILELLA et al., 1988, ABBOT et al., 1988). La PCR a également été adaptée au diagnostic des maladies infectieuses, tel le SIDA pédiatrique par détection du virus HIV dans les cellules sanguines, les leucémies à retrovirus HTLV1, et les papillomas à HPV (KWOK et al., 1987 ; DE ROSSI et al., 1988 ; IMPRAIM et al., 1987 ; SHIBATA et al., 1988 ; DUGGAND.B., 1988). Après une description du principe de la PCR faisant appel à la biologie moléculaire, à l'enzymologie et à la synthèse chimique des oligonucléotides, les auteurs présentent les modalités et résultats de son application à la détection du virus de la maladie d'Aujeszky dans les produits d'écouvillonnage des cavités nasales de porcs malades.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODE

1.1. Principe de la technique PCR

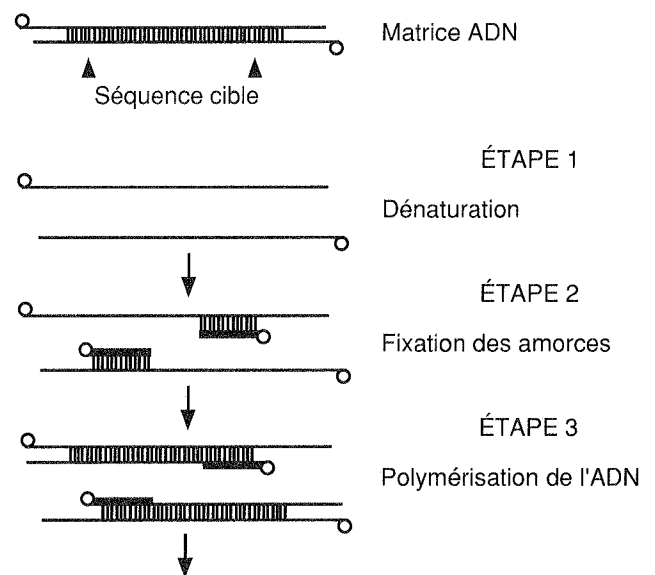
Le principe de la technique est illustré dans les figures 1-2-3 4

FIGURE 1
ÉTAPES D'UN CYCLE D'AMPLIFICATION ENZYMATIQUE.



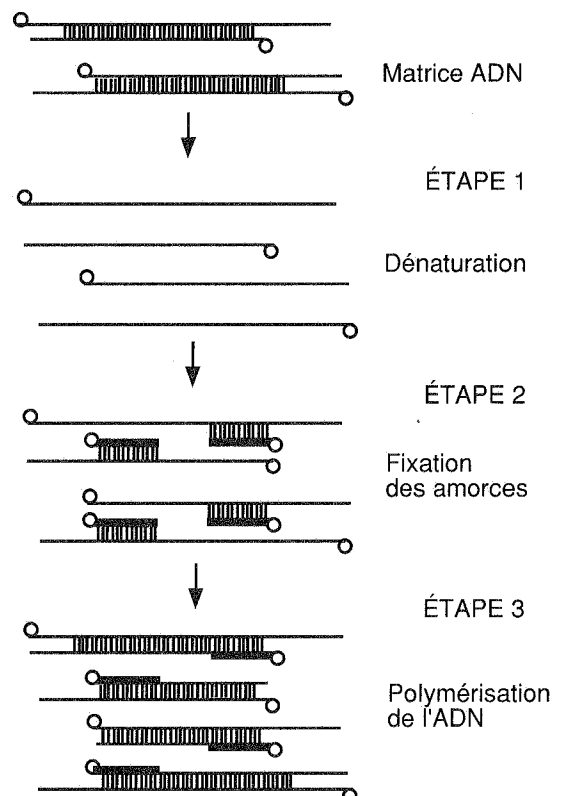
Chaque cycle comprend 3 étapes. La *dénaturation* de l'ADN est obtenue par action thermique (1^{ère} étape). Les oligonucléotides de synthèse ajoutés à la solution se fixent aux séquences spécifiques ; (c'est l'étape de la *fixation des amorces*). Puis l'enzyme DNA-polymérase synthétise deux brins d'ADN à partir des amorces en incorporant les nucléotides d'ATP, d'ITP, d'GTP et d'CTP, c'est l'étape de *polymérisation* (3^{ème} étape). L'enzyme thermorésistante supporte l'étape de dénaturation et un nouveau cycle est possible.

FIGURE 2
PREMIER CYCLE



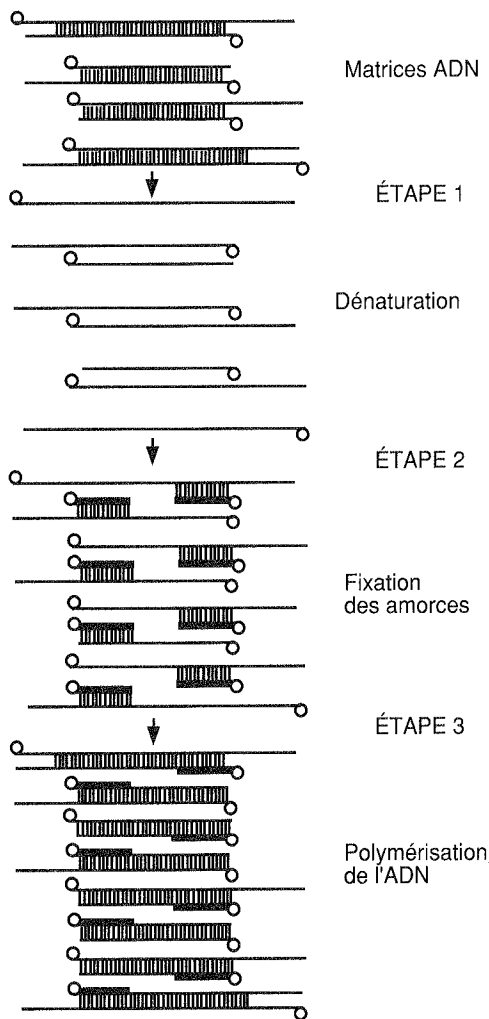
Les trois étapes du cycle présentées en Figure 1 se retrouvent : dénaturation (1) fixation des amorces (2) et polymérisation de l'ADN (3). Dans le prélèvement, une copie de la séquence virale recherchée soumise à l'action thermique (étape n° 1 du cycle) est dénaturée. Les deux brins d'ADN séparés se retrouvent dans la solution en présence de courts fragments d'ADN (amorces) synthétisés par voie chimique et ajoutés à la solution. Après refroidissement, les amorces se fixent (étape n° 2) sur les séquences homologues des deux brins d'ADN. C'est la fixation des amorces. Dans la dernière étape (étape n° 3), l'enzyme ADN polymérase assure la polymérisation de deux nouveaux brins d'ADN. A ce stade, le prélèvement contient deux copies de la séquence virale recherchée.

FIGURE 3
DEUXIÈME CYCLE



Les trois étapes du cycle se retrouvent (Figure 1). Le nombre de copies de la séquence virale étudiée passe de deux à quatre copies

FIGURE 4
TROISIÈME CYCLE

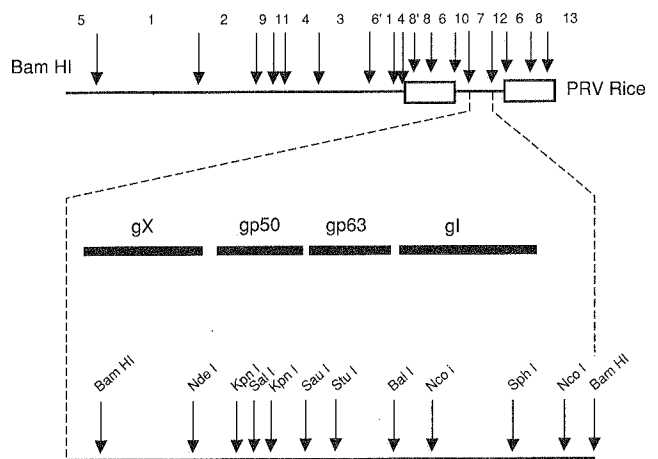


Les trois étapes du cycle se retrouvent (Figure 1). Le nombre de copies de la séquence virale étudiée passe de quatre à huit copies

1.2. Préparation des amorces oligonucléotidiques*

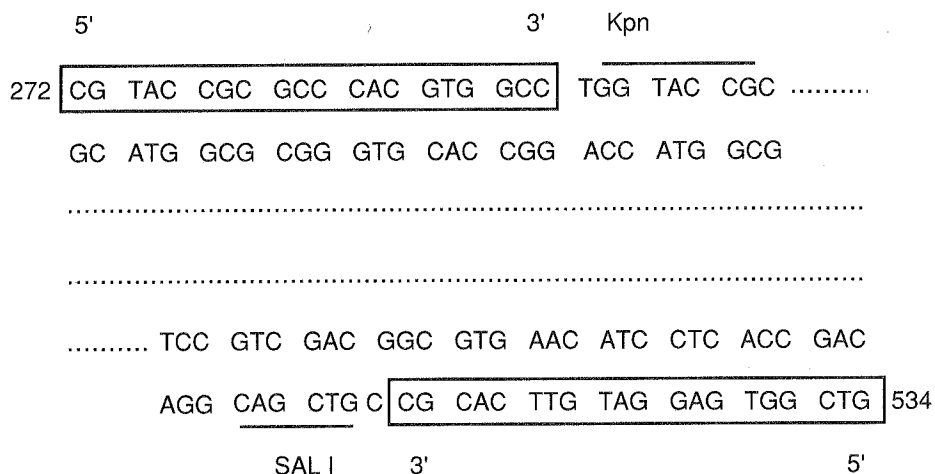
Un couple d'amorces a été synthétisé par la Société APPLIGENE (STRASBOURG) à l'aide d'un synthétiseur d'oligonucléotides. Ce couple d'amorces permet l'amplification enzymatique d'un fragment d'ADN de 262 paires de bases qui porte une partie du gène codant pour la glycoprotéine gp50 du virus de la maladie d'Aujeszky. Chaque amorce est constituée par un oligonucléotide comprenant 20 nucléotides. Les deux amorces encadrent les sites de coupure par les enzymes de restriction KpnI et SalI localisés dans le gène codant pour la gp50. (Figures 5-6) (PETROVSKI et al., 1986, a-b)

FIGURE 5
CARTE DES SITES DE COUPURE PAR L'ENZYME DE RESTRICTION Bam HI DU GÉNOME DU VIRUS DE LA MALADIE D'AUEJESKY.



La région comprise entre les sites Kpn I et Sal I du gène codant pour la glycoprotéine gp50 a été retenue comme séquence cible pour l'amplification enzymatique

FIGURE 6
SÉQUENCES DES OLIGONUCLÉOTIDES DE SYNTHÈSE (encadrés) UTILISÉS COMME AMORCE DANS LA REACTION D'AMPLIFICATION ENZYMATIQUE ET LEUR LOCALISATION DANS LE GÉNOME DU VIRUS DE LA MALADIE D'AUEJESKY.



La séquence amplifiée est située entre les nucléotides 272 et 534 suivant le premier codon de la glycoprotéine gp50. Le fragment amplifié comprend 262 nucléotides et correspond aux 2 amorces de 20 nucléotides encadrant le segment amplifié par polymérisation

* fragment d'ADN synthétisé chimiquement.

1.3. Les animaux d'expérience

Six porcs SPF âgés de 5 mois sont infectés par la souche 75V19 du virus Aujeszky (ANDRIES et al., 1978). Le virus est inoculé par voie nasale (106 TCID₅₀). Les symptômes et les températures rectales sont enregistrés quotidiennement. L'excrétion virale est détectée par écouvillonnage des cavités nasales à l'aide d'écouvillons selon un protocole déjà décrit (ONNO et al., 1987).

1.4. Les animaux infectés naturellement dans les élevages

Des troubles respiratoires sur porcs charcutiers furent signalés dans 6 élevages de Bretagne. Les signes cliniques furent notés et des écouvillons prélevés sur 10 porcs par élevage.

1.5. Isolement du virus des produits d'écouvillonnage

L'isolement et le titrage du virus sont effectués en culture cellulaire sur cellules PK15. Les effets cytopathiques sont recherchés après 3-5 et 8 jours et le virus identifié.

1.6. Recherche des anticorps dans les sérums

Deux prélèvements sanguins furent effectués sur les animaux infectés expérimentalement ou naturellement une première fois au moment des symptômes puis deux semaines plus tard. Les anticorps sont recherchés par le test de séroneutralisation sur cellules PK15.

1.7. Production d'un stock d'ADN viral de différentes souches

45 souches du virus de la maladie d'Aujeszky ont été inoculées à des tapis cellulaires pour la production d'ADN viral. Les cellules sont récoltées 18 heures après l'inoculation et leur concentration est ajustée à environ 106 cellules par ml.

1.8. Préparation des échantillons

Après écouvillonnage de la cavité nasale des porcs, les écouvillons sont plongés dans 2 ml de milieu MEM puis vortexés. Les cellules d'origine nasale sont retrouvées à la concentration moyenne de 106 cellules par ml (ONNO, 1987).

1.9. Préparation de l'ADN pour la PCR

L'ADN est préparé à partir, soit des écouvillons nasaux, soit de cultures cellulaires selon un protocole relativement simple. Les suspensions cellulaires (200 µl) sont pendant 2 min. centrifugées à 12000 tr/min en minicentrifugeuse de paillasse. Les culots cellulaires sont remis en suspension dans 200 µl d'eau distillée et chauffées à 115° pendant 10 mn dans un thermobloc (BIOBLOCK SCIENTIFIC 92617) après quoi les tubes sont plongés dans la glace fondante pendant 5 min.

1.10. Amplification de la séquence d'ADN

La réaction d'amplification enzymatique du gène par la réaction de polymérisation en chaîne se fait sous un volume total de 10 µl. La solution comprend 50 mM de KCL, 10 mM de TRIS-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % gélatine, 1 µM de chaque amorce et 200 µM de chacun des 4 nucléotides (dATP, dCTP, dTTP et dGTP), 2 µl de la préparation de l'ADN à étudier et 0,5 unité d'une enzyme thermorésistante (extraite de *Thermus Aquaticus*, Taq, bactéries vivant dans les eaux très

chaudes). Afin d'éviter l'évaporation, la solution est recouverte de 30 µl d'huile minérale (SIGMA M-3511). La réaction d'amplification nécessitant dans son principe une répétition des cycles de variations thermiques, les tubes sont placés dans le bain-marie thermocyclé qui produit cette répétition de cycles thermiques (TECHNE-OSI). Les conditions d'hybridation des amorces sur les séquences d'ADN spécifiques ont été définies en tenant compte du pourcentage élevé de G + C contenu dans la séquence étudiée. La température optimale de l'hybridation se situe entre 50 et 65°C, les températures les plus élevées (65°C) assurant une amplification enzymatique plus spécifique. Le nombre de cycles a été fixé à 25. L'augmentation du nombre de cycles d'amplification au delà de 25 n'étant pas suivie d'une augmentation de la quantité d'ADN produit.

Les conditions de réaction retenues sont : dénaturation pendant 30 secondes à 94°C fixation des amorces et élongation à 65°C pendant 90 secondes. Un total de 25 cycles est réalisé en 50 minutes.

1.11. Détection des produits d'ADN amplifiés

Les produits d'amplification sont recherchés par électrophorèse en gel d'agarose à 2 % contenant du bromure d'éthidium. Les 10 µl de la solution d'amplification sont déposés dans les puits d'un mini-gel et l'électrophorèse est effectuée à 100 volts pendant 10 min. Les bandes d'ADN sont visualisées par exposition aux rayons ultraviolets. Le marqueur de poids moléculaire comprend 1 µg de DNA du plasmide PBR 322 coupé par l'enzyme de restriction Hae III.

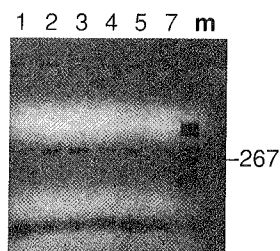
2. RÉSULTATS

2.1. Conservation de la séquence KpnI - Sal I du gène de la protéine gp50

La PCR permet l'amplification du fragment d'ADN de 262 paires de bases situé sur la séquence codant pour le gène de la gp50. L'étude portant sur les 45 souches sauvages du virus de la maladie d'Aujeszky nous montre que le même fragment est amplifié pour toutes les souches et le fragment amplifié présente rigoureusement les mêmes caractéristiques électrophorétiques quelque soit la souche.

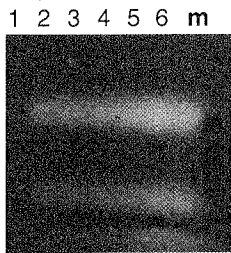
2.2. Application de la technique PCR aux porcs infectés

FIGURE 7
DETECTION DU GÉNOME DU VIRUS DE LA MALADIE D'AUEJESZKY PAR LA TECHNIQUE PCR



Les génomes du virus sont recherchés dans les écouvillons nasaux de porcs infectés. Les animaux sont prélevés quotidiennement et l'étude porte sur un pool de 6 prélèvements. Le virus est détecté du 1^{er} au 7^{ème} jour (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 : jours après l'infection), M. marqueur de poids moléculaire de longueurs standardisées.

FIGURE 8
APPLICATION DE LA PCR AU DIAGNOSTIC DE LA MALADIE
D'AUIJESZKY DANS LES ÉLEVAGES.



Un pool des 10 produits d'écouvillonnage provenant de chacun des 6 élevages suivis et testés par la technique PCR. Deux (n°2, 5) des six élevages donnent un résultat positif, confirmé par isolement viral et sérologique (1, 2, 3, 4, 5, 6 : numéros des élevages suivis)

La technique PCR détecte des séquences génomiques virales du premier au septième jour suivant l'infection et ceci dans des pools de produits d'écouvillonnage des 6 porcs inoculés. L'étude quantitative des produits d'amplification enzymatique met en évidence l'existence d'un signal important le 4ème et le 5ème jour. Le signal est plus faible le 7ème jour (Figure 7).

Appliquée aux animaux d'élevage, cette technique permet la détection des génomes viraux à partir d'un pool de produits d'écouvillonnage dans les deux élevages infectés (Figure 8). Ces résultats ont été confirmés par l'isolement viral et par les études sérologiques.

DISCUSSION

Les résultats obtenus doivent être interprétés avec précaution. En effet la technique d'amplification enzymatique du gène est très sensible. La moindre contamination avec des produits contenant la séquence à amplifier est suivie de l'amplification de cette séquence. Les intercontaminations lors des manipulations et plus particulièrement la préparation de l'ADN sont donc à éviter absolument. Cet inconvénient de la technique PCR a été décrit par de nombreux auteurs (BUCHBINDER et al., 1988).

Dans le but de mettre au point un protocole simplifié, la réaction PCR a été effectuée sur des prélèvements bruts en l'absence d'extraction. De nombreux protocoles tendant à simplifier la technique ont été décrits. Cette simplification concernait tout d'abord la préparation de l'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne (MANIATIS et al., 1982). SAIKI a démontré que le traitement à 95°C pendant 10 mn des cellules encaryotes était adapté aux exigences de la réaction d'amplification enzymatique du gène (SAIKI et al., 1988). Dans d'autres cas des traitements très rudimentaires se sont révélés suffisants. Par exemple le cytomégalo virus humain a été détecté, après amplification enzymatique par PCR dans des prélèvements d'urine, sans aucune autre préparation qu'une brève centrifugation (DEMMLER et al., 1988).

Les premiers auteurs qui ont étudié la sensibilité et la spécificité de cette technique ont montré que les températures de fixation des amorces et d'élongation étaient déterminantes. La composition en G + C du génome du virus de la maladie d'Aujeszky est exceptionnellement élevée par comparaison avec la composition génomique des autres herpes virus (BENPORAT et KAPLAN, 1980 ; HONESS et WATSON, 1977). Cette richesse en cytosine et guanine assurant une liaison forte entre les deux brins d'ADN est mise à profit dans l'étape

de fixation des amorces sur les séquences complémentaires spécifiques. Le choix d'une température élevée (65°C) pour l'étape de fixation des amorces assurant une excellente spécificité tout en conservant une bonne sensibilité sur des prélèvements provenant d'animaux, montre que les conditions d'hybridation et de polymérisation que nous avons retenues sont adaptées à la réalisation d'une polymérisation se limitant à une séquence unique d'ADN. L'activité biologique de la Taq polymérase est très élevée et la synthèse des brins d'ADN de 262 paires de bases est réalisée en quelques secondes. INNIS évalua la capacité polymérisante de la Taq polymérase à 60 nucléotides par secondes (INNIS et al., 1988).

La vulgarisation de la technologie de l'amplification enzymatique du gène n'a été rendue possible que par les progrès de l'enzymologie et la production d'enzyme polymérisante thermostable. Dès 1976, CHIEN purifia une polymérase active à 80°C (CHIEN et al., 1976). Une dizaine d'année plus tard les séquences génomiques de la beta-globine sont amplifiées au moyen de la Taq polymérase (SAIKI et al., 1985). Aujourd'hui la technologie de la production de l'enzyme a évolué, son gène a été cloné et inséré dans la bactérie *Escherichia coli*. (LA-WYER et al., 1988 ; ERLICH et al., 1987). Cette enzyme produite par *E. coli* a été récemment utilisée dans notre laboratoire avec d'excellents résultats.

Dans le protocole retenu dans notre laboratoire, l'étape de dénaturation ne dépasse pas 30 secondes, ce qui correspond à un total, pour les 25 cycles de 12 minutes à la température de 94°C. L'enzyme est donc soumise à des conditions thermiques moins sévères que dans le protocole classiquement préconisé. Dans celui-ci, l'étape de dénaturation du DNA reste de 2 minutes pour chaque cycle. Les conditions que nous avons définies sont des plus favorables à la conservation de l'activité biologique de l'enzyme et éviteraient ainsi de faire apparaître un éventuel rôle limitant de l'enzyme. (SAIKI et al., 1985).

Différentes techniques de détection des produits amplifiés par PCR ont été décrites. Le virus du SIDA est détecté par PCR et les produits amplifiés visualisés directement en gel de polyacrylamide coloré au bromure d'éthidium (LARZUL et al., 1989) ou par SOUTHERN-BLOT (KWOK et al., 1987). Dans le cas des maladies génétiques le «dot-blot» a été utilisé (SAIKI et al., 1986). Pour le virus Aujeszky, nous avons préparé une sonde marquée à la biotine (par incorporation du 11-d UTP, BIOTINE). Celle-ci, utilisée lors de la mise au point de la technique n'est plus indispensable dans le protocole actuel, le produit d'amplification pouvant être détecté très simplement par visualisation directe en gel d'agarose après coloration au bromure d'éthidium.

Notre étude montre que la PCR peut être appliquée avec succès à la détection des microorganismes dans divers prélèvements biologiques. Le choix de la séquence à amplifier reste une difficulté à surmonter : la séquence choisie est-elle conservée et retrouvée dans les différentes souches. Ce problème est capital dans l'étude des virus à ARN (KWOK et al., 1987). La séquence nucléotidique du gène du virus Aujeszky qui code pour la glycoprotéine gp50 a été déterminée pour la première fois pour la souche RICE aux U.S.A. (PETROVSKIS et al., 1986). Aucune information n'est pour l'instant disponible sur la stabilité de cette séquence. Les seules informations concernent, non pas le génotype (séquence du gène) mais le phénotype à savoir les structures épitopiques des produits d'expression soit la glycoprotéine gp50. Par le test de séroneutralisa-

tion 28 souches ont été testées vis-à-vis d'un panel d'anticorps monoclonaux (ELOIT et al., 1988). La haute stabilité des épitopes neutralisant est probablement en relation avec la grande stabilité de la séquence du gène. Ces résultats confirment nos observations. La technique PCR est donc apte à répondre aux impératifs du diagnostic rapide. Elle est utilisée avec succès pour la détection des lentivirus (virus CAE et VISNA) à partir de cultures cellulaires infectées (ZANONI et al., 1989). Elle a été essayée pour la détection des génomes du virus de la maladie d'Aujeszky (BELAK, communication personnelle). La présence d'un virus recombinant vaccine-rage

portant la glycoprotéine de la rage est détectée par PCR chez les renards vaccinés par voie orale. (THOMAS et al., 1989). D'autres techniques faisant appel à des enzymes (Q-beta, replicase) sont déjà proposés comme alternatives à la PCR (LIZARDI et al., 1988).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient P. SHELDRIK pour les critiques pertinentes apportées à la réalisation de ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDRIES K., PENSART M. B., VANDEPUTTE J., 1978. Am. J. Vet. res., 39, 1282-1284.
- BELAK S., LINNE T., 1988. Res. Vet. Sci., 44, 303-308. - BENPORAT T., KAPLAN Z.S., 1980. Molecular biology of pseudorabies virus in Herpes virus, Roizman.
- BUCHBINDER A., JOSEPHS S.F., ABLASKI D., SALAHUDDIN S.Z., KLOTMAN E., MANAK M., KRUEGER G.R.F., WONG-STAAAL F., GALLO R.C., 1988. J. Virology Methods, 21, 191-197.
- CHIEN A., EDGAR D.B., TRELA J.M., 1976. J. Bacteriol., 127, 1150-1157.
- DE ROSSO A., AMADORI A., CHIECS-BIANCHI L., GIACQUINTO C., ZACCHELLO F., BUCHBINDER A., WONG-STAAAL F., GALLO R.C., PECKHAM C.S., 1988. Lancet, 2, 278-279.
- DUGGAN D.B., EHRlich G.D., DAVEY F.P., KWOK S., SNINSKY J., GOLDBERG J., BALTRUCKI L., POIESZY B.J., 1988. Blood, 71, 1027-1032.
- ELOIT M., FARGEAUD D., L'HARIDON R., TOMA B., 1981. Arch. Virol., 99, 45-56.
- ERLICH H.A., HORN G. SAIKI, R.K. STOFFEL, S. MULLIS K.B., LAWYER F.C., GELFAND D.H., 1987. European Patent Application number 87307433.O. Publication number 0258017, 21 août 1987.
- GAMA R.E., HUGHES P.J., STANWAY G., 1988. Nucl. Acid. res., 16, 9346.
- HONESS R.W., WATSON D.N., 1977. J. gen. Virol., 37 : 15-37.
- IMPRAIM C.C., SAIKI R.K., ERLICH A., TEPLITZ R.L., 1987. Biochem. Biophys. Res. Commun., 142, 710-716.
- INNIS M.A., MYAMBO K.B., GELSAND D.H. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 9436-9440.
- JESTIN A., MEYER A., ONNO M., MADEC F., VANNIER P., 1989. Am. J. Vet. Res., (submitted).
- JESTIN A., VANNIER P., BLANCHARD P., GAMBAR-CHENON A., NICOLAS J.C., 1989. Archives of virology (Submitted).
- KWOK S., MACK D.H., MULLIS K.B., POIESZ B., ERLICH G., BLAIR D., FRIEDMAN-KIEN A., SNINSKY J.J., 1987. Virol., 61, 1690-1694.
- LARZUL D., CHEVRIER D., GUESDON J.L., 1989. Pharmacia Actualités 10 : 4-7.
- LARZUL D., GUIGNE F., SNINSKY J.J., MACK D.H., BRECHOT C., GUESDON J.L., 1988. J. Virol. Methods., 20 : 227-237.
- LAWYER F.C., STOFFEL S., SAIKI R.K., MYAMBO K.B., DRUMMAND R., GELFAND D.H., 1988. Isolation, characterization and expression in E. coli of the DNA polymerase gene from the extreme thermophile *Thermus aquaticus* (submitted for publication).
- LIVACHE T., BOURGEAT J., FOUQUE B., SAUVAIGO S., RAGET A., SEIGNEURIN J.M., TEOULE R., 1988. Detection de EBV par amplification enzymatique. Première Journée Internationale de Biologie Moléculaire, Clinique de BORDEAUX, 30 novembre 1988.
- LIZARDI P.M., GUERRA C.E., LAMELI H., TUSSIE-LUNA I., KRAMER F.R., 1988. Biotechn., 6, 1197-1202.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J., 1982. Molecular Cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- ONNO M., JESTIN A., Nicolas J.C., 1988. Vet. Med. Rev., 59 : 152-156.
- ONNO M., 1986. Diagnostic rapide des infections virales respiratoires chez le porc charcutier. Diplôme de l'Institut Supérieur des Productions Animales RENNES.
- PETROVSKIS E.A., TIMMINS J.G., ARMENTROUT M.A., MARACHIOLI C.C., YANCEY R.J., POST L.E., 1986a. J. Virol., 59-2, 216-223.
- PETROVSKIS E.A., TIMMINS J.G., GIERMAN T.D., POST L.E. 1986b. J. Virol., 60-3, 1166-1169.
- SAIKI R.K., BUGAWAN T.L., HARN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A., 1986. Nature 324, 163-166.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A., 1988. Science, 239, 487-491.
- SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N., 1985. Science 230, 1350-1354.
- SHIBATA D.K., ARNHEIM N., MARTIN W.J., 1988. J. Exp. Med., 167, 225-230.
- SHIBATA D., MARTIN W.J., APPLEMAN M.D., CAUSEY D.M., LEEDOM J.M., ARNHEIM N., 1988. J. Inf., Dis., 158, 1185-1191.
- SYVANEN A.C., BERGSTROM M., TENHUNEN J., SODERLUND H., 1988. Nuc. Acid. Res., 16, 11327-11338.
- THOMAS I., BROCHIER B., LONGUET B., BLANCOU J., KIENY M.P., GEORGES M., CHAPPUIS G., DESMETTRE P., PASTORET P.P. 1989. First Congress of the European Society for Veterinary Virology. 5-6-7 April 1989. Liège.
- ZANONI R., PAULI U., PETERHAUS E. 1989. First Congress of the European Society for Veterinary Virology. 5-6-7 April 1989. Liège.