

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	13
INTRODUCTION.....	17

<p style="text-align: center;">PREMIERE PARTIE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</p>
--

<u>I- L'infection par le VRSB</u>	21
I-1. Epidémiologie	21
I-1-1. <i>Espèces sensibles</i>	21
I-1-2. <i>Transmission du virus</i>	22
I-1-3. <i>Saisonnalité, persistance virale</i>	22
I-1-4. <i>Facteurs favorisants</i>	22
I-2. Symptômes, lésions	23
I-2-1. <i>Signes cliniques</i>	23
I-2-2. <i>Aspect lésionnel</i>	24
I-3. Pathogénie	25
I-3-1. <i>Cibles cellulaires</i>	25
I-3-2. <i>Mécanismes pathogéniques</i>	26
I-4. Conséquences diagnostiques	29
I-4-1. <i>Animal vivant</i>	30
☒ <i>Sérologie : recherche indirecte</i>	30
☒ <i>Virologie : recherche directe</i>	30
I-4-2. <i>Animal mort</i>	31
I-5. La vaccination.....	32

<u>II- Le Virus Respiratoire Syncytial, un pneumovirus</u>	33
II-1. Taxinomie.....	33
II-2. Propriétés physico-chimiques	34
II-3. Structure	35
II-4. Génome	36
II-5. Protéines virales	37
II-5-1. Les protéines non structurales : NS1 et NS2	38
II-5-2. Les protéines de nucléocapside	38
✕ la nucléoprotéine N	38
✕ la phosphoprotéine P	39
✕ la polymérase L.....	39
II-5-3. Les protéines de matrice	40
II-5-4. Les protéines d'enveloppe.....	40
✕ la protéine de fusion F	40
✕ la glycoprotéine G.....	41
✕ la protéine SH (pour Small Hydrophobic).....	44
II-6. Cycle de réplication.....	44
II-7. Immunologie	45
II-7-1. Structures immunogènes	45
II-7-2. Réponse immunitaire humorale	46
II-7-3. Immunité à médiation cellulaire	48
<u>III- Variabilité du VRSB et notion de quasi-espèces</u>	49
III-1. Etude de la variabilité du VRSB.....	49
III-1-1. Utilisation d'anticorps monoclonaux	49
III-1-2. Analyse du génome viral.....	52
III-1-3. Conséquences	56
III-2. Mécanismes moléculaires de la variabilité génétique des virus à ARN.....	57
III-2-1. Variabilité par recombinaisons	57
III-2-2. Variabilité par réassortiments.....	58
III-2-3. Variabilité par mutations.....	58
III-3. Le concept de quasi-espèces	59
III-3-1. Naissance du concept de quasiespèces.....	59
III-3-2. Evolution du concept	60

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

<u>I- Matériels et méthodes</u>	65
I-1. Cultures cellulaires	65
☒ <i>Passage des cellules sur cultures cellulaires</i> :	65
I-2. Souches virales	66
I-2-1. <i>Isolement de la souche virale W2</i>	66
I-2-2. <i>Titrage viral</i>	66
I-2-3. <i>Clonage biologique</i>	67
I-3. Technique d'immunocytochimie.....	67
I-4. Expérimentation animale.....	68
I-5. RT- PCR	69
I-5-1. <i>Phase de reverse transcription</i>	69
I-5-2. <i>Phase d'amplification</i>	70
I-5-3. <i>Migration sur gel</i>	71
I-6. Clonage moléculaire.....	71
I-7. Extraction ADN plasmidique	72
I-8. Séquençage	73
<u>II- Résultats</u>	73
II-1. Stratégie.....	73
II-2. Résultats du clonage moléculaire.....	75
II-3. Résultats du séquençage.....	76
II-3-1. <i>Les séquences consensus</i>	77
II-3-2. <i>Les séquences des clones moléculaires</i>	78
☒ <i>Les différentes mutations relevées</i>	78
☒ <i>Localisation préférentielle de ces mutations sur le gène G</i>	85
☒ <i>Fréquences de mutations</i>	85
<u>IV- Discussion</u>	86

ANNEXES 89
REFERENCES.....97

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Modèle de l'immunopathogénèse du VRSH. Les facteurs médiateurs ou modulateurs de la réponse immunitaire à l'infection par le VRS sont ici représentés, et particulièrement le processus qui induit la réactivité des voies respiratoires (Graham, 2000).....	29
Figure 2: Photographie d'un pneumovirus.....	35
Figure 3: Représentation schématique du génome du VRSB.	36
Figure 4: Représentation schématique de la structure primaire de la glycoprotéine G du VRSB (TM: transmembranaire) (Larsen, 2000).	42
Figure 5 : Représentation schématique de la structure secondaire de la protéine G. Les flèches bleues montrent les deux régions variables (en rouge) et la flèche verte le domaine conservé.....	43
Figure 6: Arbre phylogénétique sur la glycoprotéine G de 87 isolats de VRSB, un isolat de VRSO (Virus Respiratoire Syncytial Ovin) et 2 isolats de VRSH.	53
Figure 7: Séquence consensus pour chaque sous-groupe de VRSB entre les résidus aminoacides 170 et 209 de la protéine G. Les flèches horizontales représentent les épitopes linéarisés étudiés par Langedijk et al. (1998), les flèches verticales montrent les mutations qui ont déterminé les sous-groupes d'antigènes et les rectangles indiquent la localisation des hélices α	54
Figure 8: Modélisation de la boucle à cystéine chez le VRSB, souche vaccinale (souche 391.2) à gauche et souches du sous-groupe VI à droite. Cette région contient deux ponts disulfures (en jaune). Les hélices alpha sont en bleu et rouge. Les résidus 171 à 189 dans la représentation de la souche 391.2 correspondent aux résidus 1 à 19 des souches du groupe VI.....	55
Figure 9 : Matériel d'inoculation (nébulisateur DeVillbiss UltraNeb 99 et masque d'inoculation).....	68
Figure 10: Schéma représentant le plasmide pCR4-TOPO utilisé et ses amorces (In Vitrogen).	72
Figure 11: Schéma expérimental résumant les méthodes d'obtention des différentes populations virales analysées dans cette étude.....	74
Figure 12: Photographie d'un gel d'électrophorèse.	76
Figure 13: Alignement de la séquence consensus nucléotidique de la souche W2 avec la souche de référence.	77

Figure 14 : Alignement de la séquence consensus peptidique avec la souche de référence.....	78
Tableau 1: Identification des trois sous-groupes de VRSB à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine G selon Schrijver et al.,1996b.	50
Tableau 2: Variabilité de la glycoprotéine G du VRSB sur la base de la réactivité à des anticorps monoclonaux et de la séquence en acides aminés selon plusieurs auteurs; (a) poumons infectés par le VRSB ; (b) neutralisation croisée avec sérum polyclonal (Mallipeddi, 1993; Furze, 1994; Schrijver, 1996b; Prozzi, 1997; Stine, 1997; Elvander, 1998; Larsen, 1998).....	51
Tableau 3: Sous groupes du VRSB et mutations ponctuelles (Langedijk, 1997; Furze, 1997) .	51
Tableau 4: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale W2 Terrain.	79
Tableau 5: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale W2 3C.....	80
Tableau 6: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale Inoculum.....	81
Tableau 7: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale LBA E.....	81
Tableau 8: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale P1.....	82
Tableau 9: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale provenant d'un cDNA infectieux.	83
Tableau 10: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène N des divers clones de la population virale provenant d'un cDNA infectieux.....	83
Tableau 11: Relevé des différentes mutations de la séquence nucléotidique du gène N des divers clones de la population virale Inoculum.....	84
Tableau 12: Récapitulatif des différentes mutations rencontrées lors de l'analyse des séquences nucléotidiques des nombreux clones moléculaires de VRSB.....	84
Tableau 13: Fréquence de mutations relevées grâce à l'analyse des séquences des différents clones obtenus.	86

Annexe 1: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale W2 Terrain.....	89
Annexe 2: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale W2 3C.....	90
Annexe 3: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale Inoculum.....	91
Annexe 4: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale LBA E.....	92
Annexe 5: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale P1.....	93
Annexe 6: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale provenant d'un cDNA infectieux	94
Annexe 7: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène N pour les clones analysés de la population virale provenant d'un cDNA infectieux.	95
Annexe 8: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène N pour les clones analysés de la population virale Inoculum.....	96

Rapport-Gratuit.Com

INTRODUCTION

Le virus respiratoire syncytial humain (VRSH) fut isolé pour la première fois en 1955 lors d'une épidémie respiratoire au sein d'une colonie de chimpanzés élevés en laboratoire puis, un an plus tard, chez un enfant souffrant de pneumonie (Collins, 1996). La nature des effets cytopathiques du virus sur cultures cellulaires (formation de syncytia) est à l'origine de sa dénomination (Chanock, 1957). Quelques années plus tard, en 1967, un virus analogue au VRSH par ses propriétés épidémiologiques, cliniques et structurales fut isolé pour la première fois chez des bovins lors d'une forte épizootie de grippe en Suisse. Il fut alors nommé «Virus Respiratoire Syncytial Bovin » (VRSB) (Paccaud, 1970). Ce même virus fut ensuite isolé en Belgique puis au Japon vers la fin des années 1960. Au cours des années 1970, il fut isolé en Angleterre, aux Etats-Unis, aux Pays-Bas puis au Maroc au début des années 1980 (Schreiber, 2000).

Le VRSH et le VRSB présentent des homologues structurales et les maladies qui en découlent présentent également des analogies sur les plans cliniques et épidémiologiques. Chaque année, ces deux virus sont responsables de multiples épidémies dans le monde se manifestant par des infections respiratoires. La séroprévalence du VRSB chez les bovins adultes est supérieure à 60% en France. Pour le VRSH, le taux d'infection chez les enfants de moins d'un an approche 70% et tous les enfants semblent être infectés à l'âge de trois ans (Glezen, 1973). Une étude réalisée sur dix ans aux Etats-Unis a montré que le VRSH entraînait plus de 120 000 hospitalisations chaque année (Shay, 1999). Seul existe un réseau d'épidémiosurveillance pour le VRSH depuis l'échec du premier vaccin dirigé contre ce même virus dans les années 1960. Chez les bovins, la lutte contre ce virus est réalisée par l'intermédiaire de la vaccination.

Récemment, une étude menée par Valarcher et *al.* a montré qu'il existait une importante variabilité entre les différentes souches de VRSB. Dans la continuité de ces recherches, cette étude expérimentale a donc eu pour but de montrer, *in vivo* et *in vitro*, l'hétérogénéité génétique des virus qui constituent une souche virale. Dans une première partie, nous ferons une synthèse bibliographique sur l'infection par le VRSB en insistant sur les points liés à la variabilité du virus.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- L'infection par le VRSB

I-1. Epidémiologie du VRSB

I-1-1. Espèces sensibles

Les bovins sont les hôtes naturels du VRSB. La transmission interspécifique n'a pas été démontrée mais ne peut être exclue ni entre les bovins et les hommes ni entre les bovins et les petits ruminants. Les chèvres et les porcs pourraient en effet être infectés par le VRSB. Cette infection virale n'est pas une zoonose (Thiry, 2000).

Lors d'une infection naturelle par le VRSB, les signes cliniques sont principalement observés chez les jeunes animaux, âgés jusqu'à un an, et plus rarement chez les veaux de moins de deux semaines (Elvander, 1996; Valarcher, 1999a). Environ 50% des animaux sont primo-infectés avant l'âge de 12 mois. Ces signes cliniques sont parfois observables au sein de troupeaux adultes et l'infection peut alors se révéler très grave. Les taux élevés d'anticorps colostraux sont protecteurs dans le sens où ils réduisent la gravité des signes cliniques mais n'empêchent pas l'infection.

La séroprévalence en anticorps dirigés contre le VRSB augmente avec l'âge des animaux. Ainsi, elle s'approche de 50% chez les bovins de moins de 2 ans et s'élève de 55% à 95% sur des animaux âgés de plus de deux à trois ans. La fréquence des cheptels séropositifs est fortement liée à la densité des animaux (Collins, et *al.*, 1988b; Elvander, 1996). Des enquêtes épidémiologiques menées en Suède, au Danemark et aux Etats-Unis ont montré la fréquence des infections par le VRSB. En élevage laitier, ce virus est impliqué dans 60 à 70% des affections respiratoires (Elvander, 1996; Uttenthal, 1996; Baker et *al.*, 1986a).

La morbidité est très élevée, de l'ordre de 80 à 100%, mais la mortalité dépasse qu'occasionnellement 5 à 10%, sauf lors d'une épidémie touchant un élevage où elle peut ainsi atteindre 20% (Thiry, 2000).

I-1-2. Transmission du virus

Le mode de transmission du virus n'a pas été clairement établi, bien que l'on suppose qu'il s'effectue par contact direct, c'est-à-dire de naseaux à naseaux. La transmission par aérosol, par exemple lors des toux chez les veaux, serait également possible sur de courtes distances. Dans une région déjà infectée par ce virus, la maladie devient endémique et peut affecter les mêmes troupeaux chaque année (Horzinek, 1990). Au sein d'un groupe d'animaux, la transmission est plus ou moins efficace selon la densité de la population.

La transmission vectorielle du VRSB n'a jusqu'à présent jamais été démontrée.

Le mode de transmission vertical n'a pas non plus été mis en évidence.

I-1-3. Saisonnalité, persistance virale

En région tempérée, l'apparition des symptômes dus à l'infection par le VRSB se situe surtout en automne et en hiver jusqu'au mois de mai. L'absence de maladie à VRSB pendant la période estivale pose la question de la persistance virale. En effet, des épisodes respiratoires à VRSB peuvent réapparaître au sein des mêmes cheptels tous les hivers sans introduction de nouveaux animaux (Verhoeff, van Nieuwstadt, 1984). Compte tenu de la fragilité du virus, il semblerait que le VRSB circulerait à des taux très faibles parmi les animaux séropositifs à partir desquels il se réactiverait périodiquement (Van der Poel, et *al.*, 1995). Les modes de persistance virale ne sont pas encore totalement élucidés. S'agit-il d'une persistance au sens strict chez l'animal infecté ou d'une circulation permanente du virus à bas bruit chez les animaux infectés ne présentant pas de signes cliniques ? Des études ont montré que le VRSB pouvait être détecté jusqu'à 71 jours post-inoculation dans les lymphocytes B des nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux (Valarcher, et *al.*, 2000).

I-1-4. Facteurs favorisants

Selon de nombreuses études épidémiologiques, les changements climatiques paraissent augmenter les infections par le VRSB, particulièrement lorsque le temps devient humide et venteux (Baker, et *al.*, 1986b; Mahin, 1982). Il peut alors exister des petits épisodes en été qui se traduisent uniquement par une faible augmentation du taux en anticorps.

Tous les facteurs affectant l'action mucociliaire sont en fait des facteurs favorisants au développement du VRSB : forts taux d'ammoniac, forte humidité, variations importantes de

température et de pression. Malgré tout, même des animaux vivant dans de très bonnes conditions d'élevage peuvent contracter cette maladie, ce qui nous montre que les signes cliniques dus au VRSB peuvent apparaître indépendamment des conditions environnementales (Baker, et *al.*, 1986a; Bryson, 1978a).

I-2. Symptômes, lésions

I-2-1. Signes cliniques

La durée d'incubation de la maladie induite par le VRSB est de 2 à 8 jours.

Le plus souvent, l'infection est subclinique. Des études ont effectivement montré que cela concernait 21 à 47 % des infections naturelles (Baker, 1985).

Sinon, l'infection se traduit par :

- un syndrome fébrile : hyperthermie élevée, baisse modérée de l'état général, anorexie, les symptômes généraux sont souvent de courte durée, c'est-à-dire de 1 à 3 jours, et visibles dès le début de l'infection, mais peuvent s'aggraver en forte dépression et coma.
- des symptômes respiratoires : du jetage nasal muqueux à mucopurulent et de la toux qui peuvent persister jusqu'à 10 à 20 jours dans la moitié des cas ; une polypnée, un renforcement des bruits à l'auscultation (expiration très audible, sifflements, crépitements) et une dyspnée abdominale, avec un emphysème sous-cutané pour les cas les plus atteints, qui dure 6 à 10 jours.

L'évolution de la maladie est généralement bénigne d'allure grippale avec une atteinte du tractus respiratoire proximal, entraînant une rhinotrachéite.

L'évolution peut aussi s'aggraver de manière brutale lors d'une atteinte du tractus respiratoire distal. La maladie évolue donc vers une broncho-pneumonie avec emphysème aggravée d'une obstruction bronchique. Parfois, la bronchiolite est si grave qu'elle est qualifiée de « syndrome de détresse respiratoire aiguë ». L'animal garde alors la tête basse, l'encolure tendue et la bouche ouverte avec plainte expiratoire. Il ne peut plus ni bouger ni s'alimenter et fait d'énormes efforts pour respirer (Horzinek, 1990).

Une évolution biphasique a été décrite sur le terrain mais celle-ci n'a jamais été retrouvée lors d'infections expérimentales (Belknap, 1993). Les animaux toussent et présentent du jetage nasal et oculaire, associés à une hyperthermie, pendant deux à trois jours ; ils retournent à un état normal, puis une seconde phase apparaît avec de l'emphysème pulmonaire, une respiration superficielle et abdominale, une normothermie et de la toux (Thiry, 2000).

Les symptômes observés lors d'une infection naturelle par le VRSB sont difficilement reproductibles par des inoculations expérimentales et apparaissent en général avec une intensité nettement plus faible (Bryson, et *al.*, 1983; Castelman, 1985a; Otto, 1996).

I-2-2. Aspect lésionnel

➤ sur le plan macroscopique : les lésions caractéristiques lors de mortalité spontanée due au VRSB sont qualifiées de pneumonie broncho-interstitielle aiguë.

Lors d'infections expérimentales, il y a peu de changements macroscopiques durant les 5 premiers jours post-inoculation, ils s'effectuent majoritairement entre J5 et J8 (Bryson, 1978b; Castelman, 1985b; Mohanty, 1975).

Une densification pulmonaire modérée atteint les lobes pulmonaires cranioventraux qui sont alors de couleur brique à lie de vin avec un aspect luisant à la coupe et un mucopus qui s'écoule des bronches. Le septum inter lobulaire apparaît souvent épais en raison de l'œdème prononcé présent dans les poumons. Les lobes pulmonaires caudodorsaux sont le plus souvent normaux, mais peuvent aussi paraître distendus à cause de l'œdème et d'un emphysème alvéolaire, interstitiel et sous pleural (Larsen, 2000). La muqueuse nasale, la trachée et les bronches sont très hyperhémisées surtout lors des premières phases de la maladie. Les nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux sont fortement hypertrophiés (Bryson, 1983). Dans d'autres cas, un emphysème médiastinal très marqué apparaît et cet emphysème peut même s'étendre aux tissus sous-cutanés de l'épaule et de l'encolure (Horzinek, 1990).

➤ sur le plan microscopique : les zones cranioventrales sont atteintes de bronchite et de bronchiolite avec hyperplasie épithéliale et présence de neutrophiles, de macrophages et de cellules épithéliales dans la lumière bronchique (Castelman, et *al.*, 1985a). Un grand nombre de cellules syncytiales dans les muqueuses nasale et trachéale ainsi que dans les épithéliums alvéolaire et bronchiolaire représente la lésion caractéristique présente chez tous les animaux

infectés naturellement par le VRSB (Kimman, et *al.*, 1989a; Collins, 1988a; Thomas, 1981). La dégénérescence, la nécrose et l'hyperplasie de l'épithélium alvéolaire et du tissu lymphoïde sont très courantes. La paroi muqueuse des bronchioles est souvent infiltrée par des lymphocytes et des cellules plasmiques. Au niveau de la paroi alvéolocapillaire, la lumière est soulignée par des membranes hyalines éosinophiliques et des infiltrations cellulaires inter alvéolaires. Des syncytia contenant des inclusions éosinophiliques peuvent être présents dans les alvéoles, principalement chez les veaux (Horzinek, 1990).

Bronchiolite, syncytia et antigènes viraux sont apparemment absents des zones caudodorsales, les lésions qui y sont présentes sont plutôt alvéolaires et emphysémateuses. L'emphysème pulmonaire n'est pas une lésion pathognomonique de l'infection par le VRSB, c'est juste une manifestation fréquente (Thiry, 2000).

I-3. Pathogénie

I-3-1. Cibles cellulaires

L'étude de la pathogénie du VRSB a été réalisée par l'observation des infections naturelles mais a surtout été complétée par l'analyse des inoculations expérimentales qui ont permis d'expliquer les mécanismes.

La contamination de l'animal s'effectue par les voies nasales supérieures en conditions naturelles. Lors d'infections expérimentales, le virus est isolé des sécrétions nasales, plus précisément dans les cellules épithéliales du nasopharynx, du 1^{er} jour post-inoculation jusque 10 jours après, et entre 3 et 10 jours pour les muqueuses trachéale et bronchique (Castelman, et *al.*, 1985b; Elazhary, et *al.*, 1980). La protéine F est à l'origine de la fusion de cellules infectées et non infectées, conséquence de la formation de syncytia, permettant ainsi la propagation du virus sans passage par le milieu extracellulaire. Ce mode de contamination permet au virus d'échapper à la réaction immunitaire humorale de l'hôte. La dissémination du virus des cavités nasales vers les poumons se réalise par l'aspiration des mucosités et des sécrétions contenant des particules virales infectieuses ou par l'épithélium respiratoire (Collins, et *al.*, 1996).

Le VRS semble se limiter strictement au système respiratoire dans lequel différentes populations de cellules peuvent être colonisées. L'épithélium de tout le tractus respiratoire, à savoir nasal, trachéal et bronchique reste la cible principale du VRSB avec les pneumocytes alvéolaires I et II. Les macrophages alvéolaires sont aussi infectés (Bryson, et *al.*, 1983; Castelman, et *al.*, 1985a). mais le taux de réplication virale dans ces cellules est limité. L'infection des macrophages induit cependant la libération des leucotriènes, des prostaglandines, de l'histamine, des protéines éosinophiliques cationiques. Les propriétés des macrophages comme la phagocytose ou la bactéricidie sont altérées (Valarcher, 1999a). En plus de la réaction inflammatoire, les macrophages infectés inhiberaient la transformation lymphoblastique et produiraient des facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles, d'où l'affluence de ces cellules dans la lumière broncho-alvéolaire et la neutrophilie observée (Adair, et *al.*, 1992; Taylor, et *al.*, 1987).

Pour l'infection des autres cellules du tractus respiratoire, peu de travaux ont été effectués.

D'autre part, l'infection par le VRSB semble survenir même en présence d'anticorps circulants (Kimman, et *al.*, 1987).

I-3-2. Mécanismes pathogéniques

Les mécanismes pathogéniques sont mal connus. Les lésions observées sont dues à un effet cytopathogénique du virus, à des mécanismes immunopathogéniques induisant une réaction inflammatoire exacerbée et enfin à divers facteurs influençant le devenir de l'infection et la gravité des signes cliniques observés (Collins, et *al.*, 1996).

La première cause est l'effet cytopathogène du virus dans les cellules épithéliales (Thiry, 2000). Le VRSB entraîne aussi des effets phlogogènes. Cela conduit à une bronchiolite nécrosante et obstructive. Ces effets peuvent expliquer la broncho-pneumonie, même emphysémateuse, plus ou moins aggravée par divers facteurs:

- les poumons immatures présents chez les jeunes veaux d'un point de vue anatomique, physiologique et immunitaire, ainsi que la prédisposition des bovins (surtout les animaux culards) aux troubles respiratoires (Collins, et *al.*, 1996; Openshaw, 1995; Valarcher, et *al.*, 1999b);
- la virulence de la souche virale infectieuse (Mc Connochie, et *al.*, 1990);

- les déficits immunitaires congénitaux et acquis qui favorisent ainsi une multiplication virale et une exacerbation des signes cliniques (Collins, et *al.*, 1996; Thomas, et *al.*, 1996);
- les surinfections bactériennes favorisées par le VRSB car celui-ci induit une altération de l'appareil muco-ciliaire ne faisant plus barrière, l'accumulation des débris cellulaires et l'altération des fonctions macrophagiques (Adair, et *al.*, 1992).

La pathogénie du VRSB est très peu connue mais de nombreuses études montrent que le système immunitaire jouerait un rôle primordial. La deuxième composante est donc de nature immunopathologique (Collins, et *al.*, 1996; Larsen, 2000; Openshaw, 1995; Thiry, 2000). Cette composante semble être notamment responsable du syndrome de détresse respiratoire aiguë non expliqué par l'effet direct du virus. Plusieurs hypothèses ont été formulées :

◆ hypothèse d'une hypersensibilité de type III : hypothèse qui impliquerait donc l'activation du complément par des complexes immuns.

En effet, plusieurs observations ont été faites : tout d'abord, il existe une entité clinique biphasique avec des lésions microscopiques qui semblent anciennes alors que la durée d'évolution clinique paraît brève ; ensuite, des anticorps spécifiques, qui seraient d'origine passive, ont été mis en évidence chez les individus infectés ; les lésions cranioventrales et caudodorsales sont de natures différentes (lobes densifiés et lobes œdémateux et emphysémateux) ; les antigènes viraux sont répartis de façon hétérogène dans les lobes pulmonaires antérieurs.

L'effet cytopathologique du virus entraînerait dans les lobes pulmonaires antérieurs une lyse cellulaire et ainsi l'apparition d'une réaction inflammatoire et la libération d'antigènes viraux. Ces derniers formeraient des complexes immuns, strictement localisés aux poumons, avec les anticorps spécifiques de classe IgM ou IgG1 qui apparaissent 8 à 10 jours après l'infection (Thiry, 2000). Les antigènes viraux provoqueraient aussi un phénomène d'Arthus en activant le complément dont résulterait un afflux de neutrophiles (Kimman, et *al.*, 1989a; Valarcher, 1999a). De plus, les facteurs du complément, les anaphylatoxines C3a et C5a, diffuseraient dans l'ensemble du poumon en induisant la libération d'histamine et de leucotriènes (LTC4 et LTD4) par les cellules mastocytaires et provoqueraient l'effet bronchoconstricteur observé grâce à l'œdème et l'emphysème.

Cette hypothèse explique donc l'hétérogénéité de répartition du virus et de l'emphysème dans les poumons ainsi que l'allure parfois biphasique de la maladie : une première atteinte respiratoire légère suite à l'infection virale puis une pneumonie emphysémateuse après

plusieurs jours lorsque les anticorps apparaissent (Thiry, 2000). Mais deux problèmes se posent alors : des immuns complexes n'ont jamais été identifiés chez les bovins atteints de VRSB et l'évolution biphasique de la maladie est rarement observée.

◆ hypothèse d'une modulation de la réponse immunitaire cellulaire : hypothèse en relation avec la détection d'IgE et de médiateurs pro-inflammatoires dans les sécrétions respiratoires (Garofalo, et *al.*, 1992; Welliver, et *al.*, 1981). C'est l'explication qui reste la plus plausible à l'heure actuelle.

Cette hypothèse tente d'extrapoler aux bovins certains résultats issus de la recherche sur d'autres modèles animaux. Les principales études ont effectivement été menées avec le VRSH sur modèles souris, dans un premier temps dans le but d'expliquer l'exacerbation de signes cliniques dû à ce virus chez les enfants primovaccinés avec un vaccin inactivé. Ces études ont alors montré que lors d'une primo-infection ou vaccination, la glycoprotéine G orienterait la réponse immune cellulaire vers une voie Th2. Lors d'une infection ultérieure à VRSH, cette réponse Th2, caractérisée par une production d'IL-4, IL-5 et IL-13, serait à l'origine d'une libération de médiateurs proinflammatoires, responsables des signes cliniques observés, et d'une infiltration éosinophilique dans les poumons. A l'inverse, une pré-immunisation avec la protéine F du virus serait à l'origine d'une orientation de type Th1 protectrice contre l'infection virale (Alwan, et *al.*, 1993 ; Hancock, et *al.*, 1996).

La glycoprotéine G contient un épitope qui est capable potentiellement d'induire une réponse en LT CD4+ de type Th1 ou Th2. Cet épitope semble suffisant selon certaines études mais non indispensable à l'induction de la réponse Th2 et à l'infiltration éosinophilique observées dans les poumons (Graham, 2000). De nombreux facteurs interviennent dans le contexte immunologique de la réponse spécifique dirigée contre la protéine G et déterminent aussi le degré d'éosinophilie observé : l'induction préalable de cellules T mémoires CD4+ de type Th2 spécifiques du VRS, l'exposition préférentiellement à la protéine G sécrétée qu'à la protéine G ancrée dans la membrane, une diminution des LT cytotoxiques et des cellules NK car ils inhibent la réponse Th2 et l'éosinophilie (figure 1) (Graham, 2000).

Enfin, ces mécanismes sont décrits uniquement chez les souris et principalement lors d'une pré-immunisation.

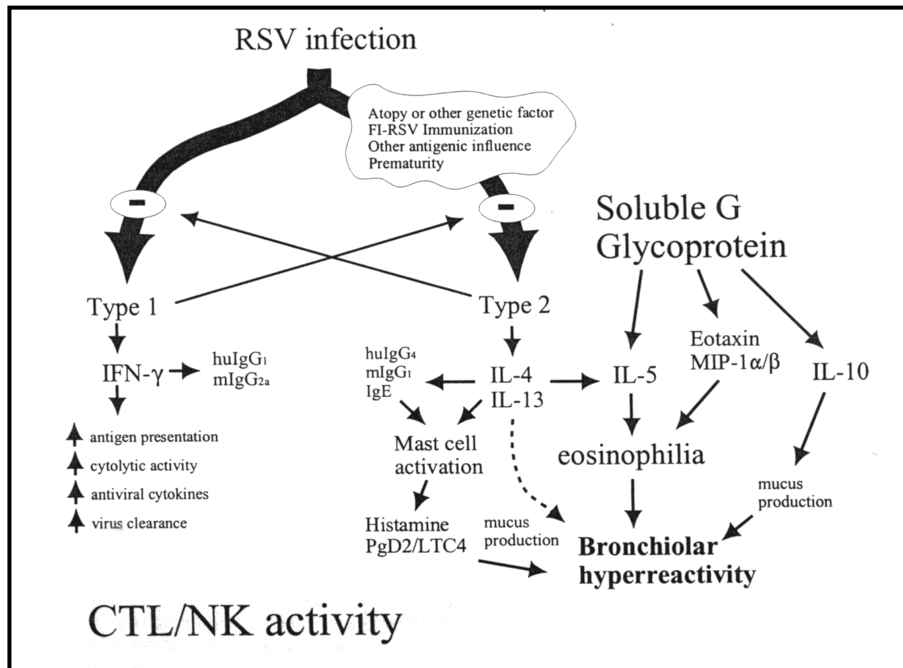


Figure 1: Modèle de l'immunopathogénèse du VRSH. Les facteurs médiateurs ou modulateurs de la réponse immunitaire à l'infection par le VRS sont représentés, particulièrement le processus qui induit la réactivité des voies respiratoires (Graham, 2000).

I-4. Conséquences diagnostiques

Un diagnostic uniquement basé sur la symptomatologie est impossible car les troubles respiratoires sont peu spécifiques. Seul un diagnostic de laboratoire peut confirmer une suspicion d'infection par le VRSB dans un élevage. De plus, les examens de laboratoire sont confrontés à diverses difficultés (Horzinek, 1990). C'est pourquoi, les résultats obtenus doivent être interprétés en tenant compte de plusieurs paramètres :

- âge de l'animal : le pic d'incidence clinique survient sur des animaux de moins de 6 mois, et les anticorps sériques d'origine maternelle, encore présents à cet âge, peuvent gêner le diagnostic de certitude.
- type et qualité du prélèvement : le VRSB est très fortement lié aux cellules donc un prélèvement contenant peu de cellules est peu utilisable pour une analyse virologique.
- mode de conservation des prélèvements : le VRSB est très labile et fragile, une conservation sous froid négatif est préférable à la température ambiante.

- sensibilité de la technique utilisée
- délai entre le début des signes cliniques ou la mort et la réalisation des prélèvements, et délai entre la réalisation des prélèvements et la mise en route des analyses : le virus est très fragile dans le milieu extérieur et la réplication virale est de courte durée dans le tractus respiratoire.

Les techniques les plus utilisées en médecine vétérinaire sont la sérologie ou la détection d'antigènes viraux chez les animaux vivants et la détection par immunomarquage sur coupe de poumons chez les animaux morts car ce sont des techniques faciles à mettre en œuvre et d'un coût faible. Malgré tout, elles n'apportent pas toujours une réponse satisfaisante car leur sensibilité est relativement faible.

I-4-1. Animal vivant

☒ Sérologie : recherche indirecte

Le diagnostic sérologique nécessite au moins deux prélèvements, afin de détecter une séroconversion ou une augmentation significative du titre en anticorps dirigés contre le VRSB. Le deuxième prélèvement doit être effectué entre une et trois semaines après le début des symptômes (Elazhary, et *al.*, 1981; Westenbrink, et *al.*, 1989). Différentes techniques sont disponibles pour mettre en évidence ces anticorps sériques mais la plus utilisée reste la technique ELISA. Vu la forte séroprévalence du VRSB chez les bovins adultes, la fréquence des veaux porteurs d'anticorps anti-VRS d'origine colostrale est très élevée et gênent donc le diagnostic sérologique.

De plus, l'immunité passive bloque partiellement ou totalement la synthèse d'IgG mais pas celle d'IgM suite à une infection (Collins, et *al.*, 1996). Donc, les tests ELISA ne détectant que les IgG ont très peu d'intérêts dans le diagnostic de certitude du VRSB, et d'autre part, les IgM sont présent de manière transitoire et à des taux faibles (Kimman, et *al.*, 1987; Kimman, et *al.*, 1988).

☒ Virologie : recherche directe

Différentes techniques de prélèvements sont utilisés pour détecter le VRS, à savoir l'écouvillonnage nasal (EN), l'aspiration trans-trachéale (ATT) et le lavage broncho-

alvéolaire (LBA). Cependant, les prélèvements issus du tractus respiratoire profond (LBA) semblent plus riches en virus, ce qui peut s'expliquer par la richesse en cellules du LBA et par la localisation pulmonaire du VRSB lors d'infections graves (Jacobs, Edington, 1975; Larsen, 2000).

◆ Technique d'isolement viral : c'est la technique classique mais elle très peu utilisée en routine car les résultats sont incertains vus la labilité du virus et les difficultés de conditionnement et de conservation jusqu'au laboratoire.

◆ Détection d'antigènes viraux : c'est la technique la plus sûre en phase aiguë de l'infection. La contamination des prélèvements n'interfère pas avec cette méthode.

Par la technique d'immunofluorescence, la détection du virus a pu être effectuée jusqu'à 14 jours post-inoculation sur des cellules nasales et 18 jours post-inoculation sur des cellules de lavage broncho-alvéolaire (Kimman, et *al.*, 1986, Thomas, 1981).

Des techniques immunoenzymatiques de détection d'antigènes ont été développées pour le VRSH avec de bonnes spécificité et sensibilité. Certains de ces tests sont utilisés pour le VRSB (Osorio, et *al.*, 1989; Rodgers, Baldwin, 1990). La sensibilité du test Abbott est de 80% par rapport à la culture (Osorio, et *al.*, 1989; Rodgers, Baldwin, 1990; West, K., et *al.*, 1998).

◆ Détection de l'ARN viral : la technique de transcription réverse suivie d'amplification génique semble intéressante notamment lors d'amplification d'un segment de gène peu variable comme celui de la nucléoprotéine (Larsen, et *al.*, 1999). Selon une étude récente, le VRSB a pu être détecté à partir du LBA de veaux inoculés expérimentalement jusqu'à 17 jours post-infection par RT-PCR sur le gène de la nucléoprotéine, celle-ci s'arrête à 9 jours par les techniques d'isolement viral et d'immunofluorescence indirecte (Valarcher, 1999b).

I-6-2. Animal mort

En raison de la grande labilité du virus, les techniques utilisées sur les animaux morts sont la mise en évidence d'antigènes par immunofluorescence sur coupe congelée de poumon ou par immunopéroxydase sur coupe de poumon fixée au formol (Kimman, et *al.*, 1989a; Masson, et *al.*, 1993). Les prélèvements doivent être effectués de préférence dans les lobes cranioventraux des poumons au vu de la localisation hétérogène des antigènes viraux dans cet

organe (Kimman, et *al.*, 1989a). La réussite du diagnostic est surtout conditionnée par la fraîcheur du prélèvement.

I-7. La vaccination

Des vaccins atténués et inactivés dirigés contre le VRSB sont d'ores et déjà commercialisés. En 1999, un des vaccins inactivés a été retiré du marché car les études de pharmacovigilance montraient une fréquence considérée comme anormalement élevée de mortalité associée au VRSB sur des bovins préalablement vaccinés. Les pays nordiques comme la Suède ou le Danemark, pratiquent la vaccination seulement depuis 1996.

Les deux types de vaccins nécessitent deux injections intramusculaires à 3 semaines d'intervalle afin d'optimiser la réponse immune, mais l'immunité est de courte durée (4 mois).

La réponse immune protectrice envers le VRSB implique une réponse humorale et à médiation cellulaire.

Pour certains vaccins inactivés, la réponse humorale paraît satisfaisante selon le rapport anticorps neutralisants sur anticorps totaux effectué grâce à une technique immunoenzymatique, même s'il reste inférieur à celui obtenu avec les vaccins vivants (Ellis, et *al.*, 1995; Ellis, et *al.*, 1992; Thomas, et *al.*, 1984).

La réponse immunitaire à médiation cellulaire n'a été évaluée que par des tests de prolifération lymphoblastique. La comparaison de vaccins inactivés commercialisés ou non et de vaccins vivants modifiés mono ou polyvalents commercialisés montre qu'une réponse cellulaire est induite dans tous les cas (Ellis, et *al.*, 1995; Ellis, et *al.*, 1992).

La problématique de la vaccination contre le VRSB repose sur différents critères :

- l'innocuité de certains vaccins, notamment les vaccins inactivés,
- la nécessité de vacciner à un âge où le système immunitaire des veaux est immature,
- la présence d'anticorps colostraux qui interfèrent avec le développement d'une réponse immunitaire post-vaccinale,
- la nécessité d'induire une réponse immunitaire locale forte,
- la variabilité des souches virales par rapport aux différents vaccins.

Or les nouvelles stratégies vaccinales incluent l'utilisation de vaccins à base d'ADN plasmidique exprimant la glycoprotéine G ou des vaccins recombinants utilisant le BHV-1 comme vecteur pour exprimer la même glycoprotéine .

II- Le Virus Respiratoire Syncytial, un pneumovirus

II-1. Taxinomie

Le VRSB est un virus à ARN appartenant à l'ordre des *Mononegavirales*. Comme tous les virus faisant partie de cet ordre, le VRSB est caractérisé par (Collins, et *al.*, 1996; Valarcher, 1999a):

- un génome représenté par un ARN mono caténaire non segmenté de sens négatif
- dans le virion et dans les cellules infectées, le génome est fortement lié sur toute sa longueur à une protéine virale, et constitue ainsi la nucléocapside
- l'ARN génomique est transcrit en ARN messagers de manière non chevauchante la plupart du temps
- une disposition des gènes constante : 3'- région non traduite/gènes codant pour des protéines non structurales – gènes des protéines de squelette – protéines d'enveloppes – gène de la polymérase – 5'
- la réplication du brin d'ARN (-) par la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire de polarité positive, ceci se déroulant dans le cytoplasme
- 80 à 99 % du génome code pour des protéines
- une enveloppe lipidique d'origine plasmique comportant des protéines virales

L'ordre des *Mononegavirales* est subdivisé en trois familles : la famille des *Rhabdoviridae*, comprenant entre autres le virus rabique, la famille des *Filoviridae*, dont l'unique genre

Filovirus comprend le virus Ebola, et la famille des *Paramyxoviridae*, à laquelle appartient le VRSB.

De nombreux virus de la famille des *Paramyxoviridae* sont importants en médecine vétérinaire et en santé humaine. La famille des *Paramyxoviridae* est subdivisée en deux sous-familles. La sous-famille des *Paramyxovirinae* comprend trois genres : le genre *Paramyxovirus* (virus parainfluenza humain 1 et 3, virus Sendai), le genre *Morbillivirus* (virus de la maladie de Carré, virus de la rougeole, virus de la peste bovine), et le genre *Rubulavirus* (virus de la maladie de Newcastle, virus des oreillons, virus parainfluenza humain 2 et 4) ; puis, la sous-famille des *Pneumovirinae* est représentée par deux genres : le genre *Pneumovirus* (VRSH, VRSB, VRSO, VRSC, pneumovirus de la souris) et le genre *Metapneumovirus* (métapneumovirus humain, virus de la rhinotrachéite de la dinde) apparu très récemment (van den Hoogen, et al., 2001).

Bien que la longueur des génomes des virus de la famille des *Paramyxoviridae* soit similaire, les virus de la sous-famille des *Pneumovirinae* ont un nombre de gènes plus important (10, alors qu'il n'y en a que 6 ou 7 pour les virus de l'autre sous-famille). Cette deuxième sous-famille diffère de la première par l'absence de neuraminidase et d'hémagglutinine.

II-2. Propriétés physico-chimiques

Le virus respiratoire syncytial bovin est un virus très peu résistant dans le milieu extérieur. Il est sensible au pH acide (pH < 4), à l'éther, au chloroforme, au deoxycholate de sodium à 0.1% et à la trypsine à 0.25%, ainsi qu'à de nombreux solvants huileux.

C'est un virus thermolabile ; en effet, l'infectiosité du virus est détruite en 30 minutes à 56°C et en quelques heures à 37°C (Paccaud, et al., 1970; Smith, 1975). D'autre part, elle diminue peu à peu en quelques semaines lorsque le virus est stocké à - 20°C, alors qu'elle est stable plusieurs mois en dessous de - 50°C ou - 196°C (Ito, 1973). Plusieurs congélations et décongélations successives détruisent le virus (Larsen, 2000). Cette fragilité du VRSB explique le rôle prépondérant du contact direct dans la transmission et la difficulté de l'isoler à partir des prélèvements réalisés pour le diagnostic car ce virus est très fortement lié aux cellules (Thiry, 2000).

Le VRSB n'a pas de propriétés d'hémadsorption et d'hémagglutination.

Un grand nombre de cultures cellulaires peut être infecté par le VRSB. Il se réplique en effet dans de nombreux types de cellules (rénales, testiculaires, thyroïdiennes, du thymus, duodénales, rectales) d'origine bovine (Inaba, 1970; Jacobs, 1971; Openshaw, 1995; Bastien, 1997) tout comme des cellules provenant de porc (plus précisément de rein d'embryon), d'hamster (rein, poumons), de singe (souche Vero) et d'origine humaine (poumons et reins embryonnaires, souche Hela, souche Hep-2). Le VRSB se multiplie dans les cultures cellulaires obtenues à partir d'extrait de trachée fœtale à 37°C et à pH 7.2. Le titre maximal relevé varie entre 10^4 et 10^6 Unité Formant Plage (UFP) par mL (Horzinek, 1990).

II-3. Structure

Le VRS est représenté par un virion de forme filamenteuse d'une longueur allant jusqu'à 10 μm avec un diamètre entre 60 et 100 nm ou de forme pléiomorphe d'allure arrondie de 100 à 350 nm de diamètre. Les particules de VRSB peuvent former un réseau par l'intermédiaire de ponts de 12 ± 3 nm de long et de 17 ± 1 de diamètre (Trudel, et *al.*, 1989; Belanger, 1988).

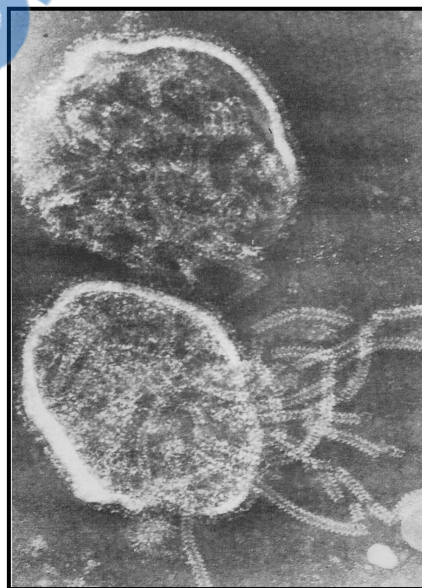


Figure 2: Photographie d'un pneumovirus.

Le virion contient une nucléocapside hélicoïdale symétrique de diamètre variant de 12 à 15 nm (Ulloa, et *al.*, 1998). La nucléocapside est principalement constituée d'une protéine virale, la nucléoprotéine N, qui reste étroitement liée au brin d'ARN génomique.

L'enveloppe virale est constituée d'une bicouche lipidique issue de la membrane cellulaire cytoplasmique dans laquelle sont incluses des glycoprotéines virales de surface. Ces glycoprotéines d'enveloppe sont utiles pour l'attachement, la pénétration dans les cellules hôtes et l'induction de la réponse immunitaire et forment à la surface des virions des spicules de 11 à 20 nm de long et espacées de 6 à 10 nm qui sont visibles au microscope électronique.

II-4. Génome

Le génome du VRSB est constitué d'une molécule d'ARN simple brin linéaire qui possède un coefficient de sédimentation de 50S et a un poids moléculaire de 5.10^6 kDaltons. Cet ARN génomique comprend environ 15000 nucléotides et n'est ni coiffé ni polyadénylé (Stott, et *al.*, 1985; Buchholz, 1999). Il est toujours très fortement lié à la nucléoprotéine N dans le virion et les cellules infectées (Mallipeddi, et *al.*, 1996).

La disposition des gènes du VRSB est caractéristique de l'ordre des Mononegavirales. Le génome est constitué de 10 gènes selon l'ordre suivant (Collins, 1991a) :



Figure 3: Représentation schématique du génome du VRSB.

La souche de VRSB A51908 a récemment été séquencée dans sa totalité (Buchholz, et *al.*, 1999; Yunus, 2001) et la souche A2Gelfi est en cours de séquençage.

L'étude du génome du VRSH a permis de montrer qu'il existe :

- en 3' : une région « leader » extra-génique de 44 nucléotides contenant un promoteur viral majeur (Mink, et *al.*, 1991),
- en 5' : une région « trailer » de 155 nucléotides, après le dernier gène, L (Mink, et *al.*, 1991),
- deux segments nucléotidiques agissant en *Cis* localisés en 3' et 5' apparemment indispensables pour la transcription, la réplication et l'assemblage viral. En 3', ce segment est composé de 88 nucléotides (région « leader » + signal d'initiation de transcription du gène NS1 + extrémité non codante de ce gène) ; en 5', ce segment est constitué de 192 nucléotides (extrémité non codante du gène L + signal de terminaison de la transcription + région « trailer ») (Yunus, et *al.*, 1998; Zamora, et *al.*, 1992)
- un signal d'initiation de transcription se trouve au début de chaque gène, la séquence est identique pour le VRSH et le VRSB (3' – CCCCGUUUA) sauf pour le gène SH du VRSB et pour les gènes L du VRSH et du VRSB. Pour chaque gène, la transcription débute dès le premier nucléotide du signal (Zamora, et *al.*, 1992).
- un signal de terminaison de transcription termine chaque gène, la séquence de 12 ou 13 nucléotides est semi-conservée d'un gène à l'autre mais est conservée pour un même gène entre le VRSH et le VRSB (3' – UCA A/U UN A/U A/U UUU). Ce signal induit la terminaison de la transcription ainsi que la polyadénylation.
- les 9 premiers gènes sont non chevauchants et sont séparés par des séquences intergéniques de longueur variable (entre 1 et 52 nucléotides) et non conservées entre le VRSH et le VRSB (Samal, et *al.*, 1991a; Zamora, et *al.*, 1992; Pasty, 1995).
- les deux derniers gènes (M2 et L) se chevauchent sur 68 nucléotides chez le VRSH et 67 chez le VRSB (du moins pour la souche A51908). En effet, le signal d'initiation de transcription du gène L se trouve dans la séquence du gène M2. Cela aurait pour fonction, une régulation de la transcription de la polymérase (Collins, et *al.*, 1987).

II-5. Protéines virales

Dix protéines virales ont été décrites pour le VRSB, avec des poids moléculaires similaires à ceux décrits pour le VRSH.

Parmi ces protéines, on compte 2 protéines non structurales (NS1 et NS2) et 8 protéines structurales englobant 3 protéines d'enveloppe (F, G, SH), 2 protéines de matrice (M et M2) et 3 protéines de nucléocapside (N, P, L).

II-5-1. Les protéines non structurales : NS1 et NS2

Ces protéines non structurales sont caractéristiques des *Pneumovirus*. Elles sont synthétisées en quantité abondante dans les cellules infectées lors du cycle de réplication (Collins, et *al.*, 1983).

Le gène codant pour la NS1 est constitué de 524 bases, il code pour une protéine de 136 acides aminés et de poids moléculaire d'environ 15 kDa (Pastey, et *al.*, 1995). Le gène codant pour la NS2 est constitué de 488 nucléotides, il code pour une protéine de 124 acides aminés dont le poids moléculaire est de 14.5 kDa (Evans, et *al.*, 1996; Mallipeddi, et *al.*, 1990).

Leurs séquences ont été déterminées chez le VRSH et chez le VRSB ; il apparaît que les pourcentages de conservation au niveau nucléotidique entre ces deux virus sont compris entre 65 et 67% pour la NS1 et entre 67 et 69% pour la NS2 (Pastey, et *al.*, 1995).

Leurs fonctions respectives n'ont pas été mises en évidence, mais selon une étude récente ces deux protéines NS1 et NS2 auraient un rôle dans l'inhibition de la réponse cellulaire par les interférons de type I (Schlender, et *al.*, 2000).

II-5-2. Les protéines de nucléocapside

α la nucléoprotéine N

Le gène codant pour la nucléoprotéine N est constitué de 1196 nucléotides. Il est à l'origine d'un polypeptide de 391 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 43 kDa quel que soit le VRS (Samal, et *al.*, 1991b). Parmi les virus à ARN, cette nucléoprotéine de capsidite fait preuve d'un haut degré d'homologie. Elle est présente en grande quantité dans le virion et les cellules infectées.

Cette protéine est le principal constituant de la nucléocapside et elle protégerait l'ARN génomique des dégradations dues aux ARNases. Elle forme un complexe avec la phosphoprotéine et la polymérase dans le cytoplasme des cellules infectées (Samal, et *al.*, 1993; Mallipeddi, et *al.*, 1996). D'autre part, il semblerait aussi que sa concentration cellulaire

serait déterminante pour le passage de la transcription à la réplication de l'ARN génomique (Mallipeddi, et *al.*, 1996).

Le degré d'homologie entre la nucléoprotéine N du VRSB et du VRSH est de 80.7% au niveau nucléotidique et de 93.3% au niveau peptidique (Samal, et *al.*, 1991a).

☒ la phosphoprotéine P

Le gène codant pour la phosphoprotéine P est long de 860 nucléotides. La séquence contient un ORF (Open Reading Frame, cadre ouvert de lecture) de 723 nucléotides (Larsen, 2000). La protéine P est constituée de 241 acides aminés avec un poids moléculaire de 27 kDa quel que soit le VRS (Mallipeddi, et *al.*, 1992). La grande proportion de résidus sérine et thréonine (17%) montrent un degré de phosphorylation élevé de cette protéine, ce qui participe certainement aux variabilités entre les divers isolats.

La protéine P est un facteur de transcription, de réplication et d'assemblage du virion, rôle qu'elle joue aussi chez tous les virus à ARN non segmenté de polarité négative (Khattar, et *al.*, 2001; Lu, et *al.*, 2002).

Le degré d'homologie entre la phosphoprotéine du VRSB et celle du VRSH est de plus de 72% au niveau nucléotidique et de plus de 81% au niveau peptidique (Mallipeddi, et *al.*, 1992).

☒ la polymérase L

Le gène L est constitué de 6562 nucléotides et comporte un seul site d'initiation de lecture correspondant à un polypeptide de 2161 acides aminés (Yunus, et *al.*, 1998). C'est le gène le plus long présent sur l'ARN génomique du VRSB et représente d'ailleurs 60 % de ce génome. Cette protéine est une polymérase ARN dépendante. La polymérase L du VRSB partage 77% d'identité au niveau nucléotidique et 84% d'identité au niveau peptidique avec celle du VRSH (Yunus, et *al.*, 1998). La comparaison des séquences de plusieurs polymérases ARN-dépendantes appartenant à des virus à brin négatif non segmenté révèle quatre motifs identiques toujours présents et hautement conservés qui représentent certainement des domaines fonctionnels (Poch, et *al.*, 1990; Stec, et *al.*, 1991).

Elle est associée à la nucléoprotéine et à la phosphoprotéine et est alors responsable de la transcription et de la réplication de l'ARN génomique.

II-5-3. Les protéines de matrice

La plupart des virus à ARN non segmenté n'ont qu'une seule protéine de matrice, les *Pneumovirus* sont donc une exception parmi les *Mononegavirales*.

La séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARN messager M compte 938 nucléotides. Le polypeptide correspondant est long de 256 acides aminés (Samal, et *al.*, 1991a). La séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARN messager M2 compte 958 à 962 nucléotides (Zamora, et *al.*, 1992). Le gène M2 contient deux ORF. L'ORF principal est à l'origine d'une protéine de 186 acides aminés correspondant à un poids moléculaire de 22kDa ; le second ORF, qui chevauche le premier, code pour un polypeptide potentiel de 95 acides aminés (Collins, et *al.*, 1990; Mallipeddi, et *al.*, 1990).

Comme les protéines de matrice des autres virus de la même famille, les protéines M et M2 ne sont pas glycosylées et ne possèdent pas de sites d'ancrage membranaire sur leur séquence (Collins, et *al.*, 1996).

Le rôle des protéines de matrice n'est pas clair pour les VRS mais l'étroite relation avec la membrane laisse suggérer, pour la protéine M surtout, qu'elles agissent sur la nucléocapside virale et la membrane de la cellule cible en vue de l'assemblage, la maturation et le bourgeonnement des virions (Larsen, 2000). La protéine M2 est localisée dans le secteur intracellulaire et associée avec les autres protéines de la nucléocapside. Elle a un rôle de régulation de la transcription de la protéine L (Hardy, et *al.*, 1998) et augmenterait quantitativement la synthèse d'ARN messagers (Yunus, et *al.*, 1998).

II-5-4. Les protéines d'enveloppe

▣ la protéine de fusion F

La protéine F des virus respiratoires syncytiaux est sensiblement identique structurellement et fonctionnellement aux protéines F des *Paramyxovirus*. C'est une des raisons pour lesquelles les *pneumovirus* ont été classés parmi les *Paramyxoviridae* (Collins, et *al.*, 1984).

La séquence de cette protéine est longue de 574 acides aminés et est relativement bien conservée entre les nombreux VRS (Pastey, et *al.*, 1993).

La protéine F est à peu près similaire aux autres protéines de fusion des virus de la même famille si l'on regarde la localisation des domaines hydrophobes, le clivage du peptide et les résidus cystéines. C'est une glycoprotéine de type I, peu glycosylée, contenant une séquence

signal près de l'extrémité N-terminale et un site d'ancrage dans la membrane près de l'extrémité C-terminale (Collins, et *al.*, 1984).

La protéine de fusion F est synthétisée tout d'abord sous la forme d'un précurseur inactif Fo. Ce précurseur est clivé dans le réticulum endoplasmique grâce à une protéase de type trypsine en une sous-unité F1 de 48 kDa et une sous-unité F2 de 20 kDa, toutes deux reliées par un pont disulfure. Par cette transformation, un domaine hydrophobe N terminal est alors exposé ; il jouerait un rôle dans l'activité de fusion. La protéine F contient 15 cystéines dont 11 se situent dans le centre de la sous-unité F1 et interviennent dans la formation des ponts disulfures (Lopez, et *al.*, 1996).

Comme son nom l'indique, la protéine F assure la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible, permettant ainsi la pénétration du virus dans celle-ci. Elle assure également la fusion des cellules infectées et non infectées formant ainsi les syncytia observés dans les cultures de cellules et dans les tissus infectés par le VRSB (Heminway, et *al.*, 1994). In vitro, elle permettrait aussi la pénétration du virus dans des systèmes cellulaires particuliers (Zimmer, et *al.*, 2002).

⌘ la glycoprotéine G

La glycoprotéine G des *Pneumovirus* est unique et ne présente pas d'homologie avec les protéines d'attachement des autres *Paramyxoviridae*. Elle ne possède pas d'activité hémagglutinante et neuraminidasique (Richman, et *al.*, 1971).

Le gène codant est constitué de 838 nucléotides et l'ARN messager contient deux ORF. Le premier est le point de départ de la synthèse d'un polypeptide de 257 acides aminés de poids moléculaire estimé à 30 kDa (Larsen, et *al.*, 1998; Lerch, et *al.*, 1990), l'autre servirait à la synthèse de la forme sécrétée de la molécule. La protéine G est une protéine de type II et est fortement glycosylée par des sucres N- et O-liés car elle contient de nombreux sites pouvant potentiellement être le lieu de O- ou N-glycosylation. Son poids moléculaire passe d'ailleurs à environ 90 kDa après cette maturation et la conformation structurelle de la glycoprotéine G ressemble lors à celle de la mucine (Lambert, 1988; Collins, et *al.*, 1991), ce qui pourrait faciliter la pénétration du virus dans les sécrétions muqueuses des voies respiratoires. La variation des sites de glycosylation contribue à l'hétérogénéité antigénique. Jusqu'à 46% du domaine extracellulaire peut être substitué par une séquence différente sans altérer la viabilité du virus.

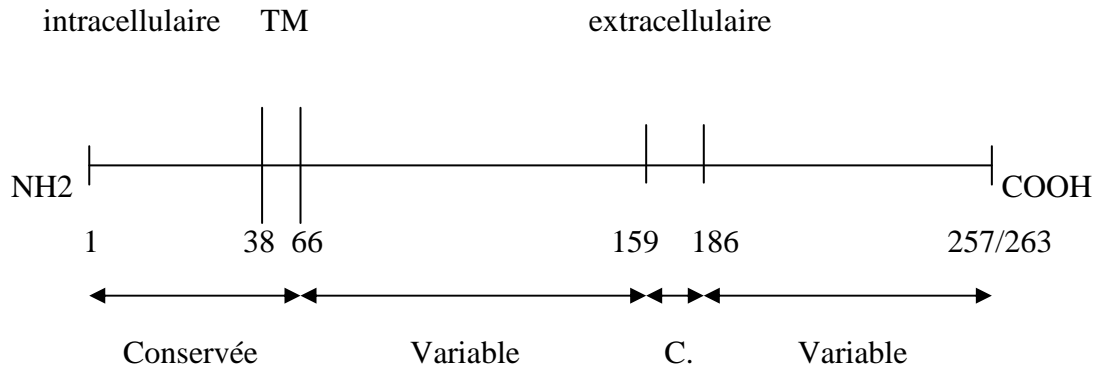


Figure 4: Représentation schématique de la structure primaire de la glycoprotéine G du VRSB (TM: transmembranaire) (Larsen, 2000).

La glycoprotéine G est extrêmement variable dans ce domaine extracellulaire pour les souches de VRSH et de VRSB. Cette partie extracellulaire est constituée de deux régions variables dites « mucin-like » encadrant une région conservée centrale.

La variabilité est due à des mutations non synonymes au niveau nucléotidique, ce qui peut générer un codon stop donc la production de la protéine tronquée. La région centrale extracellulaire comprend un segment très conservé (représenté sur la figure 4 pour le VRSB et allant des acides aminés 164 à 176 pour le VRSH) renfermant 4 résidus cystéines formant deux ponts disulfures. Ces résidus Cystéine sont impliqués dans une boucle centrale au niveau de la structure secondaire, cette boucle restant fixée grâce aux ponts disulfures. Cette région contient un site putatif de reconnaissance au récepteur spécifique et un site épitopique majeur.

La protéine G existe à l'état de multimère plus précisément à l'état de dimère ou trimère comme le montre la figure 5.

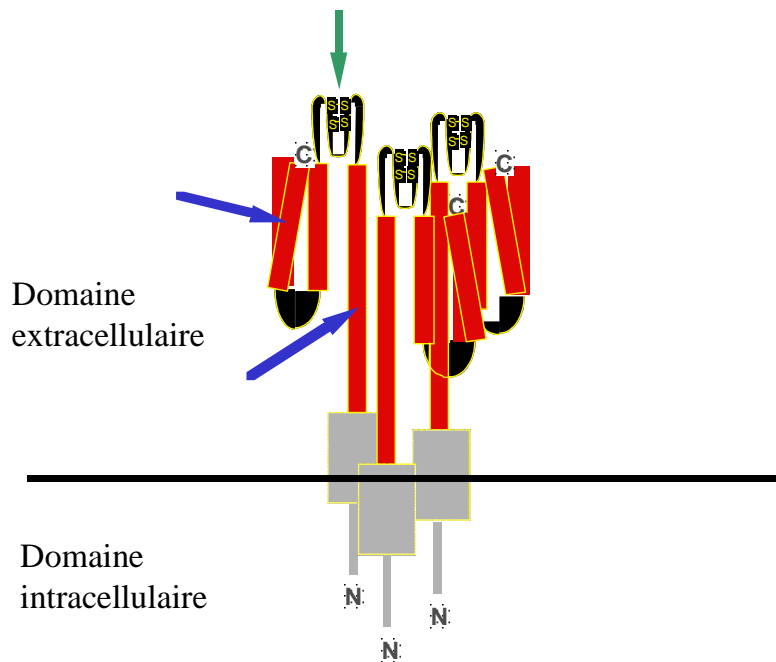


Figure 5 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la protéine G. Les flèches bleues montrent les deux régions variables (en rouge) et la flèche verte le domaine conservé.

In vitro, cette protéine s'exprime sous deux formes : une forme ancrée dans l'enveloppe virale et une forme tronquée sécrétée par la cellule infectée, qui pourrait jouer le rôle de leurre pour le système immunitaire (Hendricks, et al., 1987; Roberts, et al., 1994; Thiry, 2000). Cette forme sécrétée serait également responsable de quelques manifestations cliniques lors d'une primo-infection par le VRSB (Graham, et al., 2000).

La protéine G a pour fonction principale l'attachement du virus sur le récepteur des cellules cibles, ceci a été supposé grâce à la découverte d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine G qui inhibaient l'adsorption des virions sur ces cellules (Levine, et al., 1987).

La protéine G est une cible majeure de la réponse en anticorps dirigés contre le VRSB, la plupart d'entre eux réagissent seulement avec la forme glycosylée (Murphy, et al., 1986; Palomo, et al., 1991).

Enfin, il a été récemment montré qu'une souche de VRS contenant une délétion des protéines G et SH était atténuée *in vivo* mais pouvait toujours infecter certaines lignées cellulaires comme les cellules Vero *in vitro* (Karron, et al., 1997). Cela montre alors que la protéine G n'est pas essentielle à la multiplication du virus *in vitro*.

▣ la protéine SH (pour Small Hydrophobic)

Les séquences nucléotidiques des protéines SH appartenant à deux souches de VRSB varient entre 462 et 566 nucléotides. La conservation nucléotidique entre ces deux souches est de 85% (Collins, et *al.*, 1993). La conservation au niveau nucléotidique et peptidique entre la SH du VRSH et du VRSB est de 49% et de 36%, respectivement (Samal, et *al.*, 1991a).

Cette protéine SH se trouve presque intégralement dans la membrane, seule la terminaison C se situe dans le secteur extracellulaire. L'observation de cellules infectées montre que SH peut exister sous de nombreuses formes, glycosylées (SH_g, SH_p) ou non (SH_o, SH_i) (Anderson, et *al.*, 1992; Samal, et *al.*, 1991a). La signification de l'existence de ces différentes formes reste inconnue. De même, la fonction de cette protéine n'est pas totalement définie. Quelques études ont permis de montrer qu'elle participerait à la formation des syncytia en exacerbant l'activité de la protéine F (Pastey, et *al.*, 1997).

II-6. Cycle de réplication

Les macromolécules cellulaires servant de récepteur au VRS n'ont pas encore été identifiées, mais ces récepteurs sont en grand nombre à la surface des cellules (Walsh, et *al.*, 1984). La pénétration du virus se fait par fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire. La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme et la polymérase débute la transcription. La transcription et la réplication se font intégralement dans le cytoplasme (Levine, 1969).

La transcription s'effectue dans le sens 3' → 5' à partir d'un promoteur unique situé en 3'. La polymérase entre en contact avec la région « leader » en 3'. L'ARN génomique est alors transcrit en 10 ARN messagers subgénomiques grâce aux signaux d'initiation et de terminaison encadrant chaque gène et en plusieurs transcrits polycistroniques polyadénylés, résultant de l'absence de lecture d'un ou plusieurs signaux de terminaison de la transcription de gène par la polymérase. Les quantités d'ARN messagers transcrits sont décroissantes de 3' vers 5', ce qui est dû au décrochage de plus en plus fréquent de la polymérase lorsqu'elle avance vers l'extrémité 5'. La quantité de protéines virales synthétisées est proportionnelle à la quantité d'ARN messagers. Par conséquent, plus un gène est proche de l'extrémité 3', plus la quantité

de protéine codée par ce gène est importante ; ainsi, dans la cellule, les protéines NS1 et NS2 sont en très grande quantité par rapport aux protéines M2 et L (Barik, S., 1992). La séquence de l'ARN régule aussi la transcription. En effet, le signal de terminaison du gène M2 se trouve après le signal d'initiation du gène L ce qui amène à la production dans 90% des cas d'un transcrit de L tronqué, et l'existence de deux codons d'initiation de la transcription du gène G entraîne une diminution de l'efficacité de la transcription et de la traduction (Roberts, et *al.*, 1994).

Pour la réplication de l'ARN viral, la polymérase doit lire le génome sans tenir compte des signaux d'initiation et de terminaison. Elle synthétise ainsi un ARN de polarité positive complémentaire de l'ARN génomique. La région 3' du brin positif contiendrait une région promotrice pour la synthèse de brins négatifs. L'orientation de la polymérase vers sa fonction de réplication dépend de la quantité de protéine virale synthétisée présente dans le cytoplasme. Lorsque le nombre de nucléoprotéines est élevé, la polymérase encapsiderait l'ARN au fur et à mesure de sa synthèse, puis s'associerait au complexe P-L (Atreya, et *al.*, 1998; Bermingham, et *al.*, 1999).

Les protéines de matrice paraissent être à l'origine de l'assemblage entre l'enveloppe virale et la nucléocapside.

Le bourgeonnement du VRSB s'effectue soit dans les vésicules cytoplasmiques avec une libération des virions par exocytose soit directement à la surface de la membrane plasmique (Arslanagic, et *al.*, 1996). Cependant, 90% des virions produits sont associés à la membrane cellulaire (Stott, et *al.*, 1985).

II-7. Immunologie

II-7-1. Structures immunogènes

Les protéines N, G et F du virus respiratoire syncytial bovin, exprimées par des virus de la vaccine recombinants, protègent le veau vis-à-vis d'une épreuve virulente (Thomas, et *al.*, 1994). Cependant la nature des effecteurs immunitaires et l'existence d'une protection sur le long terme ne sont pas précisées.

La plupart des connaissances lors d'infection naturelle par le VRSB concernent la réaction humorale. Lors d'une primo-infection, les anticorps sont surtout dirigés contre les protéines N et F. En revanche, lors de réinfection, la réponse anamnesticque est surtout dirigée contre la protéine F, alors que les taux des anticorps dirigés contre les autres protéines sont extrêmement faibles (Westenbrink, et *al.*, 1989). L'immunogénicité des protéines non structurales NS1 et NS2, malgré leur importante production au cours du cycle viral, n'est pas connue.

Les anticorps monoclonaux spécifiques de F neutralisent presque tous l'infectiosité, alors que très peu d'anticorps monoclonaux spécifiques de G le sont, à la différence des anticorps polyclonaux (Collins, et *al.*, 1996).

Sur la protéine F, la majorité des sites antigéniques connus est localisée sur la sous-unité F1. Ces sites sont au nombre de 11 (Taylor, et *al.*, 1992; Trudel, et *al.*, 1987). Sur la glycoprotéine G, des sites antigéniques ont aussi été identifiés, beaucoup sont des sites linéaires (Melero, et *al.*, 1997; Walsh, et *al.*, 1989) ; les sites conformationnels sont localisés principalement sur les parties glycosylées (Garcia-Barreno, et *al.*, 1996; Rueda, et *al.*, 1991) pour le VRSH. La région centrale hydrophobe non glycosylée de G comprend trois zones immunodominantes (Valarcher, 1999a). Pour le VRSB, il n'y a aucune donnée sur des sites antigéniques de la protéine N et P.

D'autre part, il y aurait des sites impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire sur les protéines N, F et M2 mais aucun n'a encore été localisé.

Les glycoprotéines F et G induisent une réponse protectrice marquée, évaluée sur la réduction de la multiplication virale dans les poumons et basée sur les anticorps neutralisants circulants. Les protéines M et N induisent elles aussi une réponse protectrice mais partielle et de courte durée car elle est seulement basée sur l'induction de LTc (Valarcher, 1999a).

Au début et au cours de l'infection, le VRSB se multiplie dans l'épithélium de l'appareil respiratoire donc les anticorps sériques neutralisants ne peuvent agir sur le VRSB au cours de l'infection précoce.

II-7-2. Réponse immunitaire humorale

Chez le veau, les anticorps maternels sont d'origine colostrale, ils disparaissent en moyenne vers trois ou quatre mois, mais peuvent persister jusqu'à sept mois (Baker, et *al.*, 1986a).

Lors d'infections expérimentales, les anticorps neutralisants apparaissent dans le sérum entre 3 et 9 jours après l'inoculation avec un pic vers 21 à 30 jours post-inoculation (Elazhary, et *al.*, 1981). Les IgM sont les premières à être synthétisées et elles sont détectées 6 à 10 jours post-inoculation avec un pic vers 10 à 13 jours et restent détectables jusqu'à presque 1 mois (Kimman, et *al.*, 1987; Thomas, et *al.*, 1984); les IgG1 spécifiques sont détectées une semaine après les précédentes, forment un pic vers 24 à 38 jours et sont détectables jusqu'à 8 mois après l'infection (Kimman, et *al.*, 1988; Schrijver, et *al.*, 1996a); enfin, les IgG2 n'apparaissent pas avant 1 à 3 mois post infection, sont au taux le plus élevé vers 2 à 4 mois et sont présentes au moins pendant 8 mois. Les IgA sériques peuvent être détectées en même temps que les IgM mais peuvent aussi être absentes (Kimman, et *al.*, 1987; Thomas, 1984).

Lors d'une primo-infection naturelle, le taux en anticorps anti-G spécifiques décroît plus vite et à des niveaux plus faibles que celui en anticorps anti-F spécifiques et lors de réinfections, des anticorps dirigés contre la protéine G sont alors détectés. Ainsi, cette détection des anticorps anti-G permet de différencier une infection récente d'une infection ancienne (Schrijver, et *al.*, 1996a).

La protection par les anticorps varie en fonction de leur isotype et des cibles antigéniques.

Les IgG1 et les IgM dirigées contre le VRSB activent le complément en présence de cellules infectées et provoquent la lyse cellulaire (Kimman, et *al.*, 1989b). Les IgA sécrétoires auraient une activité neutralisante restreinte et pourraient agir en bloquant le virus dans les mucosités (Kimman, et *al.*, 1989c).

En conditions naturelles, la fréquence et la gravité de la maladie sont inversement liées aux concentrations en anticorps sériques neutralisants d'origine maternelle (Kimman, et *al.*, 1988).

Un titre élevé en anticorps neutralisants dirigés contre le VRSB dans le colostrum ne protège pas le veau contre une éventuelle infection et les anticorps sériques neutralisants post-infection n'empêchent pas non plus une réinfection (Kimman, et *al.*, 1988; Westenbrink, et *al.*, 1989).

Le rôle protecteur de ces anticorps semble supérieur à l'étage pulmonaire qu'à l'étage nasal.

La protection contre les réinfections est habituellement attribuée aux anticorps " sécrétés " dans les mucosités de l'appareil respiratoire. Les classes d'immunoglobulines retrouvées dans les sécrétions oculaires, nasales et pulmonaires, chez des animaux infectés expérimentalement 10 jours auparavant, sont les IgM et les IgA. Les IgM semblent y persister 10 à 18 jours contrairement aux IgA qui semblent y rester 3 mois voire plus (Kimman, et *al.*, 1987). Néanmoins le rôle de l'immunité locale est plutôt déduit que directement déterminé. Le rôle protecteur de l'immunité locale intervient surtout à l'étage supérieur des voies respiratoires.

II-7-3. Immunité à médiation cellulaire

La réponse de type T cytotoxique est essentielle dans l'élimination virale. Une activité lymphocytaire T cytotoxique associée au phénotype CD8⁺ peut être mise en évidence dans le sang des animaux infectés expérimentalement par le VRSB 7 à 10 jours post-inoculation et dans les poumons 10 jours post-inoculation (Gaddum, et *al.*, 1996; Thomas, et *al.*, 1996). En outre, une augmentation significative de la réponse cellulaire de type T associée au type CD4⁺ et des concentrations accrues en IL-2 et en INF γ ont été observés sur des animaux préalablement vaccinés avec des vaccins à virus vivants recombinés ou inactivés (Ellis, et *al.*, 1992).

Lors d'une primo-infection chez le veau, le nombre de CD8⁺ augmente au cours de l'infection. Chez les animaux infectés expérimentalement, la diminution des cellules T CD8⁺ n'affecte ni la réponse en anticorps sériques ni celle en anticorps locaux dirigés contre le VRSB alors que la diminution des cellules CD4⁺ supprime la réponse en anticorps (Taylor, et *al.*, 1995; Thomas, et *al.*, 1996). La déplétion lymphocytaire CD8⁺ provoque une excrétion virale prolongée par rapport à des animaux déplétés en CD4⁺ (Taylor, et *al.*, 1995). Les CD8⁺ ont un rôle prépondérant par rapport au CD4⁺ dans l'élimination virale. Les rôles des cellules CD4⁺ et des autres cellules T sont d'orienter la réponse immunitaire vers une balance Th1/ Th2.

Cependant la réaction et l'orientation de la réponse immune se fait sous l'influence des cytokines produites dans le milieu. Dans une étude réalisée chez des veaux inoculés expérimentalement avec du VRSB, les profils d'interleukines obtenus à partir de cellules mononucléées pulmonaires et sanguines prélevées 7 jours post-inoculation et sans restimulation sont apparus variables entre individus. Les cytokines détectées, à savoir INF γ , IL-2, IL-4 et IL-10 indiquent un mélange des réponses Th1 et Th2 (McInnes, et *al.*, 1998). L'orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th1 ou Th2 varie en fonction des protéines virales et du type de présentation. Lors d'une infection primaire, la protéine F est plus efficace que la N et la G pour stimuler une réponse de type T auxiliaire. La protéine F stimule une réponse Th1 engendrée par des cellules CD4⁺ et des cellules CD8⁺ ainsi qu'une forte réponse en LT cytotoxiques, alors qu'une réponse Th1 ou Th2 développée exclusivement par des cellules CD4⁺ est observée dans le cas de la G (Alwan, et *al.*, 1993; Srikiatkachorn, et *al.*, 1999).

III- Variabilité du VRSB et notion de quasi-espèces

III-1. Etude de la variabilité du VRSB

Jusqu'à récemment, l'analyse de la diversité génétique du VRSB, comme celle du VRSH, était basée uniquement sur un faible nombre de souches isolées.

III-1-1. Utilisation d'anticorps monoclonaux

Les premières expériences sur l'étude de la variabilité du VRSB ont consisté en l'analyse de la réactivité des quelques souches virales isolées vis-à-vis d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines virales. Ces études ont montré que les différences majeures concernent essentiellement la glycoprotéine G et la sous-unité F2 (Prozzi, *et al.*, 1997; Stine, *et al.*, 1997). Les études suivantes ont donc été axées principalement sur la protéine G car elle est apparue comme étant la protéine virale la plus variable de toutes et une des cibles principales des anticorps (Elvander, *et al.*, 1998; Furze, *et al.*, 1997; Mallipeddi, *et al.*, 1993).

Pour le VRSH, le dimorphisme antigénique (contre G) observé a ainsi permis de définir deux sous-groupes A et B (Mufson, *et al.*, 1985; Norrby, *et al.*, 1986). Six subdivisions au sein du sous-groupe A, et deux à trois subdivisions au sein du sous-groupe B ont par la suite été définies. Sur le plan épidémiologique, la prévalence des sous-groupes varie d'un foyer à l'autre, géographiquement et dans le temps (Freymuth, *et al.*, 1991). Sur le plan immunitaire, l'importance de la variabilité antigénique n'est pas claire. Des observations, en nombre limité, suggèrent que, dans certains cas au moins, les réinfections seraient plus fréquentes avec des souches hétérologues (Anderson, *et al.*, 1991). Aucune corrélation entre la variabilité et le pouvoir pathogène des souches virales isolées n'a pu être mise en évidence.

Par analogie, les souches de VRSB ont été classées en sous-groupes sur la base de la réactivité antigénique de la protéine G. Dans une étude réalisée par Furze *et al.* (1994), l'utilisation d'un panel d'anticorps monoclonaux dirigés contre cette même protéine a permis

de classer les souches de VRSB en 2 sous groupes, A et B. En utilisant les mêmes anticorps, Schrijver *et al.* (1996b) ont déterminé un troisième sous-groupe appelé AB également reconnu par Prozzi *et al.* (1997) (Tableau 1).

Sous-groupe de VRSB	mab70 (aa : 199-209)	Mab20 et48 (aa : 174-185)
A	-	+
AB	+	+
B	+	-

Tableau 1: Identification des trois sous-groupes de VRSB à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine G selon Schrijver *et al.*, 1996b.

Enfin, des souches (n=5) circulant en Suède entre 1992 et 1995 ont été considérées comme des souches intermédiaires car inclassables dans les sous-groupes A, B et AB (non A, non B et non AB) (Elvander, *et al.*, 1998). Finalement, il est possible de considérer aujourd'hui que les souches de VRSB sont réparties en au moins 4 sous groupes (A, AB, B et intermédiaire) (Tableau 2).

D'autre part, une corrélation a pu être établie entre la réactivité antigénique sur G et des mutations ponctuelles sur la séquence de cette protéine, exclusivement sur un site épitopique majeur situé entre les acides aminés 171 et 208 (Furze, *et al.*, 1997; Langedijk, *et al.*, 1997) (Tableau 3).

Auteurs	Souches		Identité de séquence des acides aminés	Groupes antigéniques
	n	origine		
Mallipeddi et al. 1993	4	USA	>84 %	1(b)
Furze et al. 1994	19	Europe	ND	2 (A et B)
Schrijver et al. 1996b	14 (a)	Pays Bas	ND	3 (A ; AB ; non A, non B et non AB)
Stine et al. 1997	18	USA	>89 %	1
Prozzi et al. 1997	8	Europe, USA, Japon	>85 %	3(A, B, AB)
Elvander et al. 1998	12	Europe, USA, Japon	>84 %	intermédiaire
Larsen et al. 1998	17	Europe, USA	>84 %	3(A, AB, B)

Tableau 2: Variabilité de la glycoprotéine G du VRSB sur la base de la réactivité à des anticorps monoclonaux et de la séquence en acides aminés selon plusieurs auteurs; (a) poumons infectés par le VRSB ; (b) neutralisation croisée avec sérum polyclonal (Elvander, et al., 1998; Furze, et al., 1994; Larsen, et al., 1998; Mallipeddi, et al., 1993; Prozzi, et al., 1997; Schrijver, et al., 1996b; Stine, et al., 1997).

Sous groupes	Mutations sur le segment 171-208				
A	L ¹⁸⁰	L ¹⁸³	S ¹⁸⁴	H ¹⁸⁷ ou Q ¹⁸⁷	T ²⁰⁵
AB	L ¹⁸⁰	S ¹⁸³	S ¹⁸⁴	Q ¹⁸⁷	A ²⁰⁵
B	P ¹⁸⁰	S ¹⁸³	P ¹⁸⁴	Q ¹⁸⁷	A ²⁰⁵
Souche non typée (WBH)	P ¹⁸⁰	S ¹⁸³	S ¹⁸⁴	Q ¹⁸⁷	T ²⁰⁵

Tableau 3: Sous groupes de VRSB et mutations ponctuelles (Furze, et al., 1997, Langedijk, et al., 1997).

Des souches de VRSB appartenant à différents sous-groupes circulent simultanément dans la population bovine (Stine, et *al.*, 1997) mais aucune souche pouvant être classée dans le sous-groupe B n'a été isolée depuis 1976 (Furze, et *al.*, 1997; Furze, et *al.*, 1994). D'autre part, aucune différence de virulence n'a pu être démontrée entre ces sous-groupes de VRSB.

III-1-2. Analyse du génome viral

L'analyse du génome viral du VRSH a permis de confirmer l'hétérogénéité de la protéine G. La divergence moyenne des séquences en acides aminés de G est de l'ordre de 3 à 20 % entre des souches virales appartenant à un même sous-groupe, et de l'ordre de 40 à 50 % pour des souches virales de deux sous-groupes différents (Collins, 1991a). Les protéines les mieux conservées sont les protéines N, F, M et M2 pour le VRSH.

En ce qui concerne le VRSB, l'homologie entre les divers sous-groupes viraux est de 88 à 100%, la variabilité est donc beaucoup moins marquée par rapport au VRSH (Elvander, et *al.*, 1998; Furze, et *al.*, 1997). Les mécanismes à l'origine de la variabilité sont principalement représentés par des mutations ponctuelles, aucune insertion ou délétion n'ayant été déterminée.

Une des études les plus récentes sur l'évolution et la variabilité du génome est celle qui a été menée par Valarcher et *al.* (2000). Les séquences nucléotidiques de fragments situés sur les gènes codant pour les protéines F, G et N provenant de 54 isolats de VRSB y ont été déterminés et comparés avec 33 séquences connues provenant des banques de données, parmi lesquels 3 sont des souches vaccinales très utilisées en Europe. Ces nombreux isolats avaient été récupérés sur 32 ans (de 1967 à 1999). Cette étude a permis de tirer de nombreuses conclusions.

Premièrement, les taux moyens des divergences nucléotidiques entre les fragments de VRSB sont de 2% pour les séquences codant pour les protéines F et N, alors qu'il s'élève à 8% pour les séquences correspondant à la protéine G. Ces taux de divergence restent cependant très inférieur à ceux observés entre les protéines G de deux souches de VRSH appartenant à des sous-groupes différents.

Deuxièmement, la constitution d'arbres phylogénétiques pour les protéines G, N et F a montré que les souches testées de VRSB peuvent être arbitrairement classées en six sous-

groupes (Figure 6). Les arbres phylogénétiques obtenus pour les gènes N, F et G sont similaires, ce qui montre que l'évolution de ces trois gènes est parallèle (Valarcher, et *al.*, 2000). Cette classification a une réalité à la fois géographique et temporelle : en effet, le sous-groupe I contient uniquement des souches isolées avant 1976. Les souches du sous-groupe III proviennent exclusivement des USA. Celles qui appartiennent aux sous-groupes II, IV, V et VI, sont exclusivement européennes, sauf une.

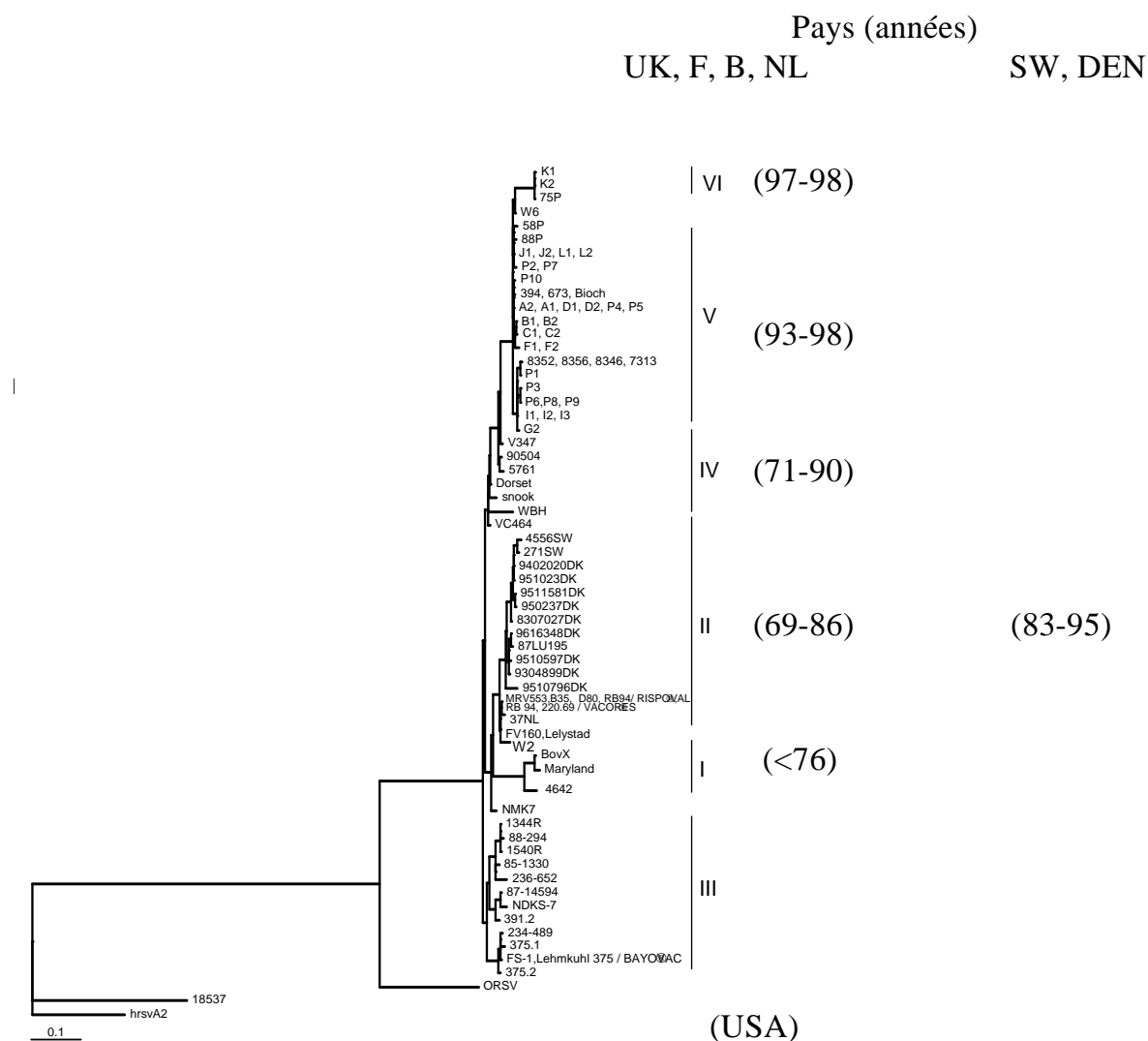


Figure 6: Arbre phylogénétique sur la glycoprotéine G de 87 isolats de VRSB, un isolat de VRSO (Virus Respiratoire Syncytial Ovin) et 2 isolats de VRSH.

Les souches récemment isolées dans les pays européens comme la France, la Grande-Bretagne, la Belgique et les Pays-Bas, sont regroupées en haut de l'arbre, dans les sous-

Le domaine central, allant des acides aminés 154 à 192 et qui contient un site épitopique majeur et un site d'attachement, est plus conservé. Néanmoins, des mutations importantes ont pu être observées, au moins pour les souches du sous-groupe VI. En effet, une mutation primordiale intervient dans la structure tridimensionnelle de la protéine G. La région centrale conservée de cette protéine comprend quatre résidus Cys (cystéine) formant ainsi deux ponts disulfures (Cys 173-Cys 186 et Cys 176-Cys 182). La structure débute avec une hélice α d'un tour (Cys 173-Cys 176) puis se poursuit par une hélice α antiparallèle d'un tour et demi (Leu 180-Asn 179), formant ainsi une boucle au sommet de laquelle se trouve le site épitopique majeur de la protéine G. Ces résidus ne sont pas modifiés pour les souches appartenant aux sous-groupes I à V, mais ils sont remplacés par quatre résidus Arg (arginine) dans les souches du sous-groupe VI. En conséquence, la première hélice α est rompue et les ponts disulfures ont disparu d'une part, et l'Asparagine 179 normalement impliquée dans 3 ponts hydrogènes ne l'est plus que dans un, celui avec l'Arg 176 d'autre part (Figure 8).

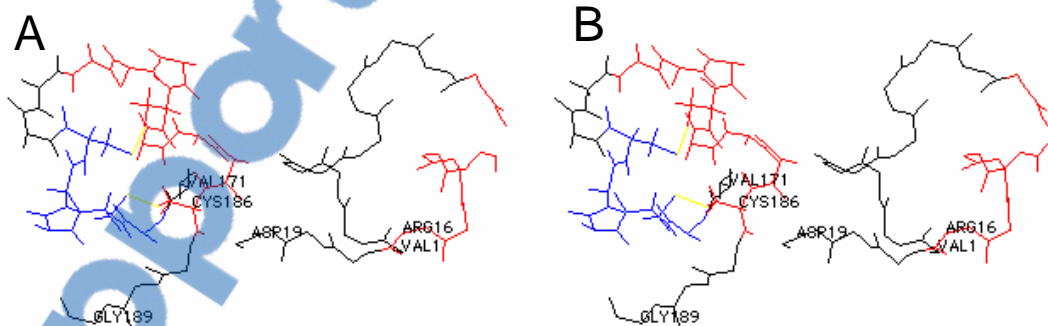


Figure 8: Modélisation de la boucle à cystéine chez le VRSB, souche vaccinale (souche 391.2) à gauche et souches du sous-groupe VI à droite. Cette région contient deux ponts disulfures (en jaune). Les hélices alpha sont en bleu et rouge. Les résidus 171 à 189 dans la représentation de la souche 391.2 correspondent aux résidus 1 à 19 des souches du groupe VI.

La structure tertiaire de la glycoprotéine G des souches du sous-groupe VI pourrait donc être largement modifiée.

Enfin, une pression de sélection positive serait exercée sur les souches provenant de pays où la vaccination est largement pratiquée (Valarcher, et *al.*, 2000). L'analyse du ds (nombre de substitutions nt par site synonyme), du dn (nombre de substitutions nt par site non synonyme) et du rapport dn/ds du segment étudié de G était significativement plus élevé que ceux obtenus sur N et F. La même analyse sur un segment de G a été effectuée sur des souches appartenant aux sous-groupes V et VI, c'est-à-dire provenant de pays où la vaccination est pratiquée depuis au moins 15 ans, d'une part et sur des souches appartenant aux sous-groupes I et II, incluant les 3 souches vaccinales, à savoir de l'isolat le plus ancien (Belgique, 1969) à l'isolat le plus récent (Danemark, 1995) représentant 26 années d'évolution sans aucune pression de sélection. Le rapport dn/ds des souches des sous-groupes V et VI est plus élevé que celui des souches du sous-groupe II. Cela montre alors l'existence d'une pression de sélection positive dans les sous-groupes V et VI par rapport aux autres souches virales testées. Les taux d'évolution calculés sur les protéines N, F et G indiquent une évolution continue des séquences nucléotidiques du VRSB en présence de la vaccination.

En conclusion, ces études ont montré une évolution continue en France du VRSB avec des modifications d'acides aminés dans des régions spécifiques de la glycoprotéine G.

III-1-3. Conséquences

Les résultats obtenus lors d'études sur la variabilité du VRSB montrent qu'il existe à la fois une évolution temporelle et spatiale du virus. Les souches récentes les plus éloignées des souches vaccinales ont toutes été isolées dans des pays qui pratiquent la vaccination intensive depuis longtemps contre le VRSB. Une pression de sélection due à la vaccination pourrait ainsi expliquer l'apparition de souches différentes échappant à la réponse immunitaire induite par la vaccination. D'autres paramètres doivent cependant être envisagés tels que les techniques d'élevage et de commercialisation entre les différents pays. Si cette vaccination semble dans certains cas limiter l'expression clinique et les pertes économiques associées à l'infection par le VRSB dans les troupeaux de bovins, elle ne supprime pas la circulation virale.

III-2. Mécanismes moléculaires de la variabilité génétique des virus à ARN

Les mécanismes qui expliqueraient la variabilité du VRS n'ont jusqu'à présent jamais été déterminés.

Théoriquement, la variabilité génétique résulte d'erreurs lors du processus de réplication et d'altérations du matériel génétique. Alors que dans le cas de l'ADN, l'existence de mécanismes de relecture et de réparation permet en général le maintien ou la restauration de l'intégrité du matériel génétique, de tels mécanismes n'existent pas pour l'ARN, ce qui se traduit par l'accumulation de mutations et d'altérations du matériel génétique. Les taux de divergence des virus à ARN augmentent très rapidement. Au niveau nucléotidique, de nombreux auteurs ont estimé ce taux de divergence génomique à ARN comme allant de 0.03% à 2.0%, soit un millions de fois plus que les génomes à ADN (Holland, et *al.*, 1982; Steinhauer, 1987). Une telle variabilité génétique des virus à ARN leur a vraisemblablement permis de s'adapter peu à peu à de nouveaux hôtes et à de nouveaux environnements lors de l'évolution (Strauss, et *al.*, 1996). Les mécanismes moléculaires de la variation des virus à ARN sont les mutations, les réassortiments du génome et les recombinaisons.

III-2-1. Variabilité par recombinaisons

Le mécanisme de recombinaison est couramment utilisé parmi les virus à ARN. C'est une cause majeure de diversité génétique au sein de ce groupe de virus. La recombinaison implique des échanges d'information génétique au sein de segments génomiques. Ce mécanisme de variabilité ne semble pas ou rarement se produire pour les virus à ARN négatif comme le VRSB, mais existe plutôt pour les virus à ARN positif comme les picornavirus et les coronavirus (Strauss, et *al.*, 1996). Cela serait dû à la présence de la nucléoprotéine N qui entoure l'ARN génomique lors de la réplication et limiterait ainsi la possibilité de changer de matrice. La recombinaison se produirait par un mécanisme de choix de copie faisant intervenir un saut de la polymérase d'une matrice à une autre au cours de la réplication de l'ARN viral. Parallèlement à la recombinaison homologue qui peut se produire à la faveur d'une co-infection du même hôte par différents variants d'un même virus, des événements de recombinaison hétérologue peuvent être observés entre virus à ARN de la même famille

virale. L'existence d'événements de recombinaison entre virus de familles virales distinctes semble également se produire.

III-2-2. Variabilité par réassortiments

Un autre mécanisme à l'origine d'une diversité génétique existe chez les virus dont le génome est présent sous forme de plusieurs segments génomiques, ce qui n'est pas le cas pour les VRS. Deux virus au génome segmenté peuvent s'échanger de tels segments et produire ainsi des mutants extrêmement variables. Cette stratégie représente un mécanisme rapide pour la production de virus aux propriétés totalement nouvelles, c'est en tout cas ce qui est supposé pour les virus influenza (Strauss, et *al.*, 1996) provoquant des pandémies.

Cela suggère d'ailleurs que lors de l'évolution, des virus ont pu soit se partager afin de former des virus au génome segmenté, soit rester sous forme de virus au génome non segmenté, selon les conditions environnementales.

III-2-3. Variabilité par mutations

Les mutations représentent la principale source de variabilité des virus à ARN négatifs. Les mutations se produisent pour de multiples raisons à la suite d'une mésincorporation lors du processus de réplication, et se traduiront par des substitutions, des délétions ou des insertions. Ces mésincorporations peuvent résulter de mésappariements aboutissant à des substitutions nucléotidiques, ou résulter d'un dysfonctionnement de l'ARN-polymérase aboutissant alors à des délétions ou des insertions. Le plus souvent, ce sont des mutations ponctuelles et l'importance de la grande fréquence de mutations des virus à ARN provient principalement de l'ARN polymérase ARN dépendante, qui ne possèdent pas d'activité correctrice contrairement aux ADN polymérases. Le pourcentage moyen d'erreur est estimé à 10^{-4} substitutions par nucléotide copié (Drake, 1993; Steinhauer, 1986) mais ce chiffre peut varier en fonction des virus entre 10^{-3} et 10^{-5} dans la mesure où un grand nombre de copies d'ARN génomique sont produites lors d'un cycle de réplication. La plupart des mutations sont neutres ou délétères et sont donc éliminées par sélection naturelle mais beaucoup ont une valeur sélective dans l'environnement particulier dans lequel le virus se réplique et de tels virus deviennent alors dominant au sein de la population (Novella, et *al.*, 2001; Strauss, et *al.*, 1996). En effet, le taux de mutations peut varier en réponse à des changements de

l'environnement comme la concentration du milieu en tel ou tel nucléotide, la composition ionique de celui-ci ou la présence d'un stress quelconque (Domingo, et *al.*, 1996).

Des génomes hypermutés du fait d'une fréquence élevée d'un type de substitution nucléotidique ont été observés lors d'infections *in vivo* (Vartanian, et *al.*, 1991). Des formes hypermutées du génome de la rougeole ou du virus respiratoire syncytial (RSV), dues à des hypermutations A → G ont ainsi été décrites (Rueda, et *al.*, 1994).

Des substitutions nucléotidiques spécifiques peuvent survenir à différentes fréquences, et certains sites ou régions du génome des virus à ARN peuvent correspondre à des points chauds de mutations alors que d'autres apparaîtront plus stables. En moyenne, au moins une mutation par génome et par cycle de réplication est introduite dans le génome d'un virus à ARN. Une telle fréquence de mutation est proche du seuil d'erreur au-delà duquel un taux d'erreur plus élevé se traduit par une perte irréversible d'information et conduit le génome à la « catastrophe d'erreur ».

De nombreuses protéines virales, notamment structurales, peuvent absorber un nombre considérable de mutations, qui en règle générale n'altèrent pas leurs structures secondaire et tertiaire.

La distribution dynamique des mutants qui constitue la population virale se réfère aux quasiespèces, terme inventé par Eigen et Schuster pour la description des premiers réplicons sur terre (Eigen, Schuster, 1979).

III-3. Le concept de quasi-espèces

III-3-1. Naissance du concept de quasiespèces

Au cours du vingtième siècle, de nombreuses observations ont annoncé l'étendue de la diversité génétique des virus dont le génome est composé d'ARN. Dès les années quarante est apparue la nécessité de caractériser la distribution de génotypes en populations initiale et finale du virus, la fréquence de mutation, l'effet sélectif du milieu et la difficulté d'obtenir des populations homogènes de virus a été reconnue (Domingo, 1999a). Malgré cela, les variations individuelles entre génomes viraux n'ont pendant longtemps pas été considérées comme essentielles dans la compréhension des virus et dans leur pathogénie.

Le concept de quasiespèces a connu des origines théoriques et expérimentales indépendantes. L'origine théorique est apparue pendant les années soixante-dix. En 1971, Eigen énonça un système de molécules capables de réplication qui produisaient des molécules filles erronées (Eigen, 1971). Il définit en 1979 les quasiespèces comme des ensembles de macromolécules répliquatives qui représentent des distributions stables, d'un format de population infinie, dominées par une séquence principale appelée séquence «maîtresse» (Eigen, Schuster, 1979). La théorie des quasiespèces établit ainsi un lien entre l'évolution darwinienne et la théorie de l'information et représente une approche déterministe de l'évolution (Domingo, 2002). En conséquence, il existe pour chaque taux de fidélité une quantité maximale d'information génétique qui peut se transmettre de façon stable.

La deuxième origine du concept de quasiespèce a été expérimentale. Lors de l'étude du génome du bactériophage Q β , une pression élevée de mutations a été observée. Elle occasionnait une grande hétérogénéité au sein des populations de bactériophage si bien que dans une population donnée, 80 à 90 % des génomes formaient un spectre de mutants dans lequel chaque génome individuel possédait une ou plusieurs substitutions des autres génomes (Domingo, et *al.*, 1976). Un concept de génome du phage défini de façon statistique mais indéterminé en ce qui concerne la précision de la séquence de chaque génome individuel a alors été établi (Domingo, 1999a). Par l'intermédiaire de la réplication, un génome va donc évoluer en un spectre de mutants qui peut ou non maintenir une séquence consensus stable ou une séquence moyenne sur plusieurs générations dans des cultures cellulaires ou *in vivo*. La séquence consensus n'est pas nécessairement identique à la séquence dominante ou «maîtresse» (Domingo, 2002).

La corrélation entre cette théorie et ce concept expérimental est à l'origine des nombreuses études actuelles sur la variabilité génétique des virus à ARN et les quasiespèces. Les quasiespèces virales réelles diffèrent évidemment des quasiespèces théoriques proposées initialement par Eigen et Schuster en 1979.

III-3-2. Evolution du concept

La théorie des quasiespèces a été essentielle pour enfin comprendre que les populations virales sont constituées d'un important et dynamique panel de mutants et que la séquence consensus n'existe pas forcément en réalité (Domingo, 2002).

La première évidence de quasiespèces chez un virus animal a été obtenue sur le virus de la fièvre aphteuse (Domingo, et *al.*, 1980). Puis, de nombreux pathogènes viraux comme le virus de l'hépatite B et celui de l'immunodéficience humaine ont été décrits comme des quasiespèces. La dynamique des quasiespèces a une répercussion directe sur l'adaptation des virus, sur leur survie dans les organismes infectés et sur les mécanismes de pathogénie.

Les virologistes utilisent une définition d'influence plutôt chimiste, à savoir que les quasiespèces virales sont des distributions dynamiques de génomes mutants ou recombinants, non identiques mais étroitement liés, et qui se trouvent soumis à un processus continu de variation génétique, de compétition et de sélection (Domingo, 1999b; Domingo, et *al.*, 2001).

Biologiquement, les quasiespèces représentent l'objectif d'une sélection d'un spectre de mutants préférée à des génomes individuels hyperdominants ou au contraire très éphémères (Domingo, et *al.*, 2001). C'est en fait une stratégie adaptative et le spectre de mutants constitue une réserve de variants phénotypiques qui peuvent être sélectionnés comme réponse à des changements du milieu. Plusieurs changements biologiques ont été observés chez les virus à ARN et associés à cette stratégie adaptative comme l'échappement aux anticorps neutralisants ou aux cellules cytotoxiques, la résistance aux agents antiviraux, les changements de tropisme cellulaire et de virulence (dont l'exemple le plus dramatique est celui du virus de l'immunodéficience humaine), la persistance virale... Ce pouvoir adaptatif provient de quatre paramètres : le nombre moyen de mutations par génome, la taille de la population virale, la complexité du génome viral, le nombre de mutations nécessaires à un changement biologique important (Domingo, 1999a). Le nombre de mutations par génome augmente avec le nombre de cycles de réplication et sera donc d'autant plus grand que l'intensité de la sélection négative sera faible.

Le processus d'évolution adaptative d'un virus à ARN peut être visualisé comme le mouvement d'un nuage de mutants dans un espace de séquences. Le concept d'espace de séquence représente le nombre total de séquences nucléotidiques qui pourrait être théoriquement occupées par un génome viral, c'est donc un nombre immense. Le rythme d'exploration de cet espace sera d'autant plus grand que la fréquence de mutation et la taille de la population le seront aussi (Eigen, 1988).

Les virus à ARN créent des quasiespèces en continue évolution lorsqu'ils se multiplient dans leurs hôtes et causent une maladie. Chaque distribution de génomes d'une quasiespèce chez un individu infecté est unique et neuve dans le sens où aucune distribution semblable n'a existé ou n'existera jamais (Holland, 1992).

Dans ce sens, l'évolution d'une quasiespèce est imprévisible. Ce concept de quasiespèces représente une menace importante en médecine humaine et vétérinaire, les virus pouvant ainsi s'adapter et évoluer en présence d'une pression vaccinale ou thérapeutique.

Les études sur les quasiespèces tendent depuis la fin des années quatre-vingt à être incluses dans la recherche concernant les stratégies de contrôles des maladies virales. Ces stratégies de contrôles peuvent être divisées en deux groupes : l'adéquation de procédés de prévention et de thérapie d'un côté et les possibilités thérapeutiques révolutionnaires comme la thérapie basée sur l'induction de catastrophe d'erreur durant la multiplication virale d'un autre côté.

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE

Notre étude a pour objectif d'analyser si le VRSB évolue lui aussi en tant que quasiespèces, et de définir l'existence d'une variabilité au sein d'une même souche virale de VRSB, à partir de l'étude de plusieurs populations virales issues d'une même souche.

I- Matériels et méthodes

I-1. Cultures cellulaires

La lignée utilisée est une lignée cellulaire d'origine épithéliale constituée de cellules des cornets nasaux d'origine bovine. Elle a pour dénomination BT ou «turbinate » (n° ACTT : CRL 1390). Les cellules sont cultivées en étuve à 37°C et 5 % de CO₂. Le milieu de culture de base est composé de 500 ml de Milieu Essentiel Minimum contenant des sels de Earle et de la L-glutamine (MEM complet) 1X, de 5 ml d'acides aminés non essentiels (AANE) 100X, de 5 ml de pénicilline à 100 U / ml et de streptomycine à 100 µg / ml (In Vitrogen).

▫ Passage des cellules sur cultures cellulaires :

Les cellules sont entretenues en flacon de 175 cm². Elles sont utilisées entre les 28^{ème} et 32^{ème} passages. Pour chaque passage, ces cellules sont trypsinées sur un tapis confluent d'un flacon de 175 cm², puis diluées en milieu MEM de base contenant en plus 10 % de sérum de veau foetal (SVF). Après dissociation des cellules par action de la trypsine et centrifugation, la suspension cellulaire est diluée à 1.10⁶ cellules / ml puis répartie sur une plaque de 24 cm² ou dans des flacons de 25 et 75 cm².

Les cellules turbinates ont été utilisées pour amplifier le VRSB et titrer le virus. Lors d'infection, le milieu de culture est ramené à 3 % de SVF final pour les deux premiers passages, additionnés de 5 ml de fungizone à 250 µg / l (In Vitrogen).

I-2. Souches virales

I-2-1. Isolement de la souche virale W2

La souche virale initiale utilisée dans cette étude est une souche nommée W2. Elle a été isolée à partir du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) d'un veau de quatre mois de race Blonde d'Aquitaine présentant des signes cliniques respiratoires, originaire d'un élevage à Carmaux (81). Le LBA a été réalisé sous endoscopie. Le milieu de prélèvement était constitué de 500 ml de MEM 1X, 5 ml d'AANE 100X, 100 µl d'enrofloxacin à 20 µg / ml, 2 ml de gentamicine à 200 µg / ml et 5 ml de fungizone à 250 µg / ml.

Un ml de LBA prélevé le jour même a été déposé sur une boîte de culture cellulaire BT de 25 cm² puis agité doucement à 37°C pendant 2 heures. L'inoculum a ensuite été éliminé et remplacé par 5 mL de milieu de base + 3 % de SVF + 1 % de fungizone. Le milieu est à nouveau changé au bout de 24 heures. Le flacon a été congelé à -80°C sept jours après inoculation. Des passages successifs sur des cellules BT ont été réalisés jusqu'à l'obtention d'un effet cytopathogène (ECP). Pour cela, le flacon de 25 cm² (F25) a été rapidement décongelé au bain-marie à 37°C et son contenu a été récupéré. Un à deux ml de suspension cellulaire infectée est redéposé sur une boîte de cellules BT. Le reste de la suspension cellulaire est conservé à -80°C en tube de 5 ml.

La souche W2 a ainsi subi trois passages sur cultures cellulaires BT. Un effet cytopathique caractéristique du VRS a été observé lors du deuxième passage sur les cellules BT. Le virus a alors été identifié par immunocytochimie sur les cellules BT fixées à l'acétone.

I-2-2. Titrage viral

A partir d'une suspension virale de 100 µl, des dilutions au dixième sont réalisées, les tubes contenant chacun initialement 900 µl de MEM sans sérum. Ces dilutions sont ensuite déposées sur une plaque de 24 puits à raison de 100 µl par puits et 4 puits par dilution. Cette plaque est incubée 2 heures à 37°C puis le surnageant est enlevé. Un ml de la suspension de chaque puits est déposée dans un milieu contenant 3 % de SVF puis incubé à 37°C sous CO₂ pendant 5 jours.

I-2-3. Clonage biologique

Le clonage biologique a été réalisé à partir du troisième passage de la souche W2 sur les cultures cellulaires BT. Après décongélation, des dilutions virales ont été effectuées avec la suspension virale afin de pouvoir isoler un clone par puits. Le clone est ensuite récupéré pour être à nouveau cloné. Trois clonages successifs sont ainsi réalisés, et trois étapes sont nécessaires pour chacun d'entre eux :

- 1^{re} étape : dilution de deux en deux de 10^3 à 0.65 UFP / ml et infection sur deux plaques de 24 puits. Après cinq jours de culture sous 5 % de CO_2 et $37^\circ C$, une des deux plaques est fixée puis colorée par immunocytochimie pour visualiser les foyers infectieux.
- 2^{ème} étape : sur la deuxième plaque, les puits de dilution inférieure à la dilution ayant donné une UFP par immunocytochimie sont « décrochés » et une nouvelle plaque est infectée avec un clone par puits. Le virus a été ensuite amplifié sur cellules BT pendant 5 jours.
- 3^{ème} étape : les clones positifs sont décrochés et dilués de la même façon qu'à la première étape. Une nouvelle étape de clonage est alors recommencée.

L'ensemble des clones obtenus aux différents passages a été conservé à $-80^\circ C$.

I-3. Technique d'immunocytochimie

Les cultures virales sont d'abord fixées à l'acétone à 95 % pendant 20 min à $-20^\circ C$ sur une plaque de 24 puits; elles peuvent ainsi être directement révélées par immunocytochimie ou conservées à $-20^\circ C$ pour quelques jours. L'anticorps primaire (anticorps anti-F du VRS, Argène, pré-dilués au 1/100^e, incubés 30 min à $37^\circ C$) est déposé sur la plaque à la dose de 200 μl par puits.

A la fin de l'incubation, les anticorps monoclonaux sont éliminés et les puits sont rincés deux fois au PBS, puis remplis à nouveau de PBS pendant une minute.

Ensuite, 200 μl de conjugué anti-Ig G de souris marqué à la peroxydase sont distribués dans chaque puits, la plaque est alors incubée 30 min à $37^\circ C$ dans l'étuve. Après l'incubation, la plaque est lavée comme précédemment puis 200 μl par puits du substrat AEC (AminoEthylCarbazole, Argène) est distribué. La plaque est incubée 10 min à température ambiante et l'évolution de la coloration est surveillée au microscope. Le substrat AEC est

ensuite éliminé et les puits sont rincés deux fois au PBS. Les plaques sont lues au microscope après avoir remis du PBS dans les puits.

I-4. Expérimentation animale

L'expérimentation animale a consisté à infecter quatre veaux de trois mois de race Prim'Holstein, préalablement testés indemne de VRSB, de BHV-1 et de BVDV par sérologie. La souche d'inoculation, nommée inoculum, est la souche virale W2 clonée (8D8C3C) et amplifiée trois fois sur culture cellulaire BT. Son titre était de $2,3 \cdot 10^6$ UFP / mL.

L'infection de l'appareil respiratoire des veaux a été réalisé au moyen de particules virales nébulisées (grâce au nébulisateur DeVilBiss Ultra-Neb 99, Sunrise Medical, avec une source de nébulisation à quartz), et d'un masque adapté aux veaux.



Figure 9 : Matériel d'inoculation (nébulisateur DeVillbiss UltraNeb 99 et masque d'inoculation).

Les animaux sont isolés et maintenus. Le masque est alors appliqué sur la tête de l'animal et branché au nébulisateur. La nébulisation dure 10 à 20 minutes et 10 ml contenant 10^7 UFP / ml de virus sont ainsi nébulisés. Des filtres sont ajoutés aux sorties d'air des masques.

Ce protocole ne provoque aucun stress supplémentaire à l'animal qui tolère facilement le port du masque pendant le temps d'inoculation. Deux veaux nébulisés avec du milieu de culture sans virus ont servi de veaux témoins.

Des examens cliniques sont réalisés deux fois par jour de J-3 jusqu'au jour de l'euthanasie. Les paramètres évalués sont: température, fréquence respiratoire, fréquence cardiaque, abattement, toux, jetage, bruits respiratoires.

Des écouvillons nasaux sont prélevés tous les jours dans chaque narine des quatre veaux de J-1 au jour de l'euthanasie. Ils sont transmis sous couvert froid dans l'heure au laboratoire.

Des prises de sang sont réalisées à J-14, J-7 puis tous les deux jours de J0 au jour de l'euthanasie.

Un test commercial immunoenzymatique (test Pack Abbott RSV de la société Abbott) a été réalisé chaque jour sur les écouvillons nasaux dans les deux heures suivant le prélèvement.

I-5. RT- PCR

La RT-PCR a été réalisée à partir des écouvillons nasaux, des lavages broncho-alvéolaires, des infections virales sur cultures cellulaires BT. Les échantillons sont repris dans un tampon de lyse (100 µl), puis l'ARN est extrait selon le protocole QIAGEN RNeasy. La solution récupérée, contenant de l'ARN total, est vortexée pendant une minute puis conservée à -80°C. Les amorces sont reçues lyophilisées et quantifiées en nmoles. Une solution mère à 100 µM est obtenue en rajoutant 10 µl d'eau depc par nmol. Cette solution mère est répartie en tubes 500 µl, à doses de 20 µl par tube puis stockée au congélateur à -80°C. Une solution d'amorce à 10 µM est ensuite préparée à partir de la solution mère, puis une solution d'amorce à 2 µM (10 µl à 10 µM + 40µl d'eau depc).

I-5-1. Phase de reverse transcription

9 µl d'ARN total est mélangé à 1 µl d'amorce N2P1 (5' ATG GCT CTC AGC AAG GTC A 3') à 2 µM sous les conditions requises. Cette amorce se situe en position 1144 sur le génome du VRSB, elle se trouve donc dans le gène de la protéine N. Ce mélange est incubé 10 min à 68°C (l'amorce se fixe alors sur l'ARN linéarisé) puis déposé dans la glace. Les tubes sont

rapidement centrifugés pour regrouper le liquide en fond de tube puis mis en attente dans la glace sous PSM, ouverts.

Un mélange est préparé à partir de :

4 µl de PCR Buffer 5X (250 mM TrisHCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂),

2 µl de DTT 0.1M,

4 µl de dNTP 10 mM (Perkin Elmer).

Ce mélange peut être stocké à 4°C et 1 µl de Rnasine et 1 µl de superscript (Enzyme Reverse Transcriptase, In Vitrogen) y sont rajoutés au dernier moment. 12 µl de ce mélange complet est rajouté par tube d'ARN.

Les tubes sont incubés 50 min à 42°C, phase pendant laquelle s'effectue la polymérisation, puis 15 min à 70°C, ce qui induit la destruction de l'enzyme.

Le cDNA obtenu est utilisable immédiatement ou congelé à -20°C.

I-5-2. Phase d'amplification

Une PCR sur le gène G a ensuite été réalisée.

Les amorces utilisées sont :

Amorce G1 : 5' CAG ATG TTG GGG CAA ATA CAA G 3'

Amorce G2 : 5' TGA TAT TAT ATG GAG GTG TGT TGT TAG 3'

L'amorce G1 est positionnée en 4682 sur le génome viral et l'amorce G2 en 5501, le fragment attendu après cette PCR est donc de 819 paires de bases. C'est une amplification spécifique du gène codant pour G.

Préparation du mélange réactionnel pour 50 µl d'échantillon:

35 µl d'eau,

5 µl de tampon 10X (contenant 1.5 mM de MgSO₄),

1 µl de dNTP 50X (contenant 200 µM de chaque dNTP),

1.5 µl d'amorce G1 (soit 300 nM final),

1.5 µl d'amorce G4 (soit 300 nM final),

1 µl d'enzyme ThermalAce (InVitrogen),

5 µl de cDNA.

La polymérase utilisée pour le RT-PCR est la ThermalAce polymérase (In Vitrogen) qui est dotée d'une activité correctrice dans le sens 3' → 5'. C'est une polymérase à haute fidélité qui limite le nombre d'erreurs de l'enzyme de copie. Les conditions de la PCR sont les suivantes: 95°C pendant 3 min, puis 35 cycles : 95°C pendant 30s, 58°C pendant 30s, 72°C pendant 45s, et enfin 72°C pendant 7 min.

I-5-3. Migration sur gel

Les produits d'amplification sont ensuite analysés par une migration sur gel d'agarose. Pour cela, deux gels d'agarose à 2 % sont préparés avec 2 g d'agarose et 100 ml de tampon de migration 1X (tampon TAE ou trisacétate EDTA) puis 10 µl de Bromure d'éthydiu (BET) à 0.5 mg/ml. Cet ajout préalable de BET permet de détecter après migration les bandes d'ADN sous lumière UV car le BET est un agent intercalant qui présente ainsi une fluorescence orangée sous une telle lumière.

Huit µl de chaque échantillon obtenu après cette PCR sont mélangés à 2 µl de bleu de bromophénol (X5), qui permet de suivre le front de migration, puis déposés dans chaque puits. Un puits est réservé pour le marqueur de taille. La migration se fait sous 100 volts pendant environ 30 min, puis la visualisation des bandes s'effectue sous une table à UV.

I-6. Clonage moléculaire

Les produits de la PRC subissent ensuite un clonage moléculaire.

Les produits d'amplification du gène G des différents échantillons ont donc été clonés dans le plasmide pCR4-TOPO selon les directives du kit ZeroBlunt TopoPCR Cloning Kit for Sequencing (InVitrogen).

Brièvement, après ligation des produits amplifiés, ils sont transformés dans des bactéries TOP10. Les bactéries sont alors amplifiées à 37°C pendant 1 heure puisensemencées sur boîtes de gélose LB + kanamycine + ampicilline.

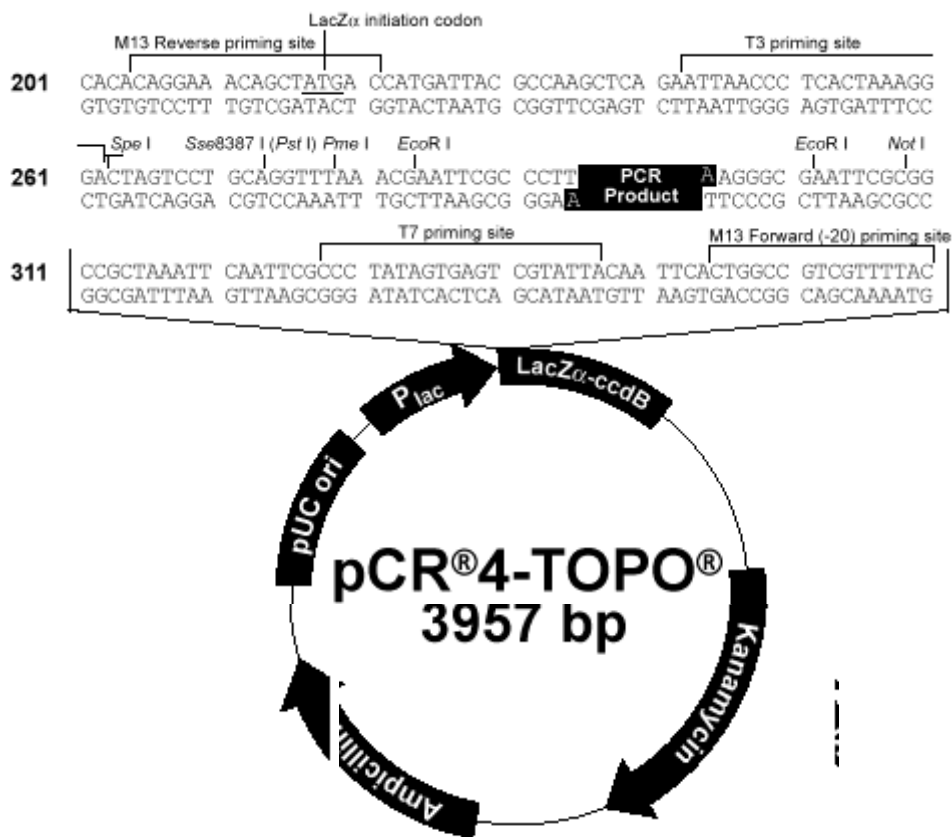


Figure 10: Schéma représentant le plasmide utilisé pCR4-TOPO et ses amorces (In Vitrogen).

Les colonies bactériennes, qui contiennent l'insert utilisé, sont conservées à +4°C. Des cultures dans des bouillons sont réalisées pour une conservation à -80°C dans 15% de glycérol.

I-7. Extraction ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait des bactéries par lyse alcaline et purification sur matrice selon le protocole nommé QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol (QIAGEN).

La présence de l'insert G dans le plasmide a été réalisée par digestion par l'enzyme EcoRI (InVitrogen). Elle permet d'extraire du plasmide un fragment d'environ 900 paires de bases, contenant le fragment amplifié plus une vingtaine de bases de chaque côté de ce fragment.

Un mélange constitué de 5 µl d'eau, 1 µl du tampon enzyme 3, 3 µl de l'échantillon contenant l'ADN extrait des plasmides, et 1 µl d'enzyme est incubé à 37°C pendant 2 heures. La réaction est arrêtée dans le bleu de migration. Les échantillons sont déposés dans un gel d'agarose à 1% en tampon de migration TAE. La migration et la visualisation des bandes se font de la même façon que pour la RT-PCR.

I-8. Séquençage

Les amorces plasmidiques ont été utilisées pour le séquençage des clones viraux sélectionnés. Ces séquences ont été obtenues selon une technique haut débit par séquençage automatique sur Abiprism. Pour cela, les clones sélectionnés ont été distribués sous forme de bactéries transformées sur plaques de 96 puits puis envoyés à la société Génome Express.

Les résultats ont été fournis sous forme de séquences brutes et chromatogramme. L'analyse des séquences a été effectuée aux moyens des logiciels suivants : SeqMan 4 (DNASTAR, Applied Biosystem) et Clustalw (Infobiogen).

II- Résultats

II-1. Stratégie

La stratégie expérimentale a été pour ces travaux d'obtenir cinq populations virales différentes du VRSB à partir d'une souche initiale prélevée sur le terrain. Cette stratégie est résumée dans la figure 11.

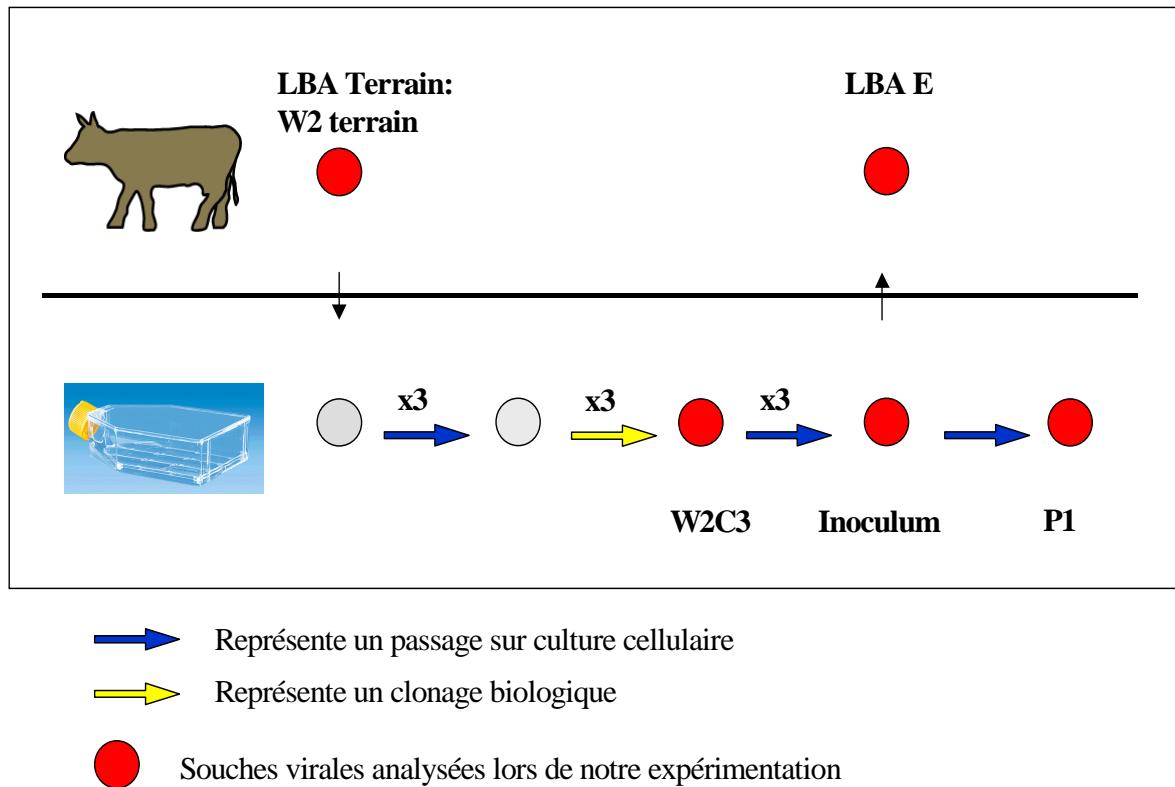


Figure 11: Schéma expérimental résumant les méthodes d'obtention des différentes populations virales analysées dans cette étude.

La souche W2 a été récupérée sur le terrain et conservée au laboratoire sans passage sur culture cellulaire (souche dite W2 Terrain). Un aliquot a été amplifié par trois passages successifs sur cultures cellulaires. Trois clonages successifs ont ensuite été réalisés par la technique des dilutions lentes. Un clone 8D a été sélectionné au premier passage, puis un clone 8D 8C au second et enfin quatre clones au troisième passage : 1A, 6A, 3B1 et 3C. L'ensemble de ces clones obtenus aux différents passages a été multiplié sur cultures cellulaires BT et conservés à -80°C . Parmi les quatre clones obtenus après le troisième passage, le clone W2 8D 8C 3C a été sélectionné pour être utilisé dans la suite de l'expérimentation, clone appelé « W2 3C ». Ce clone a ensuite été amplifié par trois passages successifs sur cellules pour obtenir un titre suffisant pour l'expérimentation animale ($2,3 \cdot 10^6$ UFP / ml). La suspension virale obtenue a été nommée « Inoculum ». Celle-ci a été inoculée aux veaux au jour 0 (J0). Les écouvillons nasaux réalisés chaque jour étaient analysés dans la

journée au laboratoire. Le veau nommé E a présenté un résultat positif sur test Abbott à J6 et J7 et a été euthanasié à J7. Un lavage bronchoalvéolaire (LBA) a été fait sur le poumon immédiatement après autopsie de l'animal. Cent cinquante ml de liquide de LBA ont été récupérés. Les trois autres veaux, nommé respectivement F, G et H, ont subi un LBA par endoscopie à J9 sous anesthésie générale et 60 à 70 ml de liquide ont été récupérés à chaque fois. Ces veaux ont été euthanasiés et autopsiés à J28, comme les veaux témoins.

Les techniques RT-PCR et Abbott ont montré que trois LBA (LBA E, LBA F et LBA G) sur quatre provenant des veaux E, F et G étaient positifs ou contenaient du VRSB. La suite des travaux ont essentiellement porté sur le LBA E. En parallèle, le clone « Inoculum » a été cultivé *in vitro* sur des cellules, la souche récupérée est nommée P1.

Les populations virales obtenues et sélectionnées ont été titrées pour la plupart:

- W2 Terrain a été titrée à 3.10^4 UFP / ml
- W2C3 : Non déterminé
- Inoculum : $2,3.10^6$ UFP / ml
- LBA E : $2,5.10^2$ UFP / ml
- P1 : Non déterminé

En résumé, cinq clones ont ainsi été obtenus et analysés à l'issue de cette expérimentation :

- la souche W2 recueillie sur le terrain,
- la souche W2C3, obtenue après clonage biologique de la souche W2,
- la souche Inoculum, obtenue après trois passages sur cultures cellulaires de la souche W2C3,
- la souche LBA E, récupérée dans le liquide de LBA du veau E,
- la souche P1, obtenue après un passage *in vitro* de la souche Inoculum.

II-2. Résultats du clonage moléculaire

Pour chaque souche virale analysée, cinq clonages moléculaires ont été réalisés à partir d'un ou plusieurs cDNA viraux. L'utilisation du kit ZeroBlunt TopoPCR Cloning Kit for Sequencing (InVitrogen) a permis d'obtenir un grand nombre de colonies bactériennes sur

boites LB + ATB. Trente clones bactériens ont alors été sélectionnés pour chaque population analysée. La vérification de l'insertion du gène G du VRSB dans le plasmide a été réalisée par extraction de l'ADN plasmidique de chaque clone, puis par digestion par l'enzyme EcoRI des clones bactériens. En général, plus de 99% des clones analysés se sont révélés positifs, c'est-à-dire contenant l'insert. Les clones positifs ont alors été envoyés au séquençage.

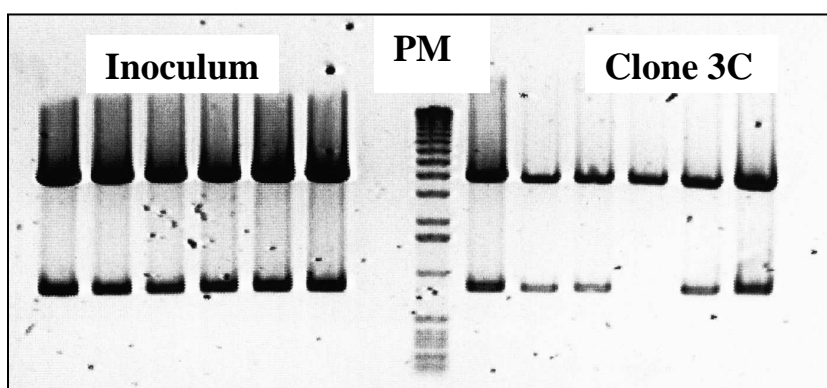


Figure 12: Photographie d'un gel d'électrophorèse. Digestion EcoRI de clones moléculaires provenant des isolats inoculum ou clone 3C. PM : marqueur de poids moléculaire

Différents témoins ont été utilisés pour établir la variabilité du VRSB :

- une souche provenant d'un clone cDNA infectieux passé deux fois en culture cellulaire. La séquence consensus a été analysée et un clonage moléculaire a été effectué sur cette souche.
- le gène N : c'est un gène considéré comme plus conservé que le gène G. La séquence consensus a été recherchée.
- le gène cellulaire codant pour la GAPDH. Un clonage moléculaire a été réalisé sur ce gène ainsi que l'analyse de la séquence consensus.

Pour chaque témoin, une RT-PCR a été réalisée à partir de l'ARN messenger correspondant, en utilisant des amorces spécifiques.

II-3. Résultats du séquençage

Le séquençage du gène G du VRSB a été réalisé :

- ◆ sur les séquences consensus de chaque population virale : dans ce cas, un séquençage est réalisé directement sur le produit de PCR du gène G. Les séquences consensus des clones W2 8D 8C 1A, 6A et 3B1 ont également été réalisées.

◆ sur les séquences de chaque clone moléculaire.

II-3-1. Les séquences consensus

La séquence consensus de la région codante pour la glycoprotéine G de la souche W2 a été comparée avec une souche de référence du VRSB (Numéro d'accès : NC 001989 ; Buchholz, et al., 1999).

ATGTCCAACCATAACCACCATCTTAAATTCAAGACATTAAGAGGGCTTGGAAAGCCTCA	60	0
.....T.....	60	1
AAATACTTCATAGTAGGATTATCATGTTTATATAAGTTCAATTTAAAATCCCTTGTCCAA	120	0
.....A.....	120	1
ACGGCTTTGACCACCTTAGCAATGATAACCTTGACATCACTCGTCATAACAGCCATTATT	180	0
.....T.....	180	1
TACATTAGTGTGGGAAATGCTAAAGCCAAGCCACATCCAAACCAACCATCCAACAAACA	240	0
.....	240	1
CAACAGCCCCAAAACCATAACCTCACCATTTTTTCACAGAGCACAACCTACAAATCAACTCAC	300	0
.....	300	1
ACATCAATTCAAAGCACCACACTGTCCCAACTACCAAACACAGACACCACTAGAGAAACT	360	0
.T.....C.....C...G....	360	1
ACATACAGTCACTCAATCAACGAAACCCAAAACAGAAAAATCAAAGCCAATCCACTCTA	420	0
...C..G.....C.	420	1
CCCGCCACCAGAAAACCACCAATTAACCCATCGGGAAGCAACCCCTGAAAACCACCAA	480	0
...T.....C.....C.....	480	1
GACCACAACAACCTCCCAAACACTCCCCTATGTGCCTTGCAGTACATGTGAAGGTAATCTT	540	0
.....C.....T.....C.....CC	540	1
GCTTGTTTATCACTCTGCCAAATCGGGCCGGAGAGAGCACCAAGCAGAGCCCCTACAATC	600	0
.....CC.....T.....T..CT.A..A..T..GT.....C.....	600	1
ACCCTCAAAAAGACTCCAAAACCCAAAACCACAAAAGCCAACCAAGACAACAATCCAC	660	0
.....T.....CA.....	660	1
CACAGAACCAGCCCTGAAGCCAAACTGCAACCCAAAACAACACGGCAGCTCCACAACAA	720	0
.....C.....C.....G.....	720	1
GGCATCCTCTCTTCACCAGAACACCACACAAATCAATCAACTACACAGATCTAA	774	0
.....A.....	774	1

Figure 13: Alignement de la séquence consensus nucléotidique de la souche W2 avec la souche de référence.

MSNHTHHLKFKTLKRAWKASKYFIVGLSCLYKFNLKSLVQTALTTLAMITLTSLVITAI I	60	0
.....I.....	60	1
YISVGNAAKAKPTSKPTIQQTQQPQNHTSPFFTEHNYKSTHTSIQSTTLSQLPNTD TTRET	120	0
.....I.....P.....G.	120	1
TYSHSINETQNRKIKSQSTLPATRKPPINPSGSNPPENHQDHNSQTLPYVPCSTCEGNL	180	0
.HG.....P.V.....P.....H.L.....P	180	1
ACLSLCQIGPERAPSRAPTITLKKTPKPKTTKKPTKTTIHHRTSPEAKLQPKNNTAAPQQ	240	0
.....S.S.S.....S.....T.....P.....	240	1
GILSSPEHHTNQSTTQI	257	0
.....K.....	257	1

Figure 14 : Alignement de la séquence consensus peptidique avec la souche de référence.

Toutes les séquences consensus ont été comparées et les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences au niveau de la séquence consensus des diverses populations virales utilisées lors de cette étude, à l'exception du clone W2 8D 8C 1A qui montre une mutation T 772 → C (mutation d'un codon stop en Q, glutamine), entraînant une élongation de cinq acides aminés dans la partie terminale.

II-3-2. Les séquences des clones moléculaires

▣ Les différentes mutations relevées :

L'analyse des séquences nucléotidiques de tous ces clones montre l'existence de mutations réparties sur le génome viral, qui sont pour la plupart des mutations ponctuelles.

Les tableaux 4 à 11 montrent les résultats obtenus. Les tableaux placés en annexes répertorient le nombre de mutations observées pour chaque clone analysé et séquencé en fonction du nombre de nucléotides analysés (cf. annexes 1 à 8). Les tableaux suivants répertorient chaque mutation observée lors du séquençage et sa conséquence au niveau nucléotidique et peptidique.

La population virale W2 Terrain :

Pour cette population virale, 27 clones ont été séquencés. Sur 19844 nucléotides analysés, 21 mutations ont été mises en évidence (cf. annexe 1). Les mutations observées sont énumérées dans le tableau 4.

Mutation au niveau nucléotidique	Mutation au niveau peptidique	Clone	Commentaires
T 021→C	-	41	
A 168→G	I 56→ M	34	
A 240→G	-	53	
G 246→A	-	57	
T 262→C	S 88→ P	56	
C 280→T	H 94→ Y	21	
A 384→G	-	53	
A 392→G	N 131→ K	55	parmi 4 A
C 393→G	N 131→ S	24	
C 462→G	N 154→ K	57	
C 467→-	Délétion	36	parmi 6 C
G 481→T	D 161→ Y	12	
A 491→G	N 164→ S	57	
T 580→C	S 194→ P	52	
C 585→T	-	45	
A 611→-	Délétion	56	parmi 5 A
C 672→-	Délétion	56	parmi 4 C
G 687→A	-	45	
G 709→A	A 237→ T	45	
C 758→T	S 253→ L	35	
T 772→C	Stop 258→ Q	42	STOP + 6 AA

Tableau 4: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale W2 Terrain.

La population virale W2 3C :

Pour cette population virale, 26 clones ont été séquencés. Sur 17227 nucléotides analysés, 17 mutations ont été mises en évidence (cf. annexe 2). Les mutations observées sont énumérées dans le tableau 5.

Mutation au niveau nucléotidique	Mutation au niveau peptidique	Clone	Commentaires
T 012→A	H 4→ Q	113	A5 → A6
C 047→T	A 16→ V	23	
G 055→A	A 19→ T	12	
G 205→A	A 69→ T	53	
G 279→A	-	113	
C 280→T	H 94→ Y	112	
C 282→T	-	27	
A 289→G	K 97→ E	24	
C 419→A	P 130→ Q	34	
A 498→T	Q 166→ H	33*	
C 505→T	P 169→ S	55*	
C 567→G	-	53*	
G 639→A	-	12	
C 640→T	P 214→ S	55*	
C 644→T	T 215→ I	110	
G 687→T	-	35	
C 692→T	P 231→ L	110	

Tableau 5: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale W2 3C.

La population Inoculum :

Pour cette population virale, 28 clones ont été séquencés. Sur 20777 nucléotides analysés, 16 mutations ont été mises en évidence (cf. annexe 3). Les mutations observées sont énumérées dans le tableau 6.

La population LBA E :

Pour cette population virale, 30 clones ont été séquencés. Sur 22159 nucléotides analysés, 20 mutations ont été mises en évidence (cf. annexe 4). Les mutations observées sont énumérées dans le tableau 7.

Mutation au niveau nucléotidique	Mutation au niveau peptidique	Clone	Commentaires
A 034→G	T 12→ A	55	parmi 5A
C 056→T	A 19→ V	44	
A 274→G	T 92→ A	32	
A 306→T	-	23	
G 314→T	S 105→ I	24	
A 329→-	délétion	56	
A 363→G	-	14	
C 388→T	Q 130→ STOP	54	
A 397→G	K 133→ E	23	
C 451→T	P 156→ S	27	
C 508→-	délétion	42	parmi 5C
C 519→G	C 173→ W	41	
G 589→A	A 197→ T	27	parmi 5C
C 590→T	-	46	
C 707→T	A 236→ V	45	
A 755→T	Q 252→ L	16	

Tableau 6: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale Inoculum.

Mutation au niveau nucléotidique	Mutation au niveau peptidique	Clone
G 042→T	K 14→ N	42
C 150→A	-	54
A 240→G	-	14
A 251→-	Délétion	16
G 279→A	-	11*
T 297→A	-	54
C 317→T	T 107→ I	45
A 346→G	T 116→ A	13
A 385→C	T 129→ P	34*
C 423→T	-	52
A 433→G	K 145→ E	53*
C 467→T	P 156→ L	45*
C 528→G	C 176→ W	54*
T 576→C	-	41*
A 609→G	-	15*
G 665→C	R 222→ T	16
A 694→T	K 232→ STOP	32
C 699→A	N 233→ K	34
C 715→T	Q 239→ STOP	11*
C 747→A	H 249→ Q	31

Tableau 7: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale LBA E.

La population virale P1 :

Pour cette population virale, 28 clones ont été séquencés. Sur 20517 nucléotides analysés, 14 mutations ont été mises en évidence (cf. annexe 5). Les mutations observées sont énumérées dans le tableau 8.

Mutation au niveau nucléotidique	Mutation au niveau peptidique	Clone	Commentaires
T 085→C	C 29→ L	43	Délétion de 4 A
A 105→-	délétion	21	
T 162→C	-	52	
A 394→G	R 132→ G	32	délétion de 6C
C 467→-	délétion	12 et 13	
T 568→C	S 90→ P	22	
A 595→T	T 199→ S	14	
C 603→A	-	33*	
A 631→G	T 211→ A	25	
C 640→T	P 214→ S	16	
C 645→T	-	37	
C 672→T	-	32	parmi 4C
T 772→C	STOP 258→ Q	12	STOP + 6aa

Tableau 8: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale P1.

Les population témoins : la souche provenant d'un cDNA infectieux

Pour cette population virale, 29 clones du gène G ont été séquencés. Sur 22188 nucléotides analysés, 18 mutations ont été mises en évidence (cf. annexe 6). Les mutations observées sont énumérées dans le tableau 9.

Mutation au niveau nucléotidique	Mutation au niveau peptidique	Clone	Commentaires
A 105 → -	délétion	B4	délétion de 4A
G 115→A	V 39→I	F4	
A 237→C	Q 79→H	F2	
T 268→C	F 90→L	G4	parmi 5T
A 319→T	T 107→S	F3	
C 334→G	P 112→A	A1	
A 389→C	Q 130→P	A1	parmi 4A
G 407→A	S 136→N	B3	
C 408→T	-	F4	
A 561→G	-	B3	parmi 4A
C 564→T	-	C1	
- 612→A	insertion	B4	insertion 5A
A 637→G	-	F4	parmi 5A
C 685→T	-	F2	
C 699→T	-	F1	
C 710→A	A 237→D	D2	
C 712→T	P 238→S	C1	

Tableau 9: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène G des divers clones de la population virale provenant d'un cDNA infectieux.

D'autre part, pour cette même population virale, 29 clones du gène N ont été séquencés. Sur 20445 nucléotides analysés, 2 mutations ont été mises en évidence (cf. annexe 7).

Mutation au niveau nucléotidique	Mutation au niveau peptidique	Clone	Commentaires
T 355→C	-	D9	
C 557→T	A 186→V	D9	

Tableau 10: Les différentes mutations observées dans la séquence nucléotidique du gène N des divers clones de la population virale provenant d'un cDNA infectieux.

Les populations témoins : le gène N de la Population Inoculum

Pour cette population virale, 32 clones ont été séquencés. Sur 21956 nucléotides analysés, 15 mutations ont été mises en évidence (cf. annexe 8).

Mutation au niveau nucléotidique	Mutation au niveau peptidique	Clone	Commentaires
A 165→C	E 55→ D	E8	
A 206→G	Y 69→ C	E6	
T 210→C	-	D6	
G 225→A	-	D7, C7	parmi 4G
A 226→G	R 76→ G	D5	4G → 5G
G 260→A	G 87→ D	A7	
G 280→A	G 94→ R	F5	parmi 4G
G 334→A	E 112→ K	B6	
A 429→G	-	E5	3G → 4G
G 485→A	C 162→ Y	E5	
C 491→T	A 164→ V	G6	
C 491→A	A 164→ D	B6	
G 782→-	deletion	C8	Parmi 4G
C 836→A	A 279→ E	B7	

Tableau 11: Relevé des différentes mutations de la séquence nucléotidique du gène N des divers clones de la population virale Inoculum.

Toutes ces mutations sont résumées dans le tableau 12.

Population virale	Nombre de mutations	Substitutions		Délétions
		Silencieuses	Non silencieuses	
W2	21	6	12	3
W2 3C	17	5	12	0
Inoculum	16	3	11	2
P1	14	4	7	3
LBA E	20	7	12	1

Tableau 12 : Récapitulatif des différentes mutations rencontrées lors de l'analyse des séquences nucléotidiques des nombreux clones moléculaires de VRSB.

Des mutations diverses interviennent au niveau nucléotidique. Il y a en effet de nombreuses mutations de substitution qui s'avèrent parfois synonymes, ou silencieuses, mais plus de la moitié sont plutôt des mutations non synonymes, ou non silencieuses, c'est-à-dire qu'elles induisent un changement de codons donc la synthèse d'un acide aminé différent. Parmi ces mutations de substitutions non synonymes, la substitution d'un nucléotide en un autre engendrant le changement de l'acide aminé en un codon stop, ou vice et versa, apparaît cinq fois dans les séquences nucléotidiques analysées dans nos travaux : pour le clone 42 de la population W2 Terrain en position 772 (STOP → Q 258) ce qui entraîne la synthèse d'une protéine G allongée de 6 acides aminés ; pour le clone 54 de la population virale Inoculum en position 388 (Q 130→ STOP) dont résulte la synthèse d'une protéine G écourtée de 127 acides aminés; pour le clone 11 de la population LBA E en position 715 (Q 239→ STOP), ce qui entraîne également la synthèse d'une protéine écourtée de 18 acides aminés; pour le clone 32 de cette même population en position 694 (K 232→ STOP), ce qui entraîne encore une protéine écourtée cette fois de 25 acides aminés; pour le clone 12 de la population virale P1 en position 772 (STOP → Q 258), avec la synthèse d'une protéine G allongée de 6 acides aminés. Quelques mutations de délétions sont également observées mais en faible quantité (11% environ).

▣ Localisation préférentielle de ces mutations sur le gène G :

Les mutations semblent se positionner préférentiellement dans deux régions essentiellement. En effet, pratiquement 80% des mutations observées ici se situent entre les positions 240 et 467 ainsi qu'entre les positions 567 et 709 (cf. tableaux 4 à 11).

▣ Fréquences de mutations :

A partir du nombre de mutations relevées et le nombre de nucléotides séquencés, les fréquences de mutations respectives des cinq populations virales analysées dans notre étude ainsi que celle de la souche provenant d'un cDNA infectieux cloné dans un plasmide ont pu être calculées, en divisant le nombre de mutations par le nombre de nucléotides séquencés, et sont récapitulées dans le tableau 13.

Population virale	Protéine G	Protéine N
Souche W2 (terrain)	$1,06.10^{-3}$	
Souche W2 3C	$9,87.10^{-4}$	
Souche Inoculum	$7,70.10^{-4}$	$6,38.10^{-4}$
Souche P1	$6,33.10^{-4}$	
Souche LBA E	$9,0.10^{-4}$	
Souche provenant du cDNA infectieux	$8,11.10^{-4}$	$9,78.10^{-5}$
Gène cellulaire GAPDH	$4.71.10^{-4}$	

Tableau 13: Fréquence de mutations relevées par l'analyse des séquences des différents clones obtenus.

IV- Discussion

L'hétérogénéité génétique du VRSB a été étudiée à partir de cinq populations virales dérivées d'un virus (souche W2) isolé directement chez un veau atteint de symptômes respiratoires.

Les ARN viraux extraits de ces cinq populations ont été amplifiés par RT-PCR et clonés dans des plasmides d'E. coli. Pour chaque population, un nombre élevé (> 25) de clones moléculaires a été analysé par séquençage nucléotidique afin de calculer le nombre de mutations différentes. Pour les cinq populations analysées, une fréquence de mutation de l'ordre de 10^{-3} mutations par nucléotide a été mesurée au niveau de la région codante de la glycoprotéine G. Les virus à ARN ont des fréquences de mutations généralement comprises entre 10^{-6} et 10^{-3} mutations par nucléotides (van der Werf, 2002). La fréquence de mutation du VRSB au niveau du gène G étant de l'ordre de 10^{-3} , cela montre que ce virus est hautement variable. Toutefois, notre calcul de la fréquence de mutation du VRSB porte sur le gène G,

gène reconnu comme l'un des plus variables. D'autre part, lors de l'expérimentation, l'utilisation de la technique PCR introduit un biais dû à la polymérase et au nombre de cycles réalisés. En effet, malgré le fait que l'enzyme utilisée est une polymérase à haute fidélité, le taux d'erreur de la ThermalAce (InVitrogen) est de 6.10^{-5} mésincorporations / paire de base, elle ne fait que limiter le nombre d'erreurs lors de la copie et un certain taux de mutation peut alors persister. De même, plus le nombre de cycles est élevé, plus le nombre de mutations risque d'augmenter parallèlement. Un contrôle a alors été effectué afin d'écarter les erreurs dues à la technique de la PCR. Il consiste en l'amplification de l'ARN messager (ARNm) d'un gène cellulaire nommé GAPDH. Ce gène ne mute pas et son expression en ARNm est stable au niveau des cellules. La fréquence de mutation observée est de $4,71.10^{-4}$. Cette variation des ARNm GAPDH est probablement due aux erreurs liées aux étapes de RT et de PCR. Si l'on soustrait cette valeur à la fréquence de mutation du VRSB, les fréquences de mutation du virus varient entre 2 et 4.10^{-4} . Ces valeurs correspondent aux valeurs moyennes de mutations des virus à ARN. Cette étude montre donc que le VRSB existe sous forme de populations virales hautement hétérogènes.

Le clonage biologique du VRSB est une étape délicate dans la mesure où ce virus est étroitement lié aux cellules et forme des syncytia. Ainsi, lors du prélèvement d'une plage de lyse, il est impossible d'être certain d'avoir recueilli un unique clone viral. C'est pourquoi, afin de confirmer la variabilité du VRSB à partir d'un clone unique, un deuxième contrôle a été réalisé en utilisant un cDNA infectieux du VRSB cloné dans un plasmide. Après transfection du clone infectieux, récupération du virus puis deux passages en cultures cellulaires, la fréquence de mutation obtenue à partir de ce cDNA est de l'ordre de 10^{-3} pour le gène G et 10^{-4} pour le gène N. Ces fréquences sont identiques à celles observées pour les différents isolats de la souche W2.

Cette étude expérimentale a donc montré que le VRSB évolue sous formes de quasi-espèces. Les conséquences biologiques de cette variabilité n'ont, jusqu'à présent, jamais été étudiées. Concernant le VRSH, il est fort probable que ce virus soit aussi hautement variable. Les recherches axées sur les nouvelles techniques de vaccination portent actuellement sur le développement de vaccins sous-unitaires constitué de glycoprotéine G recombinante voire même de peptides de synthèse de zones épitopiques du gène G. Vu les fréquences de mutations observées pour le VRSB, le risque de sélectionner rapidement des mutants d'échappement aux vaccins est très important. Le développement de tels vaccins ne

représente donc pas une solution adéquate à la lutte contre l'infection par le VRS. La vaccination à l'aide de vaccins à agents vivants, inactivés ou modifiés dans lesquels coexistent divers mutants viraux reste probablement le meilleur moyen pour éviter l'échappement viral à la réponse immune.

De nombreux virus à ARN évoluent sous forme de quasiespèces et développent ainsi des variants phénotypiques pouvant être sélectionnés comme réponse à des changements du milieu. Différentes conséquences biologiques liées à ce pouvoir d'adaptation ont été identifiées (Domingo, 1999a) telles que l'échappement aux anticorps neutralisants, l'échappement aux cellules cytotoxiques (CTL), la résistance aux agents antiviraux, les changements de tropisme cellulaire et de virulence, la réversion de l'atténuation de la virulence, la variation dans la capacité d'induction d'interféron et la persistance virale. De nouvelles études devront être menées pour voir si de telles implications biologiques existent pour le VRSB.

ANNEXES

Les tableaux suivants répertorient le nombre de mutations observées pour chaque clone analysé et séquencé en fonction du nombre de nucléotides analysés. Ce nombre est variable selon les clones car nous ne prenons pas en considération les nucléotides ambigus, notés N, dans les résultats du séquençage. Le nombre de mutations est calculé par rapport à la séquence consensus de la population virale concernée.

Annexe 1: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale W2 Terrain.

Clone	Nombre de nucléotides analysés	Nombre de mutations observées
12	774	1
13	774	
14	507	
15	774	
16	774	
21	733	1
22	733	
23	733	
24	600	1
25	679	
28	687	
32	774	
34	774	1
35	774	1
36	774	1
41	774	1
42	774	1
43	774	
44	507	
45	774	3
46	774	
51	774	
52	774	1
53	733	2
55	774	1
56	774	3
57	774	3
27	19844	21

Annexe 2: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale W2 3C.

Clone	Nombre de nucléotides analysés	Nombre de mutations observées
12	681	2
16	697	
23	580	1
24	580	1
25	746	
26	750	
27	740	1
31	548	
32	583	
33	774	1
34	563	1
35	480	1
36	559	
41	556	
42	566	
43	562	
45	774	
46	604	
51	774	
52	774	
53	774	2
54	774	
55	774	2
110	560	2
112	736	1
113	718	2
26	17227	17

Annexe 3 : Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale Inoculum.

Clone	Nombre de nucléotides analysés	Nombre de mutations observées
11	725	
14	719	1
16	774	1
17	774	
18	740	
21	774	
23	762	2
24	735	1
25	574	
27	774	2
31	764	
32	685	1
33	762	
34	767	
35	759	
36	772	
41	764	1
42	769	1
43	755	
44	740	1
45	759	1
46	769	1
51	759	
52	562	
53	765	
54	762	1
55	774	1
56	739	1
28	20777	16

Annexe 4 : Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale LBA E.

Clone	Nombre de nucléotides analysés	Nombre de mutations
11	774	2
12	774	
13	774	1
14	773	1
15	774	1
16	768	2
21	774	
22	774	
23	774	
24	774	
25	774	
26	774	
31	506	1
32	506	1
33	774	
34	774	2
35	774	
36	774	
41	774	1
42	774	1
43	774	
44	506	
45	774	2
46	774	
51	774	
52	524	1
53	774	1
54	774	3
55	774	
56	774	
30	22159	20

Annexe 5 : Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale P1.

Clone	Nombre de nucléotides analysés	Nombre de mutations observées
12	774	2
13	690	1
14	711	1
15	774	
16	714	1
17	774	
21	774	1
22	693	1
23	585	
24	722	
25	683	1
31	774	
32	529	2
33	774	1
36	774	
37	774	1
41	700	
42	748	
43	745	1
44	744	
45	744	
46	726	
51	743	
52	774	1
54	774	
55	752	
56	774	
57	774	
28	20517	14

Annexe 6: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène G pour les clones analysés de la population virale provenant d'un cDNA infectieux.

Clone	Nombre de nucléotides analysés	Nombre de mutations observées
D3	774	
E4	774	
B2	774	
E2	774	
B3	774	2
G3	773	
G4	774	1
F4	774	3
A1	774	2
A4	774	
D4	774	
C2	774	
B4	775	2
E3	774	
B1	774	
A2	516	
C1	774	2
E1	774	
F1	774	1
G2	774	
F3	774	1
H2	774	
C4	774	
G1	774	
D2	774	1
H3	774	
H4	774	
F2	774	2
C3	774	
29	22188	17

Annexe 7: Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène N pour les clones analysés de la population virale provenant d'un cDNA infectieux.

Clone	Nombre de nucléotides analysés	Nombre de mutations observées
A10	705	
A12	705	
A9	705	
B10	705	
B11	705	
B12	705	
B9	705	
C10	705	
C11	705	
C9	705	
D10	705	
D11	705	
D12	705	
D9	705	2
E10	705	
E12	705	
E9	705	
F10	705	
F11	705	
F12	705	
F9	705	
G10	705	
G11	705	
G12	705	
G9	705	
H10	705	
H11	705	
H12	705	
H9	705	
9	20445	2

Annexe 8 : Nombre de mutations observées par séquence nucléotidique du gène N pour les clones analysés de la population virale Inoculum.

Clone	Nombre de nucléotides analysés	Nombre de mutations observées
A5	704	
A6	704	
A7	704	1
A8	704	
B5	704	
B6	704	2
B7	704	1
B8	704	
C5	704	
C6	704	
C7	132	1
C8	704	1
D5	704	1
D6	704	1
D7	704	1
D8	704	
E5	704	2
E6	704	1
E7	704	
E8	704	1
F5	704	1
F6	704	
F7	704	
F8	704	
G5	704	
G6	704	1
G7	704	
G8	704	
H5	704	
H6	704	
H7	704	
H8	704	
32	21956	15

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADAIR, B. M. and MCNULTY, M. S.

Effect of "in vitro" exposure of bovine alveolar macrophages to different strains of bovine respiratory syncytial virus.

Vet Immunol Immunopathol, 1992, **30**, 2-3, 193-206.

ALWAN, W. H. and OPENSHAW, P. J.

Distinct patterns of T- and B-cell immunity to respiratory syncytial virus induced by individual viral proteins.

Vaccine, 1993, **11**, 4, 431-7.

ANDERSON, L. J., HENDRY, R. M., PIERIK, L. T., TSOU, C. and MCINTOSH, K.

Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus.

J Infect Dis, 1991, **163**, 4, 687-92.

ANDERSON, K., KING, A. M., LERCH, R. A. and WERTZ, G. W.

Polylactosaminoglycan modification of the respiratory syncytial virus small hydrophobic (SH) protein: a conserved feature among human and bovine respiratory syncytial viruses.

Virology, 1992, **191**, 1, 417-30.

ARSLANAGIC, E., MATSUMOTO, M., SUZUKI, K., NEROME, K., TSUTSUMI, H. and HUNG, T.

Maturation of respiratory syncytial virus within HEp-2 cell cytoplasm.

Acta Virol, 1996, **40**, 4, 209-14.

ATREYA, P. L., PEEPLES, M. E. and COLLINS, P. L.

The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication.

J Virol, 1998, **72**, 2, 1452-61.

BAKER, J. C., AMES, T. R. and MARKHAM, R. J.

Serologic studies of bovine respiratory syncytial virus in Minnesota cattle.

Am J Vet Res, 1985, **46**, 4, 891-2.

BAKER, J. C., AMES, T. R. and MARKHAM, R. J.

Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd.

Am J Vet Res, 1986a, **47**, 2, 240-5.

BAKER, J. C., AMES, T. R. and WERDIN, R. E.

Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a beef herd.

Am J Vet Res, 1986b, **47**, 2, 246-53.

BARIK, S.

Transcription of human respiratory syncytial virus genome RNA in vitro: requirement of cellular factor(s).

J Virol, 1992, **66**, 11, 6813-8.

BASTIEN, N., TAYLOR, G., THOMAS, L. H., WYLD, S. G., SIMARD, C. and TRUDEL, M.

Immunization with a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV-associated pneumonia in the natural host. *Vaccine*, 1997, **15**, 12-13, 1385-90.

BELANGER, F., BERTHIAUME, L., ALAIN, R., LUSSIER, G. and TRUDEL, M.

Electron microscopic evidence for bridges between bovine respiratory syncytial virus particles.

J Gen Virol, 1988, **69**, Pt 6, 1421-4.

BELKNAP, E. B.

Recognizing the clinical signs of BRSV infection.

Vet Med, 1993, 886-887.

BERMINGHAM, A. and COLLINS, P. L.

The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, **96**, 20, 11259-64.

BRYSON, D. G., MCFERRAN, J. B., BALL, H. J. and NEILL, S. D.

Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves--(1) Epidemiological, clinical and microbiological findings.

Vet Rec, 1978a, **103**, 22, 485-9.

BRYSON, D. G., MCFERRAN, J. B., BALL, H. J. and NEILL, S. D.

Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves--(2) Pathological and microbiological findings.

Vet Rec, 1978b, **103**, 23, 503-9.

BRYSON, D. G., M. S. MCNULTY, ET AL.

Respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: clinical and pathologic findings.

Am J Vet Res, 1983, **44**, 9, 1648-55.

BUCHHOLZ, U. J., FINKE, S. and CONZELMANN, K. K.

Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter.

J Virol, 1999, **73**, 1, 251-9.

CASTELMAN, W. L., J. C. LAY, ET AL.

Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves: light microscopic lesions, microbiology, and studies on lavaged lung cells.

Am J Vet Res, 1985a, **46**, 3, 547-53.

CASTELMAN, W. L., S. K. CHANDLER, ET AL.

Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves: ultrastructural respiratory lesions.

Am J Vet Res, 1985b, **46**, 3, 554-60.

CHANOCK, RM., FINBERG, L.

Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). Epidemiological aspects of infection in infants and young children.

Am. J. Hyg., 1957, **66**, 291-300.

COLLINS, P. L. and WERTZ, G. W.

cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, **80**, 11, 3208-12.

COLLINS, P. L., HUANG, Y. T. and WERTZ, G. W.

Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1984, **81**, 24, 7683-7.

COLLINS, P. L., OLMSTED, R. A., SPRIGGS, M. K., JOHNSON, P. R. and BUCKLER-WHITE, A. J.

Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus.

Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, **84**, 15, 5134-8.

COLLINS, J. K., R. JENSEN, ET AL.

Association of bovine respiratory syncytial virus with atypical interstitial pneumonia in feedlot cattle.

Am J Vet Res, 1988a, **49**, 7, 1045-9

COLLINS, J. K., TEEGARDEN, R. M., MACVEAN, D. W., SALMAN, SMITH, G. H. and FRANK, G. R.

Prevalence and specificity of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in sera from feedlot and range cattle.

Am J Vet Res, 1988b, **49**, 8, 1316-9.

COLLINS, P. L., HILL, M. G. and JOHNSON, P. R.

The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro.

J Gen Virol, 1990, **71**, Pt 12, 3015-20.

COLLINS, P. L.

The molecular biology of human respiratory syncytial virus (RSV) of genus pneumovirus.

In: D. W. Kingsbury. The paramyxoviruses. New York, Plenum Press, 1991. 103-162.

COLLINS, P. L. and MOTTET, G.

Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus.

J Gen Virol, 1993, **74**, Pt 7, 1445-50.

COLLINS, P. L., MCINTOSH, K., R. M. CHANOCK

Respiratory Syncytial Virus

In: D. M. Knipe B. N. Fields, P. M. Howley, et al. Fields Virology, Third Edition. Philadelphia, Lippincott -Raven Publisher, 1996. 1313-1346.

DOMINGO, E., FLAVELL, R. A., WEISSMANN, C.
In vitro site-directed mutagenesis: Generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Qb.
Gene, 1976, **1**, 3-25.

DOMINGO, E., DAVILA, M., ORTIN, J.
Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth disease virus.
Gene, 1980, **11**, 333-346.

DOMINGO, E., ESCARMIS, C., SEVILLA, N., MOYA, A., ELENA, S. F., QUER, J., NOVELLA, I. S. and HOLLAND, J. J.
Basic concepts in RNA virus evolution.
Faseb J, 1996, **10**, 8, 859-64.

DOMINGO, E.
Vers une compréhension des virus comme systèmes complexes et dynamiques.
Ann. Méd. Vét., 1999a, **143**, 225-235.

DOMINGO, E.
Quasispecies
In: A. Granoff and R. G. Webster. Encyclopedia of Virology. London, Academic Press, 1999b.

DOMINGO, E., BIEBRICHER C., EIGEN M., HOLLAND J. J.
Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences
Landes Bioscience. Austin, 2001.

DOMINGO, E.
Quasispecies theory in virology.
J Virol, 2002, **76**, 1, 463-465.

DRAKE, J. W.
Rates of spontaneous mutations among RNA viruses.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, **90**, 4171-4175.

EIGEN, M.
Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules.
Naturwissenschaften, 1971, **58**, 465-523.

EIGEN, M. AND SCHUSTER, P.
The hypercycle - A Principle of Natural Self-organization.
Springer-Verlag. New York, 1979.

EIGEN, M., BIEBRICHER C.
Sequence space and quasispecies distribution.
In: E. Domingo, Holland J. J., Ahlquist P. RNA Genetic. Boca Raton, CRC Press Inc., 1988. 211-245.

ELAZHARY, M. A., GALINA, M., ROY, R. S., FONTAINE, M. and LAMOTHE, P.
Experimental infection of calves with bovine respiratory syncytial virus (Quebec strain).
Can J Comp Med, 1980, **44**, 4, 390-5.

ELAZHARY, M. A., SILIM, A., ET AL.
Interferon, fluorescent antibody, and neutralizing antibody responses in sera of calves inoculated with bovine syncytial virus.
Am J Vet Res, 1981, **42**, 8, 1378-82.

ELLIS, J. A., RUSSELL, H., CAVENDER, J., HAVEN, T. R.
Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in cattle following immunization with modified-live and inactivated vaccines. Analysis of the specificity and activity of serum antibodies.
Vet Immunol Immunopathol, 1992, **34**, 35-45.

ELLIS, J. A., HASSARD, L. E. ET AL.
Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in calves after inoculation with commercially available vaccines.
J Am Vet Med Assoc, 1995, **206**, 3, 354-361.

ELVANDER, M.
Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus.
Vet Rec, 1996, **138**, 5, 101-5.

ELVANDER, M., VILCEK, S., BAULE, C., UTTENTHAL, A., BALLAGI-PORDANY, A. and BELAK, S.
Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains.
J Gen Virol, 1998, **79**, Pt 12, 2939-46.

EVANS, J. E., CANE, P. A. and PRINGLE, C. R.
Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus.
Virus Res, 1996, **43**, 2, 155-61.

FREYMUTH, F., PETITJEAN, J., POTHIER, P., BROUARD, J. and NORRBY, E.
Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups A and B in France from 1982 to 1990.
J Clin Microbiol, 1991, **29**, 3, 653-5.

FURZE, J., WERTZ, G., LERCH, R. and TAYLOR, G.
Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1994, **75**, Pt 2, 363-70.

FURZE, J. M., ROBERTS, S. R., WERTZ, G. W. and TAYLOR, G.
Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strains share a high degree of genetic homogeneity.
Virology, 1997, **231**, 1, 48-58.

GADDUM, R. M., COOK, R. S., ET AL.
Primary cytotoxic T-cell responses to bovine respiratory syncytial virus in calves.
Immunology, 1996, **88**, 3, 421-427.

- GARCIA-BARRENO, B., DELGADO, T. and MELERO, J. A.
 Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions.
J Virol, 1996, **70**, 2, 801-8.
- GAROFALO, R., KIMPEN, J. L. L., WELLIVER, R. C., OGRA, P. L.
 Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection.
J Pediatr, 1992, **120**, 28-32.
- GLEZEN, P., DENNY, F. W.
 Epidemiology of acute lower respiratory disease in children.
N. Engl. J. Med., 1973, **288**, 498-505.
- GRAHAM, B. S., T. R. JOHNSON, R. S. PEEBLES
 Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection.
Immunopharmacology, 2000, **48**, 237-247.
- HANCOCK, G. E., SPEELMAN, D. J., HEERS, K., BORTELL, E., SMITH, J. and COSCO, C.
 Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in BALB/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus.
J Virol, 1996, **70**, 11, 7783-91.
- HARDY, R. W. and WERTZ, G. W.
 The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription.
J Virol, 1998, **72**, 1, 520-6.
- HEMINWAY, B. R., YU, Y., TANAKA, Y., PERRINE, K. G., GUSTAFSON, E., BERNSTEIN, J. M. and GALINSKI, M. S.
 Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion.
Virology, 1994, **200**, 2, 801-5.
- HENDRICKS, D. A., BARADARAN, K., MCINTOSH, K. and PATTERSON, J. L.
 Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells.
J Gen Virol, 1987, **68**, Pt 6, 1705-14.
- HOLLAND, J., K. SPINDLER, F. HORODYSKI, ET AL.
 Rapid evolution of RNA genomes.
Science, 1982, **215**, 1577-85.
- HOLLAND, J. J., DE LA TORRE J. C., STEINHAEUER D.
 RNA virus population as quasispecies.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1992, **176**, 1-20.
- HORZINEK, MARIAN C.
 Bovine Respiratory Syncytial Virus
 In: *Virus Infections of Ruminants*. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, 1990. 363-375.

- INABA, Y., TANAKA, Y.
Nomi virus, a virus isolated from an apparently new epizootic disease of cattle.
Jpn J Microbiol., 1970, **14**, 3, 246-8.
- ITO, Y., TANAKA, Y., INABA, Y., OMORI, T.
Structure of bovine respiratory syncytial virus.
Arch. Gesamte Virusforsch, 1973, **40**, 198-204.
- JACOBS, J. W., AND N. EDINGTON
Isolation of respiratory syncytial virus from cattle in Britain.
Vet Rec, 1971, **88**, 26, 694.
- JACOBS, J. W., EDINGTON, N.
Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus.
Res Vet Sci, 1975, **18**, 299-306.
- KARRON, R. A., D. A. BUONAGURIO, ET AL.
Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV-subgroup B mutant.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, **94**, 25, 13961-6.
- KHATTAR, S. K., YUNUS, A. S., COLLINS, P. L. and SAMAL, S. K.
Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription, RNA replication, and interaction with the nucleoprotein.
Virology, 2001, **285**, 2, 253-69.
- KIMMAN, T. G., ZIMMER, G. M., ET AL.
Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections improved by virus detection in lung lavage samples.
Am J Vet Res, 1986, **47**, 1, 143-147.
- KIMMAN, T. G., WESTENBRINK, F., SCHREUDER, B. E. and STRAVER, P. J.
Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies.
J Clin Microbiol, 1987, **25**, 6, 1097-106.
- KIMMAN, T. G., ZIMMER, G. M., WESTENBRINK, F., ET AL.
Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease.
Vet Rec, 1988, **123**, 104-109.
- KIMMAN, T. G., P. J. STRAVER, ET AL.
Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: morphologic and serologic findings.
Am J Vet Res, 1989a, **50**, 5, 684-93.
- KIMMAN, T. G., DAHA, M. R., ET AL.
Activation of complement by bovine respiratory syncytial virus-infected cells.
Vet Immunol Immunopathol, 1989b, **21**, 3-4, 311-25.

KIMMAN, T. G., WESTENBRINK, F., ET AL.

Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus: effect of amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies.

Vet Immunol Immunopathol, 1989c, **22**, 2, 145-60.

LAMBERT, D. M.

Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins.

Virology, 1988, **164**, 2, 458-66.

LANGEDIJK, J. P., MELOEN, R., TAYLOR, G., FURZE, J. M. and VAN OIRSCHOT, J. T.

Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus.

J Virol, 1997, **71**, 5, 4055-61.

LANGEDIJK, J. P., DE GROOT, B. L., BERENDSEN, H. J. and VAN OIRSCHOT, J. T.

Structural homology of the central conserved region of the attachment protein G of respiratory syncytial virus with the fourth subdomain of 55-kDa tumor necrosis factor receptor.

Virology, 1998, **243**, 2, 293-302.

LARSEN, L. E., A. UTTENTHAL, P. ARCTANDER AND AL.

Serological and genetic characterisation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) indicates that Danish isolates belong to the intermediate subgroup: no evidence of a selective effect on the variability of G protein nucleotide sequence by prior cell culture adaptation and passages.

Vet Microbiol, 1998, **62**, 265-279.

LARSEN, L. E., UTTENTHAL, A., ARCTANDER, P ET AL.

Diagnosis of enzootic pneumonia in Danish cattle: application of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in naturally and experimentally infected calves.

J Vet Diagn Invest, 1999, **11**, 416-422.

LARSEN, L. E.

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review.

Acta Vet Scand, 2000, **41**, 1, 1-24.

LERCH, R. A., K. ANDERSON, G. W. WERTZ

Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus.

J Virol, 1990, **64**, 5559-5569.

LEVINE, S., HAMILTON, R.

Kinetics of the respiratory syncytial virus growth cycle in HeLa cells.

Arch. Gesamte Virusforsch, 1969, **28**, 122-132.

- LEVINE, S., R. KLAIBER-FRANCO, P. R. PARADISO
Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1987, **68**, 2521-2524.
- LOPEZ, J. A., BUSTOS, R., PORTELA, A., GARCIA-BARRENO, B. and MELERO, J. A.
A point mutation in the F1 subunit of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein blocks its cell surface transport at an early stage of the exocytic pathway.
J Gen Virol, 1996, **77**, Pt 4, 649-60.
- LU, B., MA, C. H., BRAZAS, R. and JIN, H.
The major phosphorylation sites of the respiratory syncytial virus phosphoprotein are dispensable for virus replication in vitro.
J Virol, 2002, **76**, 21, 10776-84.
- MAHIN, L., WELLEMANS, G.
Serological evidence for the intervention of bovine respiratory syncytial virus in a respiratory disease outbreak in moroccan cattle.
Zbl. Vet. Med., 1982, **29**, B, 76-79.
- MALLIPEDDI, S. K., SAMAL, S. K. and MOHANTY, S. B.
Analysis of polypeptides synthesized in bovine respiratory syncytial virus-infected cells.
Arch Virol, 1990, **115**, 1-2, 23-36.
- MALLIPEDDI, S. K. and SAMAL, S. K.
Sequence comparison between the phosphoprotein mRNAs of human and bovine respiratory syncytial viruses identifies a divergent domain in the predicted protein.
J Gen Virol, 1992, **73**, Pt 9, 2441-4.
- MALLIPEDDI, S. K. and SAMAL, S. K.
Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1993, **74**, Pt 9, 2001-4.
- MALLIPEDDI, S. K., LUPIANI, B. and SAMAL, S. K.
Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P interaction using a two-hybrid system.
J Gen Virol, 1996, **77**, Pt 5, 1019-23.
- MASSON, C., DELVERDIER, M., ET AL.
Mise en évidence immunopéroxydasique du virus respiratoire syncytial bovin (B.R.S.V.) sur coupes en paraffine de tissu pulmonaire bovin.
Rev Med Vet, 1993, **144**, 2, 99-104.
- MC CONNOCHIE, K. M., HALL, C. B., WALSH, E. E.
Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtypes.
J Pediatr, 1990, **117**, 52-62.
- MC INNES, E., COLLINS, R. A., ET AL.
Cytokine expression in pulmonary and peripheral blood mononuclear cells from calves infected with bovine respiratory syncytial virus.
Res Vet Sci, 1998, **64**, 2, 163-166.

MELERO, J., GARCIA-BARRENO, B., MARTINEZ, I., PRINGLE, C. R. and CANE, P. A.
Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein.
J Gen Virol, 1997, **78**, Pt 10, 2411-8.

MINK, M. A., STEC, D. S. and COLLINS, P. L.
Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA.
Virology, 1991, **185**, 2, 615-24.

MOHANTY, S. B., A. L. INGLING, ET AL.
Experimentally induced respiratory syncytial viral infection in calves.
Am J Vet Res, 1975, **36**, 4, 417-9.

MUFSON, M. A., ORVELL, C., RAFNAR, B. and NORRBY, E.
Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1985, **66**, Pt 10, 2111-24.

MURPHY, B. R., GRAHAM, B. S., PRINCE, G. A., WALSH, E. E., CHANOCK, R. M., KARZON, D. T. and WRIGHT, P. F.
Serum and nasal-wash immunoglobulin G and A antibody response of infants and children to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins following primary infection.
J Clin Microbiol, 1986, **23**, 6, 1009-14.

NORRBY, E., MUFSON, M. A., AND SHESHBERADARAN, H.
Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1986, **67**, 2721-2729.

NOVELLA, I. S., E. DOMINGO AND J. J. HOLLAND
Rapid viral quasispecies evolution: implications for vaccine and drug strategies.
Molecular Medicine Today, 2001, 248-253.

OPENSHAW, P. J.
Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease.
Springer Semin Immunopathol, 1995, **17**, 2-3, 187-201.

OSORIO, F. A., ANDERSON, G. A., ET AL
Detection of bovine respiratory syncytial virus using a heterologous antigen-capture enzyme immunoassay.
J Vet Diagn Invest, 1989, **1**, 3, 210-214.

OTTO, P. M. ELSCHNER, ET AL.
A model for respiratory syncytial virus (RSV) infection based on experimental aerosol exposure with bovine RSV in calves.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 1996, **19**, 2, 85-97.

PACCAUD, M. F., JACQUIER, C.
A respiratory syncytial virus of bovine origin.
Arch. Gesamte Virusforsch, 1970, **30**, 4, 327-342.

- PALOMO, C., GARCIA-BARRENO, B., PENAS, C., MELERO, J. A.
The G protein of human respiratory syncytial virus: significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity.
J Gen Virol, 1991, **72**, 669-675.
- PASTEY, M. K. and SAMAL, S. K.
Structure and sequence comparison of bovine respiratory syncytial virus fusion protein.
Virus Res, 1993, **29**, 2, 195-202.
- PASTEY, M. K. and SAMAL, S. K.
Nucleotide sequence analysis of the non-structural NS1 (1C) and NS2 (1B) protein genes of bovine respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1995, **76**, Pt 1, 193-7.
- PASTEY, M. K. and SAMAL, S. K.
Analysis of bovine respiratory syncytial virus envelope glycoproteins in cell fusion.
J Gen Virol, 1997, **78**, Pt 8, 1885-9.
- POCH, O., BLUMBERG, B. M., BOUGUELERET, L. and TORDO, N.
Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains.
J Gen Virol, 1990, **71**, Pt 5, 1153-62.
- PROZZI, D., WALRAVENS, K., LANGEDIJK, J. P., DAUS, F., KRAMPS, J. A. and LETESSON, J. J.
Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein.
J Gen Virol, 1997, **78**, Pt 2, 359-66.
- RICHMAN, A. V., F. A. PEDREIRA, AND N. M. TAURASO
Attempts to demonstrate hemagglutination and hemadsorption by respiratory syncytial virus.
Appl. Microbiol., 1971, **21**, 1099-100.
- ROBERTS, S. R., LICHTENSTEIN, D., BALL, L. A. and WERTZ, G. W.
The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons.
J Virol, 1994, **68**, 7, 4538-46.
- RODGERS, S. J., AND BALDWIN, C. A.
The rapid detection of bovine respiratory syncytial virus antigens by use of a commercial enzyme immunoassay.
Bov Pract, 1990, **25**, 76-81.
- RUEDA, P., DELGADO, T., PORTELA, A., MELERO, J. A. and GARCIA-BARRENO, B.
Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies.
J Virol, 1991, **65**, 6, 3374-8.

- RUEDA, P., GARCIA BARRENO B., MEMERAO J. A.
Loss of conserved cysteine residues in the attachment glycoprotein of two human respiratory syncytial virus escape mutants that contain multiple A-G substitutions (hypermutations).
Virology, 1994, **198**, 653-662.
- SAMAL, S. K. and ZAMORA, M.
Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus.
J Gen Virol, 1991a, **72**, Pt 7, 1715-20.
- SAMAL, S. K., ZAMORA, M., MCPHILLIPS, T. H. and MOHANTY, S. B.
Molecular cloning and sequence analysis of bovine respiratory syncytial virus mRNA encoding the major nucleocapsid protein.
Virology, 1991b, **180**, 1, 453-6.
- SAMAL, S. K., PASTEY, M. K., MCPHILLIPS, T. H. and MOHANTY, S. B.
Bovine respiratory syncytial virus nucleocapsid protein expressed in insect cells specifically interacts with the phosphoprotein and the M2 protein.
Virology, 1993, **193**, 1, 470-3.
- SCHLENDER, J., BOSSERT, B., BUCHHOLZ, U. and CONZELMANN, K. K.
Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response.
J Virol, 2000, **74**, 18, 8234-42.
- SCHREIBER, P., DESSY, F., VAN HERF, A., LETESSON, J., COPPE, P., COLLARD, A.
Statut sérologique des veaux et des jeunes bovins blanc bleu belges vis-à-vis du virus respiratoire syncytial bovin pendant les automnes 1996-1997.
Ann. Méd. Vét., 2000, **144**, 23-28.
- SCHRIJVER, R. S., LANGEDIJK, J. P., VAN DER POEL, W. H., MIDDEL, W. G., KRAMPS, J. A., VAN OIRSCHOT, J. T.
Antibody responses against the G and the F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections.
Clin Diagn Lab Immunol, 1996a, **3**, 500-506.
- SCHRIJVER, R. S., DAUS, F., KRAMPS, J. A., LANGEDIJK, J. P., BUIJS, R., MIDDEL, W. G., TAYLOR, G., FURZE, J., HUYBEN, M. W. and VAN OIRSCHOT, J. T.
Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue.
Vet Microbiol, 1996b, **53**, 3-4, 253-60.
- SHAY, D. K., HOLMAN, R. C., NEWMAN, R. D., LIU, L. L., STOUT, J. W., ANDERSON, L. J.
Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1999.
J Am Vet Med Assoc, 1999, **282**, 1440-1446.
- SMITH, M. H., M. L. FREY AND R. E. DIERKS
Isolation, characterization, and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus.
Arch. Virol., 1975, **47**, 237-247.

SRIKIATKHACHORN, A., CHANG, W., BRACIALE, T. J.
Induction of Th-1 and Th-2 responses by respiratory syncytial virus attachment glycoprotein epitope and major histocompatibility complex independent.
J Virol, 1999, **73**, 6590-6597.

STEC, D. S., HILL, M. G., 3RD and COLLINS, P. L.
Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses.
Virology, 1991, **183**, 1, 273-87.

STEINHAEUER, D. A., J. J. HOLLAND
Direct method for quantification of extreme polymerase error frequencies at selected single base sites in viral RNA.
J Virol, 1986, **59**, 545-50.

STEINHAEUER, D. A., J. J. HOLLAND
Rapid evolution of RNA viruses.
Annu Rev Microbiol, 1987, **41**, 409-33.

STINE, L. C., HOPPE, D. K. and KELLING, C. L.
Sequence conservation in the attachment glycoprotein and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates.
Vet Microbiol, 1997, **54**, 3-4, 201-21.

STOTT, E. J. and TAYLOR, G.
Respiratory syncytial virus. Brief review.
Arch Virol, 1985, **84**, 1-2, 1-52.

STRAUSS, E. G., J. H. STRAUSS, AND A. J. LEVINE
Virus Evolution
In: Third Edition. Fields Virology. Philadelphia, Raven Publisher, 1996. 153-171.

TAYLOR, G., STOTT, E. J. and THOMAS, L. H.
Lymphocyte transformation response of calves to respiratory syncytial virus.
J Med Virol, 1987, **22**, 4, 333-44.

TAYLOR, G., STOTT, E. J., ET AL.
Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine antibodies.
J Gen Virol, 1992, **73**, 9, 2217-23.

TAYLOR, G., THOMAS, L. H., WYLD S. G., FURZE, J., SOPP, P., HOWARD C. J.
Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves.
J Virol, 1995, **69**, 6658-6664.

THIRY, ETIENNE
Le virus respiratoire syncytial bovin
In: Maladies virales des ruminants. Maisons-Alfort, Editions du point vétérinaire, 2000. 33-42.

THOMAS, L. H., ET E. J. SCOTT

Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in the bovine respiratory tract by immunofluorescence.

Vet Rec, 1981, **108**, 20, 432-5.

THOMAS, L. H., STOTT, E. J., COLLINS, A. P., JEBBETT J.

Experimental pneumonia in gnotobiotic calves produced by respiratory syncytial virus.

Br J Exp Pathol, 1984, **65**, 19-28.

THOMAS, L. H., TAYLOR, G., ET AL.

Determination of the protective proteins of bovine respiratory syncytial virus using vaccinia recombinants and monoclonal antibodies.

In: XVIIIth World Buiatrics Congress, Bologne, Italie, 1994.

THOMAS, L. H., COOK, R. S., HOWARD, C. J., GADDUM, R. M., TAYLOR, G.

Influence of selective T-lymphocyte depletion on the lung pathology of gnotobiotic calves and the distribution of different T-lymphocyte subsets following challenge with bovine respiratory syncytial virus.

Res Vet Sci, 1996, **61**, 1, 38-44.

TRUDEL, M., NADON, F., ET AL.

Respiratory syncytial virus fusion protein: further characterization of a major epitope involved in virus neutralization.

Can J Microbiol, 1987, **33**, 10, 933-938.

TRUDEL, M., NADON, F., SIMARD, C., BELANGER, F., ALAIN, R., SEGUIN, C. and LUSSIER, G.

Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus.

Arch Virol, 1989, **107**, 1-2, 141-9.

ULLOA, L., SERRA, R., ASENJO, A. and VILLANUEVA, N.

Interactions between cellular actin and human respiratory syncytial virus (HRSV).

Virus Res, 1998, **53**, 1, 13-25.

UTTENTHAL, A., JENSEN, N. P. and BLOM, J. Y.

Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology.

Vet Rec, 1996, **139**, 5, 114-7.

VALARCHER, J. F.

Persistance in vivo et évolution génétique du virus respiratoire syncytial bovin

Th: Thèse de doctorat: Lyon: 1999a - 11-70.

VALARCHER, J. F., FOUCRAS, G., MEYER, G., SCHELCHER, F.

Pathogénie de l'infection par le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB);

Bulletin des GTV, 1999b, **5**, 329-333.

VALARCHER, J. F., SCHELCHER, F. and BOURHY, H.

Evolution of bovine respiratory syncytial virus.

J Virol, 2000, **74**, 22, 10714-28.

VAN DEN HOOGEN, B. G., DE JONG, J. C., GROEN, J., KUIKEN, T., DE GROOT, R., FOUCHIER, R. A. and OSTERHAUS, A. D.

A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease.

Nat Med, 2001, **7**, 6, 719-24.

VAN DER POEL WHM, MOURITS MCM, NIELEN M, FRANKENA K, VANOIRSCHOT JT, SCUUKEN YH

Bovine respiratory syncytial virus reinfections and decreased milk yield in dairy cattle.

Vet Q, 1995, **17**, 77-81.

VAN DER WERF, S.

Variabilité génétique des virus à ARN.

In: *Génomique microbienne*. Editions scientifiques et médicales Elsevier, 2002. 19-32.

VARTANIAN, J. P., A. MEYERHANS, B. ASJÖ AND S. WAIN-HOBSON

Selection, recombination and G/A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes.

J Virol, 1991, **65**, 1779-1788.

VERHOEFF J., VAN NIEUWSTADT APKMI

BRS virus, PI3 virus and BHV1 infections of young stock on self-contained dairy farms: epidemiological and clinical findings.

Vet Rec, 1984, **114**, 288-293.

WALSH, E. E., SCHLESINGER, J. J. and BRANDRISS, M. W.

Purification and characterization of GP90, one of the envelope glycoproteins of respiratory syncytial virus.

J Gen Virol, 1984, **65**, Pt 4, 761-7.

WALSH, E. E., HALL, C. B., SCHLESINGER, J. J., BRANDRISS, M. W., HILDRETH, S. and PARADISO, P.

Comparison of antigenic sites of subtype-specific respiratory syncytial virus attachment proteins.

J Gen Virol, 1989, **70**, Pt 11, 2953-61.

WELLIVER, R. C., WONG, D. T., SUN, M., MIDDLETON, E. JR., VAUGHAN, R. S., OGRA, P. L.

The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection.

N. Engl. J. Med., 1981, **305**, 841-846.

WEST, K., BOGDAN, J., ET AL.

A comparison of diagnostic methods for the detection of bovine respiratory syncytial virus in experimental clinical specimens.

Can J Vet Res, 1998, **62**, 4, 245-250.

WESTENBRINK, F., KIMMAN, T. G., ET AL.

Analysis by radio-immunoprecipitation assays of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus-proteins in experimentally and naturally infected cattle.

In: XVth Congress of Buiatrie, Palma, Spain, 1989.

- YUNUS, A. S., COLLINS, P. L. and SAMAL, S. K.
Sequence analysis of a functional polymerase (L) gene of bovine respiratory syncytial virus: determination of minimal trans-acting requirements for RNA replication.
J Gen Virol, 1998, **79**, Pt 9, 2231-8.
- YUNUS, A. S., KHATTAR, S. K., COLLINS, P. L. and SAMAL, S. K.
Rescue of bovine respiratory syncytial virus from cloned cDNA: entire genome sequence of BRSV strain A51908.
Virus Genes, 2001, **23**, 2, 157-64.
- ZAMORA, M. and SAMAL, S. K.
Gene junction sequences of bovine respiratory syncytial virus.
Virus Res, 1992, **24**, 1, 115-21.
- ZIMMER, G., CONZELMANN, K. K. and HERRLER, G.
Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture.
J Virol, 2002, **76**, 18, 9218-24.