

CARACTERISATION D'ISOLATS DU VIRUS DE LA MALADIE DE DERZSY PAR SEQUENÇAGE DU GENE DE LA VP2

J.-L. Pingret^a, J.-M. Huguet^b, J.-L. Guerin^c et P. Morillon^d

^aSCANELIS, 9, allée Charles Cros, BP 70006, 31771 COLOMIERS Cedex, France

^bCabinet Vétérinaire Biosud, 281, avenue du Béarn, BP 15, 40330 AMOU, France

^cEcole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, chemin des Capelles, BP 87614, 31076
TOULOUSE Cedex, France

^dMerial, BP 7, ST HERBLON, 44153 ANCENIS Cedex, France
paul.morillon@merial.com

RESUME

La VP2 est la protéine de capsid majoritaire des parvovirus ; elle est impliquée dans les processus immunitaires. Lors de cette étude nous avons amplifié par PCR, séquencé et analysé la VP2 de 5 isolats de virus Derzsy, provenant de différents élevages du Sud-Ouest de la France. Cette étude vise à comparer ces isolats du terrain à la souche vaccinale Hoekstra. Les séquences obtenues pour les 5 isolats du virus de la maladie de Derzsy montrent une grande conservation de la séquence ADN de la VP2. Douze polymorphismes ont été mis en évidence sur les 1764 pb du gène ce qui correspond au minimum à 99,3% d'identité entre les isolats. Ces données ont permis de réaliser une étude phylogénétique par comparaison aux séquences d'isolats de virus de Derzsy provenant d'Europe ou d'Asie. De plus la séquence de la souche vaccinale Hoekstra a été ajoutée afin de positionner les isolats de terrain dans un contexte plus général. Le dendrogramme présenté illustre la très grande proximité des 5 isolats de terrain séquencés et montre la proximité génétique de la souche vaccinale. Cette étude a donc permis de confirmer la très grande stabilité génétique des parvovirus habituellement admise. L'analyse phylogénétique confirme la proximité des différents isolats entre eux ainsi que leur proximité avec la souche vaccinale Hoekstra.

ABSTRACT

Characterisation of Derzsy Disease Virus Isolates by VP2 Gene Sequencing

VP2 is the major capsid protein present in the parvovirus and plays a role in immune processes. During this study VP2 was taken from 5 isolates of Derzsy virus from various different farms in SW France and PCR-amplified, sequenced and analysed. The object of the study was to compare these field isolates to the Hoekstra vaccine strain. The sequences obtained for the 5 isolates of Derzsy disease virus demonstrated that the VP2 DNA sequence is massively preserved. Twelve polymorphisms were revealed in the 1764 pb of the gene, which corresponds to a minimum rate of 99.3% identity between the isolates. These data lead to a phylogenetic study by comparison with Derzsy virus isolates from all over Europe or Asia. What is more, the sequence from the Hoekstra vaccine strain was added so that the field isolates would be in a more general context. The dendrogram presented here demonstrates the close proximity of the 5 sequenced field isolates and illustrates the genetic proximity of the vaccine strain. It can therefore be said that this study was able to confirm the very great genetic stability of the parvovirus usually admitted. The phylogenetic analysis confirms the proximity of the different isolates between themselves as well as their proximity with the Hoekstra vaccine strain.

INTRODUCTION

La VP2 est la protéine de capside majoritaire des parvovirus et elle est également impliquée dans les processus immunitaires. Cette protéine est de ce fait un candidat idéal pour être le support de mutations. Lors de cette étude nous avons amplifié par PCR, séquencé et analysé la VP2 de 5 isolats de virus de la maladie de Derzsy. Ces prélèvements proviennent de différents élevages de canards mulards atteints de maladie de Derzsy dans le Sud-Ouest de la France et ont été collectés entre 2008 et 2010.

1. MATERIELS ET METHODES

Les ADN ont été extraits à partir de rates de canards mulards prélevés entre 2008 et 2010 (kit extraction silice, Macherey Nagel) pour réaliser le diagnostic PCR lors de l'épisode clinique. Ils ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à l'étude de typage moléculaire. Afin de séquencer la VP2, trois PCR chevauchantes (figure 1) ont été dessinées (PCR1 : gggagacaacccatatataaaa / tggaaaggaactttctcaaa ; PCR2 : ttcccgctggatgtctat / cttttctcagctccacac ; PCR3 : acctattggggcaaaaatac / ccaggaagtgtttattga). Les conditions réactionnelles des 3 PCR sont les suivantes : 300 nM de chacune des deux amorces, 5 μl d'échantillon ADN, 5 μl tampon 10x, 1 U Platinum Taq DNA polymérase (Invitrogen) pour un volume réactionnel total de 50 μl . Le programme PCR utilisé est le suivant : 3min. 94°C 40x[15 sec 94°C / 30sec ; 57°C / 45 sec 72°C]. Pour chaque échantillon, les trois produits de PCR ont été séquencés dans les deux sens (sur les deux brins de l'acide nucléique) afin d'obtenir une fiabilité maximale. La construction d'une séquence nucléique consensus pour chaque échantillon a permis de déduire la séquence protéique de la VP2. Les analyses bioinformatiques (réalisation des contigs et des alignements) ont été faites à l'aide du logiciel Vector NTI® (Invitrogen).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Analyse des séquences des isolats de virus Derzsy

Les séquences obtenues pour les 5 isolats du virus de la maladie de Derzsy (Annexe 1) montrent une grande conservation de la séquence ADN de la VP2 (séquences non encore déposées). Douze polymorphismes ont été mis en évidence sur les 1764 pb du gène ce qui correspond au minimum à 99.3% d'identité entre les isolats. Quatre mutations étant silencieuses, la séquence protéique déduite montre seulement huit polymorphismes (Annexe 2). Les 5

isolats présentent des séquences différentes et chaque isolat présente 2 à 3 polymorphismes par rapport aux autres isolats.

Analyse phylogénétique

Les séquences obtenues ont permis de réaliser une étude phylogénétique par comparaison aux séquences d'isolats de virus de Derzsy provenant d'Europe ou d'Asie disponibles dans les bases de données internationales (figure 1). De plus la séquence de la souche vaccinale Hoekstra a été ajoutée afin de positionner les isolats de terrain dans un contexte plus général en particulier par rapport à cette souche contenue dans le vaccin vivant de la maladie de Derzsy. Les distances génétiques ont été estimées par la méthode « Juke & Cantor » et l'arbre phylogénétique a été construit grâce à la méthode « Neighbor-joining ». Le dendrogramme présenté (figure 2) illustre la très grande proximité des 5 isolats de terrain séquencés et montre la proximité génétique de la souche vaccinale.

CONCLUSION

L'analyse moléculaire des VP2 des 5 isolats de virus de la maladie de Derzsy a permis de mettre en évidence un faible nombre de polymorphismes ce qui est en accord avec la très grande stabilité génétique des parvovirus habituellement admise. Il est important de noter que l'ensemble des polymorphismes sont répartis entre les différents isolats et aucun d'entre eux ne semble concentrer un taux particulièrement élevé de mutations. L'analyse phylogénétique confirme la proximité des différents isolats entre eux ainsi que leur proximité avec la souche vaccinale Hoekstra.

Figure 1. Répartition des 3 PCR chevauchantes permettant le séquençage de la VP2

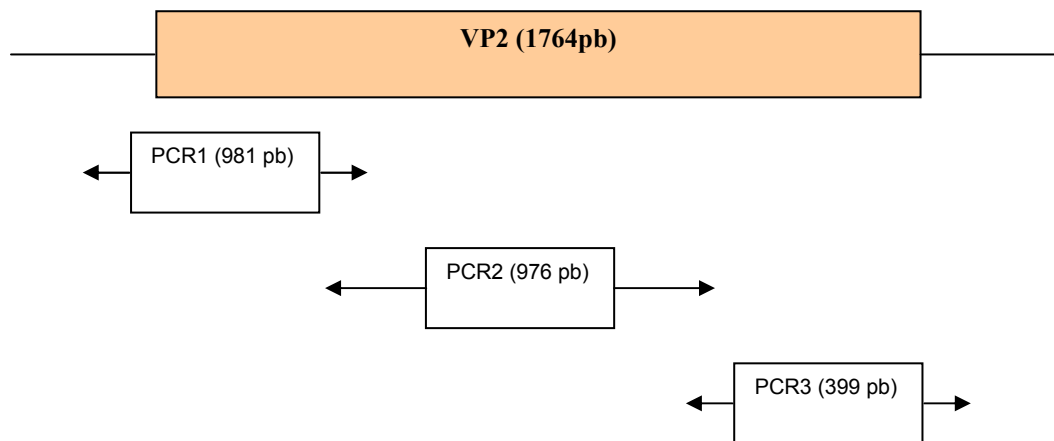
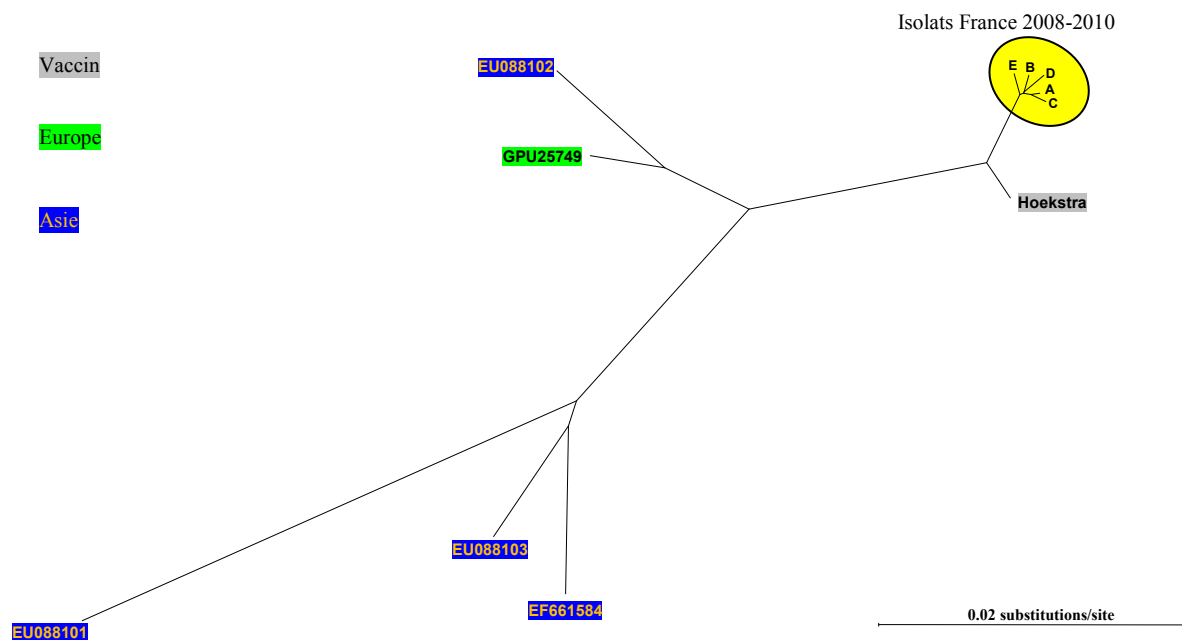


Figure 2. Dendrogramme réalisé par analyse de la séquence ADN de la VP2 des différents isolats



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Short beak and dwarfism syndrome of mule duck is caused by a distinct lineage of goose parvovirus.
 Avian Pathol. 2009 Apr;38(2):175-80.
- Palya V, Zolnai A, Benyeda Z, Kovács E, Kardi V, Mató T.
 Genetic variation of the nucleocapsid genes of waterfowl parvovirus
 J.Vet.Med.Sci. 63(11): 1165-1170, 2001
- Chun-Yen CHU, Ming-Jeng PAN and Jiin-Tsuey CHENG

ANNEXE 1

		1	80
A	(1)	ACGGCTCTCTGCAAAAAAATACAGGGAAGCTTACTGACCATTACCCAGTAGTTAAGAAGCCTAAACTCACCGAGGAAGT	
B	(1)	ACGGCTCTCTGCAAAAAAATACAGGGAAGCTTACTGACCATTACCCAGTAGTTAAGAAGCCTAAACTCACCGAGGAAGT	
C	(1)	ACGGCTCTCTGCAAAAAAATACAGGGAAGCTTACTGACCATTACCCAGTAGTTAAGAAGCCTAAACTCACCGAGGAAGT	
D	(1)	ACGGCTCTCTGCAAAAAAATACAGGGAAGCTTACTGACCATTACCCAGTAGTTAAGAAGCCTAAACTCACCGAGGAAGT	
E	(1)	ACGGCTCTCTGCAAAAAAATACAGGGAAGCTTACTGACCATTACCCAGTAGTTAAGAAGCCTAAACTCACCGAGGAAGT	
		81	160
A	(81)	CAGTGC CGGAGGTGGTAGCAGTCCCGTACAAGACGGAGGAGCCACCGCGGAGGGCACCGAACCTGTGGCAGCATCTGAAA	
B	(81)	CAGTGC CGGAGGTGGTAGCAGTCCCGTACAAGACGGAGGAGCCACCGCGGAGGGCACCGAACCTGTGGCAGCATCTGAAA	
C	(81)	CAGTGC CGGAGGTGGTAGCAGTCCCGTACAAGACGGAGGAGCCACCGCGGAGGGCACCGAACCTGTGGCAGCATCTGAAA	
D	(81)	CAGTGC CGGAGGTGGTAGCAGTCCCGTACAAGACGGAGGAGCCACCGCGGAGGGCACCGAACCTGTGGCAGCATCTGAAA	
E	(81)	CAGTGC CGGAGGTGGTAGCAGTCCCGTACAAGACGGAGGAGCCACCGCGGAGGGCACCGAACCTGTGGCAGCATCTGAAA	
		161	240
A	(161)	TGCGCAGAGGGAGGAGGCGGAGCTATGGGGGACTCTTCAGGGGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCGGGAATTTGGCAT	
B	(161)	TGCGCAGAGGGAGGAGGCGGAGCTATGGGGGACTCTTCAGGGGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCGGGAATTTGGCAT	
C	(161)	TGCGCAGAGGGAGGAGGCGGAGCTATGGGGGACTCTTCAGGGGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCGGGAATTTGGCAT	
D	(161)	TGCGCAGAGGGAGGAGGCGGAGCTATGGGGGACTCTTCAGGGGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCGGGAATTTGGCAT	
E	(161)	TGCGCAGAGGGAGGAGGCGGAGCTATGGGGGACTCTTCAGGGGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCGGGAATTTGGCAT	
		241	320
A	(241)	TGCGATTTCCCAATGGATGGGAAACACAGTCATCACAAGACCACCAGAACCCTGGGTCTGCCAAGCTACAACAATCACAT	
B	(241)	TGCGATTTCCCAATGGATGGGAAACACAGTCATCACAAGACCACCAGAACCCTGGGTCTGCCAAGCTACAACAATCACAT	
C	(241)	TGCGATTTCCCAATGGATGGGAAACACAGTCATCACAAGACCACCAGAACCCTGGGTCTGCCAAGCTACAACAATCACAT	
D	(241)	TGCGATTTCCCAATGGATGGGAAACACAGTCATCACAAGACCACCAGAACCCTGGGTCTGCCAAGCTACAACAATCACAT	
E	(241)	TGCGATTTCCCAATGGATGGGAAACACAGTCATCACAAGACCACCAGAACCCTGGGTCTGCCAAGCTACAACAATCACAT	
		321	400
A	(321)	CTACAAGCAATTACCAGTGGAACTCTCAAGATGCAAAATGTCCAGTATGCTGGATACAGTACCCCTCGGGGTACTTTTG	
B	(321)	CTACAAGCAATTACCAGTGGAACTCTCAAGATGCAAAATGTCCAGTATGCTGGATACAGTACCCCTCGGGGTACTTTTG	
C	(321)	CTACAAGCAATTACCAGTGGAACTCTCAAGATGCAAAATGTCCAGTATGCTGGATACAGTACCCCTCGGGGTACTTTTG	
D	(321)	CTACAAGCAATTACCAGTGGAACTCTCAAGATGCAAAATGTCCAGTATGCTGGATACAGTACCCCTCGGGGTACTTTTG	
E	(321)	CTACAAGCAATTACCAGTGGAACTCTCAAGATGCAAAATGTCCAGTATGCTGGATACAGTACCCCTCGGGGTACTTTTG	
		401	480
A	(401)	ATTTCATCGCTTCCACTGCCACTTCTCCCTAGAGACTGGCAGAGACTTATCAACAACCCTGGGGAATCAGGCCCAAG	
B	(401)	ATTTCATCGCTTCCACTGCCACTTCTCCCTAGAGACTGGCAGAGACTTATCAACAACCCTGGGGAATCAGGCCCAAG	
C	(401)	ATTTCATCGCTTCCACTGCCACTTCTCCCTAGAGACTGGCAGAGACTTATCAACAACCCTGGGGAATCAGGCCCAAG	
D	(401)	ATTTCATCGCTTCCACTGCCACTTCTCCCTAGAGACTGGCAGAGACTTATCAACAACCCTGGGGAATCAGGCCCAAG	
E	(401)	ATTTCATCGCTTCCACTGCCACTTCTCCCTAGAGACTGGCAGAGACTTATCAACAACCCTGGGGAATCAGGCCCAAG	
		481	560
A	(481)	TCTCTTAAATTCAGATCTTCAATGTTCAAGTCAAGGAAGTCAACAACGAGGATCAGACAAGACCATTGCAAAACATCT	
B	(481)	TCTCTTAAATTCAGATCTTCAATGTTCAAGTCAAGGAAGTCAACAACGAGGATCAGACAAGACCATTGCAAAACATCT	
C	(481)	TCTCTTAAATTCAGATCTTCAATGTTCAAGTCAAGGAAGTCAACAACGAGGATCAGACAAGACCATTGCAAAACATCT	
D	(481)	TCTCTTAAATTCAGATCTTCAATGTTCAAGTCAAGGAAGTCAACAACGAGGATCAGACAAGACCATTGCAAAACATCT	
E	(481)	TCTCTTAAATTCAGATCTTCAATGTTCAAGTCAAGGAAGTCAACAACGAGGATCAGACAAGACCATTGCAAAACATCT	
		561	640
A	(561)	CACCTCAACAATCCAAGTTTTCAGATGATGAGCACCAACTCCCGTATGTCTCTGGGCTCGGCTACGGAAGGGACCATGC	
B	(561)	CACCTCAACAATCCAAGTTTTCAGATGATGAGCACCAACTCCCGTATGTCTCTGGGCTCGGCTACGGAAGGGACCATGC	
C	(561)	CACCTCAACAATCCAAGTTTTCAGATGATGAGCACCAACTCCCGTATGTCTCTGGGCTCGGCTACGGAAGGGACCATGC	
D	(561)	CACCTCAACAATCCAAGTTTTCAGATGATGAGCACCAACTCCCGTATGTCTCTGGGCTCGGCTACGGAAGGGACCATGC	
E	(561)	CACCTCAACAATCCAAGTTTTCAGATGATGAGCACCAACTCCCGTATGTCTCTGGGCTCGGCTACGGAAGGGACCATGC	
		641	720
A	(641)	CGCCGTTC CCGGTCCGATGTCTATGCCCTGCCGAGTACGGGTACTGCAAAATGCACACCAACCAGAATGGAGCACGGTTC	
B	(641)	CGCCGTTC CCGGTCCGATGTCTATGCCCTGCCGAGTACGGGTACTGCAAAATGCACACCAACCAGAATGGAGCACGGTTC	
C	(641)	CGCCGTTC CCGGTCCGATGTCTATGCCCTGCCGAGTACGGGTACTGCAAAATGCACACCAACCAGAATGGAGCACGGTTC	
D	(641)	CGCCGTTC CCGGTCCGATGTCTATGCCCTGCCGAGTACGGGTACTGCAAAATGCACACCAACCAGAATGGAGCACGGTTC	
E	(641)	CGCCGTTC CCGGTCCGATGTCTATGCCCTGCCGAGTACGGGTACTGCAAAATGCACACCAACCAGAATGGAGCACGGTTC	
		721	800
A	(721)	AATGACCCGTAGCGCATTTCTACTGCTTAGAGTACTTCCCTAGTCAGATGCTGAGAACAGGTAAACAACCTTTGAGTTTCAGATT	
B	(721)	AATGACCCGTAGCGCATTTCTACTGCTTAGAGTACTTCCCTAGTCAGATGCTGAGAACAGGTAAACAACCTTTGAGTTTCAGATT	
C	(721)	AATGACCCGTAGCGCATTTCTACTGCTTAGAGTACTTCCCTAGTCAGATGCTGAGAACAGGTAAACAACCTTTGAGTTTCAGATT	
D	(721)	AATGACCCGTAGCGCATTTCTACTGCTTAGAGTACTTCCCTAGTCAGATGCTGAGAACAGGTAAACAACCTTTGAGTTTCAGATT	
E	(721)	AATGACCCGTAGCGCATTTCTACTGCTTAGAGTACTTCCCTAGTCAGATGCTGAGAACAGGTAAACAACCTTTGAGTTTCAGATT	
		801	880
A	(801)	TCGACTTTGAGAAGTTCCTTTCCACAGCATGTTCGCTCATTACACAGGACTTAGACAGGCTTATGAACCCCTAGTGGATC	
B	(801)	TCGACTTTGAGAAGTTCCTTTCCACAGCATGTTCGCTCATTACACAGGACTTAGACAGGCTTATGAACCCCTAGTGGATC	
C	(801)	TCGACTTTGAGAAGTTCCTTTCCACAGCATGTTCGCTCATTACACAGGACTTAGACAGGCTTATGAACCCCTAGTGGATC	
D	(801)	TCGACTTTGAGAAGTTCCTTTCCACAGCATGTTCGCTCATTACACAGGACTTAGACAGGCTTATGAACCCCTAGTGGATC	
E	(801)	TCGACTTTGAGAAGTTCCTTTCCACAGCATGTTCGCTCATTACACAGGACTTAGACAGGCTTATGAACCCCTAGTGGATC	
		881	960
A	(881)	AATACCTCTGGAATTTCAATGAGGTAGACAGCAACAGAAATGCTCAANTTAAAAAAGCTGTGAAAGGGGGTATGGCACCC	
B	(881)	AATACCTCTGGAATTTCAATGAGGTAGACAGCAACAGAAATGCTCAANTTAAAAAAGCTGTGAAAGGGGGTATGGCACCC	
C	(881)	AATACCTCTGGAATTTCAATGAGGTAGACAGCAACAGAAATGCTCAANTTAAAAAAGCTGTGAAAGGGGGTATGGCACCC	
D	(881)	AATACCTCTGGAATTTCAATGAGGTAGACAGCAACAGAAATGCTCAANTTAAAAAAGCTGTGAAAGGGGGTATGGCACCC	
E	(881)	AATACCTCTGGAATTTCAATGAGGTAGACAGCAACAGAAATGCTCAANTTAAAAAAGCTGTGAAAGGGGGTATGGCACCC	
		961	1040
A	(961)	ATGGGCGGCAATTTGGCTGCCGGGACCTAAATTTCTGGATCAGAGAGTTAGGGCCTACACAGGAGGAACAGACAAATTTATGC	
B	(961)	ATGGGCGGCAATTTGGCTGCCGGGACCTAAATTTCTGGATCAGAGAGTTAGGGCCTACACAGGAGGAACAGACAAATTTATGC	
C	(961)	ATGGGCGGCAATTTGGCTGCCGGGACCTAAATTTCTGGATCAGAGAGTTAGGGCCTACACAGGAGGAACAGACAAATTTATGC	
D	(961)	ATGGGCGGCAATTTGGCTGCCGGGACCTAAATTTCTGGATCAGAGAGTTAGGGCCTACACAGGAGGAACAGACAAATTTATGC	
E	(961)	ATGGGCGGCAATTTGGCTGCCGGGACCTAAATTTCTGGATCAGAGAGTTAGGGCCTACACAGGAGGAACAGACAAATTTATGC	
		1041	1120
A	(1041)	AACTCGGAACATCTGGATTAATGGAACAAAGGTGAATTTAAAGGACAGGCAGTATCTCCTACAACCCGGACCTGTGTGAC	
B	(1041)	AACTCGGAACATCTGGATTAATGGAACAAAGGTGAATTTAAAGGACAGGCAGTATCTCCTACAACCCGGACCTGTGTGAC	
C	(1041)	AACTCGGAACATCTGGATTAATGGAACAAAGGTGAATTTAAAGGACAGGCAGTATCTCCTACAACCCGGACCTGTGTGAC	
D	(1041)	AACTCGGAACATCTGGATTAATGGAACAAAGGTGAATTTAAAGGACAGGCAGTATCTCCTACAACCCGGACCTGTGTGAC	
E	(1041)	AACTCGGAACATCTGGATTAATGGAACAAAGGTGAATTTAAAGGACAGGCAGTATCTCCTACAACCCGGACCTGTGTGAC	
		1121	1200
A	(1121)	CTCTCACAACAGAAAGGGGAGGCTTCAGCATCCAGCTCAGAATATTTTAGGGATAGCTAAAGATCCATACAGATCTGGG	
B	(1121)	CTCTCACAACAGAAAGGGGAGGCTTCAGCATCCAGCTCAGAATATTTTAGGGATAGCTAAAGATCCATACAGATCTGGG	
C	(1121)	CTCTCACAACAGAAAGGGGAGGCTTCAGCATCCAGCTCAGAATATTTTAGGGATAGCTAAAGATCCATACAGATCTGGG	
D	(1121)	CTCTCACAACAGAAAGGGGAGGCTTCAGCATCCAGCTCAGAATATTTTAGGGATAGCTAAAGATCCATACAGATCTGGG	
E	(1121)	CTCTCACAACAGAAAGGGGAGGCTTCAGCATCCAGCTCAGAATATTTTAGGGATAGCTAAAGATCCATACAGATCTGGG	
		1201	1280
A	(1201)	AGCACTACAGCAGGAATAAGTGTATTATGGTTCACGGACGAGCAGGAAGTAGCACCCACGAATTTATAGGGTGGAAACC	
B	(1201)	AGCACTACAGCAGGAATAAGTGTATTATGGTTCACGGACGAGCAGGAAGTAGCACCCACGAATTTATAGGGTGGAAACC	
C	(1201)	AGCACTACAGCAGGAATAAGTGTATTATGGTTCACGGACGAGCAGGAAGTAGCACCCACGAATTTATAGGGTGGAAACC	
D	(1201)	AGCACTACAGCAGGAATAAGTGTATTATGGTTCACGGACGAGCAGGAAGTAGCACCCACGAATTTATAGGGTGGAAACC	
E	(1201)	AGCACTACAGCAGGAATAAGTGTATTATGGTTCACGGACGAGCAGGAAGTAGCACCCACGAATTTATAGGGTGGAAACC	
		1281	1360
A	(1281)	ATATGGTAGGACTGTAAACGAATGAACAAAACTACTACAGCTCCTACAAGTTCAGATCTGGATTTCTTTGGAGCTTTAC	
B	(1281)	ATATGGTAGGACTGTAAACGAATGAACAAAACTACTACAGCTCCTACAAGTTCAGATCTGGATTTCTTTGGAGCTTTAC	
C	(1281)	ATATGGTAGGACTGTAAACGAATGAACAAAACTACTACAGCTCCTACAAGTTCAGATCTGGATTTCTTTGGAGCTTTAC	
D	(1281)	ATATGGTAGGACTGTAAACGAATGAACAAAACTACTACAGCTCCTACAAGTTCAGATCTGGATTTCTTTGGAGCTTTAC	
E	(1281)	ATATGGTAGGACTGTAAACGAATGAACAAAACTACTACAGCTCCTACAAGTTCAGATCTGGATTTCTTTGGAGCTTTAC	
		1361	1440
A	(1361)	CAGGAATGGTGTGGCAGAACAGAGATATATATCTGCAGGGACCTATTGGGCAAAAATACCGAAGACTGATGGCAAAATTC	
B	(1361)	CAGGAATGGTGTGGCAGAACAGAGATATATATCTGCAGGGACCTATTGGGCAAAAATACCGAAGACTGATGGCAAAATTC	
C	(1361)	CAGGAATGGTGTGGCAGAACAGAGATATATATCTGCAGGGACCTATTGGGCAAAAATACCGAAGACTGATGGCAAAATTC	
D	(1361)	CAGGAATGGTGTGGCAGAACAGAGATATATATCTGCAGGGACCTATTGGGCAAAAATACCGAAGACTGATGGCAAAATTC	
E	(1361)	CAGGAATGGTGTGGCAGAACAGAGATATATATCTGCAGGGACCTATTGGGCAAAAATACCGAAGACTGATGGCAAAATTC	
		1441	1520
A	(1441)	CATCCCTTCTCAAATCTCGGAGCTTTTGGCCTGCACAATCCACCACCACAGGCTTTCATCAAGAATACACCAGTACCTGC	
B	(1441)	CATCCCTTCTCAAATCTCGGAGCTTTTGGCCTGCACAATCCACCACCACAGGCTTTCATCAAGAATACACCAGTACCTGC	
C	(1441)	CATCCCTTCTCAAATCTCGGAGCTTTTGGCCTGCACAATCCACCACCACAGGCTTTCATCAAGAATACACCAGTACCTGC	
D	(1441)	CATCCCTTCTCAAATCTCGGAGCTTTTGGCCTGCACAATCCACCACCACAGGCTTTCATCAAGAATACACCAGTACCTGC	
E	(1441)	CATCCCTTCTCAAATCTCGGAGCTTTTGGCCTGCACAATCCACCACCACAGGCTTTCATCAAGAATACACCAGTACCTGC	

1521 1600
A (1521) AGACCCCTCCAGTAGAATATGTGCACCAGAAGTGGAACTCCTACATAAACAATACTCTACAGGCCAGTGTACAGTAGAGAA
B (1521) AGACCCCTCCAGTAGAATATGTGCACCAGAAGTGGAACTCCTACATAAACAATACTCTACAGGCCAGTGTACAGTAGAGAA
C (1521) AGACCCCTCCAGTAGAATATGTGCACCAGAAGTGGAACTCCTACATAAACAATACTCTACAGGCCAGTGTACAGTAGAGAA
D (1521) AGACCCCTCCAGTAGAATATGTGCACCAGAAGTGGAACTCCTACATAAACAATACTCTACAGGCCAGTGTACAGTAGAGAA
E (1521) AGACCCCTCCAGTAGAATATGTGCACCAGAAGTGGAACTCCTACATAAACAATACTCTACAGGCCAGTGTACAGTAGAGAA
1601 1680
A (1601) TGGTGTGGGAGCTGAGAAAAAGAGAATTCAAAGAGATGGAAACCCAGAAATCCAGTTCCACAGCAATTTTCAGTAACAGAACT
B (1601) TGGTGTGGGAGCTGAGAAAAAGAGAATTCAAAGAGATGGAAACCCAGAAATCCAGTTCCACAGCAATTTTCAGTAACAGAACT
C (1601) TGGTGTGGGAGCTGAGAAAAAGAGAATTCAAAGAGATGGAAACCCAGAAATCCAGTTCCACAGCAATTTTCAGTAACAGAACT
D (1601) TGGTGTGGGAGCTGAGAAAAAGAGAATTCAAAGAGATGGAAACCCAGAAATCCAGTTCCACAGCAATTTTCAGTAACAGAACT
E (1601) TGGTGTGGGAGCTGAGAAAAAGAGAATTCAAAGAGATGGAAACCCAGAAATCCAGTTCCACAGCAATTTTCAGTAACAGAACT
1681 1760
A (1681) AGTATAATGTTTGCACCTAATGAAACTGGTGGATATGTAGAAGATAGATTGATTGGAACAGATATCTAACTCAAAATCT
B (1681) AGTATAATGTTTGCACCTAATGAAACTGGTGGATATGTAGAAGATAGATTGATTGGAACAGATATCTAACTCAAAATCT
C (1681) AGTATAATGTTTGCACCTAATGAAACTGGTGGATATGTAGAAGATAGATTGATTGGAACAGATATCTAACTCAAAATCT
D (1681) AGTATAATGTTTGCACCTAATGAAACTGGTGGATATGTAGAAGATAGATTGATTGGAACAGATATCTAACTCAAAATCT
E (1681) AGTATAATGTTTGCACCTAATGAAACTGGTGGATATGTAGAAGATAGATTGATTGGAACAGATATCTAACTCAAAATCT
1761
A (1761) GTAA
B (1761) GTAA
C (1761) GTAA
D (1761) GTAA
E (1761) GTAA

ANNEXE 2

1 80
A (1) TAPAKKNTGKLDHYFVVKPKLTHEVSAGGSSAVQDGGATAEGTEPVAASEMAEGGGGAMGDSGGGADGVGNASGNWH
B (1) TAPAKKNTGKLDHYFVVKPKLTHEVSAGGSSAVQDGGATAEGTEPVAASEMAEGGGGAMGDSGGGADGVGNASGNWH
C (1) TAPAKKNTGKLDHYFVVKPKLTHEVSAGGSSAVQDGGATAEGTEPVAASEMAEGGGGAMGDSGGGADGVGNASGNWH
D (1) TAPAKKNTGKLDHYFVVKPKLTHEVSAGGSSAVQDGGATAEGTEPVAASEMAEGGGGAMGDSGGGADGVGNASGNWH
E (1) TAPAKKNTGKLDHYFVVKPKLTHEVSAGGSSAVQDGGATAEGTEPVAASEMAEGGGGAMGDSGGGADGVGNASGNWH
81 160
A (81) CDSQWMGNTVITKTRTWLPSYNNHIYKAITSGTSQDANVQYAGYSTPWGYDFNRFCHFSRPRDQRLINNHGIRPK
B (81) CDSQWMGNTVITKTRTWLPSYNNHIYKAITSGTSQDANVQYAGYSTPWGYDFNRFCHFSRPRDQRLINNHGIRPK
C (81) CDSQWMGNTVITKTRTWLPSYNNHIYKAITSGTSQDANVQYAGYSTPWGYDFNRFCHFSRPRDQRLINNHGIRPK
D (81) CDSQWMGNTVITKTRTWLPSYNNHIYKAITSGTSQDANVQYAGYSTPWGYDFNRFCHFSRPRDQRLINNHGIRPK
E (81) CDSQWMGNTVITKTRTWLPSYNNHIYKAITSGTSQDANVQYAGYSTPWGYDFNRFCHFSRPRDQRLINNHGIRPK
161 240
A (161) SLKFKIFNVQVKEVTQDQTKTIANNLTSTIQVFTDDEHQLPYVLGSATBGMTMPFPPSDVYALPQYGYCTMHTNQNGARF
B (161) SLKFKIFNVQVKEVTQDQTKTIANNLTSTIQVFTDDEHQLPYVLGSATBGMTMPFPPSDVYALPQYGYCTMHTNQNGARF
C (161) SLKFKIFNVQVKEVTQDQTKTIANNLTSTIQVFTDDEHQLPYVLGSATBGMTMPFPPSDVYALPQYGYCTMHTNQNGARF
D (161) SLKFKIFNVQVKEVTQDQTKTIANNLTSTIQVFTDDEHQLPYVLGSATBGMTMPFPPSDVYALPQYGYCTMHTNQNGARF
E (161) SLKFKIFNVQVKEVTQDQTKTIANNLTSTIQVFTDDEHQLPYVLGSATBGMTMPFPPSDVYALPQYGYCTMHTNQNGARF
241 320
A (241) NDRSAFYCLEYFPQMLRTGNNEFTDFEEVPPHSMFAHSQDLRLMNLVDQYLWNFNNEVDSNRNAQFKKAVKGAYGT
B (241) NDRSAFYCLEYFPQMLRTGNNEFTDFEEVPPHSMFAHSQDLRLMNLVDQYLWNFNNEVDSNRNAQFKKAVKGAYGT
C (241) NDRSAFYCLEYFPQMLRTGNNEFTDFEEVPPHSMFAHSQDLRLMNLVDQYLWNFNNEVDSNRNAQFKKAVKGAYGT
D (241) NDRSAFYCLEYFPQMLRTGNNEFTDFEEVPPHSMFAHSQDLRLMNLVDQYLWNFNNEVDSNRNAQFKKAVKGAYGT
E (241) NDRSAFYCLEYFPQMLRTGNNEFTDFEEVPPHSMFAHSQDLRLMNLVDQYLWNFNNEVDSNRNAQFKKAVKGAYGT
321 400
A (321) MGRNWLPGPKFLDQVRAYTGGTDNYANWNIISNGNKVNLKDRQYLLQPGPVSAATEGEASSIPAQNILGIAKDPYRSG
B (321) MGRNWLPGPKFLDQVRAYTGGTDNYANWNIISNGNKVNLKDRQYLLQPGPVSAATEGEASSIPAQNILGIAKDPYRSG
C (321) MGRNWLPGPKFLDQVRAYTGGTDNYANWNIISNGNKVNLKDRQYLLQPGPVSAATEGEASSIPAQNILGIAKDPYRSG
D (321) MGRNWLPGPKFLDQVRAYTGGTDNYANWNIISNGNKVNLKDRQYLLQPGPVSAATEGEASSIPAQNILGIAKDPYRSG
E (321) MGRNWLPGPKFLDQVRAYTGGTDNYANWNIISNGNKVNLKDRQYLLQPGPVSAATEGEASSIPAQNILGIAKDPYRSG
401 480
A (401) STTAGISDIMVTDEQEVAPINVGWPKPYGRTVTNEQNTTAPTSSDLVLGALPGMVWQNRDIYLGQPIGAKIPKTDGKF
B (401) STTAGISDIMVTDEQEVAPINVGWPKPYGRTVTNEQNTTAPTSSDLVLGALPGMVWQNRDIYLGQPIGAKIPKTDGKF
C (401) STTAGISDIMVTDEQEVAPINVGWPKPYGRTVTNEQNTTAPTSSDLVLGALPGMVWQNRDIYLGQPIGAKIPKTDGKF
D (401) STTAGISDIMVTDEQEVAPINVGWPKPYGRTVTNEQNTTAPTSSDLVLGALPGMVWQNRDIYLGQPIGAKIPKTDGKF
E (401) STTAGISDIMVTDEQEVAPINVGWPKPYGRTVTNEQNTTAPTSSDLVLGALPGMVWQNRDIYLGQPIGAKIPKTDGKF
481 560
A (481) HPSPNLGGFGLHNPVPPQVFIKNTVPADPPVEYVHQWNSYITQYSTGQCTVEMWELRKENSKRWNPEIQFTSNFSNRT
B (481) HPSPNLGGFGLHNPVPPQVFIKNTVPADPPVEYVHQWNSYITQYSTGQCTVEMWELRKENSKRWNPEIQFTSNFSNRT
C (481) HPSPNLGGFGLHNPVPPQVFIKNTVPADPPVEYVHQWNSYITQYSTGQCTVEMWELRKENSKRWNPEIQFTSNFSNRT
D (481) HPSPNLGGFGLHNPVPPQVFIKNTVPADPPVEYVHQWNSYITQYSTGQCTVEMWELRKENSKRWNPEIQFTSNFSNRT
E (481) HPSPNLGGFGLHNPVPPQVFIKNTVPADPPVEYVHQWNSYITQYSTGQCTVEMWELRKENSKRWNPEIQFTSNFSNRT
561 587
A (561) SIMFAPNETGGYVEDRLIGTRYLTQNL
B (561) SIMFAPNETGGYVEDRLIGTRYLTQNL
C (561) SIMFAPNETGGYVEDRLIGTRYLTQNL
D (561) SIMFAPNETGGYVEDRLIGTRYLTQNL
E (561) SIMFAPNETGGYVEDRLIGTRYLTQNL