

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	9
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	13
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	15
<b>INTRODUCTION</b> .....	17
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	19
<b>I. LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN : UN PNEUMOVIRUS</b> .....	21
<u>I.1 Taxonomie</u> .....	21
<u>I.2 Propriétés physicochimiques</u> .....	22
<u>I.3 Structure</u> .....	23
<u>I.4 Génome</u> .....	25
<u>I.5 Protéines virales</u> .....	26
<i>I.5.1 Les protéines non structurales</i> .....	26
• NS1et NS2	
<i>I.5.2 Les protéines d'enveloppe</i> .....	28
• la protéine de fusion F	
• la glycoprotéine G	
• la protéines SH (Small Hydrophobic)	
<i>I.5.3 Les protéines de nucléocapside</i> .....	33
• la nucléoprotéine N	
• la phosphoprotéine P	
• la polymérase L	
<i>I.5.4 les protéines de matrice</i> .....	34
• la protéine M	
• le facteur d'anti-terminaison M2-1 et le facteur de régulation M2-2	
<u>I.6 Cycle de réplication</u> .....	36
<i>I.6.1 Attachement et entrée du virus</i> .....	36
<i>I.6.2 Transcription et traduction</i> .....	36
<i>I.6.3 Réplication de l'ARN</i> .....	37
<i>I.6.4 Assemblage des virions</i> .....	38
<b>II. L'INFECTION PAR LE VRSB</b> .....	38
<u>II.1 Epidémiologie</u> .....	38
<i>II.1.1 Espèces sensibles</i> .....	38
<i>II.1.2 Prévalence de l'infection</i> .....	39

II.1.3	<i>Mortalité et morbidité chez les bovins</i> .....	39
II.1.4	<i>Les voies de transmission</i> .....	39
II.1.5	<i>Saisonnalité de l'infection et persistance virale</i> .....	40
II.2	<u>Signes cliniques</u> .....	40
II.3	<u>Lésions</u> .....	42
II.3.1	<i>Lésions macroscopiques</i> .....	42
II.3.2	<i>Histopathologie</i> .....	43
II.4	<u>Diagnostic</u> .....	43
II.4.1	<i>Animal vivant</i> .....	44
•	sérologie : recherche indirecte	
•	virologie : recherche directe	
II.4.2	<i>Animal mort</i> .....	46
II.5	<u>Prévention médicale</u> .....	47
II.5.1	<i>Problématique de la vaccination contre le VRSB</i> .....	47
II.5.2	<i>Les vaccins contre le VRSB</i> .....	49
II.5.3	<i>La recherche et les futurs vaccins</i> .....	51
<b>III</b>	<b>PATHOGENIE DE L'INFECTION</b> .....	52
III.1	<u>Les modèles expérimentaux</u> .....	52
III.1.1	<i>Intérêts</i> .....	52
III.1.2	<i>Les différentes espèces modèles d'étude du VRSH</i> .....	53
•	Le modèle souris	
•	Les chimpanzés et macaques	
•	Les ovins	
•	Les bovins	
III.1.3	<i>Protocoles expérimentaux d'infection des veaux par le VRSB</i> .....	54
•	Animaux	
•	Origine et choix des souches	
•	Inoculation	
•	Paramètres de suivi	
•	Apports à l'étude du virus respiratoire syncytial bovin	
III.2	<u>Pathogénie de l'infection par le virus respiratoire syncytial bovin</u> .....	62
III.2.1/	<i>Cinétique de l'infection</i> .....	62
III.2.2/	<i>Tropisme cellulaire</i> .....	63

III.2.3	<i>La réponse non spécifique de l'hôte à l'infection naturelle</i>	63
III.2.4	<i>La réponse immunitaire spécifique</i>	65
III.2.5	<i>Immunopathogénie induite par la vaccination</i>	67
III.3	<b>Facteurs favorisant la maladie</b>	69
III.3.1	<i>Facteurs liés à l'environnement</i>	69
•	Facteurs d'ambiance	
•	Facteurs climatiques et géographiques	
•	Gestion des lots	
III.3.2	<i>Facteurs liés à l'hôte</i>	70
•	Prédisposition de l'espèce bovine aux affections respiratoires	
•	Race et conformation	
•	Statut immunologique et sur-infections bactériennes	
•	Facteurs génétiques	
•	Age	
III.3.3	<i>Facteurs de virulence du VRSB</i>	72
•	étude de la variabilité du virus	
•	Mécanismes moléculaires de la variabilité génétique des virus à ARN	
•	Implications biologiques de la variabilité du VRSB	
	<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE</b>	81
	<b>I. OBJECTIFS</b>	83
	<b>II. MATERIEL ET METHODES</b>	84
II.1	<u>Lignées et cultures cellulaires</u>	84
II.2	<u>Isolement des virus VRSB</u>	84
II.2.1	<i>Isolement des souches de terrain</i>	84
II.2.2	<i>Souches virales</i>	85
II.3	<u>Séquençage</u>	86
II.3.1	<i>Extraction de l'ARN et étape rétrotranscription</i>	87
II.3.2	<i>Amplification de l'ADNc viral</i>	87
II.3.3	<i>Méthode de séquençage et analyse des séquences</i>	89
II.4	<u>Expérimentation animale</u>	89
II.4.1	<i>Animaux</i>	89
II.4.2	<i>Protocole expérimental</i>	90

II.4.3 <i>Suivi expérimental</i> .....	92
• Suivi clinique	
• Suivi virologique	
• Suivi sérologique	
<b>III. RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	94
<u>III.1. Stratégie de séquençage</u> .....	94
III.1.1 <i>Choix des souches</i> .....	94
III.1.2 <i>Stratégie de séquençage</i> .....	95
<u>III.2 Analyse du génome viral</u> .....	97
III.2.1 <i>Organisation générale</i> .....	97
III.2.2 <i>Etude comparative du génome viral</i> .....	104
• Degrés de parenté entre <i>Pneumovirus</i>	
• Arbres phylogénétiques du VRSB	
<u>III.3 Analyses des séquences amino-acides déduites</u> .....	113
III.3.1 <i>Organisation générale</i> .....	113
III.3.2 <i>Degrés de parenté entre les ORF du VRSB</i> .....	114
III.3.3 <i>Substitutions synonymes/non synonymes</i> .....	115
<u>III.4 Etude comparative du pouvoir pathogène</u> .....	118
III.4.1 <i>Suivi clinique</i> .....	118
III.4.2 <i>Virologie</i> .....	123
III.4.3 <i>Réponse sérologique</i> .....	124
III.4.4 <i>Discussion sur les expérimentations animales</i> .....	125
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	127
<b>ANNEXES</b> .....	137
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	155

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du VRSB, d'après Meyer <i>et al.</i> , 2008.....	25
Figure 2 : Représentation schématique du génome du VRSB. ....	25
Figure 3 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de F .....	29
Figure 4 : Représentation schématique de la structure primaire de la glycoprotéine G du VRSB d'après Larsen, 2000. ....	30
Figure 5 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de G.....	31
Figure 6 : Transcription, traduction et réplication de l'ARN viral, d'après Valarcher et Taylor, 2007.....	37
Figure 7 : Réponse innée de l'hôte à l'infection naturelle, d'après Meyer, 2008. ....	67
Figure 8 : Arbre phylogénétique sur la glycoprotéine G de 87 isolats de VRSB, un isolat de VRSO et deux isolats de VRSH. ....	76
Figure 9 : Séquence consensus pour chaque sous-groupe de VRSB entre les résidus aminoacides 170 et 209 de la protéine G. ....	77
Figure 10 : Exemple de la stratégie de séquençage pour la souche 3761 du VRSB.....	97
Figure 11 : Organisation générale du génome des souches de VRSB.....	98
Figure 12 : Comparaison des séquences début et fin de gènes, séquences intergéniques entre les 4 souches de VRSB.....	100
Figure 13 : Séquences (A) promoteur (Leader) et (B) terminales (Trailer) des 4 souches de VRSB et d'une souche de VRSH (données personnelles, Krempf <i>et al.</i> , 2005).....	103
Figure 14 : Arbre phylogénétique avec racine des génomes des pneumoviridae.....	106
Figure 15 : Arbres phylogénétiques sur la séquence nucléotidique de G (position nucléotidique ) entre les souches 3761, A2-Gelfi et W2 en comparaison avec les séquences d'isolats de VRSB obtenus à partir des banques de données.....	107
Figure 16 : Arbres phylogénétiques sur la séquence nucléotidique de F (position nucléotidique ) entre les souches 3761, A2-Gelfi et W2 en comparaison avec les séquences d'isolats de VRSB obtenus à partir des banques de données.....	110
Figure 17 : Arbres phylogénétiques sur la séquence nucléotidique de N (position nucléotidique ) entre les souches 3761, A2-Gelfi et W2 en comparaison avec les séquences d'isolats de VRSB obtenus à partir des banques de données.....	112
Figure 18 : Moyennes (et écarts types) des scores cliniques pour les lots 3761, A2 Gelfi, et W2..	119
Figure 19 : Moyennes (et écarts types) des fréquences respiratoires pour les lots 3761, A2 Gelfi, W2, et les témoins 1 et 2.....	121

Figure 20 : Moyennes (et écarts types) des températures pour les lots 3761, A2 Gelfi, W2.....	122
Figure 21 : Charges virales mesurées pour la souche 3761 puis pour les souches A2 Gelfi et W2....	124
Figure 22 : Séquence consensus pour chaque sous-groupe de VRSB entre les résidus aminoacides 170 et 209 de la protéine G. Les séquences des souches 3761 et W2 ont été ajoutées.....	131

## **TABLEAUX**

Tableau 1 : Composition de la famille des <i>Paramyxoviridae</i> (d'après Lambs et Kolakofsky).....	22
Tableau 2 : Caractéristiques principales des protéines du VRSB d'après Valarcher <i>et al.</i> , 2007.....	26
Tableau 3 : Liste des vaccins contre le VRSB commercialisés en France.....	50
Tableau 4 : 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; (Elvander, <i>et al.</i> , 1998; Furze, <i>et al.</i> , 1994, etc....).....	74
Tableau 5 : Les amorces utilisées pour l'étape de rétrotranscription.....	87
Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour la PCR et le séquençage.....	88
Tableau 7 : Position et longueur des fragments à séquencer en fonction des amorces dessinées sur la séquence de la souche VRSB ATue.....	96
Tableau 8 : Nombre de substitutions au sein des séquences intergéniques au total et pour chaque souche.....	101
Tableau 9 : Pourcentage d'homologies pour les séquences nucléotidiques codantes.....	104
Tableau 10 : Position des ORFs potentielles pour la souche 3761.....	113
Tableau 11 : Degré d'identité entre souches pour les séquences en acides aminés déduites.....	114
Tableau 12: Substitutions synonymes et non synonymes pour chaque séquence en acide aminés...	115
Tableau 13 : dN/dS pour chaque souche par rapport à VRSB ATue, calculés pour tous les ORF....	117

## **PHOTOGRAPHIES**

Photo 1 : Photographie d'un <i>Pneumovirus</i> .....	24
Photos 2 et 3 : Réalisation du LBA lors du troisième passage sur veau.....	91

## **ANNEXES**

Annexe 1 : Fiche d'évaluation clinique biquotidienne.....	137
Annexe 2 : Mode de calcul du score clinique.....	138
Annexe 3 : Alignement des séquences complètes des quatre souches de VRSB (Meg Align, Lasergene DNASTar).....	139

# LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Anticorps  
AdBv : Adénovirus bovin  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
APV : Pneumovirus aviaire  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ATT : Aspiration trans-trachéale  
BHV1 : Herpèsvirus bovin de type 1  
BVDV : Virus de la diarrhée bovine virale  
ENP : Ecouvillon nasal profond  
FR : Fréquence respiratoire  
Ig E : Immunoglobuline E  
Ig G : Immunoglobuline G  
Ig M : Immunoglobuline M  
J X p.i : Jour X post-infection  
LBA : Lavage broncho-alvéolaire  
MEM : Milieu essentiel minimum  
MPM : Mouvement par minute  
MPV : Pneumovirus murin  
NC : souche ATue A51908  
ORF : Open-reading frame / phase ouverte de lecture  
PH : Prim'holstein  
PI3 : Virus Parainfluenza de type 3  
RT-PCR : Transcription réverse et amplification génique  
SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë  
TR : Température rectale  
TM: transmembranaire  
UFP : Unité formant plaque  
VRSB : Virus respiratoire syncytial bovin  
VRSH : Virus respiratoire syncytial humain  
VRSO : Virus respiratoire syncytial ovin





# INTRODUCTION

Les virus respiratoires syncytiaux humain (VRSH) et bovin (VRSB) sont des *Pneumovirus* présentant de grandes similitudes structurales, et qui partagent des caractéristiques épidémiologiques, cliniques et lésionnelles communes. Ces virus sont respectivement les causes majeures d'infections respiratoires virales sévères chez les nourrissons et les jeunes bovins dans le monde. Le VRSB est associé à plus de 50% des troubles respiratoires chez les bovins de moins de un an, ce qui le place en tête des agents infectieux (Kimman *et al.*, 1988). En France, la séroprévalence du VRSB est de 60 %. Outre son impact en production bovine, l'infection par le VRSB s'avère d'un grand intérêt en pathologie comparée.

Les virus respiratoires syncytiaux sont des virus à ARN de polarité négative : ils ont la capacité de muter à chaque cycle de réplication. Cette caractéristique biologique leur confère un potentiel de variation et d'adaptation essentiel, pouvant poser des problèmes variés notamment en matière de réponse à la vaccination.

Les études génétiques et antigéniques du VRSH ont permis de définir deux sous-groupes A et B distincts. L'analyse du génome viral du VRSB montre que les souches peuvent être classées en 6 sous-groupes génétiques. Toutefois, la diversité génétique du VRSB est moins importante que celle de son homologue, le VRSH. Si les séquences complètes du génome de nombreuses souches de VRSH ont été déterminées, on ne dispose aujourd'hui que de peu de séquences partielles de souches circulant actuellement en France. La seule séquence complète de référence à disposition est celle d'une souche de laboratoire amplifiée, datant de 1969.

Dans cette étude, nous avons obtenu les séquences consensus de trois souches de terrain récentes isolées en France, et réalisé des études phylogénétiques sur le génome complet ainsi que sur les gènes G, F et N, dans le but d'établir des degrés de parenté entre souches. Enfin, à travers l'étude des résultats de deux séries d'expérimentations, nous avons cherché à mettre en relation l'étude des séquences et le pouvoir pathogène des souches en modèle d'infection expérimentale chez le veau.

Dans une première partie, nous ferons une synthèse bibliographique sur l'infection par le VRSB en insistant sur les points clés liés au génome et à la pathogénie virale, puis nous présenterons et discuterons les résultats obtenus.

**PREMIERE PARTIE :**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



# I. LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN, UN PNEUMOVIRUS

Le premier virus respiratoire syncytial (VRS) fut isolé par Morris *et al.* en 1956 lors d'une épidémie chez des chimpanzés (Morris *et al.*, 1956). La nature des effets cytopathiques (ECP) du virus sur cultures cellulaires (formation de syncytia) a été à l'origine de sa dénomination (Chanock *et al.*, 1957), puis, dans les années 60, une série d'études établirent l'importance du virus respiratoire syncytial humain (VRSH) dans les affections respiratoires des enfants (Chanock *et al.*, 1961). Dix ans plus tard, un virus étroitement lié au VRSH fut isolé au cours d'une épizootie de maladies respiratoires sévères chez des bovins, ce virus a été nommé le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) (Paccaud et Jacquier, 1970).

Les descriptions des caractéristiques virologiques des VRS sont surtout basées sur les études réalisées sur le VRSH, mais en raison des grandes similitudes entre le VRSH et VRSB, les connaissances obtenues pour le virus humain sont souvent extrapolées au virus bovin.

## I.1. Taxonomie

Le VRSB est un virus à ARN de polarité négative 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):

- une enveloppe lipidique d'origine plasmique comportant des protéines virales
- un génome représenté par une molécule d'ARN monocaténaire non segmentée de polarité négative
- un génome étroitement lié sur toute sa longueur aux protéines de la nucléocapside dans le virion et dans les cellules infectées
- une synthèse initiale d'ARN messager (ARN<sub>m</sub>), de manière non chevauchante la plupart du temps, par une polymérase virale ARN dépendante fortement associée à la nucléocapside
- une disposition constante des gènes: 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

L'ordre des *Mononegavirales* est divisée en 4 familles: la famille des *Rhabdoviridae*, comprenant entre autre le virus rabique, la famille des *Filoviridae*, dont l'unique genre *Filovirus* comprend les virus Marburg et Ebola, la famille des *Bornaviridae* et la famille des *Paramyxoviridae*, à laquelle appartient le VRSB.

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 *Morbilivirus* (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). La sous-famille des *Pneumovirinae* est représentée par deux genres : le genre *Pneumovirus* (VRSH, VRSB, ovin (VRSO) et caprin (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).

<b>Sous famille <i>Paramyxovirinae</i></b>		
<u>Genre <i>Paramyxovirus</i></u> virus Parainfluenza humain types 1 et 3 virus Parainfluenza bovin type 3 virus Parainfluenza murin type 1 (virus Sendai)	<u>Genre <i>Rubulavirus</i></u> virus parainfluenza humain de type 2, 4a et 4b virus de Newcastle (paramyxovirus aviaire de type 1) virus des oreillons rubulavirus porcine virus parainfluenza simien type 5	<u>Genre <i>Morbilivirus</i></u> virus de la rougeole virus de la peste bovine virus de la peste des petits ruminants virus de la maladie de Carré morbilivirus du phoque morbilivirus du dauphin
<b>Sous famille <i>Pneumovirinae</i></b>		
<u>Genre <i>Pneumovirus</i></u> VRS humain VRS bovin VRS ovin VRS caprin pneumovirus de la souris	<u>Genre <i>Métapneumovirus</i></u> métapneumovirus humain virus de la rhinotrachéite de la dinde	

Tableau 1 : Composition de la famille des *Paramyxoviridae*, d'après Lambs et Kolakofsky (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.

## I.2. Propriétés physico-chimiques

Le VRSB 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 Jacquier, 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 au-dessous de - 50°C ou à - 196°C (Inaba *et al.*, 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 (Fields Virology, 5th edition, 2006).

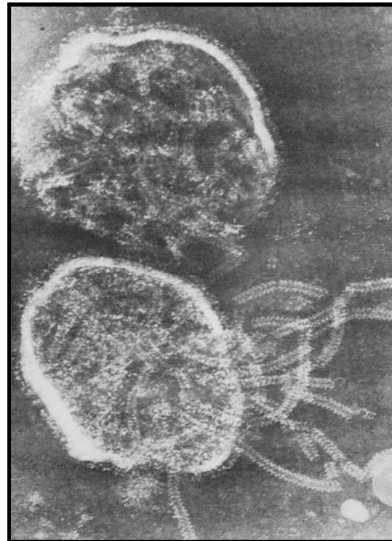
Le VRSB n'a pas de propriétés d'hémadsorption et d'hémagglutination (Richman *et al.*, 1971).

Un grand nombre de cultures cellulaires peut être infecté par le VRSH, mais il semble que la spécificité cellulaire soit plus restreinte pour le VRSB. Le VRSB se réplique dans de nombreux types de cellules (rénales, testiculaires, thyroïdiennes, du thymus, duodénales, rectales) d'origine bovine (Openshaw, 1995). Après adaptation en cultures cellulaires, il peut aussi être multiplié sur 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). Les conditions de cultures dépendent des cellules, la plupart du temps à 37°C et à pH 7.2. Le titre maximal relevé varie entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>6</sup> Unité Formant Plage (UFP) par ml (Horzinek, 1990).

## II.3 Structure

Le VRSB 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 avec un diamètre de 150 à 350 nm. A l'inverse du VRSH, et comme 80 % des particules virales du VRSC, les particules de VRSB peuvent aussi former un réseau par

l'intermédiaire de ponts de  $12 \pm 3$  nm de long et de  $17 \pm 1$  de diamètre (Trudel, *et al.*, 1989; Belanger, 1988). Aucune différence fonctionnelle n'a pu être mise en évidence entre ces deux formes de virion.



*Photo 1: Photographie d'un pneumovirus (source internet).*

L'enveloppe des VRS est constituée d'une bicouche lipidique issue de la membrane cellulaire cytoplasmique dans laquelle sont incluses des glycoprotéines virales de surface (les protéines G, F et SH). 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.

Le virion contient une nucléocapside hélicoïdale symétrique de diamètre variant de 12 à 15 nm (Ulloa, *et al.*, 1998), et formée du monobrin non segmenté d'ARN négatif (environ 15000 nucléotides), associé à la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P et la polymérase ARN-dépendante L. La protéine de matrice M forme une couche sur la face interne de l'enveloppe lipidique. Le génome code également pour deux protéines non structurales NS1 et NS2, ainsi que pour des facteurs régulateurs de la transcription M2-1 et M2-2 (Valarcher et Taylor, 2007).



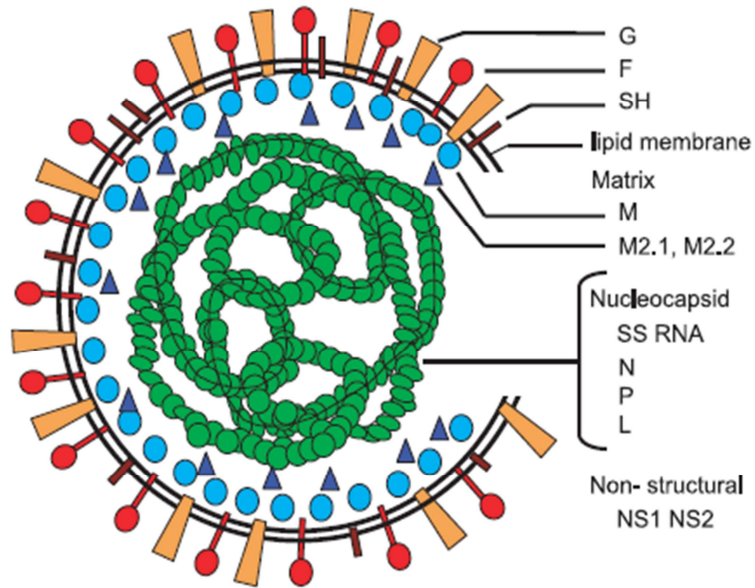


Figure 1 : Représentation schématique du VRSB, d'après Meyer et al., 2008.

#### I.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  $5 \cdot 10^6$  kDaltons. Cet ARN génomique comprend environ 15000 nucléotides et n'est ni coiffé ni polyadénylé (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, 1991) :

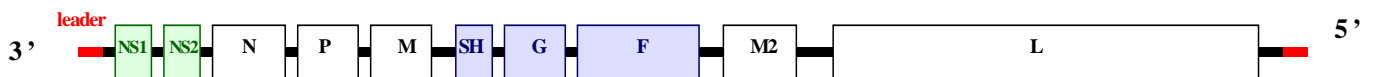


Figure 2 : Représentation schématique du génome du VRSB.

A ce jour, une seule souche de laboratoire (VRSB A51908) a été séquencée dans sa totalité (Buchholz, et al., 1999; Yunus, 2001). Par contre on dispose de plusieurs séquences

génomiques du VRSH. L'étude de ces différents génomes a permis de proposer une organisation générale comme suit :

- 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 pour le VRSH (région « leader » + signal d'initiation de transcription du gène NS1 + extrémité non codante de ce gène). En 5', le 2<sup>e</sup> 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)
- entre les régions 5' et 3', plus de 88% du génome code pour des protéines
- un signal d'initiation de transcription se trouve au début de chaque gène, la séquence est identique pour le VRSH et le VRSB (3' – CCCCCGUUUA) 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 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; Pastey, 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).

## I.5. Protéines virales (Valarcher et Taylor, 2007)

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) (Tableau 2).

	Protéine	Taille (en AA)	% d' AA identique au HRSV	Poids (kd)	Fonctions
NS1	Protéine non structurale 1	136	69	13.8	Inhibition et résistance aux interférons de type $\alpha/\beta$
NS2	Protéine non structurale 2	124	84	14.5	Inhibition et résistance aux interférons de type $\alpha/\beta$
F	Protéine de fusion	574	81	70	Fusion avec la membrane de la cellule hôte
G	Glycoprotéine	257	30	90	Attachement à la cellule hôte
SH	Petite protéine hydrophobe	73	38-34	7.5-60	Non définie
M	Protéine de matrice	256	89	25	Assemblage des virions
M2-1	Protéine de matrice 2-1	186	80	22	Facteur de terminaison de la transcription virale
M2-2	Protéine de matrice 2-1	95	43	11	Facteur de régulation de la transcription virale
N	Nucléoprotéine	391	93	45	Formation de la nucléocapside Résistance aux ARNases
P	Phosphoprotéine	241	81	33	Co facteur de la polymérase
L	Polymérase	2161	84	250	Transcription et réplication virale

*Tableau 2 : Caractéristiques principales des protéines du VRSB (d'après Valarcher et al., 2007)*

### *I-5-1. Les protéines non structurales NS1 et NS2*

Ces protéines non structurales sont caractéristiques des *Pneumovirus* au sein de la famille des *Paramyxoviridae*. Les gènes de ces deux protéines sont abondamment transcrits dans les cellules infectées mais NS1 et NS2 sont détectées en faible quantité dans les virions purifiés. Elles ne sont pas indispensables à la réplication *in vitro*, bien que la croissance de VRSH et VRSB recombinants délétés des gènes NS1/NS2 soit réduite.

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). Des études ont montré que ces NS1 et NS2 jouent un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse cellulaire par les interférons de type I (Teng *et al.*, 1999).

### *I-5-2. Les protéines d'enveloppe*

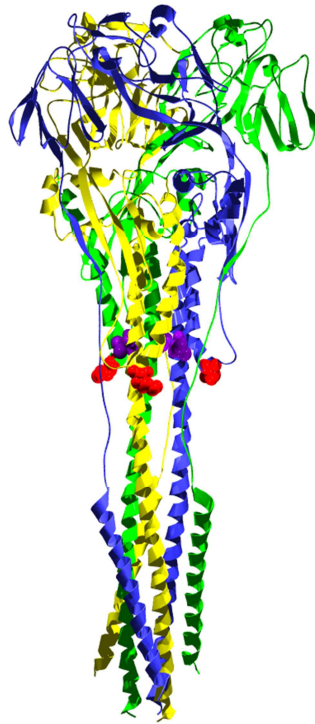
- la protéine de fusion F

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). Cette protéine, très conservée entre souches virales, est indispensable à la réplication du virus. Elle est présente sous forme de trimères dans l'enveloppe virale.

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 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). Elle 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. Le clivage permet de libérer, chez le VRSB uniquement, un peptide de 27 AA (Pep27) situé à l'origine entre les deux sous unités. Ce peptide serait un homologue des tachykinines, une famille de peptides bioactifs. (Valarcher et Taylor, 2007). 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 et les

cellules géantes multinuclées observées dans les cultures de cellules et dans les tissus infectés (Heminway, *et al.*, 1994).



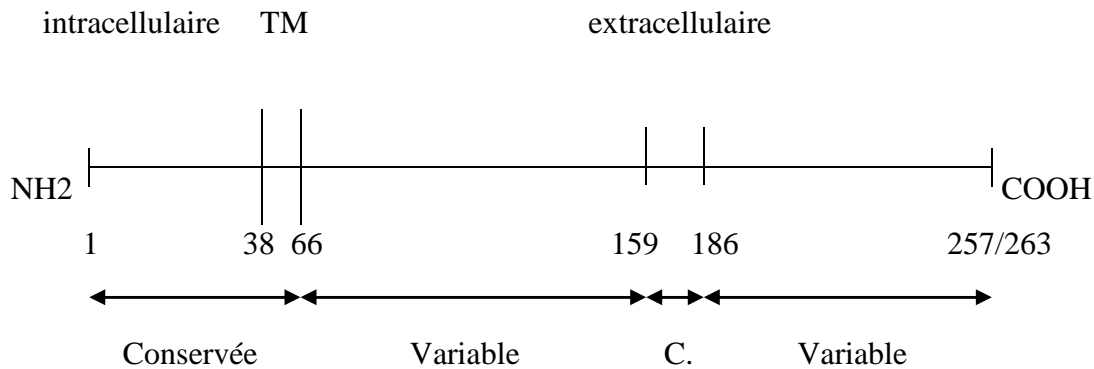
*Figure 3* : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la protéine F sous la forme d'un trimère.

- 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 (Open Reading Frame, cadre ouvert de lecture). 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 membranaire 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 maturation. La conformation structurale de la glycoprotéine G ressemble alors 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.

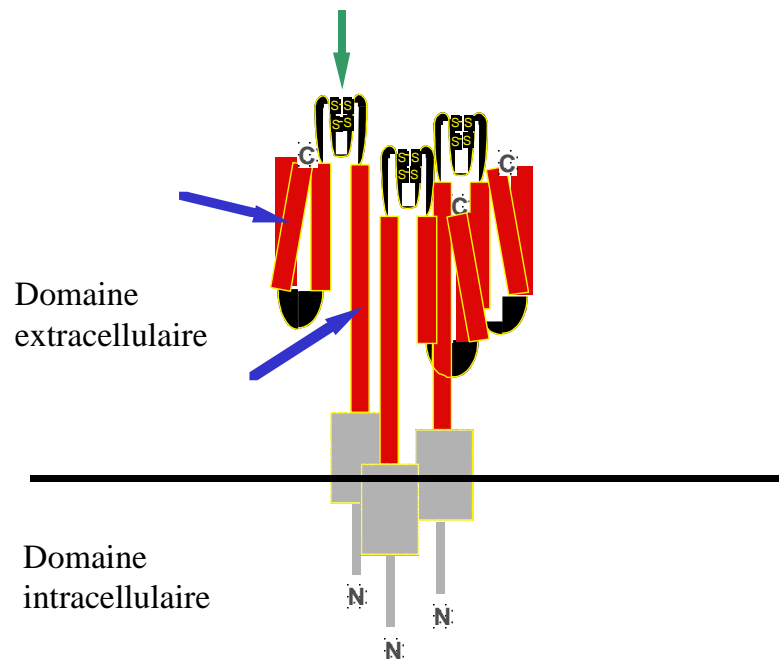


*Figure 4: Représentation schématique de la structure primaire de la glycoprotéine G du VRSB (TM: transmembranaire) (Larsen, 2000).*

La glycoprotéine G est extrêmement variable dans le 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 et 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.

La protéine G existe à l'état de multimère, ou 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.*

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). Cependant, il a été 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 (Karron, *et al.*, 1997). Cela montre alors que la protéine G n'est pas essentielle à la multiplication du virus *in vitro*.

*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 (Hendricks, *et al.*, 1987; Roberts, *et al.*, 1994). Cette forme sécrétée serait responsable de quelques manifestations cliniques lors d'une primo-infection par le VRSB (Graham, *et al.*, 2000). Cette dernière jouerait également le rôle de leurre pour le système immunitaire en se liant aux anticorps. Les autres implications de G dans la pathogénie seront développées plus tard.

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 anticorps monoclonaux spécifiques de F neutralisent presque tous l'infectiosité, alors que très peu d'anticorps monoclonaux spécifiques de G en sont capables, 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, certains sont des sites linéaires (Melero, *et al.*, 1997) ; 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, 1999). Pour le VRSB, il n'y a aucune donnée sur des sites antigéniques des protéines N et P.

- 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 l'extrémité C-terminale se situe dans le secteur extracellulaire. L'observation de cellules infectées montre que SH peut exister sous de nombreuses formes, glycosylées (SH<sub>g</sub>, SH<sub>p</sub>) ou non (SH<sub>o</sub>, SH<sub>i</sub>) (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. Elle ne semble pas essentielle à la répllication *in vitro* et *in vivo*, cependant 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).



### *I.5.3 Les protéines de nucléocapside*

- 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). Elle est présente en grande quantité dans le virion et les cellules infectées. 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).

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). De plus, la protéine N joue un rôle pour la transition de la phase de transcription à la phase de réplication virale (Mallipeddi, *et al.*, 1996).

- la phosphoprotéine P

Le gène codant pour la phosphoprotéine P est long de 860 nucléotides. 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 séquence contient un ORF 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 intervient comme une protéine chaperonne pour la protéine N soluble et intervient aussi comme facteur de régulation de la transcription, de la réplication et d'assemblage du virion (Khattar, *et al.*, 2001; Lu, *et al.*, 2002).

- la polymérase L

Le gène L est constitué de 6562 nucléotides et comporte un seul site d'initiation de lecture codant l'ARN polymérase ARN-dépendante. C'est le gène le plus long présent sur l'ARN génomique du VRSB, il représente d'ailleurs 60 % de ce génome. La polymérase est un polypeptide de 2161 acides aminés (Yunus, *et al.*, 1998). Cette protéine est une polymérase ARN dépendante. La polymérase L du VRSB partage 77% d'identité au niveau de la séquence nucléotidique du gène 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).

La protéine L est une polymérase ARN dépendante qui est responsable de la transcription et de la réplication virales.

#### *I-5-4 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 protéine de matrice M

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). Le pourcentage de conservation entre le VRSH et le VRSB pour la protéine M sont 74 % sur un plan nucléotidique et 89% sur le plan peptidique. Comme les protéines de matrice des autres virus de la même famille, la protéine M n'est pas glycosylée et ne possède pas de sites d'ancrage membranaire sur sa séquence (Collins *et al.*, 2001). Cette protéine est située à la surface interne de l'enveloppe virale, et joue un rôle important dans la formation des particules virales (Larsen LE, 2000).

- Les protéines M2-1 et M2-2

La séquence nucléotidique codant pour le gène M2 compte 958 à 962 nucléotides. Le gène M2 contient deux ORF. L'ORF principal est à l'origine d'une protéine M2-1 de 186 acides aminés correspondant à un poids moléculaire de 22 kDa ; le second ORF, qui chevauche le premier, code pour une protéine M2-2 potentiel de 95 acides aminés (Collins, *et al.*, 1990; Mallipeddi, *et al.*, 1990). Les pourcentages de conservation entre le VRSH et le VRSB pour le gène M2 sont de 69% sur le plan nucléotidique et de 80 % sur le plan peptidique (Samal et Zamora, 1992).

La protéine M2-1 a d'abord été considérée comme une protéine de matrice. Puis il a été démontré qu'elle pouvait se lier aux protéines N et P dans des inclusions cytoplasmiques (Garcia-Barreno *et al.*, 1996). Elle s'est révélée par la suite être un facteur d'anti-terminaison de la transcription, essentiel pour la viabilité virale (Fearn et Collins, 1999). M2-1 contient des motifs en doigt de zinc cystéine-histidine à son extrémité N-terminale, essentiels à cette activité d'anti-terminaison (Hardy et Wertz, 2000).

Le facteur de régulation M2-2 est codé par le second ORF, chevauchant le premier, du gène M2. Sa longueur est de 95 AA et son poids moléculaire de 11 kDa (Collins *et al.*, 1990 ; Collins *et al.*, 2001). La protéine M2-2 est peu abondante dans les cellules infectées mais sa quantité augmente pendant l'infection (Ahmadian *et al.*, 1999). Le gène M2-2 peut être délété dans un virus recombinant, il n'est pas nécessaire à la survie du virus. Mais en comparaison avec le virus sauvage, la transcription est augmentée tandis que la réplication est diminuée. M2-2 a donc un rôle dans la régulation de la synthèse d'ARN (Bermingham *et al.*, 1999).

## I.6. Cycle de réplication

### *I.6.1 Attachement et entrée du virus*

Des études montrent que la protéine G permettrait l'attachement non spécifique du virion à la surface de la cellule hôte par interaction entre son domaine « heparin-binding » et certains glycosaminoglycans (GAG) cellulaires (Teng *et al.*, 2001). En outre, l'étude de l'infection d'une lignée cellulaire épithéliale humaine a montré que la glycoprotéine G interagissait avec l'annexine II, grâce à une liaison « heparin-like », mais aussi avec d'autres protéines du surfactant (Malhotra *et al.*, 2003).

Cependant, Schendler *et al.* (2003) ont montré l'existence d'un autre mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte qui serait G-indépendant et impliqué dans la spécificité d'hôte du virus et dont le support serait la sous unité F<sub>2</sub> de la protéine de fusion F. L'hypothèse avancée est que G se lierait de façon non spécifique aux GAGs et faciliterait ainsi l'accès de la sous unité F<sub>2</sub> à un récepteur cellulaire spécifique.

La pénétration du virus se fait par fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire, fusion initiée par la protéine F. Par ailleurs, il a été montré que l'interaction de F avec la protéine cellulaire RhoA faciliterait la formation de syncytia et l'association entre RhoA et F pourrait intervenir dans l'étape de pénétration du virus dans la cellule (Pastey *et al.*, 1999). La nucléocapside est ensuite libérée dans le cytoplasme et la polymérase débute la transcription.

### *I.6.2 Transcription et traduction*

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, dans une proportion mineure, 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. L'existence de deux codons d'initiation de la transcription du gène G entraînerait aussi une diminution de l'efficacité de la transcription et de la traduction (Roberts, *et al.*, 1994).

### I.6.3 Réplication de l'ARN

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 protéines virales synthétisées présentes, principalement de la nucléoprotéine N, dans le cytoplasme, puisque les molécules d'ARN antigénomique sont encapsidées au fur et à mesure de leur synthèse.

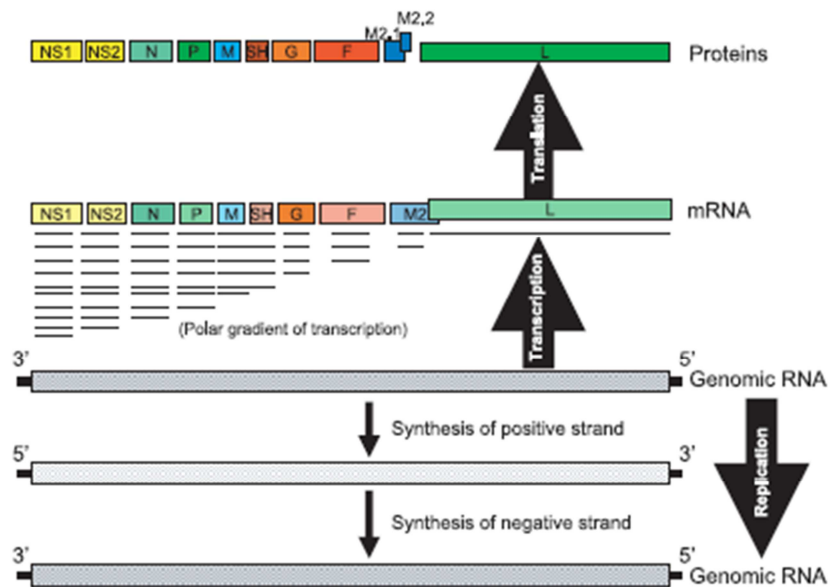


Figure 6 : Transcription, traduction et réplication de l'ARN viral (d'après Valarcher et Taylor, 2007).

### *I.6.4 Assemblage des virions*

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). 90% des virions produits sont associés à la membrane cellulaire (Stott, *et al.*, 1985).

Sachant que la dégradation des filaments d'actine cellulaire diminue drastiquement la production de particules infectieuses, le cytosquelette est probablement impliqué dans l'assemblage du virion (Burke *et al.*, 1998).

## **II. L'INFECTION PAR LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN**

### II.1 Epidémiologie

#### *II.1.1 Les espèces sensibles*

Le VRSB infecte une espèce hôte naturel : les bovins. Jusqu'à présent, la transmission interspécifique n'a pas été démontrée même si la possibilité d'une transmission entre hommes et bovins, ainsi qu'entre bovins et petits ruminants ne peut être écartée. L'infection par le VRSB n'est pas considérée comme une zoonose.

En milieu naturel, l'âge des animaux est un facteur prédominant par rapport aux signes cliniques. En effet, les signes cliniques sont surtout observés chez les jeunes de moins de un an (Elvander, 1996; Valarcher, 1999a). Le pic d'incidence des cas cliniques sévères est plutôt entre 2 et 7 mois d'âge (Grelle *et al.*, 2005a). Au Royaume-Uni, 70% des veaux ont été infectés à l'âge de 9 mois (Stott *et al.*, 1980). Dans la plupart des cas, la circulation de VRSB dans les élevages n'affecte avec gravité que les veaux (Van der Poel, 1994). Les signes cliniques sont parfois observés au sein de troupeaux adultes et l'infection peut alors induire de graves maladies respiratoires (Ellis *et al.*, 1995). Les formes sévères rencontrées chez des bovins adultes correspondent alors très probablement à une première exposition tardive au virus (Baker *et al.*, 1997b, Larsen, 2000a).

### *II.1.2 Prévalence de l'infection*

Le VRSB tient une place importante au sein du complexe des maladies respiratoires, et pourrait favoriser les maladies bactériennes secondaires. De nombreuses enquêtes épidémiologiques menées en Suède et au Danemark sur des élevages laitiers ont montré que 60 à 70 % des troubles respiratoires étaient liés au VRSB. En élevage allaitant, le VRSB a été associé aux troubles respiratoires dans 16 à 71% des cas (Stott *et al.*, 1980; Caldow *et al.*, 1988 ; Kimman *et al.*, 1988 ; Caldow *et al.*, 1993 ; Schelcher *et al.*, 1990), ce qui place cette pathologie au premier rang des pathologies respiratoires. En France, la séroprévalence du VRSB est supérieure à 60 %, sachant que 50% des animaux sont primo-infectés avant l'âge de 12 mois (Perrin *et al.*, 1979).

### *II.1.3 Mortalité et morbidité chez les bovins*

L'apparition de la maladie est brutale, et le temps d'incubation est de l'ordre de 3 à 5 jours en cas d'infection naturelle. L'infection s'étend rapidement au sein d'un cheptel sensible. La morbidité est très élevée, de l'ordre de 60 à 80%. La mortalité induite par le VRSB avoisine les 0,5-1% le plus souvent. Toutefois, dans certains cas, elle peut atteindre 20 %, avec des conséquences économiques sévères pour l'éleveur (Baker *et al.*, 1997a). En outre, certaines pneumonies bactériennes à l'autopsie auraient été initiées par une infection virale à VRSB (Larsen, 2000a).

### *II.1.4 Les voies de transmission*

Le mode de transmission du VRSB n'est pas encore clairement établi, cependant un contact étroit semblerait nécessaire. L'infection se transmettrait par voie aérienne à partir des sécrétions respiratoires des animaux infectés. La transmission par des aérosols infectieux a été confirmée, sur de courtes distances (Baker *et al.*, 1997b, Larsen 2000b, Mars *et al.*, 1999). Les animaux atteints sont donc les principaux vecteurs de la maladie. En conditions expérimentales, la durée d'excrétion serait de 4 à 12 jours post inoculation.

Jusqu'à présent, la contamination par transmission vectorielle n'a pas encore été démontrée, bien que la transmission vectorielle mécanique soit suspectée. De même, l'existence d'une transmission verticale n'a jamais pu être confirmée, bien que la présence d'anticorps anti VRSB dans le sérum fœtal ait été décrite (Gould *et al.*, 1978).

### *II.1.5 Saisonnalité de l'infection et persistance virale*

Chez les bovins, la saisonnalité de l'infection est marquée. En effet, le nombre de cas de VRSB est culminant en automne ainsi qu'en hiver (Baker *et al.*, 1985). Cette saisonnalité serait due aux changements climatiques et notamment aux baisses de température (Mahin et Shimi, 1982 ; Key et Derbyshire, 1984) et de pression atmosphérique (Wellemans et Leunen, 1975). Pendant les autres saisons, les infections primaires sont rares mais on peut assister à des épisodes cliniques suite à une réinfection.

Certains élevages sont victimes d'épidémies récurrentes sans que le virus semble être présent entre les épisodes cliniques. Ces observations ont conduit à mener des études sérologiques au sein d'élevages confinés ; les résultats étaient en faveur d'une persistance virale chez certains individus plutôt que d'une circulation du virus à bas bruit au sein de l'élevage. En 2001, Valarcher *et al.* ont mis en évidence la présence du virus sous forme d'ARN viral dans les nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux de veaux, 71 jours après infection expérimentale. Toutefois, la réactivation et la réexcrétion du VRSB à partir de ces animaux n'a jamais été démontrée. L'ARN viral a été également isolé dans les lymphocytes B des animaux.

## II.2 Signes cliniques

L'incubation de la maladie est estimée entre 2 et 5 jours. L'infection par le VRSB peut être asymptomatique (subclinique), se limiter à une atteinte des voies respiratoires supérieures, ou atteindre les voies respiratoires inférieures.

Dans 21 % à 47 % des cas, l'infection est subclinique (Baker, 1985).



Lors d'infection clinique, les signes les plus fréquemment observés sont :

- un syndrome fébrile : hyperthermie élevée (supérieure à 40°C), baisse modérée de l'état général, anorexie, baisse de la production lactée, muflle sec. 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 : un larmolement, 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 (fréquence respiratoire supérieure à 60 mpm), une augmentation des bruits à l'auscultation (sifflements, crépitements, expiration en grognement) 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. Dans certains cas, elle évolue de manière brutale lors d'une atteinte du tractus respiratoire distal. Ceci se manifeste par une broncho-pneumonie avec emphysème, aggravée d'une obstruction bronchique (Belknap, 1993). Parfois, la bronchiolite est si grave qu'elle est qualifiée de « syndrome de détresse respiratoire aiguë » : l'animal se tient debout, les membres écartés, la tête basse, l'encolure tendue et la bouche ouverte avec plainte expiratoire. Il est incapable de bouger ou de s'alimenter et fait d'énormes efforts pour respirer (Horzinek, 1990). De la mousse parfois mêlée à du sang se forme dans la bouche du veau et un bruit de cornage est parfois audible. Dans certains cas, un emphysème sous-cutané peut s'installer (Belknap, 1993).

Une évolution biphasique est décrite chez les veaux de races à viande : l'atteinte respiratoire modérée avec syndrome fébrile est suivie d'une pseudo-rémission clinique. Quelques jours plus tard, les animaux rechutent avec une sévère détresse respiratoire (Baker *et al.*, 1997b, Belknap, 1993, Elvander 1996).

Les différents tableaux cliniques peuvent être observés dans un même élevage.

L'observation de ces signes cliniques est modulée par de nombreux facteurs tels les particularités anatomiques, physiologiques et immunitaires du jeune par rapport à l'adulte, la virulence de la souche virale du VRSB, les déficits immunitaires congénitaux ou acquis ainsi que les surinfections bactériennes.

Les symptômes observés lors d'infections expérimentales sont généralement d'intensité plus faible que lors d'une infection naturelle (Otto, 1996).

## II.3 Lésions

### *II.3.1 Lésions macroscopiques*

Lors d'infections expérimentales, il y a peu de changements macroscopiques durant les 5 premiers jours post-inoculation, ils s'effectuent majoritairement entre le 5<sup>e</sup> (J5) et le 8<sup>e</sup> (J8) jours (Bryson, 1978b; Castelman, 1985b; Mohanty, 1975).

Chez les veaux morts de syndrome de détresse respiratoire aiguë, un non affaissement du poumon est souvent constaté à l'ouverture de la cage thoracique, expliqué par l'emphysème pulmonaire.

La muqueuse nasale, la trachée et les bronches sont très hyperhémisées surtout lors des premières phases de la maladie.

Une densification pulmonaire modérée atteint les lobes pulmonaires cranio-ventraux qui sont alors de couleur brique à lie de vin avec un aspect luisant à la coupe. Du mucopus s'écoule des bronches. Le septum interlobulaire apparaît souvent épais en raison de l'œdème prononcé présent dans les poumons.

Les lobes pulmonaires caudo-dorsaux sont le plus souvent distendus à cause de l'emphysème alvéolaire, interstitiel et sous pleural (Larsen, 2000). Les nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux sont hyperplasiques, œdémateux et parfois hémorragiques (Bryson, 1983). Si la maladie est compliquée de sur-infections bactériennes, la densification du parenchyme pulmonaire est plus marquée et de la fibrine peut être observée. 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).

### *II.3.1 Histopathologie*

De manière générale, les lésions microscopiques sont des lésions de bronchiolite proliférative et exsudative avec obstruction alvéolaire et infiltration lymphocytaire péribronchiolaire. Mais elles varient beaucoup en fonction du stade de la maladie et peuvent être masquées par une sur-infection bactérienne.

En région cranioventrale du parenchyme pulmonaire, les lésions du VRSB se caractérisent par une pneumonie broncho-interstitielle et une bronchiolite sévère, avec hyperplasie épithéliale et présence de neutrophiles, de macrophages et de cellules épithéliales dans la lumière bronchique (Castelman, *et al.*, 1985a). Le grand nombre de cellules syncytiales dans les muqueuses nasale et trachéale ainsi que dans les épithéliums alvéolaire et bronchiolaire est caractéristique et donne son nom au virus ; (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 (bronchiolite nécrosante oblitérante). Des syncytia contenant des inclusions éosinophiliques peuvent être présents dans les alvéoles, principalement chez les veaux (Horzinek *et al.*, 1990).

Bronchiolite, syncytia et antigènes viraux sont apparemment absents des zones caudo-dorsales, les lésions qui y sont présentes sont plutôt alvéolaires et emphysémateuses (Baker *et al.*, 1997a). L'emphysème pulmonaire n'est pas une lésion pathognomonique de l'infection par le VRSB, c'est juste une manifestation fréquente (Fields Virology, 2006).

## II.4 Diagnostic

Un diagnostic uniquement basé sur la symptomatologie est difficile, car les troubles respiratoires sont généralement peu spécifiques. Seul un diagnostic de laboratoire peut confirmer une suspicion d'infection par le VRSB dans un élevage.

Les résultats obtenus doivent être interprétés en tenant compte de plusieurs paramètres :

- l'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.
- Le site de prélèvement et sa qualité : le VRSB est très fortement lié aux cellules donc un prélèvement contenant peu de cellules est peu utilisable pour une analyse virologique.
- Le conditionnement des prélèvements : le VRSB est très labile et fragile, une conservation sous froid négatif est préférable à la température ambiante.
- La sensibilité de la technique utilisée
- Le délai entre le début des signes cliniques ou la mort et la réalisation des prélèvements, et le 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 détection d'antigènes viraux ou de l'ARN viral chez les animaux vivants et la détection par immunomarquage sur coupe de poumons chez les animaux morts.

#### *II.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 gêne 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 présentes 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 VRSB : l'écouvillonnage nasal (EN), l'aspiration trans-trachéale (ATT) et le lavage broncho-alvéolaire (LBA). Les prélèvements issus du tractus respiratoire profond (LBA) semblent être les 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).

- Isolement viral : c'est la technique classique mais elle très peu utilisée en routine compte tenu de la grande fragilité du virus et des difficultés de conditionnement et de conservation jusqu'au laboratoire (Smith *et al.*, 1974).
- Détection d'antigènes viraux : c'est la technique la plus utilisée en phase aiguë de l'infection. La contamination des prélèvements par des bactéries ou des champignons 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 (Collins, 2001).
  - ✓ Des techniques d'immunochromatographie ont été développées pour disposer de tests de terrain pour le VRSH, avec de bonnes spécificité et sensibilité. Certains de ces tests sont utilisés pour le VRSB. Il existe maintenant un test vétérinaire spécifique (test Speed® ReSpi VB, Bio Vet Test). L'intérêt de ce test de terrain est qu'il est réalisable par le vétérinaire praticien de manière immédiate avec l'obtention rapide (20-30 minutes)

d'un résultat. Ce test rapide et fiable permet de s'affranchir des analyses de laboratoire longues et coûteuses. Toutefois sa sensibilité et sa spécificité est moins bonne, par rapport aux tests ELISA de laboratoire. La conservation des prélèvements à +4 °C pendant 12 heures ne réduit pas la sensibilité du test (West, 1998).

- Détection de l'ARN viral : la technique de transcription réverse suivie d'amplification génique est intéressante notamment lors d'amplification d'un segment de gène peu variable comme celui de la nucléoprotéine (Larsen, *et al.*, 1999). La conservation des prélèvements (sécrétions nasales) à + 4°C pendant 12 heures ne réduit pas la sensibilité de la RT-PCR (West, 1998). 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, contre 9 jours par les techniques d'isolement viral et d'immunofluorescence indirecte (Valarcher, 1999). La RT-qPCR ou RT-PCR en temps réel permet d'augmenter la spécificité et la sensibilité par rapport à la RT-PCR, et pourrait ainsi être utilisée pour la détection de virus à partir d'un pool de prélèvement, ainsi que pour quantifier la charge virale détectée. Lors d'infection expérimentale, la détection du VRSB par RT-qPCR est possible de 3 à 17 jours à partir des bronches et de 2 à 13 jours à partir d'écouvillons nasaux (Meyer *et al.*, 2011).

### *II.6.2. Animal mort*

A l'autopsie, la mise en évidence des antigènes viraux peut se faire par des techniques de RT-PCR (fragment de parenchyme pulmonaire frais ou congelé) ou d'immunofluorescence (IF) sur des coupes de poumon frais ou congelé. Des techniques immunoenzymatiques peuvent être utilisées sur le mucopus présent dans les bronches (test Speed ReSpiVB®).

L'examen histologique permet de visualiser des lésions de bronchiolite interstitielle d'origine virale. En raison de la grande labilité du virus, les techniques utilisées sur les animaux morts sont la mise en évidence d'antigènes par immunochromatographie (test Speed® ReSpi VB, Bio Vet Test) sur mucopus ou par RT-qPCR. Les prélèvements doivent

être effectués de préférence dans les lobes cranio-ventraux des poumons car les régions les plus caudales sont pauvres en antigènes viraux (Kimman, *et al.*, 1989a). La réussite du diagnostic est surtout conditionnée par la fraîcheur du prélèvement.

## II.5 Prévention médicale

Les objectifs de la vaccination contre les viroses respiratoires sont : la protection clinique des animaux vaccinés pour limiter les pertes chez les jeunes bovins, et la protection virologique permettant de limiter la circulation du virus dans et entre élevages. Dans le cas du VRSB, il s'agit de stimuler une réponse immunitaire efficace pendant la période critique, en fonction de l'âge de l'animal (entre 1 et 6 mois) et de la saisonnalité des infections (période automno-hivernale)

Si elle est le plus souvent essentielle dans la lutte contre les infections respiratoires, la prévention médicale doit être envisagée en association avec des mesures visant à réduire l'effet des facteurs favorisants sur la réceptivité et la sensibilité des bovins.

### *II.5.1 Problématique de la vaccination contre le VRSB*

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

- l'absence potentielle d'innocuité de certains vaccins, notamment les vaccins inactivés. En effet, dans les années 1960, des accidents sont survenus chez de jeunes enfants suite à la vaccination avec un vaccin anti-VRSH inactivé au formol. Ce vaccin ne s'est pas révélé protecteur, et a été à l'origine de troubles cliniques graves, chez les enfants vaccinés, lors d'une infection naturelle ultérieure (Openshaw *et al.*, 2005). Cette découverte d'une immunopathologie sévère induite par un vaccin explique qu'il n'existe actuellement pas de vaccins commerciaux contre le VRSH. Différentes hypothèses ont été émises, notamment l'hypersensibilité de type III, ainsi que l'orientation de la réponse immunitaire cellulaire des lymphocytes CD4+ vers une voie de type Th2. Sur le terrain, en 1999, l'autorisation de mise sur le marché d'un vaccin inactivé par la  $\beta$  propiolactone et adjuvé à l'hydroxyde d'aluminium (Vacoress<sup>ND</sup>) a été retirée en raison d'un nombre élevé de mortalités attribuées au VRSB et

survenues sur bovins vaccinés (environ 1/1000). Il n'a pas été possible de savoir si ces accidents étaient dus à un défaut d'efficacité ou d'innocuité du vaccin incriminé. Il semble que dans un cas au moins, un taux de mortalité élevé (30%) chez des broutards blanc-bleu belges préalablement vaccinés avec le Vacores<sup>ND</sup> a pu être associée à un défaut d'innocuité du vaccin (Schreiber *et al.*, 2000). Les vaccins vivants modifiés sont souvent considérés comme peu susceptibles d'induire une exacerbation des troubles cliniques car ils induisent une réponse immunitaire semblable à celle observée dans les conditions naturelles. Une forme clinique grave de VRSB a cependant été décrite suite à la vaccination par un vaccin vivant (Rispoval RS<sup>ND</sup>) (Kimman *et al.*, 1989c). La responsabilité du vaccin n'a cependant pas été démontrée.

- la nécessité de vacciner à un âge où le système immunitaire des veaux est immature : un vaccin efficace doit être capable d'induire une protection efficace pendant les premiers mois de vie puisque c'est à ce moment-là que s'exprime le pic d'incidence du VRSB. Le problème est donc de vacciner des animaux immatures immunologiquement, et possédant des anticorps maternels susceptibles de limiter la réponse vaccinale. Ce problème peut être contourné par la vaccination intra-nasale, en effet l'inhibition de la réponse vaccinale se fait essentiellement contre l'immunité générale. Une autre possibilité serait peut-être de vacciner les mères pendant la gestation puisque les anticorps maternels semblent être protecteurs pour le veau, pourvu qu'ils soient présents en grande quantité.
- la variabilité des souches virales par rapport aux différents vaccins. Le VRSB est, comme la plupart des virus à ARN, génétiquement variable, possédant un fort potentiel de variation et d'adaptation. Ce potentiel pourrait avoir des conséquences sur la capacité d'échappement du virus à la réponse immunitaire. Bien que les études sur la variabilité du VRSB aient montré l'existence de 4 groupes antigéniques et six groupes génétiques (Valarcher *et al.*, 2000), il n'existe actuellement aucune donnée montrant que les souches virales qui circulent aujourd'hui sont capables d'échapper à la réponse immunitaire induite par les vaccins commerciaux. Les vaccins actuels utilisent des virus entiers contenant l'ensemble des épitopes viraux des protéines immunogènes, l'apparition brutale de souches résistantes est donc peu probable, mais problème se pose pour le développement de vaccins sous-unités. Par ailleurs les



données actuelles suggèrent que la vaccination pourrait sélectionner progressivement au cours du temps des souches mutées dans les zones immunodominantes, où la pression de sélection est forte (Valarcher *et al.*, 2000).

### *II.5.2 Les vaccins contre le VRSB*

A l'inverse du VRSH, de nombreux vaccins contre le VRSB sont disponibles. Depuis 2000, un vaccin inactivé et de nouveaux vaccins atténués ont été mis sur le marché en Europe et sont distribués à raison de plusieurs millions de dose sans que les systèmes de pharmacovigilance ou les données du terrain n'aient enregistré de cas graves d'accidents liés à un défaut d'innocuité de ces vaccins. Cela suggère que ces vaccins inactivés et atténués sont sûrs quand ils sont administrés correctement dans le cadre de l'AMM.

Ces vaccins protègent cliniquement les animaux et permettent de limiter la circulation du virus. 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, environ 4-5 mois. Cinq formulations commerciales sont proposées en France : quatre utilisent la voie parentérale, et un vaccin utilise la voie intranasale. Les vaccins atténués utilisent des souches isolées en 1969 ou dans les années 1970 et le vaccin inactivé une souche virale isolée en 1990.

Vaccin	Type	Souche			Valences associées
		Nature	Date isolement	Type génétique	
<b>RISPOVAL RS® (Pfizer)</b>	Vivant modifié	RB94	1969	2	Aucune
<b>RISPOVAL RS-BVD® (Pfizer)</b>	Vivant modifié	RB94	1969	2	BVDV
<b>RISPOVAL 3® (Pfizer)</b>	Vivant modifié	375		3	BVDV bPI3
<b>RISPOVAL INTRANASAL RS-PI3® (Pfizer)</b>	Vivant modifié	375		I3	bPI3
<b>BOVILIS BOVIGRIP® (Intervet)</b>	Inerte	EV908	1990	Non déterminé	Manheimia haemolytica bPI3

Tableau 3 : Liste des vaccins VRSB commercialisés en France

Les vaccins inactivés utilisés chez les bovins aujourd’hui, emploient des adjuvants (saponine Quillaja) qui orientent la réponse immunitaire vers un type Th1 (Meyer *et al.*, 2008). 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).

### *II.5.3 La recherche et les futurs vaccins*

Deux types de vaccins sont à l'étude, les vaccins sous-unitaires, et les vaccins atténués construits par la technique dite de génétique inverse.

- Les vaccins sous-unités : ils sont en cours de développement en santé humaine, et à l'état de projet en médecine vétérinaire. Deux approches sont envisagées. La première utilise la protéine F, épitope majeur pour la production d'anticorps neutralisants. Une combinaison des voies d'administration parentérale et intranasale semble nécessaire pour obtenir une réponse protectrice satisfaisante (Meyer *et al.*, 2008). La seconde approche est basée sur l'élaboration d'une protéine recombinante comprenant l'épitope majeur de la région centrale de la protéine G. L'efficacité des candidats vaccins sous-unitaires contre le VRSH a été testée avec plus ou moins de succès soit en modèle rongeur, soit sur adultes et enfants âgés de plus de 12 mois. La principale problématique est leur innocuité potentielle chez le nourrisson et le jeune. L'avenir de tels vaccins passe par l'utilisation d'adjuvants qui orientent la réponse immunitaire vers une voie protectrice de type Th1.
- Les vaccins obtenus par génétique inverse : en recherche, l'utilisation de la génétique inverse a permis d'identifier certains facteurs de pathogénicité virale du VRSH et les cibles des nouveaux vaccins. Les souches vaccinales les plus prometteuses pour l'obtention d'un vaccin contre le VRSH ont en effet été obtenues par introduction dans le génome viral de mutations spécifiques d'atténuation ou de délétion de gènes pathogènes non essentiels (Collins *et al.*, 1999). Pour exemple, le candidat vaccin le plus abouti pour le VRSH est un virus VRSH délété du gène SH et muté en position nucléotidique 208, 404 et 1030 (gènes NS1 et NS2) du génome viral. En règle générale, les candidats vaccins ADN pour le VRSB donnent de bons résultats en modèle souris, mais l'efficacité est plus réduite chez l'hôte naturel (Taylor *et al.*, 2005).

### III. PATHOGENIE DE L'INFECTION AU VRSB

#### III.1 Les modèles expérimentaux

##### *III.1.1. Intérêts*

L'étude des infections par les VRS a nécessité de réaliser de nombreuses expériences chez l'animal.

Les premiers modèles expérimentaux ont été élaborés pour comprendre la pathogénie de l'infection virale à VRSH, mais aussi et surtout les mécanismes liés à l'immunopathologie induite par certains vaccins. Ainsi, les premiers échecs de vaccination chez l'homme (vaccin « lot 100 »), ont été à l'origine du développement de modèles expérimentaux d'infection à VRSH sur des rats des cotonniers (Prince *et al*, 1978) et des souris (Prince *et al*, 1979). Ces modèles se sont révélés être des outils indispensables, permettant d'aborder les mécanismes immunopathologiques provoqués par les VRS.

En vaccinologie humaine, les modèles de laboratoire sont aussi un lien indispensable entre les études sur cultures cellulaires et les essais de phase I. De plus, ils contribuent de façon essentielle aux tests précliniques d'innocuité dans le cadre de nouvelles approches vaccinales. Ces modèles doivent alors répondre à différents critères afin d'être pertinents. Ils doivent reproduire les symptômes respiratoires et la physiopathologie, les lésions pulmonaires, mais aussi permettre au virus de se multiplier au niveau des organes cibles et induire une réaction immunitaire de l'hôte similaire à celle survenant lors d'infection naturelle (Reinout *et al.*, 2011).

Pour le VRSB, la possibilité de pratiquer des infections expérimentales chez l'hôte naturel, le veau, est un atout majeur, bien que la lourdeur et le coût des manipulations freine l'utilisation de ce modèle. Par ailleurs, l'infection du veau par le VRSB est un modèle de pathologie comparée du VRSH chez l'homme.

### *III.1.2 Les différentes espèces modèles d'étude du VRSH*

Le choix des espèces utilisées dans les protocoles d'expérimentation dépend directement des objectifs poursuivis et du VRS étudié. En ce qui concerne le VRSH, il est en effet impossible qu'un seul modèle animal reproduise tous les aspects de la maladie humaine. La difficulté d'entretien des animaux et le coût de leur entretien sont également des facteurs influençant le choix de l'espèce dans les protocoles.

- Le modèle souris

L'entretien des petits rongeurs et carnivores (souris, vison, furet et rat des cotonniers) est plus aisé et moins coûteux. Ces animaux ont servi de modèles pour l'infection par le VRSH. A ce jour, il n'existe en effet aucune donnée concernant la capacité du VRSB à se multiplier chez les rongeurs. Le rat des cotonniers et les souris sont les plus utilisés bien qu'ils ne soient pas des espèces cibles, ce qui limite l'interprétation des résultats de ces modèles.

La souris est l'animal de laboratoire modèle. Elle permet une investigation poussée de la réponse immunitaire, car de nombreux outils sont disponibles. Ainsi, ce modèle a été très utilisé pour comprendre les mécanismes immunopathologiques induits par certains vaccins. Toutefois les souris ne sont pas sensibles cliniquement au VRSH et la multiplication du virus est restreinte chez cet animal. Par ailleurs, contrairement au rat des cotonniers, l'infection par le VRSH n'induit pas de lésions macroscopiques et microscopiques dans cette espèce.

La souris est aussi un modèle d'infection comparé à travers l'infection par le pneumovirus murin (PVM) (Reinout *et al.*, 2011).

- Les chimpanzés et macaques

Les chimpanzés sont les seuls animaux capables de reproduire la pathologie observée par le VRSH chez l'enfant. Toutefois leur disponibilité est étroitement réglementée. Les macaques représentent un modèle expérimental principal, voué à l'étude du VRSH, notamment en immunologie. Ils sont réceptifs à l'infection virale et font des signes cliniques minimes à modérés. Toutefois, la réglementation et les coûts limitent leur utilisation à des phases terminales de conception vaccinale.

- Les ovins

Ils ont été utilisés lors d'infections expérimentales avec le VRSO (Bryson *et al.*, 1988), le VRSH (Lapin *et al.*, 1993) et le VRSB (Lehmkuhl *et al.*, 1979 ; Trigo *et al.*, 1984 ; Sharpe *et al.*, 1990). Les ovins sont des animaux d'entretien plus facile que les bovins et de coût inférieur. Ainsi les protocoles réalisés peuvent compter un nombre plus important d'individus pouvant aller jusqu'à 40 animaux (Trigo *et al.*, 1984). Cela permet de réaliser des euthanasies séquentielles utiles en histopathologie notamment. L'âge des ovins utilisés est compris en général entre 1 semaine (Lehmkuhl *et al.*, 1979) et 2 ans (Bryson *et al.*, 1988). Leur grande taille facilite l'étude de la fonction pulmonaire, et le développement du poumon est similaire à celui de l'homme mais les outils moléculaires disponibles sont limités (Reinout *et al.*, 2011). Toutefois, dans le modèle ovin, les troubles lésionnels et cliniques sont toujours minimes avec le VRSB et quasi inexistantes avec le VRSH.

- Les bovins

Les bovins sont un modèle d'étude comparée du VRSH (Reinout, 2011) dans la mesure où la pathologie et la pathogénie des infections sont similaires pour ces deux virus. La réplication du VRSB chez les bovins est plus efficace et les signes cliniques respiratoires plus importants, en comparaison avec l'infection par le VRSH des espèces hétérologues que sont la souris et le chimpanzé.

L'utilisation de bovins nécessite des coûts relativement élevés et l'utilisation de structures adaptées.

### *III.1.2 Les protocoles expérimentaux d'infection des veaux par le VRSB*

Le bovin, hôte naturel, est logiquement l'espèce privilégiée pour l'étude du VRSB et surtout le veau car c'est le principal groupe d'âge atteint par le VRSB. Il en ressort que les données sur le VRSB ont principalement été obtenues après infections expérimentales chez l'hôte naturel. Nous limiterons donc notre étude des modèles expérimentaux à l'espèce bovine, espèce cible du VRSB et modèle de notre partie expérimentale.

Différents facteurs influent sur le succès d'une infection expérimentale à VRSB :

- Animaux

Le choix des animaux est directement influencé par les objectifs poursuivis par les expériences. Ainsi, l'importance de l'âge, du statut immunitaire et du statut infectieux de l'animal sont des facteurs essentiels.

Les protocoles d'infection expérimentale utilisent des veaux de 3 jours à 7 mois avec le plus souvent des inoculations entre 4 et 10 semaines d'âge (Bryson *et al.*, 1983 ; McNulty *et al.*, 1983). Dans les conditions naturelles, une grande diversité des signes cliniques a été rapportée en fonction de l'âge des veaux. Les infections expérimentales ont montré une expression clinique maximale pour des veaux de 3 à 6 jours (Bryson, 1983). Cependant, dans les conditions naturelles, les veaux de cet âge sont rarement atteints. Malgré l'importance de ce critère, aucun protocole expérimental n'a permis de comparer directement la pathogénie du VRSB suite à une infection expérimentale en fonction de l'âge des veaux.

Dans la majorité des expériences, les veaux sont élevés de façon conventionnelle. Une recherche d'agents pathogènes respiratoires majeurs (BHV-1, PI-3, BVDV, mycoplasmes, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*) est ainsi réalisée avant toute inoculation expérimentale pour garantir un statut sanitaire minimum des animaux. Pour le besoin de certaines expériences, des veaux exempts d'organismes pathogènes spécifiques sont rarement utilisés. Ces veaux sont obtenus par séparation immédiate de leur mère et du reste du troupeau dont ils proviennent dès la naissance puis sont entretenus en unités confinées, voire sous bulle. L'utilisation de tels animaux dans des locaux de niveau de biosécurité de type II permet d'éviter tout risque de contamination entre les animaux constituant les lots. Elle permet également d'éviter que des maladies intercurrentes ne viennent perturber l'étude de l'expression du VRSB sur les plans pathogéniques, cliniques et immunologiques et donc de modifier les résultats expérimentaux attendus. Il est à noter que cette situation s'éloigne quelque peu de ce qui est observé sur le terrain, où de nombreuses co-infections existent entre le VRSB et d'autres pathogènes.

Le statut sérologique des veaux vis-à-vis du VRSB est un point essentiel à maîtriser. Les résultats expérimentaux sur le plan immunologique sont en effet directement liés au statut immunitaire de l'animal au moment de l'inoculation. En raison de la forte prévalence du

VRSB, il est fort probable que les veaux utilisés ne soient pas séronégatifs s'ils ont consommés du colostrum. Les anticorps colostraux peuvent limiter l'intensité des signes cliniques et contrecarrer la réponse humorale induite (Belknap *et al.*, 1995). La maîtrise de ce statut paraît évidente lors d'expériences à visées vaccinales chez de jeunes veaux. Aucune expérience ne permet de conclure à l'heure actuelle sur les interactions entre la pathologie du VRSB (symptômes et lésions) et la qualité et la quantité en anticorps anti-VRSB du colostrum pris par le veau. Ainsi, les expériences utilisent souvent des veaux qui ne sont pas sous couvert colostrale afin de mieux maîtriser l'interprétation des résultats. Cela constitue une limite des modèles expérimentaux puisque, dans les conditions naturelles, la plupart des veaux possèdent des anticorps colostraux de façon extrêmement variable en titre comme en persistance.

Pour obtenir des veaux séronégatifs, plusieurs stratégies sont possibles :

- Une première solution consiste à priver les veaux de colostrum. Cependant, cela implique une surveillance et une protection très strictes des veaux dans des locaux spécifiques afin d'éviter que ces animaux particulièrement sensibles aux infections ne déclarent des maladies perturbant l'expérience.
- Une autre solution consiste à séparer les veaux de leur mère à la mise bas puis de ne les alimenter qu'avec du colostrum ne contenant aucun anticorps dirigés contre le VRSB. Ce type de colostrum est difficile à obtenir étant donné la forte prévalence du VRSB.
- La dernière solution consiste à attendre la disparition des anticorps maternels pendant une période de 3 mois en moyenne mais pouvant aller de 1 à 7 mois (Baker *et al.*, 1986) au cours de laquelle les veaux devront être protégés des infections naturelles pour éviter qu'ils ne produisent eux-mêmes cette fois des anticorps contre le VRSB.

- Origine et choix des souches expérimentales

Les souches expérimentales sont des souches le plus souvent isolées sur des animaux présentant des signes cliniques lors d'infection naturelle. Outre leur origine, les différences entre les inoculum résident dans la conservation, la technique d'amplification des souches virales (notamment le nombre de passages en cultures cellulaires), le titre viral et le contrôle des autres virus respiratoires pathogènes pouvant être présents. En cela, les expériences divergent beaucoup et ont abouti à des résultats contradictoires, allant d'une incapacité à



produire des signes cliniques à la reproduction, dans de rares cas, du syndrome de détresse respiratoire aiguë.

Il n'existe actuellement pas de publications comparant le pouvoir pathogène des différentes souches de VRSB. Les titres viraux (exprimés en UFP/ml ou en TCID<sub>50</sub>/ml) et les volumes utilisés pour l'inoculation peuvent être très différents selon les protocoles et notamment les voies d'inoculation. Ces titres viraux varient de 10<sup>3</sup> à 10<sup>5,2</sup> UFP/ml et de 10<sup>3</sup> à 10<sup>7,6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (Thomas *et al.*, 1984 ; Ellis *et al.*, 2001 ; Kimman *et al.*, 1987 ; Jacobs et Edington, 1975). Le contrôle de la présence de virus respiratoires majeurs dans l'inoculum est essentiel.

Les souches virales inoculées subissent des passages sur cultures cellulaires dans le but d'augmenter les stocks viraux. Le nombre de ces passages peut être très différent d'un protocole à un autre, de 3 à 23 fois (Jacobs et Edington, 1975 ; Thomas, 1984). Des passages sur veaux sont également parfois réalisés avant inoculation, jusqu'à 4 fois (Van der Poel *et al.*, 1996 ; Knott *et al.*, 1998 ; Antonis *et al.*, 2003). Une combinaison de 3 à 4 passages sur cultures cellulaires et de 3 à 4 passages sur veaux est également possible, indifféremment de l'ordre (Ellis *et al.*, 2001 ; Tjornehoj *et al.*, 2002). Il a été suggéré que le nombre de passages en cultures cellulaires atténue assez rapidement le pouvoir pathogène du VRSB. Les meilleurs résultats ont en effet été obtenus soit avec des souches à haut titre de virus et à faible nombre de passages en culture cellulaires, soit avec des souches « re-adaptées » par passages sur veaux avant utilisation. Le critère « préparation de la souche » semble donc être essentiel pour pouvoir reproduire expérimentalement la maladie.

- Inoculation

Différentes voies d'inoculation sont utilisées dans les modèles expérimentaux.

La procédure la plus couramment utilisée est l'inoculation par voie intra-nasale par dispersion en micro gouttelettes (Thomas *et al.*, 1981 ; Van der Poel *et al.*, 1996 ; Knott *et al.*, 1998). Celle-ci peut d'ailleurs être répétée plusieurs fois à quelques jours d'intervalles (Bryson *et al.*, 1983 ; McNulty *et al.*, 83 ; Kimman *et al.*, 1989). Elle doit être réalisée de façon atraumatique avec une contention efficace, afin d'éviter de blesser l'animal et de provoquer une perte d'inoculum par éternuement ou par simple jetage. L'utilisation stricte de l'inoculation par voie nasale permet l'apparition de signes cliniques de l'appareil respiratoire haut sans atteinte majeure de l'appareil respiratoire bas.

La voie d'inoculation intra trachéale exclusive est rarement utilisée (Kimman *et al.*, 1989), elle est plus souvent combinée avec une inoculation par voie nasale (Mohanty *et al.*, 1976 ; Belknap *et al.*, 1991). En effet, dans les conditions naturelles, le premier lieu de réplication virale est la muqueuse nasale, siège de l'induction primaire de la réaction immunitaire. La voie intra trachéale permet d'éviter les voies respiratoires supérieures et donc de limiter les pertes virales dues aux défenses de l'hôte et à la possibilité de rejet de l'inoculum. Cependant, elle s'éloigne des conditions naturelles de transmission du pathogène.

Une dernière voie utilisée plus récemment est la nébulisation de l'inoculum soit de manière individuelle à l'aide d'un masque à nébulisation soit par nébulisation collective. Dans ce dernier cas, les animaux sont placés dans une chambre ventilée en présence de deux nébuliseurs pendant 30 minutes. Cela permet de reproduire plus fidèlement ce qui se passe en cas d'infection naturelle (Ellis *et al.*, 2001). Le temps et le volume de nébulisation déterminent l'efficacité de la technique.

- Paramètres de suivi

Selon les objectifs poursuivis dans ces expériences, les suivis expérimentaux sont très différents.

- *Evaluation clinique et lésionnelle*

Les expériences ayant pour but d'étudier les caractéristiques cliniques et lésionnelles se basent sur un suivi clinique des animaux biquotidien le plus souvent. Afin de valider le suivi clinique et la pertinence des observations, ceux-ci se doivent d'être réalisés par une même personne présentant les compétences requises. Malgré l'importance de ce point, il est rarement précisé dans les publications.

L'examen clinique présente des éléments objectifs et des éléments d'appréciation subjectifs. Les éléments objectifs sont : la température, la fréquence respiratoire, la fréquence cardiaque. D'autres éléments sont laissés à l'appréciation du clinicien et sont donc soumis à sa subjectivité : l'intensité de la dyspnée, le comportement (abattement, etc...), l'appétit, l'intensité des bruits respiratoires et leur modification, la présence et l'intensité de la toux, de la conjonctivite, du jetage oculaire ou du jetage nasal. Les principaux paramètres étudiés sont la fréquence respiratoire et la température rectale.

Avant la fin des années 70, les modèles expérimentaux ne parvenaient qu'à reproduire des signes cliniques d'une intensité très modérée, loin des observations dans les conditions naturelles. Ainsi, afin de permettre une étude plus précise et rigoureuse de la clinique, des « scores cliniques » ont été établis afin de posséder un élément objectif et quantitatif de comparaison (Thomas *et al.*, 1977 ; Stott *et al.*, 1978) . Ces scores correspondent à la somme des notes attribuées pour différents signes cliniques, eux-mêmes notés différemment selon leur intensité ou leur gravité que ce soit de façon objective quantitative (fréquences cardiaque et respiratoire, température....) ou subjective qualitative (abattement, dyspnée....). De plus, des coefficients peuvent venir se rajouter pour pondérer les notes respectives des différentes observations de l'examen clinique. Parfois, des données hématologiques ou biochimiques (ex : gaz du sang) peuvent venir compléter les données établissant les scores cliniques (Elazhary *et al.*, 1981 ; Ellis *et al.*, 2001) . Une échelle de scores cliniques de 0 à 5 par pas de 1 a également été utilisée, chaque note correspondant à une description succincte tenant compte de l'état général et l'atteinte respiratoire de l'animal (Ellis *et al.*, 2001). L'absence de suivi clinique « type » ou de modèle de « score clinique » identiques entre les expériences limite souvent leur comparaison.

L'évaluation lésionnelle est réalisée macroscopiquement et microscopiquement en fin d'étude. La description se limite alors le plus souvent à l'évaluation du pourcentage de parenchyme présentant une coloration rouge foncée, une induration plus ou moins marquée et un affaissement (Thomas *et al.*, 1984 ; Ellis *et al.*, 2001) . Rarement, un score lésionnel succinct peut être présenté pour permettre une comparaison raisonnée entre les lots. L'échelle la plus communément utilisée est alors une échelle de notes de 0 à 5 par pas de 1, fonction du pourcentage de parenchyme modifié (Tjornehoj, 2003). L'atteinte lésionnelle peut être étudiée en parallèle avec des signes cliniques comme la pression artérielle en dioxygène (Ellis *et al.*, 1998).

Les études au cours desquelles une euthanasie séquentielle a été réalisée montrent que les lésions les plus marquées apparaissent avant J10 (Bryson *et al.*, 1983) et qu'elles disparaissent après J17 (Castelman *et al.*, 1985).

### - Sérologie

Avant l'inoculation, le statut immunitaire des animaux est évalué grâce à des sérologies sanguines. Selon le statut sérologique des veaux en début d'expérience, une interaction est possible avec les anticorps maternels. La plupart des études se limitent à une étude de la réponse humorale. La fréquence des prises de sang pour le suivi sérologique est très différente selon les modèles expérimentaux. Les prises de sang peuvent être quotidiennes ou réalisées à des dates clés à raison d'une série avant inoculation puis à intervalles réguliers pour des expériences longues (Ellis *et al.*, 2001 ; Tjornehoj *et al.*, 2003). L'importance du suivi immunologique dans le protocole de départ justifie la réalisation de ces prélèvements. La recherche se concentre sur les anticorps anti-VRSB par des dosages des IgG ou des IgM. L'INF $\gamma$ , libéré lors de la réponse immunitaire cellulaire, est parfois recherchée (Ellis *et al.*, 2001).

### - Virologie

Il n'existe pas de phase virémique dans la maladie, le VRSB étant restreint à l'appareil respiratoire. La détection du VRSB est réalisée à partir d'écouvillons nasaux ou de lavages broncho-alvéolaires. Un suivi de l'excrétion virale est réalisé de façon qualitative ou bien de façon quantitative. Les écouvillons nasaux permettent un suivi quotidien de façon non invasive et n'influencent donc pas l'expression clinique. Malgré tout, ils se limitent à l'étude de l'atteinte des voies respiratoires hautes et présentent une sensibilité limitée. Les aspirations trans-trachéales (ATT) ainsi que les lavages broncho alvéolaires (LBA) sont réalisés afin de mettre en évidence la présence du virus dans les voies respiratoires basses, mais ils présentent l'inconvénient d'être invasifs et ainsi de risquer de moduler l'expression clinique.

L'analyse des écouvillons nasaux après expression peut être différée par conservation dans différents milieux comme du trizol afin de réaliser ultérieurement des tests de type RT-PCR. Des tests rapides d'immunocapture d'antigènes peuvent être réalisés immédiatement après écouvillonnage pour évaluer qualitativement la présence de VRSB par détection d'antigène.

L'immunofluorescence peut également être utilisée pour la détection d'antigènes mais elle est plus complexe et moins rapide à mettre en œuvre. De plus, elle est moins sensible et spécifique que l'immunocapture d'antigènes.

La réalisation de RT-PCR qualitative ou bien quantitative permet un suivi virologique de l'infection expérimentale. Ainsi, le virus peut être détecté jusqu'à 17 jours post-infection dans le poumon (Valarcher, 1999). Cependant, la plupart des veaux apparaissent négatifs à 12 jours post-infection. Des analyses pulmonaires post-mortem sont parfois réalisées. Ces analyses peuvent être écartées de plusieurs semaines par rapport à l'inoculation et du début de l'apparition des signes cliniques, ce qui limite l'interprétation en cas de réversibilité des lésions. A partir des prélèvements virologiques réalisés, des analyses du génome viral par séquençage sont parfois réalisées.

- Apports à l'étude du virus respiratoire syncytial bovin

De nombreuses connaissances sur le tropisme cellulaire (Castelman *et al*, 1985a ; MacNulty *et al*, 1983) et la réaction immunitaire vis-à-vis du VRSB ont été permises grâce au développement des modèles expérimentaux. L'apparition des anticorps (Elazhary *et al*, 1981) et la cinétique des différents isotypes (Kimman *et al*, 1987) ainsi que le pouvoir protecteur des anticorps colostraux (Kimman *et al*, 1987 ; Belknap *et al*, 1991) ont été étudiés. Quelques études expérimentales ont également permis l'étude des caractéristiques de l'immunité cellulaire (Taylor *et al*, 1995 ; Thomas *et al*, 1996).

Sur les plans cliniques et lésionnels et malgré de nombreux modèles expérimentaux proposés, les résultats se sont souvent avérés insatisfaisants (Jacobs et Edington, 1975 ; Bryson *et al.*, 1983; Thomas *et al*, 1984; Otto *et al*, 1996; Van der Poel *et al*, 1996 ; Ellis *et al*, 2001). Les signes cliniques ne sont souvent que transitoires, de faible intensité, limités aux voies respiratoires supérieures et ne sont souvent observés que sur une fraction des animaux inoculés. Au niveau macroscopique, les lésions sont rarement observées et souvent de faible intensité et d'extension modérée. Sur le plan clinique, les meilleurs résultats ont été observés avec des souches à faible nombre de passages en cultures cellulaires (4-7), à un titre élevé ( $>10^5$  à  $10^6$  UFP/ml), avec une combinaison de voies d'inoculation (voie intranasale et endotrachéale), pendant 3 à 4 jours consécutifs sur de jeunes veaux (<2 mois) séronégatifs. Dans ces conditions, on observe aucune mortalité mais après 3 à 5 jours d'incubation peut apparaître un syndrome fébrile, des troubles respiratoires associés à de la polypnée et de la dyspnée, ainsi que des lésions macroscopiques d'extension légère à modérée (15 à 20 % de la surface pulmonaire) (Belknap *et al*, 1991 ; Ciszewski *et al*, 1991). Récemment, des modèles expérimentaux d'infection utilisant des souches virales préalablement passées sur veaux et

inoculées à l'aide de nébuliseur ont permis de reproduire des signes cliniques proches de ceux obtenus dans les conditions naturelles, obligeant même l'euthanasie prématurée de quelques individus (Tjernehoj *et al*, 2003). Même si il n'existe encore aucune explication, une atténuation du pouvoir pathogène du VRSB lors de passage en cultures cellulaires semble être mise en cause comme c'est déjà le cas à propos d'autres virus comme le virus de la fièvre aphteuse (FMDV) ou le virus de la diarrhée bovine virale (BVDV). Une étude a comparé la pathogénie d'une souche passée sur veau ou sur un faible nombre de passages en cultures cellulaires (Le Mercier, thèse, 2003). Il en ressort un allongement de la période d'incubation pour la souche passée sur cellules sans différences significatives pour les scores cliniques. Le même type d'expérimentation devrait être réalisé avec un nombre de passages plus important en cultures cellulaires.

## III.2 Pathogénie de l'infection par le virus respiratoire syncytial bovin

### *III.2.1 Cinétique de l'infection*

Chez le veau, il semblerait que l'incubation soit de 4 à 5 jours après l'infection expérimentale par voie nasale (Thomas *et al*, 1984b ; Belknap *et al*, 1995). Le virus VRSB peut être isolé dans les sécrétions nasales entre 1 et 10 jours après l'infection (Elazhary *et al*, 1981) et dans les muqueuses trachéales et bronchiques entre 3 et 10 jours post-infection (Jacobs et Edington, 1975 ; Castelman *et al*, 1985a). Ensuite, la quantité de virus vivant ou d'antigène détectables commencent à diminuer. Généralement, on ne retrouve plus de virus ni d'antigène 15 jours après l'infection (Grell *et al.*, 2005a).

La contamination de l'animal s'effectue par les voies nasales supérieures en conditions naturelles. A partir de la muqueuse nasale, le virus se dissémine dans le reste de l'appareil respiratoire par aspiration des mucosités et des sécrétions contenant des particules virales. La protéine F est à l'origine de la fusion entre les cellules infectées et non infectées voisines entraînant ainsi la formation de syncytia et permettant la colonisation du virus sans passage par le milieu extra cellulaire. Ce mode de contamination permet au virus d'échapper à la réaction immunitaire humorale de l'hôte (Collins, 2001). Il ne semble pas exister de phase de virémie, le virus reste localisé dans le tractus respiratoire.

### III.2.2 Tropisme cellulaire

Le tropisme cellulaire du VRSB est limité aux cellules de l'appareil respiratoire. Parmi ces cellules, ce sont surtout les cellules de l'épithélium qui sont touchées. Ainsi, on retrouve du VRSB dans les cellules épithéliales nasales, trachéales, bronchiques ainsi que dans les pneumocytes alvéolaires de type I et II (Castelman *et al*, 1985 ; Mac Nulty *et al*, 1983 ; Bryson *et al*, 1991). Cependant des particules virales sont détectées dans les macrophages (Castelman *et al*, 1985a ; Addair et Mac Nulty, 1992) et les éosinophiles (Olszewska-pazdrak *et al*. 1998), mais la réplication virale semble limitée dans ces cellules.

Le VRSB provoque une bronchiolite nécrosante obstructive évoluant progressivement vers une forme restrictive. Les effets cytopathiques directs du virus se manifestent au niveau de l'épithélium pulmonaire par de la mortalité cellulaire, contribuant à l'obstruction des voies respiratoires, et par la perte de fonctions spécialisées telles que la motilité ciliaire (Openshaw et Tregoning, 2005). Cependant, lorsque l'on infecte des cellules de l'épithélium respiratoire *in vitro*, peu d'effets cytopathiques sont observés, ce qui suggère que la réponse de l'hôte est primordiale dans le développement de la maladie (Valarcher et Taylor, 2007).

### III.2.3 La réponse non spécifique de l'hôte à l'infection naturelle

La réponse innée locale joue un rôle majeur dans la pathogénie de l'infection virale. Elle implique la réponse inflammatoire, les conséquences de l'infection sur la réponse cellulaire antivirale et les interactions entre VRS et cellules présentatrices des antigènes. La réponse inflammatoire est confirmée par la présence de médiateurs inflammatoires non spécifiques retrouvés dans le liquide de LBA, entre autres les thromboxanes, les cytokines et les prostaglandines (Gerschwin *et al.*, 1989). Brièvement (Figure 7), l'infection des cellules épithéliales et des cellules dendritiques plasmacytoïdes activent la sécrétion de la réponse en interférons de type I, bien que le virus possède la capacité de limiter cette réponse via les protéines NS1 et NS2. Les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires présentent les peptides viraux principalement dans un contexte de type CMH-II. Ces cellules sont par

ailleurs activées par le virus via l'interaction avec les PAMPs, plus spécifiquement via l'interaction de la glycoprotéine F avec le TLR4. La cascade d'activation, par le chemin d'activation NF- $\kappa$ B, aboutit à la transcription et la traduction de nombreuses cytokines et chimiokines. Ces chimiokines sont aussi produites par les cellules épithéliales et ciliées infectées. Des taux élevés d'ARNm pour les IL-12, IL-6, IL-8, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IFN $\alpha$  et IFN $\beta$  ont ainsi été détectés dans les lésions pulmonaires de veaux infectés expérimentalement (Valarcher and Taylor, 2007). La nature du profil cytokinique va avoir des conséquences directes sur la nature de la réponse immunitaire spécifique induite et le développement de la pathologie, en dirigeant la réponse T auxiliaire vers une voie Th1 ou Th2 (Gershwin, 2010).

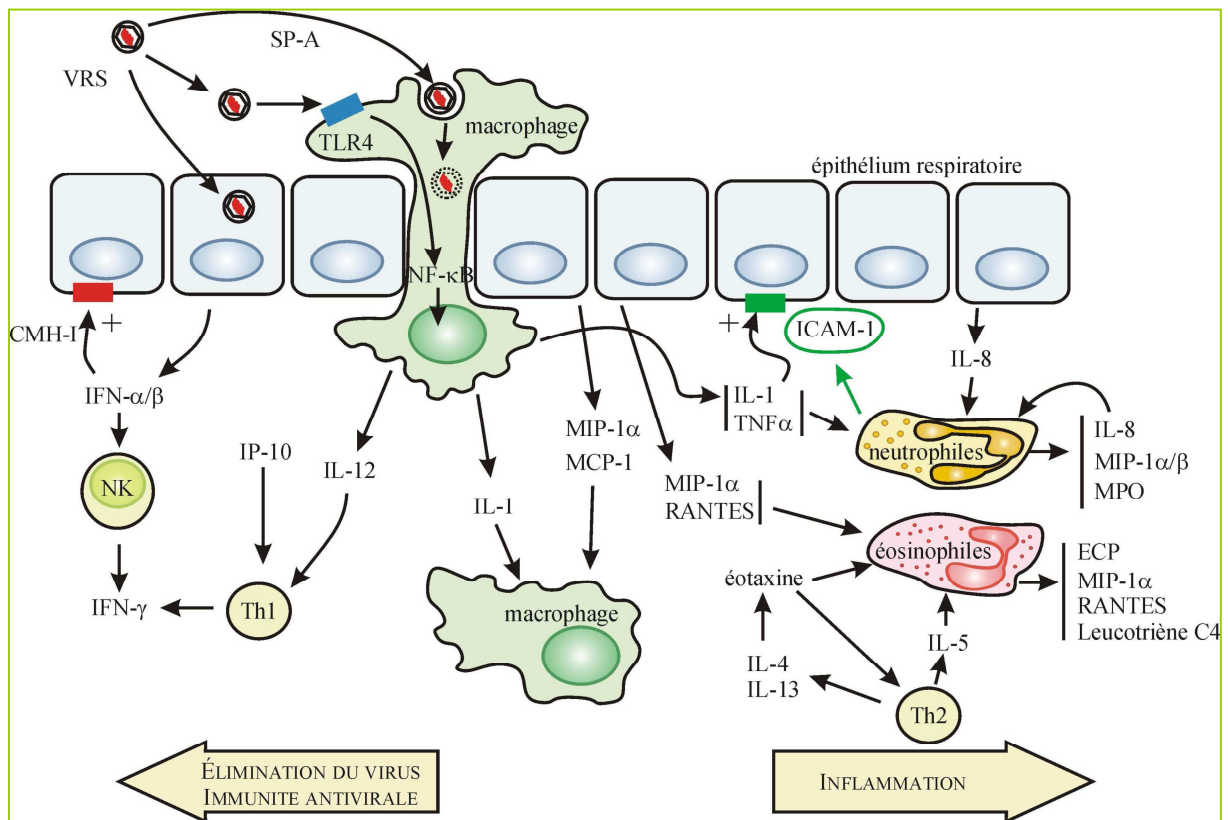


Figure 7: Réponse innée à l'infection naturelle, d'après Meyer, 2008



### III.2.4 La réponse immunitaire spécifique

- La réponse immunitaire spécifique humorale

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 anamnestic 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.

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). 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). Le rôle protecteur des anticorps maternels est discuté dans la mesure où le virus est capable d'infecter des individus sous couvert de l'immunité passive. Cependant, des études ont montré que chez le veau, l'ingestion de colostrum provenant de mères séropositives pour le VRSB et vaccinées contre le VRSB diminue la gravité des signes cliniques suite à l'inoculation expérimentale (Belknap *et al.*, 1991). Cependant la durée de la protection par les anticorps maternels reste inconnue, ainsi que le titre d'anticorps nécessaire à un effet clinique. Par ailleurs, 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.

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). Toutefois, l'infection par le VRSB étant limitée à l'épithélium de l'appareil respiratoire, les anticorps sériques neutralisants ne peuvent agir sur le VRSB au cours de l'infection précoce. 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 anticorps neutralisants sont majoritairement des IgG2, mais aussi des IgG1 et IgM. 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).

La présence d'anticorps au niveau de la muqueuse nasale est essentielle pour limiter l'infection des voies aériennes supérieures. Cette protection repose sur la présence locale d'IgA, d'IgM, et d'IgG (Meyer *et al.*, 2008). Les anticorps locaux auraient un rôle majeur lors de réinfection. Les IgA sont peu neutralisantes *in vitro* mais leur rôle supposé est de piéger le VRSB dans les mucosités et de favoriser son élimination en synergie avec les cellules Natural Killer et les LTC.

- L'immunité à médiation cellulaire

La réponse de type T cytotoxique est essentielle dans l'élimination virale. Elle est principalement dirigée chez le veau contre la nucléoprotéine N et, dans une moindre mesure contre F. Une activité lymphocytaire T cytotoxique CD8+ spécifique peut être mise en évidence dans le sang des animaux 7 à 10 jours après infection expérimentale par le VRSB et dans les poumons 10 jours après inoculation (Gaddum, *et al.*, 1996; Thomas, *et al.*, 1996). 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 réponse T auxiliaire CD4+ est un mélange de réponses de type Th1 et Th2, après infection naturelle par le VRSB. 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 l'INF $\gamma$ , IL-2, IL-4 et IL-10 indiquent un mélange des réponses Th1 et Th2. L'orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th1 ou Th2 varie en fonction des interactions précoces entre le virus et les cellules hôtes (réponse innée) mais aussi des protéines virales. 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 (CD4+) de type Th1, et conséquemment une forte réponse en LT cytotoxiques (CD8+). La glycoprotéine G induirait une réponse mixte Th1 ou Th2 selon les études (Alwan, *et al.*, 1993; Srikiatkachorn, *et al.*, 1999). 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 $\gamma$  ont été observés sur des animaux préalablement vaccinés avec des vaccins à virus vivants recombinés ou inactivés (Ellis, *et al.*, 1992).

### *III.2.5 Immunopathogénie induite par la vaccination*

A la suite du défaut majeur d'innocuité d'un vaccin VRSH inactivé au formol et adjuvé à l'alun dans les années 1960, de nombreuses études ont été menées, principalement en modèles souris et rats des cotonniers, pour expliquer ces mécanismes de sensibilisation vaccinale chez l'homme. Différentes hypothèses ont été émises comme l'hypersensibilité de type III, et une orientation de la réponse immunitaire cellulaire auxiliaire des lymphocytes CD4+ vers une voie de type Th2, la voie Th1 étant plutôt associée à la protection vaccinale (Openshaw *et al.*, 2005).

Ce vaccin aurait suscité des réponses humorales et cellulaires quantitativement et qualitativement différentes de celles observées lors d'une infection naturelle, entraînant notamment la synthèse d'anticorps non fonctionnels (Murphy *et al.*, 1986) mais qui auraient un rôle facilitant (Kimman *et al.*, 1989a). Lors de l'infection naturelle par le HRSV, l'effet

cytopathique du virus entraîne dans les lobes pulmonaires antérieurs une lyse cellulaire et la libération d'antigènes viraux. Ces derniers formeraient alors des immuns complexes avec les anticorps précipitants, strictement localisés aux poumons, et provoqueraient une activation du complément. Ceci favoriserait l'afflux de neutrophiles. Les facteurs anaphylatoxines C3a et C5a diffuseraient dans l'ensemble du poumon, induisant la libération d'histamine et de leucotriènes type LTC<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub> par les cellules mastocytaires. Ceci provoquerait une bronchoconstriction, un œdème et un emphysème pulmonaires (Valarcher, 1999). Cette hypothèse n'a pas été confirmée chez l'homme ni chez le bovin. La fraction C3 a pu être mise en évidence dans le poumon de veaux morts lors d'infection naturelle par le VRSB mais les immuns complexes n'ont jamais été détectés dans le sang de ces animaux (Kimman *et al.*, 1989a). Une étude récente a cependant démontré le rôle d'immuns complexes dans la pathologie immuno-induite par le VRSH chez la souris (Polack *et al.*, 2002). Dans ce cas, l'activation du complément a été de plus démontrée sur des coupes de poumon d'enfants morts de bronchiolite à VRSH.

Une deuxième hypothèse de l'exacerbation clinique vaccino-induite provient essentiellement d'études menées chez la souris ou le rat des cotonniers. Elles ont montré qu'un vaccin inactivé par le formol (FI-RSV) entraîne une orientation de la réponse immunitaire cellulaire spécifique vers une voie dite Th2 lors d'infection expérimentale ultérieure. Cette orientation se traduit chez la souris par une production locale d'IL4, IL5, IL10, par un afflux de lymphocytes et d'éosinophiles et par la présence d'IgE et de médiateurs pro-inflammatoires dans les sécrétions respiratoires (hypersensibilité de type I). Ces hypothèses d'orientation de la réponse immunitaire vers une voie de type Th2 n'ont pas encore été totalement validées chez l'homme ou le veau par des études épidémiologiques et immunitaires. Plusieurs études menées avec les VRSH montrent que lors d'une primo-infection, la protéine G jouerait un rôle majeur dans l'orientation de la réponse immune cellulaire vers une voie Th2, caractérisée par une production d'IL-4, IL-5 et IL-13 (pour référence, Meyer *et al.*, 2008). En effet la protéine G contient un épitope qui peut induire indifféremment une réponse LTCD4<sup>+</sup> de type Th1 ou Th2. Les facteurs influençant le contexte immunologique induit par G sont multiples : l'activation préalable de cellules mémoires CD4<sup>+</sup> de type Th2 spécifiques du VRSB, la diminution des LT cytotoxiques et des cellules NK, l'exposition primaire à la protéine G sécrétée plutôt que transmembranaire, une inflammation allergique concomitante des voies respiratoires, les propriétés intrinsèques de l'hôte favorisant la réponse de type Th2 (Graham *et al.*, 2000).

Pour le VRSB, il a également été possible de reproduire un modèle d'immunopathologie chez des veaux, similaire au modèle souris pour le VRSH, en utilisant un vaccin VRSB inactivé au formol (FI-VRSB) et adjuvé à l'alun (Antonis *et al.*, 2003). Dans ce modèle, la vaccination FI-VRSB sur des veaux séronégatifs induit une synthèse importante d'anticorps viraux et, lors d'inoculation d'épreuve, permet de réduire la charge virale. Par contre, cette immunisation est associée à l'apparition de signes cliniques respiratoires sévères lors de l'inoculation d'épreuve. Par rapport au modèle souris, les profils d'interleukines obtenus à partir de cellules mononuclées pulmonaires et sanguines indiquent un mélange de réponses Th1 et Th2. Dans cette même expérience l'utilisation d'un vaccin atténué s'est traduite, lors d'épreuve d'inoculation, par un afflux modéré d'éosinophiles par rapport au lot témoin non vacciné mais sans atteinte clinique grave des animaux.

### III.3 Facteurs favorisant la maladie

#### *III.3.1 Facteurs liés à l'environnement*

- Facteurs d'ambiance

Le bâtiment va jouer essentiellement sur la réceptivité et la sensibilité des bovins aux infections respiratoires. Le degré d'hygrométrie et la ventilation, et donc l'implantation du bâtiment vont avoir un effet néfaste sur l'appareil mucociliaire des veaux, et ainsi favoriser les infections au VRSB. De même, l'inconfort engendré par les paramètres d'ambiance provoque un stress qui va alors diminuer la résistance du veau et ainsi augmenter l'incidence des troubles respiratoires.

- Facteurs climatiques et géographiques

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 aussi exister quelques petits épisodes en été qui se traduisent juste par une légère augmentation en anticorps. Comme pour le taux d'ammoniac et la forte humidité, des variations importantes de température et de pression

atmosphérique peuvent affecter l'action mucociliaire et favoriser la multiplication du VRSB dans les voies respiratoires.

- Gestion des lots

Selon la conduite d'élevage, les animaux pourraient être plus ou moins sensibles au VRSB : le stress du transport, le passage par des centres de rassemblement, le système de conduite en bande unique, les effectifs trop élevés sont autant de facteurs de risque.

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

### *III.3.2 Facteurs liés à l'hôte*

Il semblerait que des facteurs de virulence intrinsèques à l'hôte existent puisque des formes bénigne et sévère peuvent s'exprimer conjointement au cours d'une même épidémie.

- Prédilection de l'espèce bovine aux affections respiratoires

Les spécificités anatomiques et physiologiques de l'appareil respiratoire des bovins en font des animaux prédisposés aux affections respiratoires :

- les poumons sont de taille réduite par rapport à la masse de l'animal, fortement compartimentalisés, avec un tissu conjonctif interlobulaire abondant. La ventilation collatérale entre les différents lobules en est réduite. Ainsi lors d'une obstruction bronchiale, la région en aval n'assure plus la moindre ventilation.

- Le poumon est peu compliant. La résistance à l'écoulement de l'air est très forte.
- L'hématose n'est pas non plus optimale dans l'espèce bovine.

En conclusion, chez les bovins, le coût énergétique de la ventilation est très lourd lors d'affection respiratoire. De plus, la vitesse de l'air dans les voies aériennes est élevée, ce qui favoriserait l'apparition des microlésions de l'épithélium respiratoire.

- Race et conformation

Il existe également une différence de sensibilité au VRSB entre races. La bronchopneumonie est d'autant plus grave chez les bovins culards prédisposés aux troubles respiratoires (Valarcher *et al.*, 1999b); Cela s'expliquerait par l'étroitesse des voies respiratoires supérieures chez ses animaux et par un moindre volume de réserve ventilatoire. En effet, le volume pulmonaire par rapport à la masse musculaire à oxygéner est significativement plus faible que chez les autres bovins. Leurs moyens de défense contre les agents pathogènes agressant l'appareil respiratoire sont donc plus vite débordés. Les races rouges américaines et les blanc-bleu belges seraient plus sévèrement atteintes. Aucune différence n'est par contre démontrée entre les mâles et les femelles (Baker *et al.*, 1997b), même si du sexe des bovins découle le mode d'élevage : le stress qui peut être rencontré par les mâles (castration, facteurs de croissance aux Etats-Unis) est plus important, ce qui pourrait expliquer la plus grande sensibilité apparente des mâles parfois observée sur le terrain.

- Statut immunologique et sur-infections bactériennes

Les déficits immunitaires congénitaux et acquis (parasitisme, etc...) favorisent la multiplication virale et l'exacerbation des signes cliniques (Collins, 2001). Les sur-infections bactériennes sont favorisées dans le cas des infections au VRSB : la destruction des cellules épithéliales provoque l'altération de l'appareil mucociliaire, l'accumulation de débris cellulaires et d'exsudats favorise la prolifération bactérienne, l'action dépressive du VRSB sur les fonctions macrophagiques et lymphocytaires favorise l'émergence de ces surinfections. Un effet immunodépresseur a été mis en évidence dans le modèle ovin mais n'a jamais été mis en évidence dans les autres espèces (Sharma *et al.*, 1991).

- Facteurs génétiques

En médecine humaine, les études sur l'infection par le VRSH s'orientent vers une hypothèse génétique pour expliquer les différences de gravité des signes cliniques d'un individu à l'autre. Cette prédisposition génétique serait associée à un historique familial d'asthme ou de maladie respiratoire pédiatrique sévère, et à des différences de susceptibilité selon l'ethnie/le type racial (Hull, 2007). Plus récemment, des études ont démontré l'association entre une incidence élevée de RSV sévère chez les enfants et un polymorphisme génétique dans un certain nombre de gènes sélectionnés pour l'analyse. Il s'agirait des gènes

codant pour des cytokines et chimiokines, incluant les interleukines IL-4, IL-8, IL-10, IL-13 et RANTES/CCL5, ainsi que les gènes codant pour des protéines de surface ou de surfactant (Puthothu *et al.*, 2007, Paulus *et al.*, 2007). Certains de ces polymorphismes pourraient jouer un rôle bénéfique ou pathologique dans l'infection par le VRSH. Il n'existe actuellement aucune donnée similaire pour le VRSB.

- Age

Les bovins atteints sont généralement des veaux de 2 à 9 mois (Taylor *et al.*, 2005). En plus des particularités liées à l'espèce, au type racial ou aux caractéristiques propres à l'individu, les échanges respiratoires sont moins efficaces chez le jeune de moins de 1 an : faible compliance du poumon, faible vascularisation due à la compartimentation des poumons. De plus, l'aggravation des signes cliniques est liée à l'immaturation de l'appareil respiratoire, en particulier par manque de contacts préalables avec les agents pathogènes.

D'après l'étude d'Antonis *et al.* (2010), les veaux nouveaux nés sont cliniquement plus résistants au VRSB que des veaux de 6 semaines, bien que le virus se multiplie plus facilement chez les nouveaux nés. Cela serait à mettre en relation avec la nature de la réponse inflammatoire et confirmerait le rôle majeur des mécanismes immunopathogéniques dans le développement des symptômes.

### *III.3.3 Facteurs de virulence du VRSB*

Le VRSB présente une grande variabilité génétique, qui pourrait avoir des conséquences sur le pouvoir pathogène du virus.

- 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. Les premières études ont porté sur l'analyse des réactions antigéniques croisées entre différents isolats viraux. Ces données ont rapidement été complétées par des analyses phylogénétiques comparatives entre différentes souches virales, puis plus récemment à l'intérieur d'une même souche virale.



- *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).

Par analogie, les souches de VRSB ont été classées en sous-groupes sur la base de la réactivité antigénique de la protéine G. L'utilisation d'un panel d'anticorps monoclonaux dirigés contre cette glycoprotéine a permis de classer le VRSB dans un premier temps en 2 sous-groupes, A et B (Furze *et al.*, 1994) puis finalement en en au moins 4 sous-groupes A, AB, B et intermédiaire ( Schrijver *et al.* 1996b; Prozzi *et al.* 1997; Elvander, *et al.*, 1998) (Tableau 4).

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

Tableau 4 : 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; Mallipedi, *et al.*, 1993; Prozzi, *et al.*, 1997; Schrijver, *et al.*, 1996b; Stine, *et al.*, 1997).

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)

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).

#### - Analyse du génome viral

L'analyse du génome viral du VRSH a permis de confirmer l'hétérogénéité de la glycoprotéine G. La divergence moyenne des séquences en acides aminés (AA) 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, la parenté en acides aminés 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).

Une étude sur l'évolution et la variabilité du génome du VRSB 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, ont été déterminées et comparées avec 33 séquences connues provenant des banques de données, parmi lesquels 3 sont des séquences de 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 plusieurs 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 inférieurs 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 de VRSB peuvent être arbitrairement classées en six sous-groupes génétiques (Figure 8). 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.

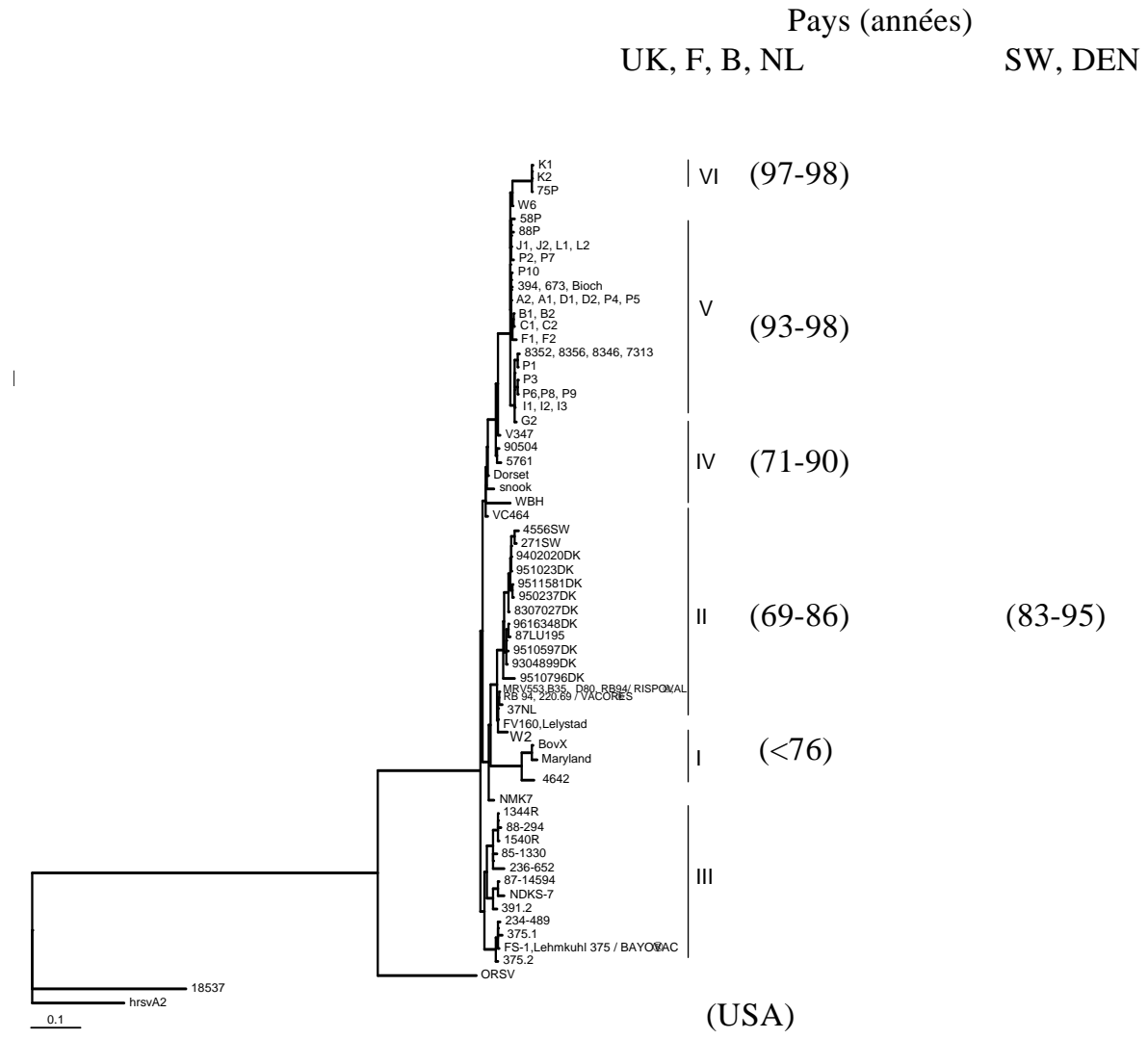


Figure 8: Arbre phylogénétique sur la glycoprotéine G de 87 isolats de VRSB, un isolat de VRSO (Virus Respiratoire Syncytial Ovin) et 2 isolats de VRSH.

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-groupes V et VI. Ces pays pratiquent une vaccination intensive contre le VRSB depuis de nombreuses années. Par contre les souches plus anciennes de ces mêmes pays sont regroupées dans le sous-groupe II avec les isolats, anciens et récents obtenus jusqu’en 1995, dans les pays nordiques européens (Danemark, Suède). Jusqu’en 1995, la vaccination contre le VRSB n’existait pas au Danemark et en Suède. D’une façon générale, au sein de chaque sous-groupe, les souches ont des dates d’obtention très proches ou des localisations voisines. En plus d’un regroupement géographique des souches de VRSB au sein des différents sous-



En conclusion, cette étude a montré une évolution continue en France du VRSB avec des modifications d'acides aminés dans des régions spécifiques de la glycoprotéine G. Les résultats obtenus 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.

- Mécanismes moléculaires de la variabilité génétique des virus à ARN

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. Les mécanismes à l'origine de la variabilité du VRSB sont principalement représentés par des mutations ponctuelles. La faible fréquence des recombinaisons s'expliquerait par l'omniprésence de la nucléoprotéine N qui entoure l'ARN génomique lors de la réplication et limiterait ainsi la possibilité de changer de matrice. 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. Il en résulte qu'une souche virale est composée de différents génomes étroitement apparentés mais génétiquement hétérogènes qui forment ce que l'on nomme le spectre de mutants. Ce spectre constitue un réservoir de variants phénotypiques et sa distribution dynamique, qui constitue la population virale, fait référence au terme de quasiespèces, terme inventé par Eigen et Schuster pour la description des premiers réplicons sur terre (Eigen, Schuster, 1979). De nombreux paramètres peuvent influencer la capacité d'adaptation des virus à ARN : la taille de la population virale, la complexité du génome et la fréquence de mutations nécessaires pour répondre à un facteur de sélection

Pour un virus à ARN, le pourcentage moyen d'erreur est compris entre  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$  substitutions par nucléotide contre  $10^{-8}$  à  $10^{-11}$  pendant la répllication de l'ADN eucaryote et procaryote (Drake, 1993; Steinhauer, 1986). Le taux de mutation moyen est estimé à  $10^{-4}$  substitutions par nucléotides copiées (Holland *et al.*, 1992 ; Drake JW, 1993). Pour un génome de 10 kb, cela représente une mutation par cycle de répllication en moyenne. Il n'existe actuellement pas de données précises sur les quasiespèces pour le VRSH mais, pour le VRSB, une étude (Delplanche *et al.*, 2007) a analysé les quasi espèces après isolement du virus chez un veau puis après différents passages en cultures cellulaires ou chez le veau. Si la séquence consensus du gène G reste stable lors des différents passages, une hétérogénéité génétique importante a été observée pour chaque population virale aux différents passages, avec des fréquences de mutations allant de  $6,8$  à  $10,1 \times 10^{-4}$  substitutions par nucléotide.

La plupart des mutations sont neutres ou délétères et sont donc éliminées par sélection naturelle. De nombreuses protéines virales, notamment structurales, peuvent ainsi absorber un nombre considérable de mutations, qui, en règle générale, n'altèrent pas leurs structures secondaire et tertiaire. Par ailleurs, 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.

- Implications biologiques de la variabilité du VRSB

Les implications biologiques de la variabilité virale et la présence du caractère hautement évolutif des virus à ARN comme le VRSB sont nombreuses et touchent à l'échappement aux anticorps neutralisants, la résistance aux agents antiviraux, l'inhibition de la réponse antivirale, la persistance virale et les changements de tropisme cellulaire.

Outre la possibilité d'évolution rapide du VRSB face à la vaccination massive des ruminants, il est clair que la capacité d'échappement d'un virus est plus aisée si une seule mutation est nécessaire. Ainsi la question de l'impact de la variabilité virale est cruciale pour les vaccins sous unitaires contenant un épitope unique ou l'utilisation de souches atténuées par une mutation unique. Il a été montré que seulement deux changements d'acides aminés (Arg 188 et Lys 192) dans un épitope T-dominant de la glycoprotéine G du VRSH étaient suffisants pour supprimer la protection induite par cette protéine, en modèle souris d'inoculation d'épreuve (Huang *et al.*, 2003). De même, l'émergence de virus VRSH mutants d'échappement après transfert passif d'un anticorps monoclonal anti-F (palivizumab), commercialisé pour le traitement des enfants malades, a été démontré *in vitro* et observé *in vivo* (Zhao *et al.*, 2004 ; 2005).

Concernant le pouvoir pathogène et la variabilité du VRSB, une étude a été menée pour comparer le pouvoir pathogène d'un même virus multiplié sur cultures cellulaires ou passées successivement chez des veaux. Les résultats ont montré qu'un faible nombre de passages en cultures cellulaires (n=3) modifie la cinétique d'infection du virus (Thèse Le Mercier, 2005), sans toutefois modifier la sévérité des signes cliniques observés.

Actuellement, il n'existe pas de preuves directes d'une différence de virulence entre différentes souches de VRSB isolées sur le terrain. Cependant peu d'études ont été menées pour investiguer cette question.



**DEUXIEME PARTIE :**  
**ETUDE EXPERIMENTALE**



# I. OBJECTIFS

A l'heure actuelle, la seule séquence complète de génome viral du VRSB est celle de la souche de laboratoire et de référence A51908 isolée en 1969 par Mohanty. Cependant, si l'historique de cette souche est peu connu, elle est la plus fréquemment utilisée, avec la souche Snook, dans les études sur le VRSB. En fonction des laboratoires, l'isolat a été multiplié sur un nombre variable, mais souvent important, de passages en cultures cellulaires. Il a aussi pris des noms différents comme souche ATue ou NC ou Maryland. Le nombre de passages en culture cellulaire de l'échantillon séquencé n'a pas été fourni. Pourtant, le passage en culture cellulaire introduit rapidement des mutations dans la séquence consensus du génome (Deplanche *et al.*, 2007 ; Le Mercier, 2003).

L'objectif de cette étude était d'obtenir les séquences complètes de trois isolats de terrain, isolés récemment dans le sud-ouest de la France, avec le minimum de passages en culture cellulaire, de manière à disposer d'une séquence la plus proche possible de la séquence de la souche sauvage.. La connaissance de ces séquences nous permet de comparer les souches entre elles par analyse phylogénétique, de les placer au sein des sous-groupes génétiques déterminés par Valarcher *et al* en 2000 et d'apporter de nouvelles informations sur les isolats récents de VRSB.

En outre, la détermination de ces séquences complètes constitue une première étape clé pour des études de pathogénie virale et plus spécifiquement pour l'obtention de la technique de génétique inverse à partir de souches de terrain.

Enfin, le dernier objectif de notre travail était d'essayer de corréler les résultats phylogénétiques obtenus avec d'éventuelles différences de virulence clinique entre les souches observées.

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1 Lignées et cultures cellulaires

Les cellules utilisées pour l'isolement des souches virales sont des cellules épithéliales des cornets nasaux d'origine bovine, appelées cellules BT ou « bovine turbinate » (n°ATCC CRL-1390). Les cellules BT ont été cultivées entre les 28<sup>ème</sup> et 32<sup>ème</sup> passages en étuve à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture de base est composé de 500mL 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 5mL de pénicilline à 100UI/ml et de streptomycine à 100µg/ml (Invitrogen).

Lors de l'isolement viral, et notamment pour les 2 premiers passages en cellules BT, le milieu de culture est ramené à 3 % de SVF final, additionnés de 5 ml de fungizone à 250 µg/L (Invitrogen) et de 20 µg/ml d'enrofloxacin (Bayer).

### II.2 Isolement des virus VRSB

#### *II.2.1 Isolement des souches de terrain*

Les souches de VRSB ont été isolées sur le terrain, chez des veaux présentant des signes cliniques plus ou moins graves d'atteinte de l'appareil respiratoire profond (tachypnée, dyspnée abdominale et syndrome de détresse respiratoire aigu). Brièvement, un échantillonnage par lavage bronchoalvéolaire (LBA) au moyen d'un endoscope (Olympus) a été réalisé sur des veaux préalablement anesthésiés (kétamine, 5mL en IV). Pour chaque prélèvement, environ 100 ml d'un milieu LBA (Milieu MEM complété à 100 µl d'enrofloxacin à 20 µg/ml, 2 ml de gentamycine à 200 µg/ml et 5 ml de fungizone à 250 µg/ml) ont été injectés au niveau de la bifurcation bronchique et immédiatement réaspirés (30 à 50 ml récupérés). L'échantillon a été transporté le plus rapidement sous froid positif dans un bloc de glace au laboratoire. Une partie du milieu LBA échantillonné a été conservée à -80°C et une autre partie a été immédiatement utilisée pour isoler le virus.

Pour réaliser l'isolement, des dilutions au 1/5<sup>e</sup>, 1/20<sup>e</sup> et 1/100<sup>e</sup> du milieu LBA ont été déposées sur une boîte de culture cellulaire BT (25 cm<sup>2</sup>) puis agitées 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 a été à nouveau changé au bout de 24 heures. Le flacon a été congelé à -80°C sept jours après inoculation. Trois passages en aveugle et cinq passages successifs sur des cellules BT ont été réalisés. A chaque passage, un cinquième de la production virale a été utilisé pour infecter de nouvelles boîtes de cellules BT. Le reste de la suspension cellulaire est conservé à -80°C en tube de 5 ml.

Un effet cytopathique caractéristique du VRS a été observé après le troisième passage en aveugle sur les cellules BT. Le virus a alors été identifié par immunocytochimie (anticorps monoclonal dirigé contre la glycoprotéine F) sur les cellules BT fixées à l'acétone. L'absence d'autres pathogènes respiratoires bovins (coronavirus bovin, herpèsvirus bovin de type 1 (BoHV-1), virus parainfluenza bovin de type 3 (PI3), adénovirus bovins 3 et 5 (AdBv 3 et 5), virus de la diarrhée virale/maladies des muqueuses (BVDV)) a été vérifiée par différents tests commerciaux (PCR et RT-PCR).

### *II.2.2 Souches virales*

Au total trois souches de VRSB ont été isolées et utilisées au 5<sup>e</sup> passage en culture cellulaire pour le séquençage.

- ***Souche W2-000131*** : souche de terrain isolée en 2000, à partir du LBA d'un veau de 4 mois de race Blonde d'Aquitaine originaire d'un élevage de Carmaux (81).
- ***Souche A2-Gelfi*** : souche de terrain isolée en 1996 en Aveyron, à partir d'un LBA chez de jeunes veaux atteints de troubles respiratoires modérés (Valarcher *et al.*, 1999).
- ***Souche 3761*** : souche de terrain isolée en 2003 à partir de l'écouvillon nasal et du LBA d'un veau présentant des signes cliniques respiratoires aux hôpitaux des ruminants de Toulouse (origine Tarn) traduisant une atteinte sévère (tachypnée sévère, dyspnée abdominale et orthopnée).

Par ailleurs la souche de laboratoire et de référence A51908 ou NC (American type culture collection) variant Atue51908 (n°ATCC VR-794, n° d'accèsion Genbank AF092942) a été utilisée pour les études comparatives d'analyse du génome. C'est en effet la seule souche pour laquelle on dispose de la séquence complète du génome viral. Elle a été isolée anciennement en 1969 (Mohanty *et al.*, 1975). La référence dans Genbank n'indique pas le nombre de passages utilisés pour la souche séquencée.

Pour les analyses comparatives des gènes codant pour les protéines F, G et N, la recherche des séquences disponibles dans les banques de données (Genbank, EMBL..) a été réalisée au moyen des logiciels blast et fasta (Pubmed, NIH, Betsheada).

## II.3 Séquençage

### *II.3.1 Extraction de l'ARN et étape rétrotranscription*

Pour les virus A2Gelfi, W2 et 3761, l'isolement de l'ARN viral a été réalisé au 5<sup>e</sup> passage en cultures cellulaires par utilisation du kit Qiagen RNeasy (QIAGEN France Courtaboeuf), selon les recommandations du fabricant. La solution récupérée, contenant de l'ARN total, est conservée à -80°C.

L'obtention des fragments d'ADN complémentaires du génome viral a été réalisée par transcription inverse (RT), en utilisant la transcriptase inverse Superscript TM II (Invitrogen) comme précédemment décrit par Valarcher *et al.* (2000). Brièvement, la synthèse d'ADNc a été réalisée à partir de 5µl d'ARN en utilisant chaque amorce à la concentration finale de 0,1µM. Les amorces de RT sont décrites au tableau 5. Elles ont été obtenues à partir de la séquence génétique de la souche VRSB ATue et dessinées avec le logiciel Primer3. Elles sont positionnées sur le brin génomique (brin sens négatif) de manière à rétrotranscrire l'ensemble du génome viral.

Nom	Séquence	Position sur le génome
>Pgen4'	ACGCGAAAAAATGCGTATAAC	0
>N2.P1	ATGGCTCTTAGCAAGGTCA	1144
>G2.5	AGACATTAAGAGGGCTTGGA	4735
>Pgen8	TGCCCTGGGAAGCTACTTGTGGATGG	8500

Tableau 5 : Les amorces utilisées pour l'étape de RT

### II.3.2 Amplification de l'ADNc viral

L'amplification par PCR a été réalisée en utilisant une enzyme de haute-fidélité, (*Expand High Fidelity PCR System*, Roche Diagnostics France Meylan).

Les PCR ont été réalisées à partir de 5 µL d'ADNc, à une concentration finale d'amorces à 0,3nM, sur un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) selon le programme suivant: 2 minutes (min) à 95°C suivi de 30 cycles comprenant 30 secondes (s) à 95°C, 30 s à la température d'hybridation (Th) des amorces et 4 à 6 min d'élongation à 72°C, et, pour finir, une réaction d'extension finale de 10 min à 72°C. Les différentes amorces (tableau 6) ont été dessinées à partir de la séquence de la souche VRSB ATue de manière à obtenir des produits de PCR chevauchants, permettant une relecture à la position des amorces. De 3 à 5 PCR ont été réalisées pour chaque fragment à amplifier.

>Pgen4'	ACGCGAAAAAATGCGTATAAC
<Pgen5	CCAATCGGGACATAGCATATAACATAC
MF766	ATGAACGACAGGCCACATTTA
MR1975	GTACGCTGGCATGACCAAGC
MF1959	TGGTCATGCCAGCGTACAAGC
MR3333	CATAGGAACCCATATTGTGAGAGATGC
MR3333 W2	CATAGGAACCCATATTGTAAGAGATGC
MF3308	CATCTCTCACAATATGGGTTCTATG
MF3308 W2	CATCTCTTACAATATGGGTTCTATG
MF4092	CATATTTTCTCAACCTGATTAACCCTTC
MR4119	GAAGGGTTAATCAGGTTGAGAAAATATG
MR5580	GTTGTGCGCCATCCTTATTTGC
MR5580 W2	GTTGTTGCCATCTTTATTTGC
MF5561	CAAATAAGGATGGCGACAAC
MF5561 W2	CAAATAAAGATGGCAACAAC
MR6829	TGTCTTCCCATAGCATGATACAAT
MF6685	TTAACTCTGCCTACTGACGTTAACT
MF6685/3761	TTAACTCTGCCTACTGATGTTAACT
MF6685 W2	TTAACTTTGCCTACTGATGTTAACT
MR7990	TACGTCTGCAGGCAATCTCT
MR7990/3761/ W2	CACGTCTGCAGGCAATCTCT
MF7971	AGAGATTGCCTGCAGACG
MR8658	TCTAAACCCAGCTCTCCTTT
>Pgen13	TGACACTAACACAACGCTATCTAAC
<Pgen21	GCATCCATTGCTTGCCGTTTCATCTACC
>Pgen8	TGCCCTGGGAAGCTACTTGTGGATGG
9422F*	ATGTCACTAATCTTGAACCTAACGGAA
9422F/3761	ATGTCATTAATTTTGAACCTAACAGAA
9422F W2	ATGTCATTAATCTTGAACCTAACGGAA
10430R*	AACGATTTGCTTTGTTGCTAATGCC
10279F*	AGGTAGGATGTTTACAATGCAGCCAG
10279F W2	AGGTAGGATGTTTGAATGCAGCCAG
<Pgen9	GGTTTAGTGGGACCCCTCTCACCACG
<Pgen9/3761	GGTTTAGTGGGACCTCTCTCACCACG
>Pgen10	TGCAAAAAATAGAGCCGACTTACCCG
>Pgen10/3761	TGCAAAAAATAGAGCCAACCTTACCCG
<Pgen11	AACCTTTCAGCTTACTACCTAAGCACAC
Pgen11 W2	AACCTTTCAGTTTACTACCTAAGCACAC
<Pgen 12	ACGAGAAAAAAAGTATCAAAAACTATCC
12713F*	TAAACAGGTGATACAGAAACAGC
13713F	TTCCAGCAGTAATAATAGACAAGA

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour la PCR et le séquençage



### *II.3.3 Méthode de séquençage et analyse des séquences*

Les séquences consensus des génomes viraux complets ont été déterminées directement à partir de l'ADN amplifié après purification des produits de PCR sur colonnes Microcon PCR (Millipore). Le séquençage a été réalisé selon une technique automatique en électrophorèse capillaire grâce à l'Analyseur Génétique ABI3100 (Applied Biosystems) et le kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Les résultats ont été fournis sous forme de séquences brutes et chromatogrammes.

La vérification des séquences, leur alignements et la compilation de la séquence complète de chaque génome à partir des séquences d'origine ont été réalisés aux moyens des logiciels Editseq et Seqman 4 (DNASTAR Lasergen 8, Applied Biosystem). Les alignements multiples (programme Clustal W) et les analyses phylogénétiques (programme Editree) ont été réalisés à l'aide du logiciel Megalign (DNASTAR Lasergen 8, Applied Biosystem). Les comparaisons des séquences nucléotidiques et amino-acides déduites ont été obtenues via les programmes FastaN et FastaP (Infobiogen).

## II.4 Expérimentation animale

### *II.4.1 Animaux*

Les veaux utilisés pour l'expérimentation étaient des veaux mâles, de race Prim-Holstein, qui ont été retirés de leurs mères à la naissance et privés de colostrum d'origine maternelle. Une sérologie VRSB est réalisée à 7 jours pour s'assurer qu'il n'y a pas eu prise de colostrum.

L'entretien des veaux avant l'infection expérimentale a été réalisé en unités expérimentales de niveau 2 de biosécurité de la manière suivante : pendant les 36 premières heures, ils ont reçu un produit énergétique (ENERGAID ND) puis de la poudre de lait premier âge, complétée avec du sérum de colostrum (CER Marloie, Belgique) pendant 5 jours. Par la suite, les veaux sont nourris au seau avec du lait de remplacement, deux fois par jour, à heures régulières, avant la réalisation des examens cliniques et des prélèvements. Pendant les 4 premiers jours, les animaux ont été traités par antibiotiques (cefquinome 1mg/kg/jour, MSD).

Les veaux ont ainsi été maintenus en unités expérimentales pour éviter toute infection naturelle à VRSB.

Durant cette période pré-infection, les animaux sont évalués cliniquement deux fois par semaine et des contrôles sont réalisés pour exclure toute infection naturelle par le VRSB. Une sérologie VRSB a été effectuée 7 jours avant l'expérience et le 1<sup>er</sup> jour de l'expérience, avant inoculation. Des tests par immunocapture d'antigènes (test Speed®-ReSpiVB<sup>ND</sup> BioVetoTest, Virbac.) sur écouvillons nasaux ont été réalisés à partir de 3 jours avant l'inoculation. Un contrôle de l'infection par le BVDV a été effectué par antigénémie à la naissance et par sérologie 7 jours avant le début de l'expérimentation.

#### *II.4.2 Protocole expérimental*

Toutes les manipulations d'entretien et d'infections expérimentales ont été menées selon les recommandations de la Directive Européenne relative au bien-être des animaux d'expérimentation (86/609/CEE) et approuvées par la Direction locale des Services Vétérinaires.

Les veaux Prim-Holstein âgés de 1 mois ont été inoculés avec les différentes souches de VRSB par voie nasale et intratrachéale.

Chaque inoculum viral a d'abord été obtenu en réalisant trois passages sur veaux nouveau-nés. Pour cela, des veaux nouveau-nés de race Prim-Holstein et dépourvus d'anticorps colostraux ont été inoculés par voie intranasale et intratrachéale entre 2 et 3 jours après la naissance avec chacune des souches de VRSB (A2Gelfi, W2 et 3761). Le premier veau a reçu 10<sup>6</sup> Unité Formant Plage (UFP) au total. Cinq jours après l'inoculation, les veaux sont euthanasiés sous anesthésie générale, le poumon est ensuite récupéré pour réaliser un LBA, avec 500 ml de milieu MEM complété à 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. Le LBA ainsi obtenu est conservé à -80°C. Le veau suivant est inoculé avec le LBA du veau précédent à raison de 10 ml par voie intranasale et 10 ml par voie intratrachéale. Un 3<sup>e</sup> passage est réalisé suivant le même protocole. Les LBA récupérés au 3<sup>e</sup> passage sur veaux (Photos 2 et 3) ont été utilisés comme inoculum pour les expérimentations animales. Leur titre variait de 1 à 5 x10<sup>3</sup> UFP/ml.

Ils ont été testés comme indemnes des pathogènes recherchés : BoHV-1, AdBv, PI3, BVDV, Corona, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis*.



*Photos 2 et 3 : Réalisation du LBA lors du troisième passage sur veau.*

Les infections expérimentales des veaux avec les souches A2Gelfi, W2 et 3761 ont été réalisées indépendamment en 2 temps, pour des raisons de faisabilité. Dans un premier temps, les souches A2Gelfi et W2 ont été testées, puis à un an d'intervalle la souche 3761. La race, l'âge et l'origine des veaux utilisés étaient les mêmes dans les deux expérimentations. Les modalités d'infection étaient similaires.

Pour la première expérimentation, 8 veaux, pour chaque groupe A2Gelfi et W2 et 4 veaux contrôles ont été utilisés. Les veaux des groupes A2Gelfi et W2 ont été inoculés à raison de 10 ml par voie intranasale et 10 ml par voie trans-trachéale avec un total de  $10^5$  UFP de virus par animal (la moitié par voie intranasale et la moitié par voie intratrachéale), et ce quel que soit le lot. L'inoculation intratrachéale a été réalisée à l'aide d'un cathéter veau (intraflon 2, Vycon, après tonte, rasage et désinfection du lieu d'injection) et la nébulisation intranasale à l'aide d'un instillateur nasal (vaccin IBR atténué, Bayer). Chaque inoculum a été titré directement après l'infection expérimentale.

Pour la deuxième expérimentation, six veaux ont été infectés avec la souche 3761 et 4 veaux ont servi de contrôle (non infectés), selon le même protocole que précédemment. Le jour de l'inoculation est considéré comme le jour 0 (J0).

Les animaux ont été euthanasiés à J19 post-infection (p.i.) pour la première expérimentation et J14 p.i. pour la deuxième.

### *II.4.3 Suivi expérimental*

- Suivi clinique

Un examen clinique a été réalisé deux fois par jour de J-3 à J14 (ou J19). Les signes cliniques recherchés (abattement, anorexie, tachypnée, dyspnée, toux, jetage, fièvre.) ont été reportés sur une fiche de suivi clinique, présentée en annexe 1, par le même examinateur selon un protocole bien défini. L'ordre de réalisation a toujours été le même, d'abord le lot témoin puis les animaux infectés. Les températures rectales et les fréquences respiratoires ont été enregistrées.

A partir des données cliniques récoltées en cours d'expérimentation et sur la base des observations effectuées lors de précédentes études, un score clinique a été élaboré. A chaque critère relevé quotidiennement est associée une note, et un coefficient est attribué à chaque signe. Le mode de calcul des scores cliniques est présenté en Annexe 2.

- Suivi virologique

La détection du VRSB a été réalisée à partir des sécrétions nasales. Des ENP ont été obtenus pour chaque narine de J-3 à J14 (ou J19), 10 minutes après la fin de la buvée et conservés dans du sérum physiologique et du tampon d'extraction d'ARN (tampon RLT, Qiagen).

Les tests immunochimiques de détection du VRSB ont été réalisés directement sur tampon physiologique (NaCl 0,1%) dans les deux heures qui ont suivi les ENP, à l'aide du test Speed®-ReSpiVB<sup>ND</sup> (BioVetoTest, Virbac). Il s'agit d'un test immuno-chromatographique sur bandelette, dont le seuil de détection serait de 15 UFP (données du laboratoire).

Les écouvillons nasaux conservés dans 350 µl de tampon d'extraction RLT ont été extraits par le kit RNeasy mini (QIAGEN) et repris dans 30 µl d'eau sans RNase. La solution récupérée, contenant de l'ARN total, est conservée à -80°C. La RT-PCR quantitative a été réalisée à partir des écouvillons nasaux, par une méthode Taqman dérivée de celle décrite par Boxus *et al.* (2005). Les amorces utilisées (MF1959 et MR3333) ont été recherchées par le

logiciel Primer3. Les amorces Q2216F et Q2215 ainsi que la sonde ont été décrites (Boxus *et al.*, 2005). La quantification des charges virales des différents échantillons a été harmonisée par rapport à une quantité constante d'ARN du gène rapporteur codant pour la GAPDH cellulaire afin d'avoir des valeurs comparables d'un échantillon à l'autre, indépendamment de la cellularité du prélèvement.

Pour obtenir une gamme plasmidique, un produit de PCR défini par les amorces MF 1959 et MR 3333, et amplifié à partir de la souche VRSB 3761, a été cloné par le kit Topo TA Cloning (Invitrogen). Après dosage de ce plasmide p3761 à 260 nm, des dilutions de 10 en 10 permettent l'élaboration d'une gamme comprise entre  $10^2$  et  $10^6$  copies/PCR.

- Suivi sérologique

Pour le suivi sérologique, des prises de sang sur tubes secs ont été réalisées tous les deux jours sur chaque animal de J-3 à J14. Les prélèvements sanguins ont été conservés à + 4°C pendant 18 heures, puis après centrifugation, aliquotés sous forme de sérum, identifiés et conservés à -20°C. La réponse en IgM des animaux après infection expérimentale a été évaluée, à l'aide du kit ELISA VRSB-IgM de l'institut Pourquier (Montpellier, France). Il s'agit d'un test immuno-enzymatique semi-quantitatif. Le test utilise un composé anti-IgM bovin couplé à la peroxydase. L'intensité de la coloration qui résulte de la réaction entre la peroxydase et son substrat enzymatique est proportionnelle au titre d'IgM anti-VRSB du sérum testé.

## III. RESULTATS ET DISCUSSION

### III.1 Stratégie de séquençage

#### *III.1.1 Choix des souches*

Le choix des souches à séquencer dépendait de différents critères.

Le premier critère, le plus important, était de pouvoir analyser des virus possédant une virulence réelle et la plus proche possible de celle observée sur le terrain. Pour cela, nous avons réalisé les prélèvements sur des veaux présentant des signes plus ou moins sévères d'infection à VRSB. Tous les veaux testés présentaient une hyperthermie et une tachypnée majeure (FR>50 bpm). Pour la souche A2 Gelfi et la souche W2, les deux veaux montraient aussi une dyspnée abdominale d'intensité moyenne. Pour la souche VRSB 3761, des signes cliniques similaires étaient observés avec toutefois une dyspnée abdominale plus sévère et un syndrome de détresse respiratoire (légère orthopnée). Notons toutefois que la description des signes cliniques sur les fiches était moins précise pour A2 Gelfi et 3761, ce qui peut entraîner un biais sur l'interprétation du degré de sévérité clinique observé pour chaque foyer. De plus, il faut aussi tenir compte de l'épisode clinique sur l'ensemble du lot. Pour la souche W2, deux veaux étaient morts avant la visite d'élevage, suggérant un épisode sévère de VRSB dans le lot (données disponibles).

Par ailleurs nous avons souhaité utiliser un nombre minimal de passages en cultures cellulaires pour obtenir une séquence la plus proche possible de la séquence sauvage de chaque virus. Comme pour beaucoup de virus à ARN, on estime que le passage du VRSB en cultures cellulaires entraîne des mutations sur la séquence consensus et atténue fortement sa virulence. Ainsi la plupart des vaccins VRSB atténués disponibles sur le marché résultent d'atténuations par passages en cultures cellulaires (>40), associés ou non à des mutations thermosensibles ou chimiques. Le choix des séquences sauvages était dicté par les projets de recherche de l'équipe. Une thèse vétérinaire (Le Mercier, 2003) avait montré qu'un faible nombre de passages en cultures cellulaires (n=8) modifiait la cinétique d'infection de la souche virale 3761 en allongeant la période d'incubation. Disposant de cette souche depuis le passage 0, une étude est en cours qui consiste à atténuer la souche 3761 par passages en série (100 passages) afin de comparer les génomes du virus d'origine et du virus muté. Le séquençage complet du génome de la souche 3761 au passage 5 s'inscrit dans notre étude.

Enfin, pour mener les études sur le pouvoir pathogène du VRSB par génétique inverse, il pourrait être important de travailler avec des souches sauvages possédant un pouvoir pathogène différent.

Le dernier critère reposait sur le choix d'étudier des souches isolées dans un même bassin de production et sur une période relativement courte, afin de déterminer si des souches de génotypes différents co-circulent sur le terrain depuis 2000, contrairement à ce qui avait été préalablement observé (Valarcher *et al.*, 2000).

### *III.1.2 Stratégie de séquençage*

La stratégie de séquençage a consisté à séquencer directement les produits de PCR pour éviter les erreurs de copie liées au clonage et à l'amplification des clones bactériens. Par ailleurs, pour éviter le maximum d'erreurs liées à la fidélité de la polymérase lors de l'étape de PCR, nous avons utilisé une DNA polymérase dite de haute-fidélité (Expand High Fidelity), possédant une activité proofreading 3'→5'. Le taux d'erreur liée à l'*Expand High Fidelity polymerase* a été calculé à  $2,1 \times 10^{-6}$  par nucléotide et par cycle d'amplification soit deux fois moins d'erreurs que la Pwo polymérase, 3 fois moins que la Pfu polymérase et 8 fois moins qu'une Taq polymérase classique (Malet *et al.*, 2003).

Pour séquencer la totalité du génome, nous sommes partis de la seule séquence complète connue de la souche ATue, en générant des amorces, de manière à amplifier des fragments chevauchants sur le génome d'une taille variant entre 600 et 1000 nucléotides (Tableau 7 et Figure 10). Le caractère chevauchant des fragments a permis de relire et corriger les séquences des amorces, en fonction des différentes souches. Avec cette technique, il ne nous a cependant pas été permis par la suite de corriger les deux amorces des extrémités 5' et 3' du génome. Une technique 5' et 3' RACE (non décrite car non réalisée dans le cadre de cette thèse) a permis de confirmer les séquences décrites dans nos résultats.

	<b>Amorces</b>	<b>Tm °C</b>	<b>Position génome</b>	<b>Longueur pb</b>	<b>Almorce de RT</b>
<b>1</b>	Pgen4'-Pgen5	50	1-1350	1350	Pgen4'
<b>2</b>	MF766-Mr1975	55	766-1975	1209	Pgen4'
<b>3</b>	MF1959-Mr3333	55	1959-3333	1374	Pgen4'
<b>4</b>	MF 3308-Mr4119	55	3308-4119	1111	N2P1
<b>5</b>	MF4092-MR5580	53	4092-5580	1388	N2P1
<b>6</b>	MF5561-MR6829	55	5561-6829	1268	N2P1
<b>7</b>	MF6685-MR7990	55	6685-7990	1305	N2P1
<b>8</b>	MF7971-MR8658	55	7971-8658	687	G2-5
<b>9</b>	Pgen21-Pgen13	55	8842-9734	895	G2-5
<b>9B</b>	Pgen8-Pgen21	58	8500-9734	1234	G2-5
<b>13</b>	9422F-10430R	55	9422-10430	1008	Pgen8
<b>14</b>	10279F-Pgen9	55	10279-12186	1907	Pgen8
<b>10</b>	Pgen10-12947R	55	11761-12947	1204	Pgen8
<b>11</b>	12713F-Pgen11	id	12713-14408	1680	Pgen8
<b>12</b>	13713F-Pgen12	id	13713-15140	1427	Pgen8

*Tableau 7 : Position et longueur des fragments à séquencer en fonction des amorces dessinées sur la séquence de la souche VRSB ATue.*



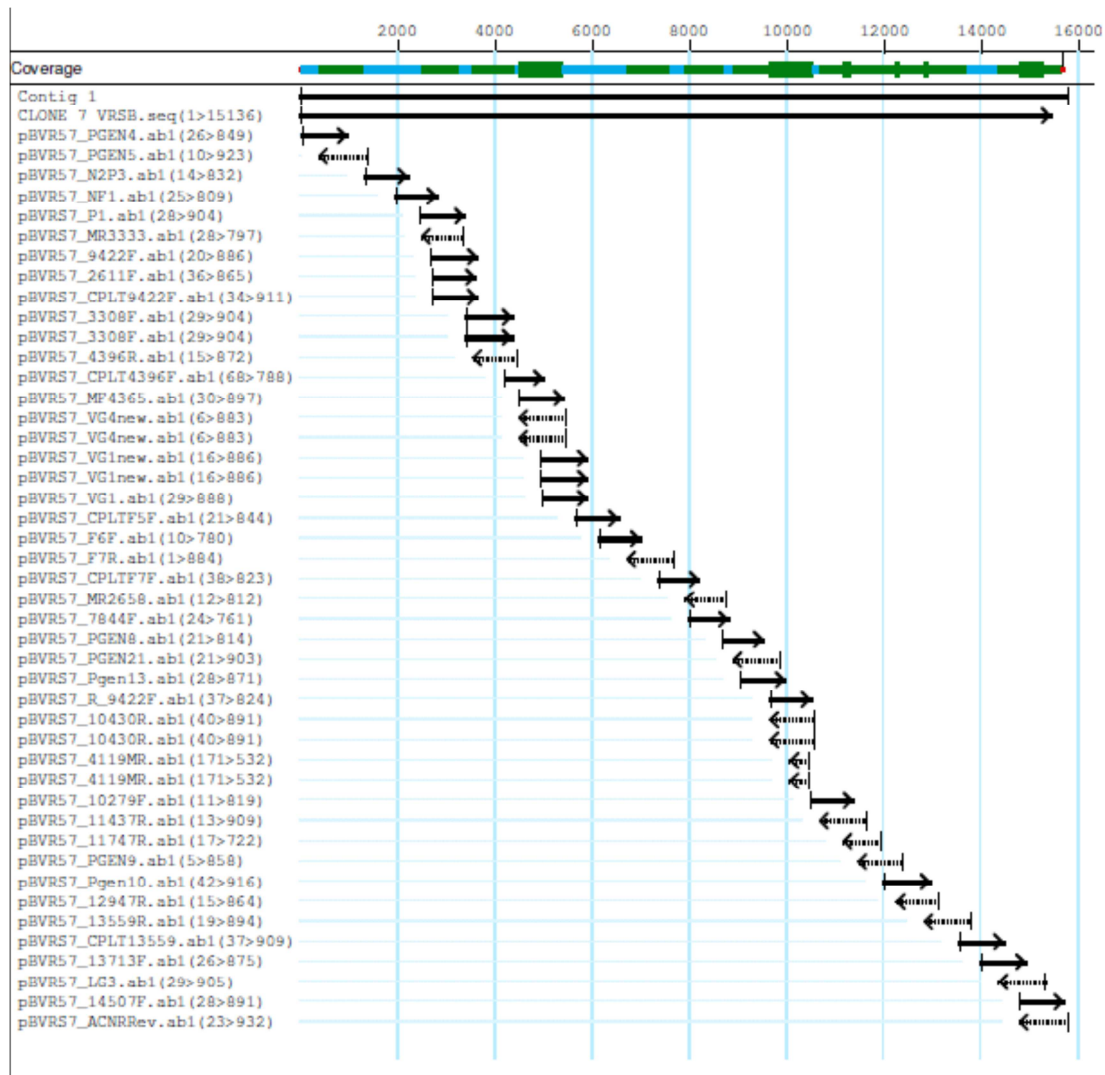


Figure 10 : Exemple de la stratégie de séquençage pour la souche 3761 du VRSB

Enfin, toutes les séquences contenant des ambiguïtés ont été soit refaites, soit obtenues par un nouveau jeu d'amorces directement dessinées à partir de la séquence homologue de la souche.

## III.2 Analyse du génome viral

### III.2.1 Organisation générale

Les séquences complètes des génomes des souches A2 Gelfi, W2 et 3761 sont fournies en annexe 3.

Globalement l'organisation des génomes est similaire avec un ordre identique des séquences codantes pour les protéines de 3' vers 5' et des séquences intergéniques (Figure 11). La longueur du génome est de 15149 nt pour les souches ATue, A2 Gelfi et 3761. La souche W2 possède un nucléotide supplémentaire, résultant de l'addition d'un résidu A sur une queue poly A dans une séquence non codante. Les séquences connues du VRSH contiennent 19 à 20 nt en moins, répartis sur toute la longueur du génome.

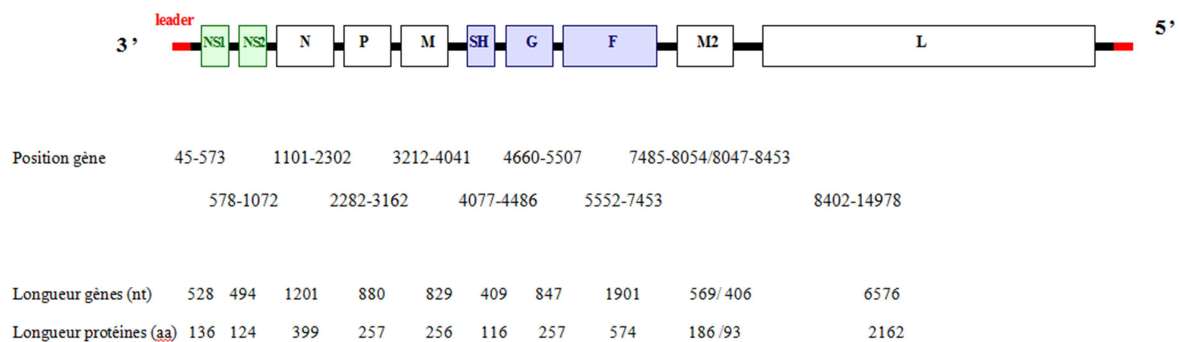


Figure 11 : Organisation générale du génome des souches de VRSB (exemple de la souche 3761).

- **Séquences de début et fin de gènes**

La figure 12 présente les débuts et fins de gènes, ainsi que les séquences intergéniques pour les quatre souches étudiées ainsi que pour la souche VRSH A2. Pour le VRSB comme pour le VRSH, la transcription se fait de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. Les séquences de début et de fin de gènes sont les signaux de transcription qui dirigent l'initiation et la polyadénylation de chaque ARNm.

La séquence de début de gène des 4 souches de VRSB est la même pour tous les gènes (GGGGCAAATA), sauf pour le gène L (AGGACAAAAT). Elle est également identique à celle du VRSH (GGGGCAAAT[A/T]) soulignant l'importance de cette séquence pour la transcription (Collins *et al.*, 2001). Ces séquences agissent de manière autonome, l'ablation de GE inhibe de plus de 90% la transcription et la délétion d'une séquence GS aboutit à la formation d'ARN bicistroniques le plus souvent non fonctionnels (Kuo *et al.*, 1996).

L'extrémité finale de chaque gène des VRSB est constituée par une séquence hautement conservée de 12 à 21 nt, similaire au consensus défini pour le VRSH (AGTAnnnAAAAA) (Collins *et al.*, 2001). Ce motif de 12 nt comprend un pentamère AGT(T/A) bien conservé, puis un trinuécléotide en A/T peu conservé, suivi par au moins 4 résidus A. Les séquences de fin de gène des 4 souches de VRSB sont similaires excepté pour l'extrémité finale du gène P (deuxième nucléotide G ou A selon la souche). Par ailleurs les extrémités terminales du gène G contiennent des résidus A surnuméraires pour les souches A2 et W2 de l'extrémité terminale de G, sans que l'on en connaisse l'importance.

	début du gène	fin du gène	séquence intergénique
NS1	GGGGCAAATA	AGTTTATAAAAA	TTAATT
NS2	GGGGCAAATA	AGTAATTAAAAA	3761 LBA GAA <b>CA</b> AGGTTTGA <b>AA</b> CA <b>AAAA</b> AA <b>AG</b> -TAGAG <b>CA</b> TAA <b>AAAA</b> CA <b>AA</b> CC-AAAAATG <b>AA</b> ATGT
			BRSV W2 GAA <b>CC</b> AGGCTTGA <b>AA</b> T <b>AAAA</b> AG <b>GG</b> TAGAG <b>AA</b> TAA <b>CA</b> CA <b>AA</b> CA <b>AA</b> CA <b>AA</b> AAAAATG <b>AA</b> ATGT
			BRSV A2 GAA <b>CC</b> AGGTTTGA <b>AA</b> CA <b>AAAA</b> AG <b>GG</b> TAGAG <b>CA</b> TAA <b>CA</b> CA <b>AA</b> CC-AAAAATG <b>AA</b> ATGT
			BRSV ATue GAA <b>CC</b> AGGTTGA <b>AA</b> CA <b>AAAA</b> AG <b>GG</b> TAGAG <b>AA</b> TAA <b>CA</b> CA <b>AA</b> CC-AAAAATG <b>AA</b> ATGT
N	GGGGCAAATA	AGTTAATAAAAA	CAT
P	GGGGCAAATA	A (G/A)TAAAAATAA G = ATue + 3761 A = A2 + W2	GTA <b>AA</b> ATTG
M	GGGGCAAATA	AGATAAATAAAA	3761 LBA ATTATG <b>GA</b> AG <b>CC</b> AA <b>CA</b> AA <b>GA</b> T
			BRSV W2 ATTATG <b>AA</b> AG <b>CC</b> AG <b>CA</b> AA <b>GG</b> T
			BRSV A2 ATTATG <b>AA</b> AG <b>CC</b> AG <b>CA</b> AA <b>GG</b> T
			BRSV ATue ATTATG <b>AA</b> TG <b>CC</b> AA <b>CA</b> AA <b>GA</b> T
SH	GGGGCAAATA	AGTTATTTAAAA	3761 LBA ATTA <b>AA</b> ACTT <b>AA</b> AAAAATG <b>CT</b> ATAG <b>AC</b> ACA <b>TAT</b> GGATG <b>TT</b>
			BRSV W2 ATTA <b>AA</b> ACTT <b>AA</b> AAAAATG <b>TT</b> TATGG <b>TT</b> TACA <b>CA</b> AGATG <b>CT</b>
			BRSV A2 ATTA <b>AA</b> ACTT <b>AA</b> AAAAATG <b>TT</b> TATGG <b>TT</b> TACA <b>TAC</b> AGATG <b>TT</b>
			BRSV ATue ATTA <b>AA</b> ACTT <b>AA</b> AAAAATG <b>TT</b> TATGG <b>TT</b> TACA <b>TAC</b> AGATG <b>TT</b>
G	GGGGCAAATA	AGTTATTTAAAA W2 : AGTTATTT <b>AAAA</b> AA <b>AG</b> AAAAA A2 : AGTTATTT <b>AAAA</b> AA <b>AG</b> AAAAA	GATATGTA <b>TA</b> ATTCAC <b>TAA</b> TT <b>AA</b> AA <b>CT</b>
F	GGGGCAAATA	AGTTATATAAAA	3761 LBA TATTA <b>AA</b> ATTAG <b>CT</b> CA <b>AA</b> GA <b>AA</b> AAAA <b>TT</b> ATTT <b>AA</b> CA <b>CC</b> CA <b>AT</b> CA <b>TT</b> CA <b>AAAA</b> AG <b>AT</b>
			BRSV W2 TATTA <b>AT</b> TAG <b>CT</b> CA <b>AA</b> GA <b>AA</b> T <b>AAAA</b> T <b>AA</b> AT <b>AA</b> ATTT <b>AA</b> CA <b>CC</b> CA <b>AT</b> CA <b>TT</b> CA <b>AAAA</b> AG <b>GG</b> T
			BRSV A2 TATTA <b>AT</b> TAG <b>CT</b> CA <b>AA</b> GA <b>AA</b> T <b>AAAA</b> T <b>AA</b> AT <b>AA</b> ATTT <b>AA</b> CA <b>CC</b> CA <b>AT</b> CA <b>TT</b> CA <b>AAAA</b> AG <b>GG</b> T
			BRSV ATue TATTA <b>AT</b> TAG <b>CT</b> CA <b>AA</b> GA <b>AA</b> T <b>AAAA</b> T <b>AA</b> AT <b>AA</b> ATTT <b>AA</b> CA <b>CC</b> CA <b>AT</b> CA <b>TT</b> CA <b>AAAA</b> AG <b>AT</b>
M2-1	GGGGCAAATA		3761 LBA TTGTTA <b>AT</b> GA <b>CA</b> AAAA <b>TGA</b> ATA <b>AA</b> CT <b>CC</b> CA <b>CA</b> CA <b>IT</b> AT <b>TT</b> AT <b>TT</b>
			BRSV W2 TTGTTA <b>AT</b> GA <b>CA</b> AAAA <b>TGA</b> ATA <b>AA</b> CT <b>CC</b> CA <b>CA</b> CA <b>IT</b> AT <b>TT</b> AT <b>TT</b>
			BRSV A2 TTGTTA <b>AT</b> GA <b>CA</b> AAAA <b>TGA</b> ATA <b>AA</b> CT <b>CC</b> CA <b>CA</b> CA <b>IT</b> AT <b>TT</b> AT <b>TT</b>
			BRSV ATue TTGTTA <b>AT</b> GA <b>CA</b> AAAA <b>TGA</b> ATA <b>AA</b> CT <b>CC</b> CA <b>CA</b> CA <b>IT</b> AT <b>TT</b> AT <b>TT</b>
M2-2	GGGGCAAATA	AGTTATTTAAAA	(seq chevauchante)
			3761 LBA ACT <b>TC</b> TT <b>CT</b> TAG <b>CT</b> AG <b>CA</b> ATA <b>TATA</b> AG <b>GA</b> CA <b>AA</b> AT <b>GG</b> ATAC <b>ACT</b> CA <b>TT</b> CA <b>TG</b> AG <b>AA</b> CT <b>CA</b> AC
			BRSV W2 ACT <b>CC</b> TT <b>CA</b> TAG <b>CT</b> AG <b>CA</b> ATA <b>TATA</b> AG <b>GA</b> CA <b>AA</b> AT <b>GG</b> ATAC <b>ACT</b> CA <b>TT</b> CA <b>TG</b> AG <b>AA</b> CT <b>CA</b> AC
			BRSV A2 ACT <b>CC</b> TT <b>CA</b> TAG <b>CT</b> AG <b>CA</b> ATA <b>TATA</b> AG <b>GA</b> CA <b>AA</b> AT <b>GG</b> ATAC <b>ACT</b> CA <b>TT</b> CA <b>TG</b> AG <b>AA</b> CT <b>CA</b> AC
			BRSV ATue ACT <b>TC</b> TT <b>CT</b> TAG <b>CT</b> AG <b>CA</b> ATA <b>TATA</b> AG <b>GA</b> CA <b>AA</b> AT <b>GG</b> ATAC <b>ACT</b> CA <b>TT</b> CA <b>TG</b> AG <b>AA</b> CT <b>CA</b> AC
L	AGGACAAAT	AGTTATTTAAAA	

Figure 12 : Comparaison des séquences début et fin de gènes, séquences intergéniques entre les 4 souches de VRSB.

- **Séquences intergéniques**

Par analogie au VRSH, les séquences intergéniques sont des espaces ne contenant pas de signal de polymérisation mais qui sont traversées lorsque la polymérase passe d'un gène à l'autre. Les séquences intergéniques du VRSH sont peu conservées entre elles et varient de 1 à 56 nt (Collins *et al.*, 2001), contrairement aux séquences à d'autres paramyxovirus, comme le VSV ou le virus Sendai, pour lesquels les séquences intergéniques sont courtes (3 nt) et très conservées. Pour les 4 souches de VRSB, les séquences intergéniques du VRSB varient de 3 à 62 nt et sont plus ou moins conservées selon la séquence et selon les souches (Tableau 8) : les séquences nucléotidiques entre NS1/NS2, N/P, P/M, G/F sont identiques entre les 4 souches. Pour les autres gènes, les différences de séquences sont principalement des substitutions de nucléotides, concernant pour la plupart la souche 3761, avec 57% (16/28) de substitutions par rapport aux trois autres. En ce qui concerne la séquence intergénique NS2/N, la souche 3761 est déléetée d'un résidu G par rapport aux trois autres, alors qu'un résidu A est inséré dans la séquence intergénique NS2/N de la souche W2. Cela indique que les séquences non codantes acceptent des délétions ou insertions de nucléotides, au moins d'un nucléotide.

<b>Séquence intergénique</b>	<b>Nombre de substitutions</b>
NS2/N	7/57 3761 (4)>>A2(1), W2(2)
M/SH	4/21
SH/G	7/39 3761(5)>>W2(2)
F/M2-1	6/55 3761(4)>>W2(2)
Séquence chevauchante M2-1/M2-2	1/41 Sur W2
M2/L	3/62 3761(2)>>W2(1)

*Tableau 8 : Nombre de substitutions (par rapport à ATue) au sein des séquences intergéniques au total et pour chaque souche.*

Le rôle de ces séquences intergéniques n'est pas bien défini. Bien qu'elles n'aient pas un effet majeur sur la transcription (Kuo *et al.*, 1996), il semblerait que de trop nombreuses mutations dans cette région pourraient entraîner le décrochage de la polymérase lors de la réplication virale.

- **Séquences promoteur (leader) et terminale (trailer)**

A chaque extrémité 3' et 5' du génome il existe deux régions dont la séquence nucléotidique est, en partie, complémentaire et en sens inverse sur les 15 nucléotides terminaux, et qui jouent un rôle promoteur sur l'initiation de la transcription et de la réplication virale. En 3', le premier du génome segment est composé de 88 nucléotides pour le VRSH (région « leader » + extrémité non codante de ce gène + signal d'initiation de transcription du gène NS1). La séquence leader du VRSH A2 est composée de 44 nucléotides. Des études ont montré que les 11 premiers nucléotides de la région leader/ promoteur du VRSH sont essentiels au recrutement de la polymérase et conséquemment à transcription et à la réplication de l'ARN viral (Cowton and Fearn, 2005). Pour la réplication, les nucléotides 16 à 34 de la région trailer ainsi que des séquences situées en amont (155 nucléotides) favoriseraient la transcription et l'encapsidation de l'antigénome, et donc la réplication. (Fearn *et al.*, 2000, 2002, 2005). Il n'existe pas de données similaires pour le VRSB.

### **La séquence Leader**

Dans notre étude, la séquence Leader des VRSB est composée de 45 nucléotides (nt). Plus particulièrement, les 3 souches virales étudiées présentent 100% d'homologie pour les 24 premiers nucléotides entre elles et pour les 17 premiers nucléotides avec le HRSV, confirmant l'importance d'une séquence unique pour la transcription et la réplication virale. Le degré de parenté sur la séquence Leader complète varie de 94 % (entre W2 et 3761) à 100% (entre A2 Gelfi et ATue) et reste important quand on le compare avec les souches A2 et B1 du HRSV (entre 80 et 82%). Les trois mutations ont été déterminées en positions 26, 27 et 42, qui ne sont pas connues pour être déterminantes pour la réplication et transcription virale.

### **La séquence Trailer**

La séquence Trailer du VRSB est une séquence de 161 nt riche en nt A. Les 47 derniers nucléotides sont parfaitement conservés au sein des quatre isolats, et une seule

mutation est déterminée dans les 97 derniers nucléotides. Quatorze mutations ont été déterminées en positions 16, 22, 23, 24, 28, 29, 41, 45, 49, 60, 61, 64, 114, sans que l'on connaisse l'impact de ces mutations. Au sein de la séquence trailer, les 14 derniers nucléotides (promoteur pour la transcription de l'antigénome) sont parfaitement conservés au sein des *pneumovirus*. Par contre, de grosses différences existent entre les séquences VRSB et VRSH pour le reste du trailer, séquences comprises dans les régions modulant l'efficacité de la réplication virale.

### A. 3' Leader

	1	45	
3761	ACGCGAAAAAATGCGTATAACAAACTCGTACATCCAAAAAAGATC		GGGG
BRSV W2	ACGCGAAAAAATGCGTATAACAAACCTGTACATCCAAAAATATC		GGGG
BRSV A2	ACGCGAAAAAATGCGTATAACAAACCTGTACATCCAAAAAAGATC		GGGG
BRSV ATue	ACGCGAAAAAATGCGTATAACAAACCTGTACATCCAAAAAAGATC		GGGG
HSRV A2	ACGCGAAAAAATGCGTACAACAAACTTGCATAAACCCAAAAAAT-		GGGG

### B. : 5' Trailer

	14996	15052
3761 LBA	CTCACATTATCTATA CAGTTGTTAATCACAAATTTCCACACATCTGTGTTCCAACCTC	
BRSV W2	CTCACATTATCTATA TAGTTGACGATCCAAATTTCCACACATCAGTGCTCCAACCTC	
BRSV A2Gelfi	CTCACATTATCTATA TAGTTGACAATTCAAATTTCCACACATCAGTGCTCCAACCTC	
BRSV ATue	CTCACATTATCTATA TAGTTGTTAATCTTAAATTTCCACATATCTGTGTTCCAACCTC	
HSRV A2	TAAAAATTAAAAATCATATAATTTTTTAAATAACTTTTAGTGAACATAATCCTAAAGT	
	15053	15128
	AAATTCTACTGGTCAAGATCTAAACCAGAAAATCAAAAATTTAATGGTACGAGAATGTGTCCTTTATGTTGCAAG	
	AAACTCCACTGGTCAAGGTCTAAACCAAAAAATCAAAAATTTAATGGTACGAGAATATGTCCTTTATGTTGCAAG	
	AAGCTCCACTGGTCAAGATCTAAACCAAAAAATCAAAAATTTAATGGTACGAGAATATGTCCTCTATGTTGCAAG	
	AAATTCCACTGGTCAAGATCTAAACCAGAAAATCAAAAATTTAATGGTACGAGAATATGTCCTTTATGTTGCAAG	
	TATCATTTTTAATCTTGGAGGAATAAATTTAAACCCTAATCTAATTGGTTTTATATGTGTATTAACATAAATTACGAG	
	15129	15158
	AGGATAGTTTTTGATACTTTTTTTCTCGT	
	AGGATAGTTTTTGATACTTTTTTTCTCGT	
	AGGATAGTTTTTGATACTTTTTTTCTCGT	
	AGGATAGTTTTTGATACTTTTTTTCTCGT	
	ATATTAGTTTTTGACACTTTTTTTCTCGT	

Figure 13 : Séquences (A) promoteur (Leader) et (B) terminales (Trailer) des 4 souches de VRSB et d'une souche de VRSH (données personnelles, Kreml et al., 2005)

### III.2.2 Etude comparative du génome viral

- **Degrés de parenté nucléotidique entre *pneumovirus***

La parenté entre les différents VRSB a d'abord été étudiée au niveau nucléotidique, en comparant les génomes complets et pour chaque gène. La souche HRSV A2 est utilisée comme souche représentative du VRSH. . Les résultats sont présentés au tableau 9.

Souches virales VRSB	ATue/ 3761	ATue/ W2	ATue/ A2Gelfi	3761/ W2	3761/ A2Gelfi	W2/ A2Gelfi	HSRV A2/ ATue
<b>Génome complet</b>	<b>97,07</b>	<b>97,52</b>	<b>97,77</b>	<b>95,84</b>	<b>96,04</b>	<b>99,16</b>	
<b>NS1</b>	96,58	95,83	96,95	95,82	96,20	98,48	72,1
<b>NS2</b>	96,36	96,56	95,55	94,53	93,52	97,98	75,7
<b>N</b>	98,17	98,50	98,42	96,84	96,92	98,42	80,5
<b>P</b>	97,24	96,89	97,24	95,97	95,86	99,19	78,1
<b>M</b>	96,74	97,26	97,58	95,58	95,89	99,26	79,9
<b>SH</b>	93,13	94,42	95,28	91,20	92,06	98,17	60
<b>G</b>	92,86	95,6	95	90,24	90,60	98,21	46,3
<b>F</b>	96,32	97,90	98,16	95,69	96,17	99,31	75
<b>M2</b>	97,46	98,49	98,49	96,88	96,98	99,17	72,6
<b>L</b>	98,13	98,33	98,37	97,15	97,17	99,39	54,6

Tableau 9 : Pourcentage d'homologies pour les séquences nucléotidiques codantes

Globalement, le degré d'homologie du génome viral est élevé et varie de 95,8 % à 99,2% entre souches de VRSB. Le degré de parenté le plus élevé est observé entre A2-Gelfi et W2 : avec plus de 99% de nucléotides identiques, puis entre les souches A2 et W2 et la souche de référence ATue. Les divergences les plus importantes sont observées lorsque l'on utilise la souche 3761, notamment quand on la compare avec les deux autres souches de VRSB isolées dans cette étude. Il n'existe pas, à notre connaissance, d'études comparant les séquences complètes des génomes de VRSH ou autres membres du genre *Pneumovirus*.

Quand on s'intéresse aux degrés de parenté entre les différents gènes, on constate une disparité d'identité selon les gènes étudiés. On peut schématiquement définir trois groupes de



gènes. Les gènes les plus conservés sont les gènes codant pour la polymérase L (écart de 0,6 à 2,9%) puis M2 (0,8-3,2% d'écart) et F, P et M (0,8-4,2% d'écart). A l'inverse, on retrouve deux gènes plus divergents codant pour les glycoprotéines G (1,8-9,8% d'écart) et SH (1,9-8,8% d'écart). Entre ces deux groupes restent des gènes avec un degré de divergence intermédiaire, codant pour la nucléoprotéine (1,5-3,2) et les deux protéines non structurales NS1 et NS2 (1,5-4,2% et 2-6,5%). Ces résultats sont similaires à ceux précédemment décrits : les degrés de divergence pour G et SH sont certes les plus importants, mais restent largement inférieurs aux différences observées (40-45% d'écart) entre souches de VRSH de sous-groupes différents. On ne peut expliquer la plus faible hétérogénéité du VRSB par rapport au VRSH, même si des facteurs épidémiologiques sont le plus souvent incriminés.

Par rapport à la souche VRSH A2, l'ordre de divergence semble légèrement différent avec un ordre de parenté décroissant suivant : N-M-P-NS2-F-NS1-SH-L-G. Cela peut paraître surprenant notamment pour le gène L qui code pour la polymérase, dont les fonctions sont communes entre les deux virus. En fait l'analyse montre que les 4 domaines fonctionnels sont très conservés entre les deux virus. Par ailleurs, ce dernier résultat est simplement indicatif car nous n'avons inclus qu'une séquence de VRSH (A2) dans le tableau.

Afin de poursuivre notre analyse, nous avons entrepris d'établir des arbres phylogénétiques entre les 3 souches de VRSB isolées, en comparant les génomes complets, mais aussi les gènes G, N et F, pour lesquels nous disposons d'un grand nombre de données.

- **Arbres phylogénétiques du VRSB**

Disposant de plusieurs séquences de génomes complets entre autres pour les virus VRSH, MPV (Pneumovirus Murin), et APV (Pneumovirus Aviaire), nous avons réalisé une comparaison des membres de la sous-famille *Pneumovirinae*. Les résultats sont présentés à la Figure 14. Brièvement, et comme attendu, les séquences de VRSB sont toutes regroupées dans une même grappe ou cluster de gènes, et sont proches du cluster des souches de VRSH avec lequel elles forment le genre pneumovirus. Curieusement, les souches de Pneumovirus de la souris, qui appartiennent aussi au genre *Pneumovirus*, forment un groupe indépendant et intermédiaire entre VRSB/VRSH et les Metapneumovirus. Ainsi les différences

nucléotidiques entre le VRSB et le Pneumovirus de la souris ou les Metapneumovirus humain et aviaire sont proches, comprises respectivement entre, 46,6-46,7%, 48,1-48,3% et 54,3-54,4%. Ces résultats sont conformes à ceux déjà obtenus (Krempl *et al.*, 2005).

Au sein des *Pneumovirus*, les différences en nucléotides entre les souches VRSH et de VRSB varient entre 26,5 et 27, 2% alors que ces différences sont comprises entre 0,8 et 4% entre souches de VRSB (voir tableau 9)

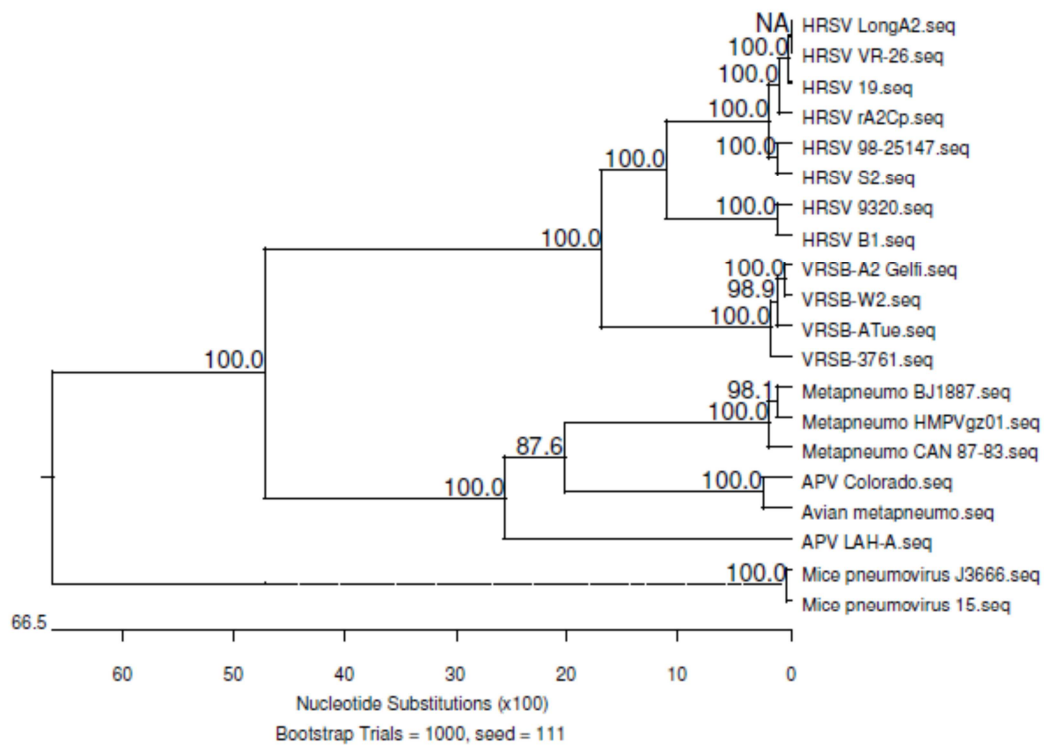


Figure 14 : Arbre phylogénétique avec racine des génomes des membres de la sous famille *Pneumoviridae*

Pour analyser plus en détail l'évolution des souches de VRSB, nous avons réalisé des analyses phylogénétiques sur une partie des gènes codant les protéines G, F et N, pour lesquels nous disposions d'un nombre conséquent de séquences.

- *Analyse phylogénétique du gène G*

L'analyse phylogénétique a été réalisée en comparant une séquence de 438 nucléotides du gène G (position nt 262-700) des 3 souches isolées avec 61 séquences, sélectionnées pour leur non-redondance, connues dans les banques de données, et en prenant comme racine une séquence similaire de HRSV et de ORSV. Les résultats sont présentés dans la Figure 15.

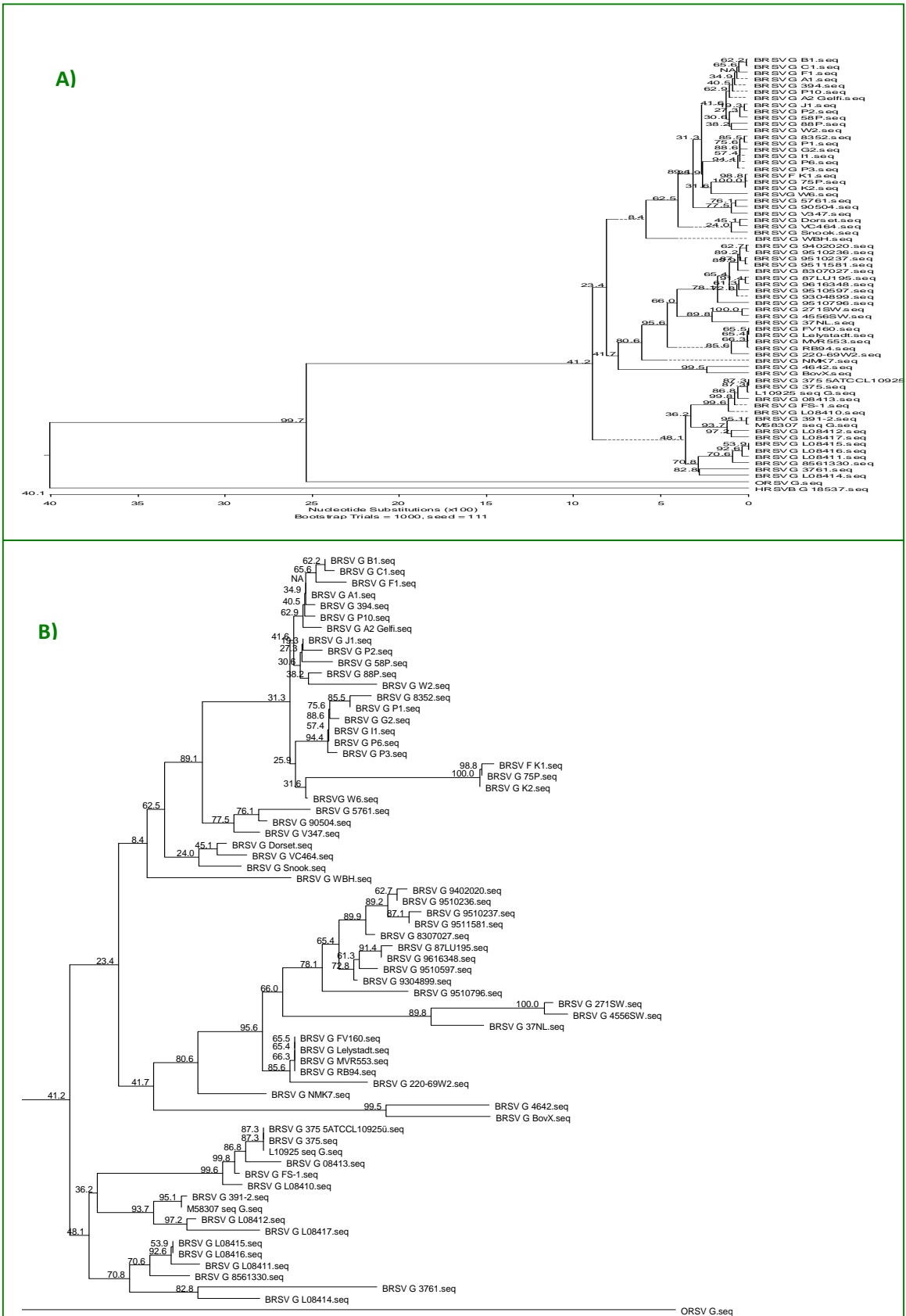


Figure 15 : Arbres phylogénétiques sur la séquence nucléotidique de G (position nucléotidique 262-700) entre les souches 3761, A2-Gelfi et W2 en comparaison avec les séquences d'isolats de VRSB obtenus à partir des banques de données. (Programme MegAlin, DNASTar Lasergen, alignement multiple par le programme CLUSTAL W). A) arbre phylogénétique global, B) grossissement sur les séquences VRSB.

Au sein des *Pneumovirus*, les différences en nucléotides entre la souche VRSH et les différentes souches de VRSB varient entre 64,3 et 78,2% pour le gène G (dédit du calcul de l'arbre, non montré), alors que les différences entre différentes souches de VRSB sont de 0,1 à 16,7%. Ces données confirment le caractère hypervariable de ce gène. Ces résultats de parenté nucléotidique sont supérieurs à ceux observés lorsque l'on compare l'entièreté du gène G (Tableau 9). Cela s'explique par la localisation et la longueur de la séquence utilisée pour l'amplification (zone hypervariable) pour la construction des arbres phylogénétiques, et ou l'élargissement du nombre de séquences exploitées. Ainsi les souches A2 Gelfi et W2 apparaissent très proches (2,8% de différences nucléotidique) alors que les différences entre la souche 3761 et les souches A2 Gelfi et W2 sont de 12,5 et 13,1%.

L'arbre phylogénétique de G permet de définir 5 à 6 groupes génétiques avec des résultats globalement similaires à ceux décrits par Valarcher *et al.* (2000) (voir Figure 8, page 74). Toutefois les scores de bootstrap sont relativement faibles pour les séparations entre groupes phylogénétiques et les analyses statistiques ne permettent pas de différencier clairement les sous-groupes 1 et 2. Ces différences avec les résultats de Valarcher *et al.* (2000) peuvent s'expliquer par la méthode utilisée et/ou l'adjonction de nouvelles séquences depuis 2000, qui affinent l'arbre phylogénétique. La méthode utilisée est très similaire : le choix d'une séquence VRSH et VRSO pour enraciner l'arbre, un alignement par le même programme Clustal, la même région séquencée et un arbre construit sur le même principe (méthode Neighbor-joining).

Selon Valarcher *et al.* (2000), il existe une évolution à la fois géographique et temporelle du VRSB. Ainsi les souches américaines sont pratiquement toutes regroupées dans un sous-groupe, et les souches européennes dans quatre sous-groupes, en fonction de la date et du lieu de l'isolement. En France, et notamment dans le Sud-Ouest, les souches isolées de 1985 à 2000 étaient toutes regroupées dans les groupes génétiques V et VI. Les souches A2 Gelfi et W2, isolées dans notre étude en 1996 et 2000, confirment ces données puisqu'elles appartiennent au groupe V. Cependant, depuis 2000, deux publications sont parues sur la phylogénie des souches anglaises (Nettleton *et al.*, 2003) et suédoises de VRSB (Bidokhti *et al.*, 2012). Si les souches suédoises forment un groupe proche des souches danoises (groupe II), sept des huit souches isolées en Grande Bretagne entre 1997 et 1999, à partir de cas

cliniques respiratoires sévères sont comparables et plus proches des souches isolées aux USA que d'autres souches anglaises ou récemment identifiées en Europe.

Dans notre arbre phylogénétique, le premier groupe à diverger est le groupe génétique III des souches américaines, qui contient notamment la souche VRSB 3761. Cette souche présente un pourcentage moyen de divergence avec les autres souches de VRSB compris entre 7,9 et 16,7%. Ainsi nos résultats montrent que des souches de génotypes différents co-circulent dans une même région sur une période de 3 ans. Par ailleurs, une de ces souches, la 3761, appartient au génotype III, dans lequel aucune souche n'avait été isolée en France. Ce résultat est en accord avec celui obtenu en Grande Bretagne (Nettleton *et al.*, 2003).

- *Analyse phylogénétique du gène F*

L'analyse phylogénétique a été réalisée en comparant une séquence de 742 nucléotides du gène F (position nt 512-1254) des 3 souches isolées avec 26 séquences sélectionnées dans les banques de données. Les résultats sont présentés dans la Figure 16.

Au sein des *Pneumovirus*, les différences en nucléotides entre la souche VRSH et les différentes souches de VRSB varient entre 26,2 et 27,4%.

Au sein des différentes souches de VRSB, ces différences sont de 0,1 à 5,6%, ce qui confirme le caractère conservé de ce gène. Les souches A2 et W2 apparaissent très proches (0,5 % de différences nucléotidiques), alors que les différences entre la souche 3761 et les souches A2 Gelfi et W2 sont de 5,6 %. C'est la souche VRSB 3761 qui présente le plus de divergence moyenne avec les autres isolats de VRSB (3,3 à 5,6%).

Le nombre de séquences disponibles pour F ne permet pas une séparation en 6 groupes génétiques, mais globalement, l'arbre phylogénétique confirme les différences observées pour le gène G et notamment entre les souches 3761 et A2 Gelfi/W2.

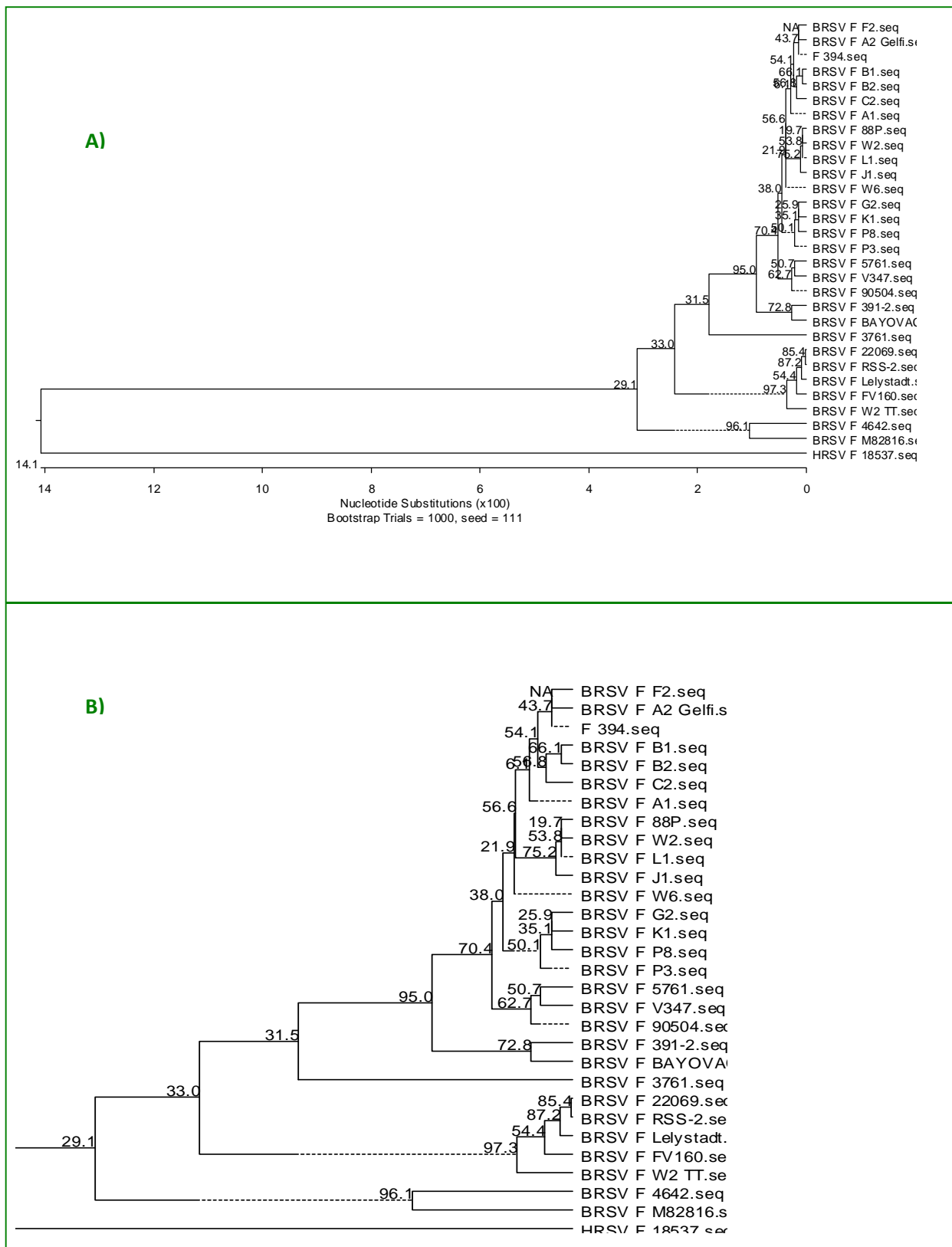


Figure 16 : Arbres phylogénétiques sur la séquence nucléotidique de F (position nucléotidique 512-1254 ) entre les souches 3761, A2-Gelfi et W2 en comparaison avec les séquences d'isolats de VRSB obtenus à partir des banques de données. (Programme MegAlin, DNASTar Lasergen, alignement multiple par le programme CLUSTAL W). A) arbre phylogénétique global, B) grossissement sur les séquences VRSB

- *Analyse phylogénétique du gène N*

L'analyse phylogénétique a été réalisée en comparant une séquence de 690 nucléotides du gène N (position nt 162-852) des 3 souches isolées avec 24 séquences sélectionnées dans les banques de données. Les résultats sont présentés dans la Figure 17.

Au sein des *Pneumovirus*, les différences en nucléotides entre la souche VRSH et les différentes souches de VRSB varient entre 23,1 et 24,9 %, des niveaux identiques à ceux observés pour le gène F.

Au sein des différentes souches de VRSB, ces différences sont de 0,1 à 4,5%, un écart légèrement moins grand que celui observé pour le gène F, ce qui là aussi confirme le caractère conservé de ce gène. Les souches A2 et W2 apparaissent très proches (0,4 % de différences nt) alors que les différences entre la souche 3761 et les souches A2Gelfi et W2 sont de 3,7 et 3,9 %, respectivement. Là encore, la souche VRSB 3761 présente le plus de divergence moyenne avec les autres isolats de VRSB (1,9% à 4,5%).

Les observations à partir de l'arbre phylogénétique montrent des résultats très similaires à ceux observés pour l'arbre phylogénétique de F. La similarité des résultats pour les gènes F, G et N suggère une évolution similaire pour les 3 gènes, avec une pression de sélection plus importante sur le gène G. Globalement les pourcentages de différences nucléotidiques observés lors de notre étude sont supérieurs dans notre étude que ceux obtenus par Valarcher *et al* (2000), à savoir 15,6% vs 8% pour G, 5,6 vs 2% pour F et 4,4 vs 2% pour N. Cela s'explique par le taux de divergence plus élevé pour les souches récemment isolés et de génotype III, dont la souche VRSB 3761. Ces taux de différences restent cependant très inférieurs à ceux observés entre souches de différents sous-groupes de VRSH (>35% pour G, >20% pour F et >16% pour N).

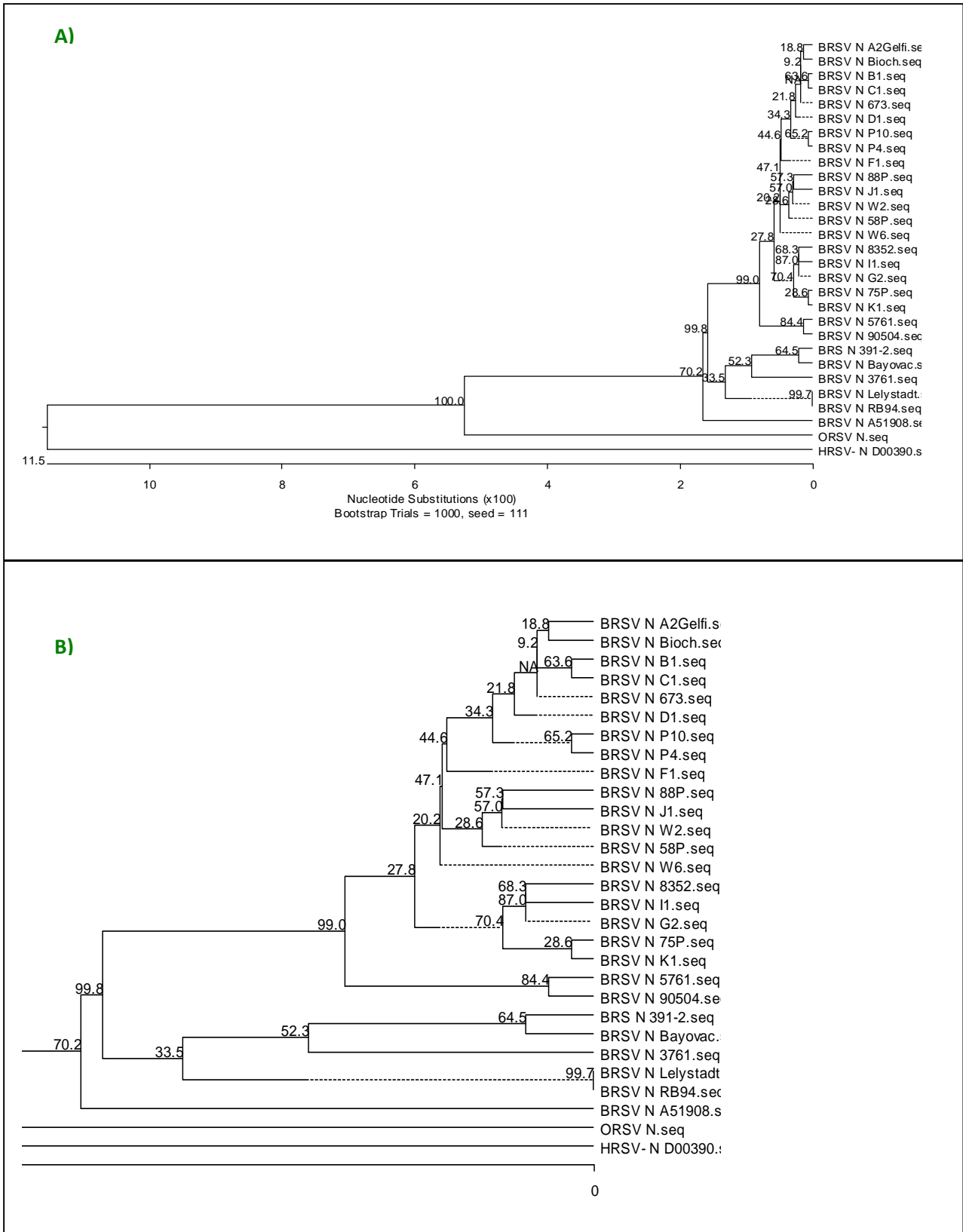


Figure 17 : Arbres phylogénétiques sur la séquence nucléotidique de N entre les souches 3761, A2-Gelfi et W2 en comparaison avec les séquences d'isolats de VRSB obtenus à partir des banques de données. (Programme MegAlin, DNASTAR Lasergen, alignement multiple par le programme CLUSTAL W).



### III.3 Analyses des séquences amino-acides déduites

#### III.3.1 Organisation générale

La position des phases ouvertes de lecture (ORF) a été obtenue à partir de l'analyse des séquences complètes (Tableau 9). Les ORFs potentielles obtenues sont similaires pour les 3 souches de VRSB étudiées.

N0	POSITION	PROTEINE	NBRE DE NT	NBRE D'AA	DEB	FIN
1	1 - 114		114	38		TGA
2	99 - 506	NS1	408	136	ATG	TAG
3	609 - 980	NS2	372	124	ATG	TAG
4	1165 - 1293		129	43	ATG	TAA
5	1116 - 2312	N	1197	399	ATG	TGA
6	2299 - 3069	P	771	257	ATG	TGA
7	3216 - 3983	M	768	256	ATG	TAA
8	4159 - 4506	SH	348	116	ATG	TAA
9	4478 - 4624		147	49	ATG	TAA
10	4612 - 4737		126	42	ATG	TAA
11	4897 - 5034		138	46	ATG	TAA
12	4677 - 5471	G	795	265	ATG	TAA
13	5529 - 5684		156	52	ATG	TGA
14	5566 - 7287	F	1722	574	ATG	TGA
15	7519 - 8076	M2-1	558	186	ATG	TAA
16	8063 - 8341	M2-2	279	93	ATG	TAG
17	8410 - 14895	L	6486	2162	ATG	TAA

Tableau 10 : Position des ORFs potentielles pour la souche 3761. Les séquences restées en noir ne correspondent à aucune ORF connue.

L'analyse a montré qu'il y avait 16 ORFs potentielles dont 11 étaient connues comme séquences codantes pour les protéines virales. Les 5 autres ORFs codent pour des protéines hypothétiques de petite taille (entre 38 et 52 aa), et ne correspondent à aucune protéine décrite jusqu'à présent dans la littérature. L'ordre des différentes ORF est, bien sûr, identique à celui décrit pour le VRSB ATue et le VRSH .

### III.3.2. Degrés de parenté entre les différentes ORF du VRSB

Le tableau 11 présente les degrés d'identité en acides aminés (aa) entre souches de VRSB.

	<b>ATue / 3761</b>	<b>ATue / W2</b>	<b>ATue / A2Gelfi</b>	<b>3761/ W2</b>	<b>3761/ A2Gelfi</b>	<b>W2/ A2Gelfi</b>	<b>HSRV(A2)/ ATue</b>
<b>NS1</b>	95,59	98,53	98,53	95,59	95,59	100	67,1
<b>NS2</b>	99,19	99,19	98,39	98,39	97,58	99,19	84
<b>N</b>	99,75	99,5	99	99,25	98,75	99,5	93,9
<b>P</b>	97,28	98,44	98,44	97,28	96,5	99,22	80,6
<b>M</b>	99,21	99,61	99,21	99,61	99,21	99,61	89,1
<b>SH</b>	83,62	89,66	89,66	81,03	81,03	98,28	46,2
<b>G</b>	87,55	92,61	93,38	84,44	84,05	96,20	26,8
<b>F</b>	96,34	98,43	98,78	96,52	96,86	99,30	80,0
<b>M2.1</b>	99,46	99,46	98,92	98,39	99,46	98,92	76,9
<b>M2.2</b>	94,62	97,78	97,85	94,45	95,70	97,79	41,8
<b>L</b>	99,07	98,80	98,66	98,20	97,96	99,49	84,1

Tableau 11 : Degré d'identité entre souches pour les séquences en acides aminés déduites.

La diversité entre souches de VRSB montre des similarités avec ce qui est observé pour le VRSH : les protéines les plus conservées sont les protéines « internes » et la protéine F, alors que les protéines SH et G sont les plus divergentes entre souches (Johnson et Collins, 1988b).

Si on se réfère aux écarts de parenté entre les VRSB, on peut définir un ordre comme suit, allant du plus au moins conservé : L-M-N-NS2-M2.1 < P-NS1-F < M2.2 < G-SH. Les séquences en acides aminés les plus conservées sont NS2, N, M, M2-1 et L : plus de 99% d'homologie entre souches de VRSB et plus de 84% d'homologie avec la souche VRSH A2. Les protéines NS1, P, F et M2-2 présentent des degrés d'homologie variant de 94 à 98% entre souches de BRSV. Enfin, les protéines G et SH sont les moins conservées avec de nettes différences entre souches: Les souches A2 et W2 présentent des degrés d'homologie de 96 et

98% pour G et SH alors que les souches 3761 et W2 présentent des degrés d'homologie de 84% pour G et 81% pour SH. Si on compare par rapport à l'ordre de parenté des séquences nucléotidiques des gènes (L-M2-F-P-M-N-NS1-NS2-SH-G), on retrouve globalement le même ordre, excepté pour les protéines non structurales et notamment NS2, dont la séquence en acides aminés est conservée et la séquence nucléotidique du gène variable. Par ailleurs, les protéines G et SH sont les seules pour lesquelles le degré de parenté des séquences en acides aminés est plus faible que le degré de parenté entre séquences nucléotidiques. Ceci suggère que les substitutions d'acides aminés sont particulièrement retenues.

### III.3.3 Substitutions synonymes/ non synonymes

Nous avons par la suite calculé le rapport entre les substitutions entraînant un changement (non synonyme ou NSyn) ou non (synonyme ou Syn) d'acide aminé pour chaque séquence et pour l'ensemble des souches (Tableau 12):

	<b>AA (n)</b>	<b>NSyn (n)</b>	<b>Syn (n)</b>	<b>Rapport NSyn/Syn</b>	<b>% NSyn</b>
<b>NS1</b>	136	6	9	0,66	40
<b>NS2</b>	124	3	17	0,18	15
<b>N</b>	399	5	34	0,15	12,8
<b>P</b>	257	9	17	0,53	34,6
<b>M</b>	256	5	27	0,18	15,6
<b>SH</b>	116	13	7	1,85	65
<b>G</b>	257	58	32	1,81	64,4
<b>F</b>	574	27	50	0,54	35,1
<b>M2.1</b>	186	6	13	0,46	31,6
<b>M2.2</b>	93	7	5	1,4	58,3
<b>L</b>	2162	53	166	0,32	24,2

Tableau 12 : Substitutions synonymes et non synonymes pour chaque séquence en acide aminés et pour les trois souches étudiées

Il apparait clairement des différences dans le degré d'acceptation des changements d'acides aminés en fonction des gènes. On peut distinguer plusieurs groupes de séquences selon la valeur du rapport mutations non synonymes/ mutations synonymes :

- NS2, N et M ont un dNSyn/dSyn compris entre 0,15 et 0,18, elles acceptent donc très peu les mutations non synonymes. Les protéines concernées sont des protéines structurales (N et M) et une protéine non structurale NS2. Plus particulièrement pour NS2, qui est apparue variable dans sa séquence nucléotidique, la grande majorité des substitutions n'entraînent pas de changement d'aa, ce qui est totalement différent pour NS1 ou le rapport NSyn/Syn est de 0,66. Le rôle de NS1 et de NS2 est de réguler la réponse immunitaire non spécifique de l'hôte en inhibant les facteurs IFN $\alpha/\beta$ . L'infectiosité de VRSB mutant délétees en NS1 et NS2 est limitée chez les veaux en modèle expérimental (Valarcher and Taylor, 2007). Pour le VRSB, il a été montré que NS2 jouait un rôle majeur l'effet inhibiteur le plus fort par rapport à NS1, alors que le contraire était observé pour le VRSH. Sans avoir de certitudes, on peut imaginer que NS2 tolère moins les mutations non synonymes pour le VRSB ,en raison de son rôle plus important dans la pathogénicité virale.
- NS1, P, F, M2-1 et L ont un dNSyn/dSyn compris entre 0,32 (L) et 0,66 (NS1) alors que les rapports dNSyn/dSyn, compris entre 1,4 et 1,85, sont les plus élevés pour les gènes hypervariables G et SH , conformément à ce qui a été observé précédemment pour le VRSH (Johnson et Collins, 1989). Ces données confirment aussi la capacité du gène G à tolérer un grand nombre de changements d'acides aminés sans altérer sa fonction (Deplanche *et al.*, 2007). Il sera intéressant dans une prochaine étape de localiser les points de mutations, par rapport aux domaines connus pour jouer un rôle dans la fonction de la protéine ou dans son pouvoir immunogène.
- La glycoprotéine F est avec G, une protéine immunodominante, à l'origine de la production d'anticorps neutralisants. Contrairement à G, elle reste très conservée avec un rapport NSyn/Syn toutefois relativement élevé. Il se pourrait que certaines régions du gène n'acceptent aucune mutation nucléotidique, comme le laisse suggérer une analyse plus précise de son gène (données non montrées), en rapport avec son activité de fusion entre enveloppe virale et membrane plasmique.

Lorsque l'on s'intéresse aux mutations NSyn et Syn, pour chaque souche (Tableau 13), on s'aperçoit que les rapports ne sont pas les mêmes selon les souches, notamment entre 3761 et A2 Gelfi/W2. Pour exemple NS1 tolère beaucoup plus de Nsyn pour la 3761, ce qui n'est pas le cas pour les souches A2 Gelfi et W2. Des différences modérées existent aussi pour N, F et L. Pour G et SH, les taux de mutations sont similaires pour les trois souches. Globalement, c'est la souche 3761 qui accepte le plus de mutations non synonymes. Nous n'avons pas d'explication claire sur ces différences entre souches de VRSB

<b>ORFs/Souches</b>	<b>3761</b>	<b>A2</b>	<b>W2</b>
<b>NS1</b>	0,83	0,14	0,14
<b>NS2</b>	0,14	0,11	0,10
<b>N</b>	0,05	0,28	0,14
<b>SH</b>	2,2	2	1,66
<b>P</b>	0,66	0,44	0,33
<b>M</b>	0,33	0,25	0,13
<b>G</b>	1,38	1,23	1,26
<b>F</b>	0,58	0,30	0,34
<b>M2.1</b>	0,25	0,28	0,42
<b>M2.2</b>	1,25	2	1
<b>L</b>	0,21	0,40	0,35

*Tableau 13 : Rapport NSyn/Syn pour chaque souche par rapport à VRSB ATue, calculés pour tous les ORF*

### III.4 Etude comparative du pouvoir pathogène

Compte tenu des différences observées entre les trois isolats de VRSB, nous avons cherché à savoir si ces souches avaient un pouvoir pathogène différent. Des infections expérimentales avaient préalablement été réalisées sur des veaux de race identique, d'âge identique et selon un protocole d'infection très similaire. Toutefois, ces expériences n'ont pas été menées au même moment et au même endroit. Par conséquent, les données qui suivent doivent être interprétées avec précaution et n'ont qu'une valeur indicative.

#### *III.4.1 Suivi clinique*

Deux séries d'expérimentations ont été réalisées de 2001 à 2005. Dans la suite de l'exposé, nous décrirons les 5 lots d'animaux en utilisant les dénominations suivantes :

- VRSB 3761: veaux infectés avec la souche 3761
  - VRSB A2 Gelfi: veaux infectés avec la souche VRSB A2 Gelfi
  - VRSB W2: veaux infectés avec la souche VRSB W2
  - Témoin 1 : veaux non infectés, pour le lot témoin de l'expérience avec 3761
  - Témoin 2 : veaux non infectés, pour le lot témoin de l'expérience avec les autres souches
- 
- Scores cliniques

Les moyennes des scores cliniques par lot et par jour sont représentées sur la figure 18.

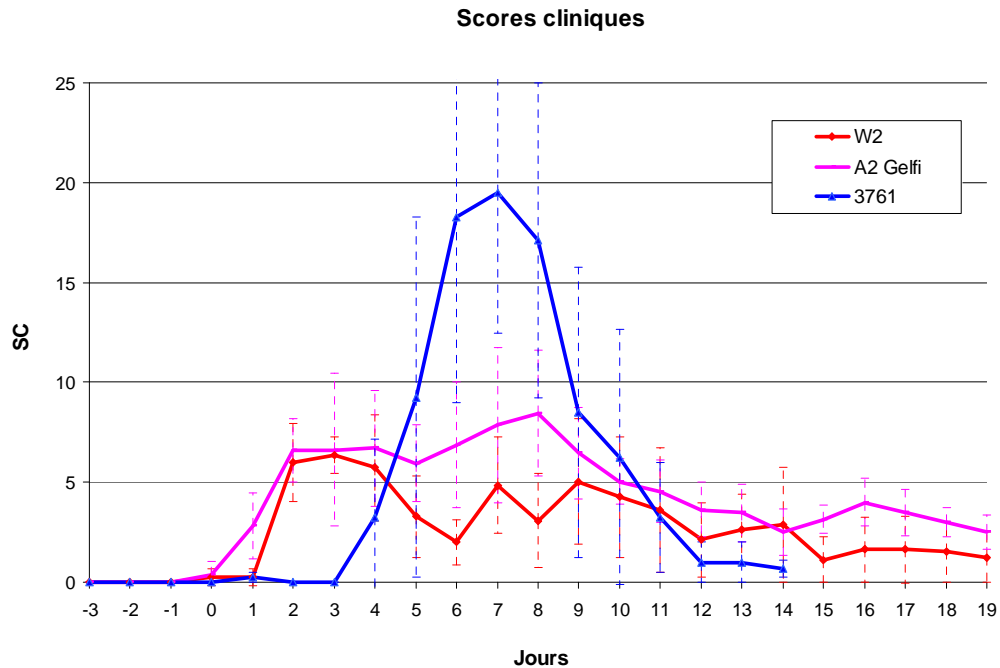


Figure 18 : Moyennes (et écarts types) des scores cliniques pour les lots 3761, A2 Gelfi, et W2

Pour les lots VRSB A2 Gelfi et VRSB W2, il n’y a pas de différence significative dans l’intensité et l’évolution temporelle des signes cliniques. Par contre, une différence dans le délai d’apparition, dans la cinétique d’évolution et l’intensité de la maladie a été observée entre les souches W2/A2, et 3761. Les signes cliniques apparaissent en moyenne à J1 p.i pour le lot A2 Gelfi, à J2 p.i pour le lot W2 et à J4 p.i pour le lot 3761.

Pour le lot A2 Gelfi, le pic clinique moyen est atteint à J8 p.i pour une valeur de 8,46 +/- 3,13. La courbe démarre à J1, croît fortement jusqu’à J2, se stabilise entre J2 et J6, croît fortement entre J6 et J8, et décroît progressivement à partir de J8. Pour le lot W2, le pic clinique moyen est atteint à J3 p.i pour une valeur de 6,34 +/- 0,91. La courbe démarre à J2 et décroît progressivement de J4 à J6, puis varie entre J6 et J9, pour enfin décroître progressivement à partir de J9. Pour le lot 3761, le pic clinique moyen est atteint à J7 p.i pour une valeur de 19,5 +/- 7. La courbe démarre à J4, croît fortement jusqu’à J7 puis décroît fortement jusqu’à J12 jusqu’à des valeurs presque nulles.

Globalement les écart-types sont importants pour les différents groupes et plus spécifiquement le groupe 3761 (0 à 9,25). Ces fortes variations montrent une grande hétérogénéité intragroupe pour le lot 3761. Cela s’explique par le fait que des signes cliniques

sévères d'affection respiratoire n'ont été observés que pour le groupe 3761, et seulement pour 2 veaux sur les 5 inoculés. La présence de signes cliniques sévères sur une partie seulement des animaux est conforme à ce qui a été observé dans les conditions naturelles ou lors d'expériences précédentes (Ellis *et al.*). Pour diminuer l'effet de la variabilité individuelle, il serait nécessaire d'augmenter le nombre d'animaux testés et/ou de mieux standardiser le fond génétique et le statut sanitaire des veaux. Toutefois, dans ce cas, on s'éloigne des conditions naturelles d'infection par le VRSB.

Si on compare les scores cliniques entre les 3 groupes, des différences significatives (ANOVA avec correction de Bonferroni) sont observées entre le groupe 3761 et les groupes A2 Gelfi et W2, de J6 à J8 post-infection. La virulence de la souche 3761 semble donc être plus forte que pour les autres souches étudiées.

- Températures et fréquences respiratoires

Les courbes de température rectale (TR) et de fréquence respiratoire (FR) sont présentées respectivement dans les figures 19 et 20.

En ce qui concerne les lots témoins, on ne note pas de modification significative de la température et de la fréquence respiratoire au cours des expérimentations. Cependant les valeurs moyennes de fréquences respiratoires sont plus élevées pour l'expérimentation 2 que pour la 1, soulignant les différences liées aux conditions expérimentales.



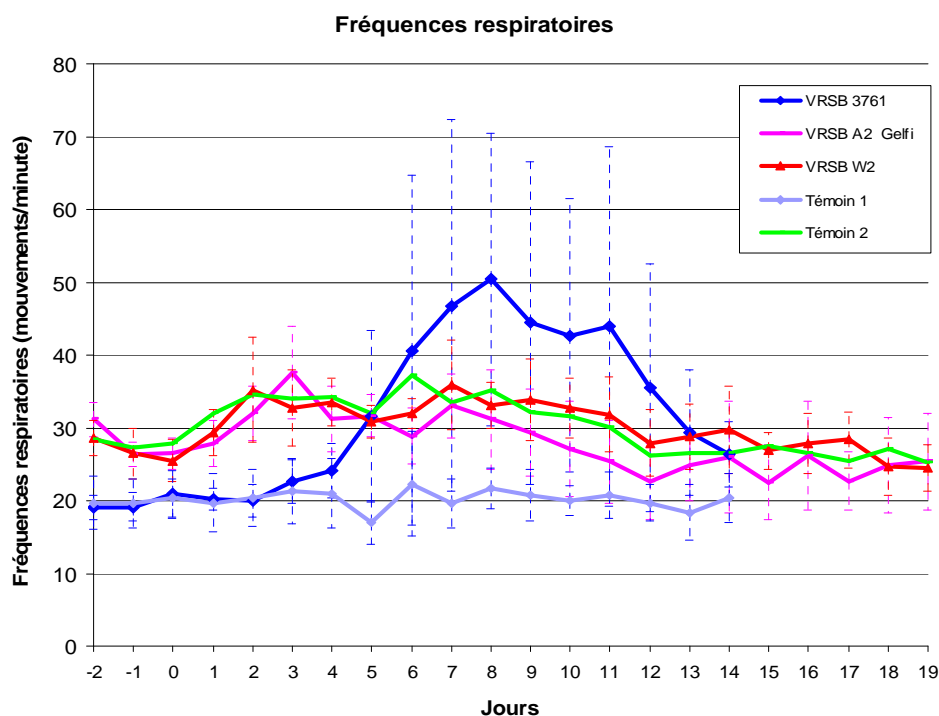


Figure 19 : Moyennes (et écarts types) des fréquences respiratoires pour les lots 3761, A2 Gelfi, W2, et les témoins 1 et 2

A J0, la fréquence respiratoire moyenne est de  $26,5 \pm 2$  mouvements/minutes pour la souche A2 Gelfi, et de  $25,5 \pm 5$  mouvements/minute pour la souche W2. Pour les lots A2 Gelfi et W2, les courbes de fréquences respiratoires suivent des profils similaires. Le pic de FR moyen est atteint à J3 avec  $37,5 \pm 6$  mouvements/minute pour A2 Gelfi et à J2 et J7 avec  $35,5 \pm 6$  mouvements/minute pour W2.

Pour la souche 3761, la fréquence respiratoire à J0 est de  $21 \pm 3$  mouvements/minutes. La courbe démarre à J3 et le pic moyen est atteint à J8 avec  $51 \pm 20$  mouvements/minutes. Les écarts types varient de 2 à 25 mouvements/minutes autour de J8, ce qui montre, là encore, une forte hétérogénéité intragroupe autour du pic.

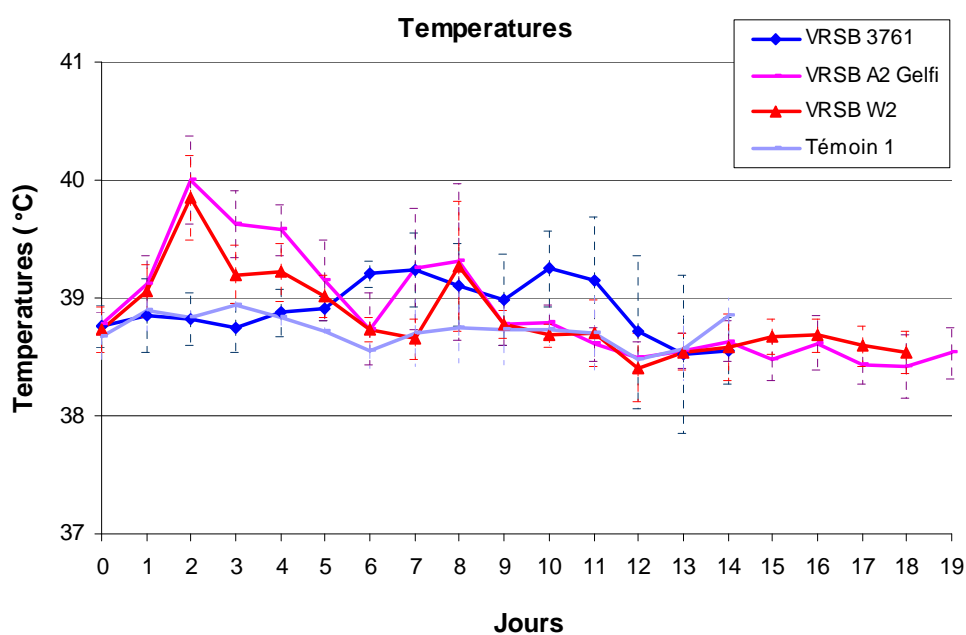


Figure 20 : Moyennes (et écarts types) des températures pour les lots 3761, A2 Gelfi, W2, et témoin 1

La température rectale moyenne à J0 est 38,8 +/- 0,1 °C pour le lot A2 Gelfi et 38,7 +/- 0,2 °C pour le lot W2. Pour le lot 3761, la température rectale à J0 est de 38,7 +/- 0,2 °C. Une augmentation de la température rectale est observée à J1 pour les lots A2 Gelfi et W2. Le pic moyen de température est atteint à J2 pour ces deux lots, avec des valeurs moyennes de 40 +/- 0,4 pour A2 Gelfi et 39,9 +/- 0,4 °C pour W2. Les températures décroissent ensuite de façon quasi similaire pour ces deux lots jusqu'à J6 pour A2 Gelfi et J7 pour W2, pour connaître un nouveau pic à J8 à 39,3 +/- 0,6 °C pour les deux souches. A partir de J9, les températures se stabilisent à nouveaux autour de 38,5°C. Les différences sont significatives entre le lot témoin et les groupes A2Gelfi et W2 à J2.

Pour le lot 3761, une légère augmentation de la température est observée à J6 avec une croissance progressive jusqu'à un pic de température à J10 à 39,3 +/- 0,7°C. Les températures restent élevées entre J6 et J12, comprises entre 39 et 39,3°C. Toutefois les différences ne sont pas significatives avec le groupe contrôle.

### *III.4.2 Virologie*

Le suivi virologique du VRSB a été réalisé directement par RT-qPCR à partir des écouvillons nasaux des veaux infectés. Aucun virus n'a pu être détecté chez les animaux contrôles non infectés. Les résultats sont présentés à la Figure 21, indépendamment pour les deux expériences, car la nature du gène cellulaire rapporteur est différente. Par comparaison aux gammes plasmidiques (données non montrées), sur une même PCR, les quantités obtenues pour les gènes GAPDH étaient en moyenne 10 fois supérieures aux quantités obtenues de  $\beta$ -actine. Les données sont exprimées pour  $10^7$  copies de  $\beta$ -actine pour le groupe 3761 et pour  $10^8$  copies de GAPDH pour les groupes A2Gelfi et W2.

Pour les deux expériences, du VRSB a été détecté chez tous les animaux des jours 1 à 15 après inoculation expérimentale. Les pics moyens apparaissent similaires entre le jour 5 et 7 post-infection pour les 3 souches virales. Les charges virales après infection par la souche VRSB 3761 apparaissent plus importantes (pic excrétion et aires sous la courbe) qu'après infection par les souches W2 et A2Gelfi. Il est toutefois impossible de conclure définitivement, compte tenu des biais liés à la méthodologie. Il n'y avait aucune différence significative entre les souches A2Gelfi et W2 lors de la 2<sup>e</sup> expérience.

La variabilité individuelle est apparue plus importante lors de cette 2<sup>e</sup> expérience, notamment pour le groupe infecté par la souche A2 Gelfi. Cela s'expliquerait en partie, par les cinétiques décalées entre les différents individus.

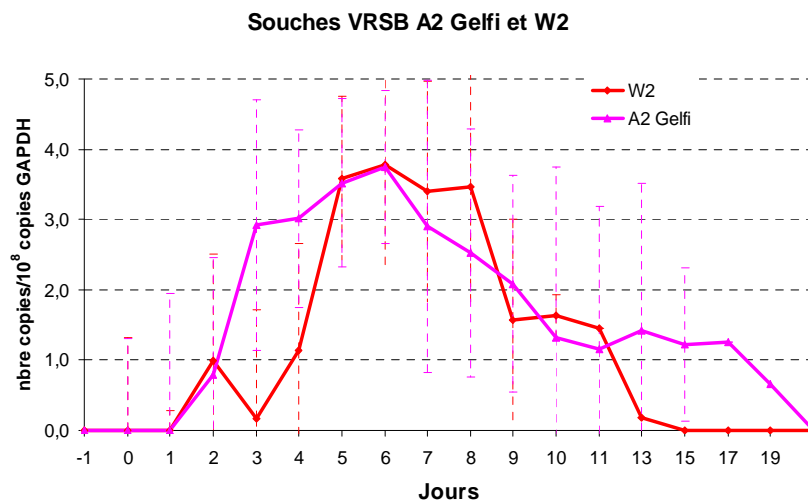
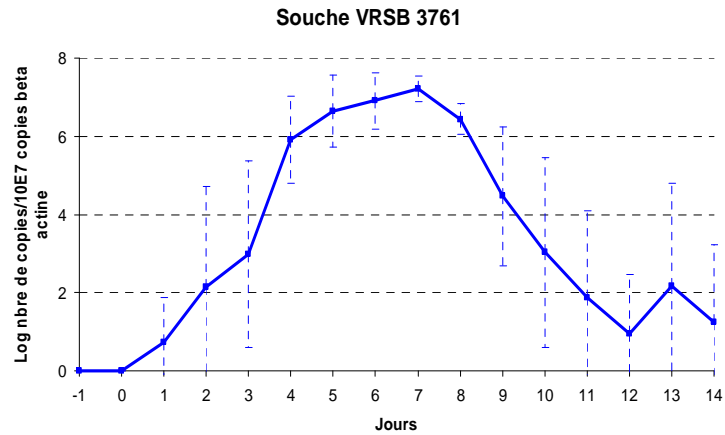


Figure 21 : Charges virales mesurées pour la souche 3761 puis pour les souches A2 Gelfi et W2.

### III.4.3 Réponse sérologique

Les réponses sérologiques en IgM et IgG ont été analysées à l'aide de trousse commerciales. Brièvement, les veaux inoculés avec les 3 souches de VRSB font tous une réponse en IgM entre 6 et 8 jours et en IgG totales entre 9 et 12 jours après infection expérimentale, sans différence entre les 3 souches étudiées.

#### III.4.4. Discussion sur les expérimentations animales

Les trois souches étudiées sont issues d'isolats collectés dans des élevages présentant des signes cliniques plus ou moins sévères d'infection à VRSB. Si les fiches d'anamnèse semblent indiquer que seule la souche 3761 a été isolée d'un veau avec syndrome de détresse respiratoire, il est cependant impossible de conclure à une plus forte pathogénicité de cette souche sur base de fiches non standardisées et à partir d'observations cliniques réalisées sur un animal et non sur le lot ou le troupeau. Même si il est aussi impossible de conclure définitivement sur la plus grande virulence de la souche 3761 après infection expérimentale, il n'en reste pas moins que la reproduction de signes cliniques de détresse respiratoire n'a été possible qu'avec cette souche. La souche VRSB3761 a, de plus, montré sa pathogénicité dans d'autres expériences (Boxus *et al.*, 2007).

D'après l'étude clinique, la souche la plus pathogène (3761) n'a pas entraîné d'hyperthermie majeure chez les veaux inoculés, alors qu'un pic rapide et transitoire a été observé pour les souches A2 Gelfi et W2. Ces résultats sont surprenants car, dans les conditions naturelles, l'hyperthermie est considérée comme le paramètre le plus précoce à prendre en considération pour le choix du traitement des bronchopneumonies. Cette différence s'explique par les conditions expérimentales mais aussi par le fait que sur le terrain de nombreux facteurs interviennent, notamment les co-infections bactériennes. L'hyperthermie et la réponse inflammatoire précoce pourraient aussi avoir un rôle sur la multiplication locale du virus et sa capacité ultérieure à induire des signes cliniques. Il semble en effet que les VRSB A2 Gelfi et W2 se répliquent moins efficacement dans la muqueuse nasale que la souche 3761. Malheureusement, il n'a pas été possible de comparer la réplication virale dans l'appareil respiratoire profond pour des raisons techniques. C'est pourtant l'atteinte pulmonaire qui est responsable de la gravité des signes.

A l'inverse de la température rectale, la fréquence respiratoire est bien corrélée aux scores cliniques observés avec des tachypnées sévères (>85 bpm, pour une valeur de référence < 30 bpm) sur certains veaux du groupe 3761.

Ces observations suggèrent donc que différents pathotypes de VRSB pourraient circuler. La littérature n'apporte que très peu de données sur d'éventuelles différences de pathogénicité entre souches virales. Les seules données concernent l'atténuation du pouvoir pathogène

d'une même souche. Sur le terrain, il apparaît aussi difficile de cerner le problème, compte tenu du grand nombre de facteurs favorisants et prédisposants qui influencent la réponse clinique des animaux infectés. Dans ces conditions, seule une expérimentation menée dans les mêmes conditions et sur des animaux similaires pourrait définitivement répondre au problème.

D'après l'étude phylogénétique, la souche 3761 de VRSB est éloignée des souches A2 et W2, et serait plus proche des souches américaines (groupe III). Cet éloignement pourrait être corrélé à un pouvoir pathogène plus important.

# **CONCLUSION**





Dans cette étude, nous avons déterminé les séquences complètes de trois isolats de terrain récents, provenant d'élevages à fort signes cliniques, situés dans le sud-ouest de la France. La connaissance de ces séquences a permis de comparer les souches entre elles par analyse phylogénétique et de les placer au sein de sous-groupes génétiques établis par Valarcher *et al.* en 2000, et ainsi d'apporter de nouvelles données sur la circulation des souches de VRSB en France.

Nous avons mis en évidence la co-circulation dans le sud-ouest de la France de souches (VRSB A2 Gelfi et W2) appartenant aux sous-groupes génétiques V et VI, comme la plupart des isolats français séquencés jusqu'à présent (Valarcher *et al.*, en 2000, données du laboratoire non publiées). Nous avons aussi identifié, pour la première fois, une souche (VRSB 3761) appartenant au sous-groupe III, contenant majoritairement des souches américaines. En 2003, Nettleton *et al.*, sont arrivés au même constat sur huit isolats de terrain anglais. En les comparant avec les séquences disponibles de VRSB provenant d'autres pays, il est apparu que les isolats anglais récents étaient plus proches des isolats américains que de ceux précédemment collectés en Angleterre et que ceux circulant durant la même période en Europe. Alors qu'une évolution spatiale et temporelle du VRSB avait été mise en évidence par Valarcher *et al.* en 2000 pour les souches locales, ces résultats suscitent une interrogation sur la co-circulation de souches européennes et américaines en Europe.

L'origine de cette co-circulation du VRSB entre les souches "françaises" (VRSB A2 GELFI et W2) et une souche "américaine" (VRSB 3761) reste méconnue. Néanmoins plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- La première hypothèse serait l'introduction de souches américaines en Europe par l'augmentation des échanges internationaux de bovins transportés entre les Etats-Unis et le continent américain. Les importations de bovins vivants et les concours bovins sont autant de situations à risque quant à la circulation de pathogènes. Cette hypothèse a été reprise dans d'autres études génétiques s'intéressant à l'herpèsvirus bovin de type 1 (BoHV-1) et au virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) : certains isolats anglais étaient plus proches des souches virales circulant au Etats-Unis que de celles circulant en Europe (Nettleton *et al.*, 2003).

- Une seconde hypothèse, moins probable, serait l'apparition de souches nouvelles provenant de souches vaccinales contenues dans les vaccins atténués, notamment ceux utilisés par voie intranasale. Il est en effet possible que la souche atténuée se multiplie dans la muqueuse nasale et contamine des animaux congénères, se propageant ainsi au sein du troupeau, puis entre troupeaux. On peut aussi imaginer que cette souche évolue par acquisition de mutations qui renversent leur pouvoir pathogène. Cette hypothèse, non prouvée, repose sur le fait que plusieurs vaccins atténués, dont celui utilisé par voie intranasale, contiennent une souche vaccinale isolée aux Etats-Unis et appartenant au groupe génétique des souches américaines.
- La troisième hypothèse serait la circulation depuis de nombreuses années de ces souches à bas bruit sur le continent européen. Dans ce cas, soit le prélèvement initial nous a permis d'isoler une souche rare en termes de fréquence, soit ces souches émergent suite à des mutations ou à un contexte favorable leur fournissant un gain biologique ou fitness plus important. Cette souche a aussi pu être isolée car son pouvoir pathogène fort en faisait une souche dominante au point de vue épidémiologique. Il est en effet rare que les éleveurs appellent les vétérinaires, pour des épisodes à VRSB sans conséquences cliniques sur le troupeau. Les études d'infection expérimentale confirment d'ailleurs le pouvoir pathogène majeur de la souche VRSB 3761.

Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses, l'analyse d'un plus grand nombre de souches et de façon plus poussée est nécessaire, en complément d'études fonctionnelles. Les techniques de séquençage à haut débit permettent depuis peu ce type d'analyse et devront être utilisés pour la continuité de ce programme.

Dans notre étude, nous avons constaté que la différence de pouvoir pathogène entre la souche VRSB 3761 et les deux autres souches est associée à des différences génétiques sur toute la longueur du génome. Les souches A2Gelfi et W2 sont en effet très proches et la souche 3761 la plus éloignée, y compris quand on utilise la souche ATue (ou NC) de référence. On peut supposer qu'une partie des mutations que nous avons observées soient impliquées dans les différences de pathogénicité. Nous n'avons bien sûr aucune preuve



disulfures. Cette région contient un épitope majeur « immunodominant ». Les trois souches étudiées ont conservé leur résidus cystéine, néanmoins certains isolats de VRSB, possèdent des mutations d'un ou plusieurs résidus cystéine en alanine ou asparagine (Valarcher *et al.*, 2000, Spilki *et al.*, 2006). L'effet de la perte d'un ou plusieurs résidus cystéines n'a pas été déterminée, toutefois la délétion des 4 cystéines de la région conservée n'altère pas l'infectiosité en cultures cellulaires. Dans une étude récente (Spilki *et al.*, 2006) les cystéines entre les positions 173 et 178 de la souche brésilienne BRSV-25-BR ont été remplacées par des alanines, entraînant une perte des ponts disulfures. Les mutations présentées par les souches brésiennes pourraient avoir été induites par la réponse immunitaire passive et active de l'hôte à l'infection, et le virus pourrait avoir été sélectionné lors d'infections d'individus possédant des anticorps contre le VRSB, par sélection de mutants qui échappent à la réponse immunitaire. Ceci a déjà été démontré *in vitro* pour le VRSH (Martinez *et al.*, 1997). Cependant, des études doivent être menées afin d'évaluer les conséquences possibles sur la virulence et la réponse immunitaire induite par cette souche.

Le rôle de la protéine SH dans la réplication est peu clair : les études portant sur des mutants de VRSB sans protéine SH montrent que ces derniers se répliquent aussi efficacement (Karger *et al.*, 2001). Cependant, une étude de Techaarpornkul (2001) sur le VRSH met en évidence un effet négatif sur la fusion virus/hôte en milieu de culture. Les études préliminaires chez le veau ne montrent pas de diminution de la réplication dans le nasopharynx mais SH semblerait jouer un rôle dans l'établissement de l'infection dans les voies respiratoires inférieures (Valarcher et Taylor, 2007). De plus, comme la protéine G sécrétée, la protéine SH pourrait supprimer certains effecteurs de la réponse innée, jouant ainsi un rôle important dans la résistance des poumons à l'infection par le VRSB. Toutefois il n'a pas été identifié sur la protéine de séquences spécifiques impliquées dans les fonctions de SH. Il nous est donc impossible de vérifier si les mutations que nous avons observées se situent dans des domaines fonctionnels

D'autres protéines ont été impliquées dans la virulence du VRSB. Si les protéines NS1 et NS2 ne sont pas essentielles à la réplication virale *in vitro*, elles jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse innée en inhibant la production d'IFN $\alpha/\beta$  par NF- $\kappa$ B. Dans le cas du VRSB, NS2 semble avoir un effet inhibiteur plus fort, alors que c'est NS1 pour le VRSH (Valarcher et Taylor, 2007). Dans notre étude, NS2 reste la plus conservée, mais NS1 accepte

de nombreuses mutations pour 3761 : on peut envisager l'hypothèse que ces mutations non synonymes lui confèrent un plus grand effet inhibiteur d'IFN $\alpha/\beta$ .

La protéine F possède un effet pathogène direct sur l'hôte : après clivage, une des sous-unités, appelée pep27, est convertie en virokinine dont les effets cytopathiques par bronchoconstriction ont été démontrés *in vivo*. Les études portant sur les mutants délétés de pep27 montrent que ces derniers ne se multiplient pas aussi efficacement et forment peu de syncytia en culture cellulaire (Valarcher *et al.*, 2006). *In vivo*, des différences cliniques ont été observées, suggérant que la virokinine aurait un effet favorisant l'inflammation du tractus pulmonaire.

La séquence codant pour la protéine F est, d'après la bibliographie comme dans notre étude, relativement bien conservée (au moins 96,5% d'identité nucléotidique). Sur pep27 (AA 109-136) seuls trois changements d'acides aminés ont été relevés entre VRSB 3761 et W2 : ces substitutions sont synonymes, (Méthionine  $\rightarrow$  Isoleucine, Lysine  $\rightarrow$  Arginine) et n'ont *a priori* pas de conséquences fonctionnelles. La protéine F, et notamment la virokinine, confère probablement un avantage sélectif au virus.

Finalement, si nous avons pu émettre des hypothèses quant à l'existence de pathotypes différents circulant en France et si ces différences semblent associées à une diversité génétique, aucune démonstration claire n'a été faite. D'autres études doivent ainsi être menées pour confirmer ces différences de pouvoir pathogène : par exemple, deux études pourraient être envisagées.

- En utilisant la technique de génétique inverse, des virus chimères entre la souche 3761 et la souche A2Gelfi pourraient être produits et comparés aux virus parentaux en modèle d'infection expérimentale. Des régions génomiques, voir des gènes (G, SH...) seraient tout particulièrement étudiés. Ainsi les régions du génome ayant l'impact le plus fort sur le pouvoir pathogène seraient déterminées.
- Dans la mesure où nous disposons d'une souche pathogène isolée de l'animal, l'étude de son atténuation par passages en cultures cellulaires est envisagée. Après vérification de l'atténuation en modèle veau, la comparaison des séquences consensus des génomes entre la séquence originelle, les séquences aux différents passages et la


séquence atténuée permettrait d'étudier la baisse progressive et relative du pouvoir pathogène et l'identification des marqueurs génétiques de virulence. Les techniques d'analyse de séquences à haut débit devraient nous permettre d'obtenir rapidement ces séquences. Une fois les mutations non synonymes identifiées, des techniques de génétique inverse permettraient de caractériser l'impact de chaque mutation sur le pouvoir pathogène de la souche virale. Ainsi, nous disposons maintenant de la souche VRSB 3761 du passage 0 au passage 100 en cellules BT. Une étude préalable (Le Mercier, 2003), a déjà montré que 8 passages en cultures cellulaires était associée à une modification de la cinétique d'infection, avec l'existence de 3 substitutions non synonymes dans le génome viral.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**



**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, **Gilles MEYER**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **AUSSAVY Manon** intitulée « *Phylogénie du virus respiratoire syncytial bovin : Etude comparative du génome de trois pathotypes.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 6 Septembre 2012  
Docteur **Gilles MEYER**  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur **Alain MILON**

Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur **Jacques IZOPET**



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
**Paul Sabatier**  
Professeur **Bertrand MONTHUBERT**


**M**  
a été admis(e) sur concours en :  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 30/6/2010  
a validé son année d'approfondissement le : 30/6/2012  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.





## Annexe 1 : Fiche d'évaluation clinique biquotidienne

INRA - ENVT  
UMR 1225 IHAP

Code: TRANSVIRO INRA  
Responsable : G. MEYER

### *Fiche clinique*

---

Veau: Groupe: N° identification:
--

Race: Sexe: Date de naissance:
--------------------------------------

**Semaine N°**

<b>Date, jour</b>						
<b>Heure</b>						
<b>Température rectale</b>						
<b>Fréquence respiratoire</b>						
<b>Toux</b> 0= absente 1= Sonore 2= faible						
<b>Jetage</b> 0= absent 1= séromuqueux 2= purulent						
<b>Dyspnée abdominale (O/N)</b>						
<b>Refus alimentaire</b> 0 = absent 1 = partiel 2 = total						
<b>Comportement</b> 0 = normal 1= triste 2= abattu						
<b>Prélèvements</b>						
<b>Remarques Paraphe</b>						

## Annexe 2 : Mode de calcul du score clinique

Signes	Note	Coefficient
<b>Fréquence respiratoire</b>		
< 30 mvts/min	1	3
30 mvts/min ? < 40 mvts/min	2	
40 mvts/min ? < 60 mvts/min	3	
? 60 mvts/min	4	
<b>Refus alimentaire</b>		
0	1	2
0 < < 30%	2	
30% ? < 60%	3	
? 60%	4	
<b>Comportement général</b>		
Normal	1	2
Moyennement altéré	2	
Très altéré	3	
<b>Écoulement nasal</b>		
Nul	1	1
Modéré	2	
Fort	3	
<b>Toux</b>		
Nulle	1	2
Modérée	2	
Forte	3	
<b>Dyspnée</b>		
Absente	1	3
Abdominale modérée	2	
Abdominale forte	3	
<b>Bruits respiratoires</b>		
normaux	0	3
Légèrement renforcés	1	
renforcés	2	
Renforcés + surajoutés	3	







	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	
BRSV W2.seq	TGATTGAGAAAATAAGATCAGAAGCTTTAATGACTAACGATAGGTTAGAAGCAATGGCCAGGCTTAGGGATGAAGAAAGT								2960
BRSV-A2 Gelfi.seq	TGATTGAGAAAATGAGATCAGAAGCTTTAATGACTAACGATAGGTTAGAAGCAATGGCCAGGCTTAGGGATGAAGAAAGT								2959
NC sequence.seq	TGATTGAGAAAATAAGATCAGAAGCTTTAATGACTAACGATAGGTTAGAAGCAATGGCCAGGCTTAGGGATGAAGAAAGT								2959
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TGATTGAGAAAATAAGATCAGAAGCTTTAATGACTAACGATAGGTTAGAAGCAATGGCCAGGCTTAGGGATGAAGAAAGT								2955
Majority	GAAAAGATGACAAAAGAXACATCAGATGAAGTAAATTAACCCCTACCTCAGAGAXGCTGAACATGGTATTAGAAGATGA								
	2970	2980	2990	3000	3010	3020	3030	3040	
BRSV W2.seq	GAAAAGATGACAAAAGACACATCAGATGAAGTAAATTAACCCCTACCTCAGAGAGGCTGAACATGGTATTAGAAGATGA								3040
BRSV-A2 Gelfi.seq	GAAAAGATGACAAAAGACACATCAGATGAAGTAAATTAACCCCTACCTCAGAGAGGCTGAACATGGTATTAGAAGATGA								3039
NC sequence.seq	GAAAAGATGACAAAAGATACATCAGATGAAGTAAATTAACCCCTACCTCAGAGAGGCTGAACATGGTATTAGAAGATGA								3039
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GAAAAGATGACAAAAGATACATCAGATGAAGTAAATTAACCCCTACCTCAGAGAGGCTGAACATGGTATTAGAAGATGA								3035
Majority	AAGTAGTGACAATGATCTATCACTTGAAGATTTCTGAAXAGCAACCAXCCCACXCAACAGATTGGTCAGATAGATCA								
	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120	
BRSV W2.seq	AAGTAGTGACAATGATCTATCACTTGAAGATTTCTGAAXAGCAACCAXCCCACACACACAGATTGGTCAGATAGATCA								3120
BRSV-A2 Gelfi.seq	AAGTAGTGACAATGATCTATCACTTGAAGATTTCTGAAXAGCAACCAXCCCACACACACAGATTGGTCAGATAGATCA								3119
NC sequence.seq	AAGTAGTGACAATGATCTATCACTTGAAGATTTCTGAAXAGCAACCAXCCCACACACAGATTGGTCAGATAGATCA								3119
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AAGTAGTGACAATGATCTATCACTTGAAGATTTCTGAAXAGCAACCAXCCCACACACAGATTGGTCAGATAGATCT								3115
Majority	AXCATCAATGATAAAGCCAACTAATCAACCAACCAACAGTCACTCAACXGCTGTGATTCCACATAGTTAXTAAAAAT								
	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	
BRSV W2.seq	ATCATCAATGATAAAGCCAACTAATCAACCAACCAACAGTCACTCAACXGCTGTGATTCCACATAGTTAXTAAAAAT								3200
BRSV-A2 Gelfi.seq	ATCATCAATGATAAAGCCAACTAATCAACCAACCAACAGTCACTCAACXGCTGTGATTCCACATAGTTAXTAAAAAT								3199
NC sequence.seq	ACCATCAATGATAAAGCCAACTAATCAACCAACCAACAGTCACTCAACXGCTGTGATTCCACATAGTTAXTAAAAAT								3199
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ACCATCAATGATAAAGCCAACTAATCAACCAACCAACAGTCACTCAACXGCTGTGATTCCACATAGTTAXTAAAAAT								3195
Majority	AAAGTAAAAATGGGGCAAATATGGGACATACGTGAACAACTCCATGAAGGATCAACCTACACAGXGCTGTTCCAGTAX								
	3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270	3280	
BRSV W2.seq	AAAGTAAAAATGGGGCAAATATGGGACATACGTGAACAACTCCATGAAGGATCAACCTACACAGXGCTGTTCCAGTAX								3280
BRSV-A2 Gelfi.seq	AAAGTAAAAATGGGGCAAATATGGGACATACGTGAACAACTCCATGAAGGATCAACCTACACAGXGCTGTTCCAGTAX								3279
NC sequence.seq	AAAGTAAAAATGGGGCAAATATGGGACATACGTGAACAACTCCATGAAGGATCAACCTACACAGXGCTGTTCCAGTAX								3279
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AAAGTAAAAATGGGGCAAATATGGGACATACGTGAACAACTCCATGAAGGATCAACCTACACAGXGCTGTTCCAGTAX								3275
Majority	AATGTCATAGAAAAAGATGATGATCTCGCATCTCXACAATATGGGTTCCATGTTCCAATCATCCATCTCTGCTGATTT								
	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360	
BRSV W2.seq	AATGTCATAGAAAAAGATGATGATCTCGCATCTCXACAATATGGGTTCCATGTTCCAATCATCCATCTCTGCTGATTT								3360
BRSV-A2 Gelfi.seq	AATGTCATAGAAAAAGATGATGATCTCGCATCTCXACAATATGGGTTCCATGTTCCAATCATCCATCTCTGCTGATTT								3359
NC sequence.seq	AATGTCATAGAAAAAGATGATGATCTCGCATCTCXACAATATGGGTTCCATGTTCCAATCATCCATCTCTGCTGATTT								3359
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AATGTCATAGAAAAAGATGATGATCTCGCATCTCXACAATATGGGTTCCATGTTCCAATCATCCATCTCTGCTGATTT								3355
Majority	GCTTATAAAGAACTAATCAATGTGAACATATTAGTTCGACAAATTTCTACTCCTCAAAAGGTCCTTCAATGAAGATTATGA								
	3370	3380	3390	3400	3410	3420	3430	3440	
BRSV W2.seq	GCTTATAAAGAACTAATCAATGTGAACATATTAGTTCGACAAATTTCTACTCCTCAAAAGGTCCTTCAATGAAGATTATGA								3440
BRSV-A2 Gelfi.seq	GCTTATAAAGAACTAATCAATGTGAACATATTAGTTCGACAAATTTCTACTCCTCAAAAGGTCCTTCAATGAAGATTATGA								3439
NC sequence.seq	GCTTATAAAGAACTAATCAATGTGAACATATTAGTTCGACAAATTTCTACTCCTCAAAAGGTCCTTCAATGAAGATTATGA								3439
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GCTTATAAAGAACTAATCAATGTGAACATATTAGTTCGACAAATTTCTACTCCTCAAAAGGTCCTTCAATGAAGATTATGA								3435
Majority	TAAACTCAAGAAGTGCTGTACTAGCCCAAATGCCAGCAAAATTTACCATAAGTGCAAAATGTATCATTTGGATGAACGAAGC								
	3450	3460	3470	3480	3490	3500	3510	3520	
BRSV W2.seq	TAAACTCAAGAAGTGCTGTACTAGCCCAAATGCCAGCAAAATTTACCATAAGTGCAAAATGTATCATTTGGATGAACGAAGC								3520
BRSV-A2 Gelfi.seq	TAAACTCAAGAAGTGCTGTACTAGCCCAAATGCCAGCAAAATTTACCATAAGTGCAAAATGTATCATTTGGATGAACGAAGC								3519
NC sequence.seq	TAAACTCAAGAAGTGCTGTACTAGCCCAAATGCCAGCAAAATTTACCATAAGTGCAAAATGTATCATTTGGATGAACGAAGC								3519
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TAAACTCAAGAAGTGCTGTACTAGCCCAAATGCCAGCAAAATTTACCATAAGTGCAAAATGTATCATTTGGATGAACGAAGC								3515
Majority	AAATTXGCATATGACATAACTACTCCTTGTGAAATXAAGGCTTGTAGTTTAAACATGTTTAAAGGTGAAAAATATGCTXAC								
	3530	3540	3550	3560	3570	3580	3590	3600	
BRSV W2.seq	AAATTXGCATATGACATAACTACTCCTTGTGAAATXAAGGCTTGTAGTTTAAACATGTTTAAAGGTGAAAAATATGCTXAC								3600
BRSV-A2 Gelfi.seq	AAATTXGCATATGACATAACTACTCCTTGTGAAATXAAGGCTTGTAGTTTAAACATGTTTAAAGGTGAAAAATATGCTXAC								3599
NC sequence.seq	AAATTXGCATATGACATAACTACTCCTTGTGAAATXAAGGCTTGTAGTTTAAACATGTTTAAAGGTGAAAAATATGCTXAC								3599
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AAATTXGCATATGACATAACTACTCCTTGTGAAATXAAGGCTTGTAGTTTAAACATGTTTAAAGGTGAAAAATATGCTXAC								3595
Majority	AACTGTGAAAGATCTCACCATGAAAACATTCATCTCACCATGAGATCATTGCACCTGTGTGAATTTGAAAAATATCATGA								
	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	
BRSV W2.seq	AACTGTGAAAGATCTCACCATGAAAACATTCATCTCACCATGAGATCATTGCACCTGTGTGAATTTGAAAAATATCATGA								3680
BRSV-A2 Gelfi.seq	AACTGTGAAAGATCTCACCATGAAAACATTCATCTCACCATGAGATCATTGCACCTGTGTGAATTTGAAAAATATCATGA								3679
NC sequence.seq	AACTGTGAAAGATCTCACCATGAAAACATTCATCTCACCATGAGATCATTGCACCTGTGTGAATTTGAAAAATATCATGA								3679
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AACTGTGAAAGATCTCACCATGAAAACATTCATCTCACCATGAGATCATTGCACCTGTGTGAATTTGAAAAATATCATGA								3675
Majority	CATCCAAAAGAGTTGTTATACCAACTTTCTTAAAGTCAATTAATGTAAAAGCXAAGGATTTGGACTCCTAGAAAATATA								
	3690	3700	3710	3720	3730	3740	3750	3760	
BRSV W2.seq	CATCCAAAAGAGTTGTTATACCAACTTTCTTAAAGTCAATTAATGTAAAAGCXAAGGATTTGGACTCCTAGAAAATATA								3760
BRSV-A2 Gelfi.seq	CATCCAAAAGAGTTGTTATACCAACTTTCTTAAAGTCAATTAATGTAAAAGCXAAGGATTTGGACTCCTAGAAAATATA								3759
NC sequence.seq	CATCCAAAAGAGTTGTTATACCAACTTTCTTAAAGTCAATTAATGTAAAAGCXAAGGATTTGGACTCCTAGAAAATATA								3759
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	CATCCAAAAGAGTTGTTATACCAACTTTCTTAAAGTCAATTAATGTAAAAGCXAAGGATTTGGACTCCTAGAAAATATA								3755
Majority	GCTACXACAGAGTTCAAAAATGCCATCACTAATGCTAAAATTTATACCTTATGCTGGGTTGGTATTAGTTTACTCTGTAAC								
	3770	3780	3790	3800	3810	3820	3830	3840	
BRSV W2.seq	GCTACTACAGAGTTCAAAAATGCCATCACTAATGCTAAAATTTATACCTTATGCTGGGTTGGTATTAGTTTACTCTGTAAC								3840
BRSV-A2 Gelfi.seq	GCTACTACAGAGTTCAAAAATGCCATCACTAATGCTAAAATTTATACCTTATGCTGGGTTGGTATTAGTTTACTCTGTAAC								3839
NC sequence.seq	GCTACTACAGAGTTCAAAAATGCCATCACTAATGCTAAAATTTATACCTTATGCTGGGTTGGTATTAGTTTACTCTGTAAC								3839
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GCTACTACAGAGTTCAAAAATGCCATCACTAATGCTAAAATTTATACCTTATGCTGGGTTGGTATTAGTTTACTCTGTAAC								3835
Majority	TGACAATAAAGGGGCATTCAAGTACATTAACCCAAAGTCAATTTATAGTAGATCTTGGTGCATATCTAGAGAAAGAGA								
	3850	3860	3870	3880	3890	3900	3910	3920	
BRSV W2.seq	TGACAATAAAGGGGCATTCAAGTACATTAACCCAAAGTCAATTTATAGTAGATCTTGGTGCATATCTAGAGAAAGAGA								3920
BRSV-A2 Gelfi.seq	TGACAATAAAGGGGCATTCAAGTACATTAACCCAAAGTCAATTTATAGTAGATCTTGGTGCATATCTAGAGAAAGAGA								3919
NC sequence.seq	TGACAATAAAGGGGCATTCAAGTACATTAACCCAAAGTCAATTTATAGTAGATCTTGGTGCATATCTAGAGAAAGAGA								3919

VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TGACAATAAAGGGCATTCAAGTACATTAACCCACAAAGTCAATTTATAGTAGATCTTGGTGCATATCTAGAGAAAGAGA	3915
Majority	GCATATATTTAAGTAACTACAAATGGAAACACACGGCCACTAAATTCCTCATXAAGCCTATAGAGGACTGATTCTCACAC	
	3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000	
BRSV W2.seq	GCATATATTTAAGTAACTACAAATGGAAACACACGGCCACTAAATTCCTCATXAAGCCTATAGAGGACTGATTCTCACAC	4000
BRSV-A2 Gelfi.seq	GCATATATTTAAGTAACTACAAATGGAAACACACGGCCACTAAATTCCTCATXAAGCCTATAGAGGACTGATTCTCACAC	3999
NC sequence.seq	GCATATATTTAAGTAACTACAAATGGAAACACACGGCCACTAAATTCCTCATXAAGCCTATAGAGGACTGATTCTCACAC	3999
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GCATATATTTAAGTAACTACAAATGGAAACACACGGCCACTAAATTCCTCATXAAGCCTATAGAGGACTGATTCTCACAC	3995
Majority	AACTTATCTTAACACAAACAGAAGACTCCCTTGATAACTTACAAATCATCAXTGTAATXGAATCTTTATTGGCTGCTCTATC	
	4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080	
BRSV W2.seq	AACTTATCTTAACACAAACAGAAGACTCCCTTGATAACTTACAAATCATCAXTGTAATXGAATCTTTATTGGCTGCTCTATC	4080
BRSV-A2 Gelfi.seq	AACTTATCTTAACACAAACAGAAGACTCCCTTGATAACTTACAAATCATCAXTGTAATXGAATCTTTATTGGCTGCTCTATC	4079
NC sequence.seq	AACTTATCTTAACACAAACAGAAGACTCCCTTGATAACTTACAAATCATCAXTGTAATXGAATCTTTATTGGCTGCTCTATC	4079
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AACTTATCTTAACACAAACAGAAGACTCCCTTGATAACTTACAAATCATCAXTGTAATXGAATCTTTATTGGCTGCTCTATC	4075
Majority	AACCATAATCATCATATTTTCTCAACCTGATTAACCCCTCAAXTCATCTTTGATAGATTATACCTCAAXTAGATAAAATAAAA	
	4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160	
BRSV W2.seq	AACCATAATCATCATATTTTCTCAACCTGATTAACCCCTCAAXTCATCTTTGATAGATTATACCTCAAXTAGATAAAATAAAA	4160
BRSV-A2 Gelfi.seq	AACCATAATCATCATATTTTCTCAACCTGATTAACCCCTCAAXTCATCTTTGATAGATTATACCTCAAXTAGATAAAATAAAA	4159
NC sequence.seq	AACCATAATCATCATATTTTCTCAACCTGATTAACCCCTCAAXTCATCTTTGATAGATTATACCTCAAXTAGATAAAATAAAA	4159
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AACCATAATCATCATATTTTCTCAACCTGATTAACCCCTCAAXTCATCTTTGATAGATTATACCTCAAXTAGATAAAATAAAA	4155
Majority	ATTATGAAAGCCAXCAAAGXTTATGTGGGGCAAATAAAATCXGCATCCAATCAAGCACAGCATACACCCGGAAACTCCTXG	
	4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240	
BRSV W2.seq	ATTATGAAAGCCAXCAAAGXTTATGTGGGGCAAATAAAATCXGCATCCAATCAAGCACAGCATACACCCGGAAACTCCTXG	4240
BRSV-A2 Gelfi.seq	ATTATGAAAGCCAXCAAAGXTTATGTGGGGCAAATAAAATCXGCATCCAATCAAGCACAGCATACACCCGGAAACTCCTXG	4238
NC sequence.seq	ATTATGAAAGCCAXCAAAGXTTATGTGGGGCAAATAAAATCXGCATCCAATCAAGCACAGCATACACCCGGAAACTCCTXG	4239
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ATTATGAAAGCCAXCAAAGXTTATGTGGGGCAAATAAAATCXGCATCCAATCAAGCACAGCATACACCCGGAAACTCCTXG	4235
Majority	XATCCACCAGCGGTTGAACCTATTACAATGAACAATACATCTACCATAATAGAGTTTACTGGTGAATTTTGGACTTACT	
	4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320	
BRSV W2.seq	GATCCACCAGCGGTTGAACCTATTACAATGAACAATACATCTACCATAATAGAGTTTACTGGTGAATTTTGGACTTACT	4320
BRSV-A2 Gelfi.seq	GATCCACCAGCGGTTGAACCTATTACAATGAACAATACATCTACCATAATAGAGTTTACTGGTGAATTTTGGACTTACT	4318
NC sequence.seq	AATCCACCAGCTGGTTGAACCTATTACAATGAACAATACATCTACCATAATAGAGTTTACTGGTGAATTTTGGACTTACT	4319
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AATCCACCAGCTGGTTGAACCTATTACAATGAACAATACATCTACCATAATAGAGTTTACTGGTGAATTTTGGACTTACT	4315
Majority	TTACATTAGTCTTTATGATGTTAACCATAGGTTTTTCTTTTATGTGCACATCATTAGTGGCAGCAACTGAACAAGTTA	
	4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400	
BRSV W2.seq	TTACATTAGTCTTTATGATGTTAACCATAGGTTTTTCTTTTATGTGCACATCATTAGTGGCAGCAACTGAACAAGTTA	4400
BRSV-A2 Gelfi.seq	TTACATTAGTCTTTATGATGTTAACCATAGGTTTTTCTTTTATGTGCACATCATTAGTGGCAGCAACTGAACAAGTTA	4398
NC sequence.seq	TTACATTAGTCTTTATGATGTTAACCATAGGTTTTTCTTTTATGTGCACATCATTAGTGGCAGCAACTGAACAAGTTA	4399
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TTACATTAGTCTTTATGATGTTAACCACAGGCTCTTTTATGTGCACATCATTAGTGGCAGCAACTGAACAAGTTA	4395
Majority	TGTGACCTCAACGATCATCATAAAATAGTCTAGACATCAGAACTAGGCTTAGAAATGATACACAATTGAXAACAGXGC	
	4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480	
BRSV W2.seq	TGTGACCTCAACGATCATCATAAAATAGTCTAGACATCAGAACTAGGCTTAGAAATGATACACAATTGAXAACAGXGC	4480
BRSV-A2 Gelfi.seq	TGTGACCTCAACGATCATCATAAAATAGTCTAGACATCAGAACTAGGCTTAGAAATGATACACAATTGAXAACAGXGC	4478
NC sequence.seq	TGTGACCTCAACGATCATCATAAAATAGTCTAGACATCAGAACTAGGCTTAGAAATGATACACAATTGAXAACAGXGC	4479
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TGTGACCTCAACGATCATCATAAAATAGTCTAGACATCAGAACTAGGCTTAGAAATGATACACAATTGAXAACAGXGC	4475
Majority	ACATGAAGGACCCATCAACCAATCAAGCAACTAAGAGGACAACAAAACAAAAGAAAATAGCAACATCXCTCAAAGXXAAG	
	4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560	
BRSV W2.seq	ACATGAAGGACCCATCAACCAATCAAGCAACTAAGAGGACAACAAAACAAAAGAAAATAGCAACATCXCTCAAAGXXAAG	4560
BRSV-A2 Gelfi.seq	ACATGAAGGACCCATCAACCAATCAAGCAACTAAGAGGACAACAAAACAAAAGAAAATAGCAACATCXCTCAAAGXXAAG	4558
NC sequence.seq	ACATGAAGGACCCATCAACCAATCAAGCAACTAAGAGGACAACAAAACAAAAGAAAATAGCAACATCXCTCAAAGXXAAG	4559
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ACATGAAGGACCCATCAACCAATCAAGCAACTAAGAGGACAACAAAACAAAAGAAAATAGCAACATCXCTCAAAGXXAAG	4555
Majority	CAAAGGAAAACCAACTAATCAGACAAATCATCACTCATACTCTTTAGTCTACAAATGCTGCATTATGACTGTTAAT	
	4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640	
BRSV W2.seq	CAAAGGAAAACCAACTAATCAGACAAATCATCACTCATACTCTTTAGTCTACAAATGCTGCATTATGACTGTTAAT	4640
BRSV-A2 Gelfi.seq	CAAAGGAAAACCAACTAATCAGACAAATCATCACTCATACTCTTTAGTCTACAAATGCTGCATTATGACTGTTAAT	4638
NC sequence.seq	CAAAGGAAAACCAACTAATCAGACAAATCATCACTCATACTCTTTAGTCTACAAATGCTGCATTATGACTGTTAAT	4639
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	CAAAGGAAAACCAACTAATCAGACAAATCATCACTCATACTCTTTAGTCTACAAATGCTGCATTATGACTGTTAAT	4635
Majority	AGTTATTTAAAATTAACCTAAAATAGGTTTATGGTTACATACAGATGTTGGGCAAATACAAGATGTCCAACCATACC	
	4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720	
BRSV W2.seq	AGTTATTTAAAATTAACCTAAAATAGGTTTATGGTTACATACAGATGTTGGGCAAATACAAGATGTCCAACCATACC	4720
BRSV-A2 Gelfi.seq	AGTTATTTAAAATTAACCTAAAATAGGTTTATGGTTACATACAGATGTTGGGCAAATACAAGATGTCCAACCATACC	4718
NC sequence.seq	AGTTATTTAAAATTAACCTAAAATAGGTTTATGGTTACATACAGATGTTGGGCAAATACAAGATGTCCAACCATACC	4719
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AGTTATTTAAAATTAACCTAAAATAGGTTTATGGTTACATACAGATGTTGGGCAAATACAAGATGTCCAACCATACC	4715
Majority	CATCATCTTAAATTCAGACATTAAAGAGGCTTGGAAAGCCTCAAAATCTTCATAGTAGGATTATCATGTTTATATAA	
	4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800	
BRSV W2.seq	CATCATCTTAAATTCAGACATTAAAGAGGCTTGGAAAGCCTCAAAATCTTCATAGTAGGATTATCATGTTTATATAA	4800
BRSV-A2 Gelfi.seq	CATCATCTTAAATTCAGACATTAAAGAGGCTTGGAAAGCCTCAAAATCTTCATAGTAGGATTATCATGTTTATATAA	4798
NC sequence.seq	CATCATCTTAAATTCAGACATTAAAGAGGCTTGGAAAGCCTCAAAATCTTCATAGTAGGATTATCATGTTTATATAA	4799
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	CATCATCTTAAATTCAGACATTAAAGAGGCTTGGAAAGCCTCAAAATCTTCATAGTAGGATTATCATGTTTATATAA	4795
Majority	GTTCAATTTAAAATCCCTTXXTCCAAACGGCTTTGACCACCTTAGCAATGATAACCTTGACATCACTXGTACATAACAGCCA	
	4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880	
BRSV W2.seq	GTTCAATTTAAAATCCCTTXXTCCAAACGGCTTTGACCACCTTAGCAATGATAACCTTGACATCACTXGTACATAACAGCCA	4880
BRSV-A2 Gelfi.seq	GTTCAATTTAAAATCCCTTXXTCCAAACGGCTTTGACCACCTTAGCAATGATAACCTTGACATCACTXGTACATAACAGCCA	4878
NC sequence.seq	GTTCAATTTAAAATCCCTTXXTCCAAACGGCTTTGACCACCTTAGCAATGATAACCTTGACATCACTXGTACATAACAGCCA	4879
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GTTCAATTTAAAATCCCTTXXTCCAAACGGCTTTGACCACCTTAGCAATGATAACCTTGACATCACTXGTACATAACAGCCA	4875
Majority	TTATTTACATTTAGTGGGAAATGCTAAGCCAAAGCCCAATCCAACCAACCATCCAACAACACACAGCCCCAAAAC	
	4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960	





	5930	5940	5950	5960	5970	5980	5990	6000	
BRSV W2.seq	ATACATTATACAAGAACTCTACAAAAAGTTTTATGGGCTAATGGGCAAGAGAGAAAAAGGAGATTTTTAGGATTCCT								6000
BRSV-A2 Gelfi.seq	ATACATTATACAAGAACTCTACAAAAAGTTTTATGGGCTAATGGGCAAGAGAGAAAAAGGAGATTTTTAGGATTCCT								5996
NC sequence.seq	ATACATTATACAAGAACTCTACAAAAAGTTTTATGGGCTAATGGGCAAGAGAGAAAAAGGAGATTTTTAGGATTCCT								5991
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ATGCATTATACAAGAACTCTACAAAAAGTTTTATGGGCTAATGGGCAAGAGAGAAAAAGGAGATTTTTAGGATTCCT								5987
Majority	XCTAGGTATTGGATCTGCTATTGCAAGTGGTGTAGCAGTCTCCAAAGTACTACACCTGGAGGGAGAGGTGAATAAAATTA								
	6010	6020	6030	6040	6050	6060	6070	6080	
BRSV W2.seq	ACTAGGTATTGGATCTGCTATTGCAAGTGGTGTAGCAGTCTCCAAAGTACTACACCTGGAGGGAGAGGTGAATAAAATTA								6080
BRSV-A2 Gelfi.seq	ACTAGGTATTGGATCTGCTATTGCAAGTGGTGTAGCAGTCTCCAAAGTACTACACCTGGAGGGAGAGGTGAATAAAATTA								6076
NC sequence.seq	GCTAGGTATTGGATCTGCTATTGCAAGTGGTGTAGCAGTCTCCAAAGTACTACACCTGGAGGGAGAGGTGAATAAAATTA								6071
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GCTAGGCATCGGATCTGCTATTGCAAGTGGTGTAGCAGTCTCCAAAGTACTACACCTGGAGGGAGAGGTGAATAAAATTA								6067
Majority	AAAATGCATGCTATCCACAATAAAGCAGTAGTTAGTCTATCCAATGGAGTTAGTGTCTTACTAGCAAAGTACTXGAT								
	6090	6100	6110	6120	6130	6140	6150	6160	
BRSV W2.seq	AAAATGCATGCTATCCACAATAAAGCAGTAGTTAGTCTATCCAATGGAGTTAGTGTCTTACTAGCAAAGTACTCGAT								6160
BRSV-A2 Gelfi.seq	AAAATGCATGCTATCCACAATAAAGCAGTAGTTAGTCTATCCAATGGAGTTAGTGTCTTACTAGCAAAGTACTCGAT								6156
NC sequence.seq	AAAATGCATGCTATCCACAATAAAGCAGTAGTTAGTCTATCCAATGGAGTTAGTGTCTTACTAGCAAAGTACTCGAT								6151
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AAAATGCATGCTATCCACAATAAAGCAGTAGTTAGTCTATCCAATGGAGTTAGTGTCTTACTAGCAAAGTACTCGAT								6147
Majority	CTAAGAAGTATATAGACAAXGAGCTTCTACCTAAAGTTAAACAATCATGATTGTAGGATATCCAACATAGAAAGTGTGAT								
	6170	6180	6190	6200	6210	6220	6230	6240	
BRSV W2.seq	CTAAGAAGTATATAGACAAXGAGCTTCTACCTAAAGTTAAACAATCATGATTGTAGGATATCCAACATAGAAAGTGTGAT								6240
BRSV-A2 Gelfi.seq	CTAAGAAGTATATAGACAAXGAGCTTCTACCTAAAGTTAAACAATCATGATTGTAGGATATCCAACATAGAAAGTGTGAT								6236
NC sequence.seq	CTAAGAAGTATATAGACAAXGAGCTTCTACCTAAAGTTAAACAATCATGATTGTAGGATATCCAACATAGAAAGTGTGAT								6231
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	CTAAGAAGTATATAGACAAXGAGCTTCTACCTAAAGTTAAACAATCATGATTGTAGGATATCCAACATAGAAAGTGTGAT								6227
Majority	AGAATTCACAACAAAAAACAATAGATTGTAGAAATGTAGGAAATTTAGTGTAAATGCTGGTATTACCACACCCCTXA								
	6250	6260	6270	6280	6290	6300	6310	6320	
BRSV W2.seq	AGAATTCACAACAAAAAACAATAGATTGTAGAAATGTAGGAAATTTAGTGTAAATGCTGGTATTACCACACCCCTXA								6320
BRSV-A2 Gelfi.seq	AGAATTCACAACAAAAAACAATAGATTGTAGAAATGTAGGAAATTTAGTGTAAATGCTGGTATTACCACACCCCTXA								6316
NC sequence.seq	AGAATTCACAACAAAAAACAATAGATTGTAGAAATGTAGGAAATTTAGTGTAAATGCTGGTATTACCACACCCCTXA								6311
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AGAATTCACAACAAAAAACAATAGATTGTAGAAATGTAGGAAATTTAGTGTAAATGCTGGTATTACCACACCCCTXA								6307
Majority	GTACATACATGTTGACCAATAGTGAATTACTACTCAATAATGATATGCCTATAACAAATGACCAAAAAAAGCTAATG								
	6330	6340	6350	6360	6370	6380	6390	6400	
BRSV W2.seq	GTACATACATGTTGACCAATAGTGAATTACTACTCAATAATGATATGCCTATAACAAATGACCAAAAAAAGCTAATG								6400
BRSV-A2 Gelfi.seq	GTACATACATGTTGACCAATAGTGAATTACTACTCAATAATGATATGCCTATAACAAATGACCAAAAAAAGCTAATG								6396
NC sequence.seq	GTACATACATGTTGACCAATAGTGAATTACTACTCAATAATGATATGCCTATAACAAATGACCAAAAAAAGCTAATG								6391
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GTACATACATGTTAACAATAGTGAATTACTACTCAATAATGATATGCCTATAACAAATGACCAAAAAAAGCTAATG								6387
Majority	TCAAGTAATGTTCAAATAGTCAGGCAACAGAGTTATTCATTATGTCAGTGGTCAAAGAAGAXGTCATAGCXATGTTGT								
	6410	6420	6430	6440	6450	6460	6470	6480	
BRSV W2.seq	TCAAGTAATGTTCAAATAGTCAGGCAACAGAGTTATTCATTATGTCAGTGGTCAAAGAAGAXGTCATAGCXATGTTGT								6480
BRSV-A2 Gelfi.seq	TCAAGTAATGTTCAAATAGTCAGGCAACAGAGTTATTCATTATGTCAGTGGTCAAAGAAGAXGTCATAGCXATGTTGT								6476
NC sequence.seq	TCAAGTAATGTTCAAATAGTCAGGCAACAGAGTTATTCATTATGTCAGTGGTCAAAGAAGAXGTCATAGCXATGTTGT								6471
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TCAAAACAATGTTCAAATAGTCAGGCAACAGAGTTATTCATTATGTCAGTGGTCAAAGAAGAXGTCATAGCXATGTTGT								6467
Majority	ACAATTCGCCTATTTATGGAGTTATAGACACCCCTGTTGGAAACTACACACCTCTCCATTATGCACCCTGATAATAAAG								
	6490	6500	6510	6520	6530	6540	6550	6560	
BRSV W2.seq	ACAATTCGCCTATTTATGGAGTTATAGACACCCCTGTTGGAAACTACACACCTCTCCATTATGCACCCTGATAATAAAG								6560
BRSV-A2 Gelfi.seq	ACAATTCGCCTATTTATGGAGTTATAGACACCCCTGTTGGAAACTACACACCTCTCCATTATGCACCCTGATAATAAAG								6556
NC sequence.seq	ACAATTCGCCTATTTATGGAGTTATAGACACCCCTGTTGGAAACTACACACCTCTCCATTATGCACCCTGATAATAAAG								6551
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ACAATTCGCCTATTTATGGAGTTATAGACACCCCTGTTGGAAACTACACACCTCTCCATTATGCACCCTGATAATAAAG								6547
Majority	AAGGGTCAAACATCTGCTTAACTAGGACAGATCGTGGTGGTATTGTGACAAATGCAGGCTCTGTXTCTTTTTCCACAG								
	6570	6580	6590	6600	6610	6620	6630	6640	
BRSV W2.seq	AAGGGTCAAACATCTGCTTAACTAGGACAGATCGTGGTGGTATTGTGACAAATGCAGGCTCTGTXTCTTTTTCCACAG								6640
BRSV-A2 Gelfi.seq	AAGGGTCAAACATCTGCTTAACTAGGACAGATCGTGGTGGTATTGTGACAAATGCAGGCTCTGTXTCTTTTTCCACAG								6636
NC sequence.seq	AAGGGTCAAACATCTGCTTAACTAGGACAGATCGTGGTGGTATTGTGACAAATGCAGGCTCTGTXTCTTTTTCCACAG								6631
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AAGGGTCAAACATCTGCTTAACTAGGACAGATCGTGGTGGTATTGTGACAAATGCAGGCTCTGTXTCTTTTTCCACAG								6627
Majority	GCAGAGACGTGTAAGGTACAATCTAATAGAGTATCTGTGACACAATGAACAGTTTAACTXTGCCTACTGATGTTAACTT								
	6650	6660	6670	6680	6690	6700	6710	6720	
BRSV W2.seq	GCAGAGACGTGTAAGGTACAATCTAATAGAGTATCTGTGACACAATGAACAGTTTAACTXTGCCTACTGATGTTAACTT								6720
BRSV-A2 Gelfi.seq	GCAGAGACGTGTAAGGTACAATCTAATAGAGTATCTGTGACACAATGAACAGTTTAACTXTGCCTACTGATGTTAACTT								6716
NC sequence.seq	ACAGAGACATGTAAGGTACAATCTAATAGAGTATCTGTGACACAATGAACAGTTTAACTXTGCCTACTGATGTTAACTT								6711
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GCAGAGACGTGTAAGGTACAATCTAATAGAGTATCTGTGACACAATGAATGTTTAACTXTGCCTACTGATGTTAACTT								6707
Majority	ATGCAACACTGACATATTXAATCAAAAGTATGACTGTAAAAATAATGACATCTAAAAGTACATXAGTACTCTGTGATAA								
	6730	6740	6750	6760	6770	6780	6790	6800	
BRSV W2.seq	ATGCAACACTGACATATTXAATCAAAAGTATGACTGTAAAAATAATGACATCTAAAAGTACATXAGTACTCTGTGATAA								6800
BRSV-A2 Gelfi.seq	ATGCAACACTGACATATTXAATCAAAAGTATGACTGTAAAAATAATGACATCTAAAAGTACATXAGTACTCTGTGATAA								6796
NC sequence.seq	ATGCAACACTGACATATTXAATCAAAAGTATGACTGTAAAAATAATGACATCTAAAAGTACATXAGTACTCTGTGATAA								6791
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GTGCAACACTAACATATTCAATCAAAAGTATGACTGTAAAAATAATGACATCTAAAAGTACATXAGTACTCTGTGATAA								6787
Majority	CTTCAATTGGAGCTATTGTATCATGCTATGGGAAGCAAAATGTACAGCTTCTAATAAAAAATCGTGGAAATCATAAAGACT								
	6810	6820	6830	6840	6850	6860	6870	6880	
BRSV W2.seq	CTTCAATTGGAGCTATTGTATCATGCTATGGGAAGCAAAATGTACAGCTTCTAATAAAAAATCGTGGAAATCATAAAGACT								6880
BRSV-A2 Gelfi.seq	CTTCAATTGGAGCTATTGTATCATGCTATGGGAAGCAAAATGTACAGCTTCTAATAAAAAATCGTGGAAATCATAAAGACT								6876
NC sequence.seq	CTTCAATTGGAGCTATTGTATCATGCTATGGGAAGCAAAATGTACAGCTTCTAATAAAAAATCGTGGAAATCATAAAGACT								6871
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	CTTCAATTGGAGCTATTGTATCATGCTATGGGAAGCAAAATGTACAGCTTCTAATAAAAAATCGTGGAAATCATAAAGACT								6867
Majority	TTTTCAATGGGTGTGATTATGTATCAACAAGAGGATGTACTGTATCTGTGGTAAACACACTATATTATGTAATAA								
	6890	6900	6910	6920	6930	6940	6950	6960	
BRSV W2.seq	TTTTCAATGGGTGTGATTATGTATCAACAAGAGGATGTACTGTATCTGTGGTAAACACACTATATTATGTAATAA								6960
BRSV-A2 Gelfi.seq	TTTTCAATGGGTGTGATTATGTATCAACAAGAGGATGTACTGTATCTGTGGTAAACACACTATATTATGTAATAA								6956
NC sequence.seq	TTTTCAATGGGTGTGATTATGTATCAACAAGAGGATGTACTGTATCTGTGGTAAACACACTATATTATGTAATAA								6951





	8970	8980	8990	9000	9010	9020	9030	9040	
BRSV W2.seq	AGCCAATTAACAACAACATTTTATGCAAGCTTTTAAAGTTCGATGAGTCATCCCCCTACATGGTTAAACATTTGGTTTAAAT								9040
BRSV-A2 Gelfi.seq	AGCCAATTAACAACAACATTTTATGCAAGCTTTTAAAGTTCGATGAGTCATCCCCCTACATGGTTAAACATTTGGTTTAAAT								9036
NC sequence.seq	AGCCAATTAACAACAACATTTTATGCAAGCTTTTAAAGTTCGATGAGTCATCCCCCTACATGGTTAAACATTTGGTTTAAAT								9031
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AGCCAATTAACAACAACATTTTATGCAAGCTTTTAAAGTTCATAGTCATCCCCCCACATGGTTAAACATTTGGTTTAAAT								9027
Majority	TTATACACAAAATTAANTGACATCTTGACCACATACAGAACAAATGAAGCAAGXAATCATGGTTACACACTTATAGATAC								
	9050	9060	9070	9080	9090	9100	9110	9120	
BRSV W2.seq	TTATACACAAAATTAANTGACATCTTGACCACATACAGAACAAATGAAGCAAGXAATCATGGTTACACACTTATAGATAC								9120
BRSV-A2 Gelfi.seq	TTATACACAAAATTAANTGACATCTTGACCACATACAGAACAAATGAAGCAAGXAATCATGGTTACACACTTATAGATAC								9116
NC sequence.seq	TTATACACAAAATTAANTGACATCTTGACCACATACAGAACAAATGAAGCAAGXAATCATGGTTACACACTTATAGATAC								9111
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TTATACACAAAATTAANTGACATCTTGACCACATACAGAACAAATGAAGCAAGXAATCATGGTTACACACTTATAGATAC								9107
Majority	TAGAACCTTGGGTGAATCCCAATTTATATAAATCAATATGGTTGCATTGTATATCATAAGAAATTAAGAAATTTACAA								
	9130	9140	9150	9160	9170	9180	9190	9200	
BRSV W2.seq	TAGAACCTTGGGTGAATCCCAATTTATATAAATCAATATGGTTGCATTGTATATCATAAGAAATTAAGAAATTTACAA								9200
BRSV-A2 Gelfi.seq	TAGAACCTTGGGTGAATCCCAATTTATATAAATCAATATGGTTGCATTGTATATCATAAGAAATTAAGAAATTTACAA								9196
NC sequence.seq	TAGAACCTTGGGTGAATCCCAATTTATATAAATCAATATGGTTGCATTGTATATCATAAGAAATTAAGAAATTTACAA								9191
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TAGAACCTTGGGTGAATCCCAATTTATATAAATCAATATGGTTGTATGTATATCATAAGAAATTAAGAAATTTACAA								9187
Majority	TCACCACATATAATCAATTTCTAACATGGAAAGACATTAGCCTCAGTAGATTAATGTTTGTATGATCACCTGGATAAGC								
	9210	9220	9230	9240	9250	9260	9270	9280	
BRSV W2.seq	TCACCACATATAATCAATTTCTAACATGGAAAGACATTAGCCTCAGTAGATTAATGTTTGTATGATCACCTGGATAAGC								9280
BRSV-A2 Gelfi.seq	TCACCACATATAATCAATTTCTAACATGGAAAGACATTAGCCTCAGTAGATTAATGTTTGTATGATCACCTGGATAAGC								9276
NC sequence.seq	TCACCACATATAATCAATTTCTAACATGGAAAGACATTAGCCTCAGTAGATTAATGTTTGTATGATCACCTGGATAAGC								9271
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TCACCACATATAATCAATTTCTAACATGGAAAGACATTAGCCTCAGTAGATTAATGTTTGTATGATCACCTGGATAAGC								9267
Majority	AATTGTTTAAATACCTTGAATAAAGAGCCTTGGATTGAGATGCGAGTTTAAACAATGTCACCTCTATCTCAATTTATCCTTCA								
	9290	9300	9310	9320	9330	9340	9350	9360	
BRSV W2.seq	AATTGTTTAAATACCTTGAATAAAGAGCCTTGGATTGAGATGCGAGTTTAAACAATGTCACCTCTATCTCAATTTATCCTTCA								9360
BRSV-A2 Gelfi.seq	AATTGCTTAAATACCTTGAATAAAGAGCCTTGGATTGAGATGCGAGTTTAAACAATGTCACCTCTATCTCAATTTATCCTTCA								9356
NC sequence.seq	AATTGTTTAAATACCTTGAATAAAGAGCCTTGGATTGAGATGCGAGTTTAAACAATGTCACCTCTATCTCAATTTATCCTTCA								9351
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AATTGTTTAAATACCTTGAATAAAGAGCCTTGGATTGAGATGCAATTTTAAACAATGTCACCTCTATCTCAATTTATCCTTCA								9347
Majority	TGGGGATTGTATATTGAAATTTTTCATAATGAAGGTTACTATATTATAAAGAAGTTGAAGGTTTATAATGTCATTAA								
	9370	9380	9390	9400	9410	9420	9430	9440	
BRSV W2.seq	TGGGGATTGTATATTGAAATTTTTCATAATGAAGGTTACTATATTATAAAGAAGTTGAAGGTTTATAATGTCATTAA								9440
BRSV-A2 Gelfi.seq	TGGGGATTGTATATTGAAATTTTTCATAATGAAGGTTACTATATTATAAAGAAGTTGAAGGTTTATAATGTCATTAA								9436
NC sequence.seq	TGGGGATTGTATATTGAAATTTTTCATAATGAAGGTTACTATATTATAAAGAAGTTGAAGGTTTATAATGTCATTAA								9431
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TGGAGATTGTATATTGAAATTTTTCATAATGAAGGTTACTATATTATAAAGAAGTTGAAGGTTTATAATGTCATTAA								9427
Majority	TXTTGAACCTAACGGAAGAAGATCAATTCAGAAAAGATTCTTCAACAGTATGCTAAATAATATTACAGATGCTGCGACGA								
	9450	9460	9470	9480	9490	9500	9510	9520	
BRSV W2.seq	TCTTGAACCTAACGGAAGAAGATCAATTCAGAAAAGATTCTTCAACAGTATGCTAAATAATATTACAGATGCTGCGACGA								9520
BRSV-A2 Gelfi.seq	TCTTGAACCTAACGGAAGAAGATCAATTCAGAAAAGATTCTTCAACAGTATGCTAAATAATATTACAGATGCTGCGACGA								9516
NC sequence.seq	TTTTGAACCTAACGGAAGAAGATCAATTCAGAAAAGATTCTTCAACAGTATGCTAAATAATATTACAGATGCTGCGACGA								9511
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TTTTGAACCTAACGGAAGAAGATCAATTTAGAAAAGATTCTTCAACAGTATGCTAAATAATATTACAGATGCTGCGACGA								9507
Majority	AGAGCTCAACAAGATTTTATCAAGAGCCGCCACTACTATATTAGACAAAACAATATCAGATAACATATTAAATGGTAA								
	9530	9540	9550	9560	9570	9580	9590	9600	
BRSV W2.seq	AGAGCTCAACAAGATTTTATCAAGAGCCGCCACTACTATATTAGACAAAACAATATCAGATAACATATTAAATGGTAA								9600
BRSV-A2 Gelfi.seq	AGAGCTCAACAAGATTTTATCAAGAGCCGCCACTACTATATTAGACAAAACAATATCAGATAACATATTAAATGGTAA								9596
NC sequence.seq	AGAGCTCAACAAGATTTTATCAAGAGCCGCCACTACTATATTAGACAAAACAATATCAGATAACATATTAAATGGTAA								9591
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	AGAGCTCAACAAGATTTTATCAAGAGCCGCCACTACTATATTAGACAAAACAATATCAGATAACATATTAAATGGTAA								9587
Majority	ATGGTTAAATTTTATTAGGTAAGTTXCTTAAATGATTAAATTAGCTGGTGCTAATAATCTTAAATACCTAAGTGAACCTCT								
	9610	9620	9630	9640	9650	9660	9670	9680	
BRSV W2.seq	ATGGTTAAATTTTATTAGGTAAGTTXCTTAAATGATTAAATTAGCTGGTGCTAATAATCTTAAATACCTAAGTGAACCTCT								9680
BRSV-A2 Gelfi.seq	ATGGTTAAATTTTATTAGGTAAGTTXCTTAAATGATTAAATTAGCTGGTGCTAATAATCTTAAATACCTAAGTGAACCTCT								9676
NC sequence.seq	ATGGTTAAATTTTATTAGGTAAGTTXCTTAAATGATTAAATTAGCTGGTGCTAATAATCTTAAATACCTAAGTGAACCTCT								9671
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ATGGTTAAATTTTATTAGGTAAGTTXCTTAAATGATTAAATTAGCTGGTGCTAATAATCTTAAATACCTAAGTGAACCTCT								9667
Majority	ACTTTCCTCTTTAGAATAATTTGGACATCCCATGGTAGATGAACGCGAAGCAATGGATGCTGTGAGATTAACCTGTAATGAA								
	9690	9700	9710	9720	9730	9740	9750	9760	
BRSV W2.seq	ACTTTCCTCTTTAGAATAATTTGGACATCCCATGGTAGATGAACGCGAAGCAATGGATGCTGTGAGATTAACCTGTAATGAA								9760
BRSV-A2 Gelfi.seq	ACTTTCCTCTTTAGAATAATTTGGACATCCCATGGTAGATGAACGCGAAGCAATGGATGCTGTGAGATTAACCTGTAATGAA								9756
NC sequence.seq	ACTTTCCTCTTTAGAATAATTTGGACATCCCATGGTAGATGAACGCGAAGCAATGGATGCTGTGAGATTAACCTGTAATGAA								9751
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ACTTTCCTCTTTAGAATAATTTGGACATCCCATGGTAGATGAACGCGAAGCAATGGATGCTGTGAGATTAACCTGTAATGAA								9747
Majority	ACTAAATTTTACTTATTGAGTAGXCTTAGXATGTTAAGAGGTGCATTTXATTTATAGAATTTATAAAGGGATTGTAAACAC								
	9770	9780	9790	9800	9810	9820	9830	9840	
BRSV W2.seq	ACTAAATTTTACTTATTGAGTAGXCTTAGXATGTTAAGAGGTGCATTTXATTTATAGAATTTATAAAGGGATTGTAAACAC								9840
BRSV-A2 Gelfi.seq	ACTAAATTTTACTTATTGAGTAGXCTTAGXATGTTAAGAGGTGCATTTXATTTATAGAATTTATAAAGGGATTGTAAACAC								9836
NC sequence.seq	ACTAAATTTTACTTATTGAGTAGXCTTAGXATGTTAAGAGGTGCATTTXATTTATAGAATTTATAAAGGGATTGTAAACAC								9831
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ACTAAATTTTACTTATTGAGTAGXCTTAGXATGTTAAGAGGTGCATTTXATTTATAGGATTATAAAGGGATTGTAAACAC								9827
Majority	ATATAATAGGTGGCTACCTTAAGGAATGCTATAGTTTACCCTTAAGATGGATAAAATXACTACAACTCAACTTACC								
	9850	9860	9870	9880	9890	9900	9910	9920	
BRSV W2.seq	ATATAATAGGTGGCTACCTTAAGGAATGCTATAGTTTACCCTTAAGATGGATAAAATXACTACAACTCAACTTACC								9920
BRSV-A2 Gelfi.seq	ATATAATAGGTGGCTACCTTAAGGAATGCTATAGTTTACCCTTAAGATGGATAAAATXACTACAACTCAACTTACC								9916
NC sequence.seq	ATATAATAGGTGGCTACCTTAAGGAATGCTATAGTTTACCCTTAAGATGGATAAAATXACTACAACTCAACTTACC								9911
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ATATAATAGGTGGCTACCTTAAGGAATGCTATAGTTTACCCTTAAGATGGATAAAATXACTACAACTCAACTTACC								9907
Majority	CATCATTATTAGAATTAACAGAACTGATTGATTATATTGCTGGAGTGCAGATTTTATAGAGAATTCATCTACCAAAA								
	9930	9940	9950	9960	9970	9980	9990	10000	
BRSV W2.seq	CATCATTATTAGAATTAACAGAACTGATTGATTATATTGCTGGAGTGCAGATTTTATAGAGAATTCATCTACCAAAA								10000
BRSV-A2 Gelfi.seq	CATCATTATTAGAATTAACAGAACTGATTGATTATATTGCTGGAGTGCAGATTTTATAGAGAATTCATCTACCAAAA								9996
NC sequence.seq	CATCATTATTAGAATTAACAGAACTGATTGATTATATTGCTGGAGTGCAGATTTTATAGAGAATTCATCTACCAAAA								9991
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	CATCATTATTAGAATTAACAGAACTGATTGATTATATTGCTGGAGTGCAGATTTTATAGAGAATTCATCTACCAAAA								9991





	12010	12020	12030	12040	12050	12060	12070	12080	
BRSV W2.seq	TCTTAGTATACACCGATATAAGTAAATATGTGAGAGAAAGATCTTGGTCACTGTCTAACATTGTAGGTATTACATCTCCTA								12080
BRSV-A2 Gelfi.seq	TCTTAGTATACACCGATATAAGTAAATATGTGAGAGAAAGATCTTGGTCACTGTCTAACATTGTAGGTATTACATCTCCTA								12076
NC sequence.seq	TCTTAGTATACACCGATATAAGTAAATATGTGAGAGAAAGATCTTGGTCACTGTCTAACATTGTAGGTATTACATCTCCTA								12071
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TCTTAGTATACACCGATATAAGTAAATATGTGAGAGAAAGATCTTGGTCACTGTCTAACATTGTAGGTATTACATCTCCTA								12067
Majority	GCATATTATATACAATGGATATTAATAACACCCTAGCCTATAAAGTGGTATAATAAATGAAAAATACAATTCGAAT								
	12090	12100	12110	12120	12130	12140	12150	12160	
BRSV W2.seq	GCATATTATATACAATGGATATTAATAACACCCTAGCCTATAAAGTGGTATAATAAATGAAAAATACAATTCGAAT								12160
BRSV-A2 Gelfi.seq	GCATATTATATACAATGGATATTAATAACACCCTAGCCTATAAAGTGGTATAATAAATGAAAAATACAATTCGAAT								12156
NC sequence.seq	GCATATTATATACAATGGATATTAATAACACCCTAGCCTATAAAGTGGTATAATAAATGAAAAATACAATTCGAAT								12151
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	GCATATTATATACAATGGATATTAATAACACCCTAGCCTATAAAGTGGTATAATAAATGAAAAATACAATTCGAAT								12147
Majority	TTTTTGACTCGTGGTGAGAGGGTCCCACTAAACCATGGGTAGGATCATCAACCCAAGAAAAAGAAAAACAATGCCTGTATA								
	12170	12180	12190	12200	12210	12220	12230	12240	
BRSV W2.seq	TTTTTGACTCGTGGTGAGAGGGTCCCACTAAACCATGGGTAGGATCATCAACCCAAGAAAAAGAAAAACAATGCCTGTATA								12240
BRSV-A2 Gelfi.seq	TTTTTGACTCGTGGTGAGAGGGTCCCACTAAACCATGGGTAGGATCATCAACCCAAGAAAAAGAAAAACAATGCCTGTATA								12236
NC sequence.seq	TTTTTGACTCGTGGTGAGAGGGTCCCACTAAACCATGGGTAGGATCATCAACCCAAGAAAAAGAAAAACAATGCCTGTATA								12231
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TTTTTGACTCGTGGTGAGAGGGTCCCACTAAACCATGGGTAGGATCATCAACCCAAGAAAAAGAAAAACAATGCCTGTATA								12227
Majority	CAATAGGCAGGTTTTAACTAAAXAAACAAAAGGATCAAAATGAXTTGTTGGCAAAACTAGATTGGGTTTATGCCTCTATAG								
	12250	12260	12270	12280	12290	12300	12310	12320	
BRSV W2.seq	CAATAGGCAGGTTTTAACTAAAXAAACAAAAGGATCAAAATGAXTTGTTGGCAAAACTAGATTGGGTTTATGCCTCTATAG								12320
BRSV-A2 Gelfi.seq	CAATAGGCAGGTTTTAACTAAAXAAACAAAAGGATCAAAATGAXTTGTTGGCAAAACTAGATTGGGTTTATGCCTCTATAG								12316
NC sequence.seq	CAATAGGCAGGTTTTAACTAAAXAAACAAAAGGATCAAAATGAXTTGTTGGCAAAACTAGATTGGGTTTATGCCTCTATAG								12311
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	CAATAGGCAGGTTTTAACTAAAXAAACAAAAGGATCAAAATGAXTTGTTGGCAAAACTAGATTGGGTTTATGCCTCTATAG								12307
Majority	ATAATAAAGATGAGTTTATGGAAGTATTATGTTGGGAACACTGGATTATCCTATGAAAAAGCCAAGAAATGTTCCCT								
	12330	12340	12350	12360	12370	12380	12390	12400	
BRSV W2.seq	ATAATAAAGATGAGTTTATGGAAGTATTATGTTGGGAACACTGGATTATCCTATGAAAAAGCCAAGAAATGTTCCCT								12400
BRSV-A2 Gelfi.seq	ATAATAAAGATGAGTTTATGGAAGTATTATGTTGGGAACACTGGATTATCCTATGAAAAAGCCAAGAAATGTTCCCT								12396
NC sequence.seq	ATAATAAAGATGAGTTTATGGAAGTATTATGTTGGGAACACTGGATTATCCTATGAAAAAGCCAAGAAATGTTCCCT								12391
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ATAATAAAGATGAGTTTATGGAAGTATTATGTTGGGAACACTGGATTATCCTATGAAAAAGCCAAGAAATGTTCCCT								12387
Majority	CAATACCTGAGTGAAACTACCTGCATCGTCTTACAGTTAGTAGTAGACCATGTGAGTTTCTGCCTCAATACCAGCTTA								
	12410	12420	12430	12440	12450	12460	12470	12480	
BRSV W2.seq	CAATACCTGAGTGAAACTACCTGCATCGTCTTACAGTTAGTAGTAGACCATGTGAGTTTCTGCCTCAATACCAGCTTA								12480
BRSV-A2 Gelfi.seq	CAATACCTGAGTGAAACTACCTGCATCGTCTTACAGTTAGTAGTAGACCATGTGAGTTTCTGCCTCAATACCAGCTTA								12476
NC sequence.seq	CAATACCTGAGTGAAACTACCTGCATCGTCTTACAGTTAGTAGTAGACCATGTGAGTTTCTGCCTCAATACCAGCTTA								12471
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	CAATACCTGAGTGAAACTACCTGCATCGTCTTACAGTTAGTAGTAGACCATGTGAGTTTCTGCCTCAATACCAGCTTA								12467
Majority	CAGAACCACTAATACCACCTTGGACACAAGTCCAATTAATCGAATACTAACTGAAAAATATGGTGATGAAGACATTGATA								
	12490	12500	12510	12520	12530	12540	12550	12560	
BRSV W2.seq	CAGAACCACTAATACCACCTTGGACACAAGTCCAATTAATCGAATACTAACTGAAAAATATGGTGATGAAGACATTGATA								12560
BRSV-A2 Gelfi.seq	CAGAACCACTAATACCACCTTGGACACAAGTCCAATTAATCGAATACTAACTGAAAAATATGGTGATGAAGACATTGATA								12556
NC sequence.seq	CAGAACCACTAATACCACCTTGGACACAAGTCCAATTAATCGAATACTAACTGAAAAATATGGTGATGAAGACATTGATA								12551
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	CAGAACCACTAATACCACCTTGGACACAAGTCCAATTAATCGAATACTAACTGAAAAATATGGTGATGAAGACATTGATA								12547
Majority	TAGTGTTTCAGAATTGTATCAGTTTGGTCTTAGCTTAATGTCAGTTGTAGAACAAATTTACAAATGTATGXCCAAATAGA								
	12570	12580	12590	12600	12610	12620	12630	12640	
BRSV W2.seq	TAGTGTTTCAGAATTGTATCAGTTTGGTCTTAGCTTAATGTCAGTTGTAGAACAAATTTACAAATGTATGXCCAAATAGA								12640
BRSV-A2 Gelfi.seq	TAGTGTTTCAGAATTGTATCAGTTTGGTCTTAGCTTAATGTCAGTTGTAGAACAAATTTACAAATGTATGXCCAAATAGA								12636
NC sequence.seq	TAGTGTTTCAGAATTGTATCAGTTTGGTCTTAGCTTAATGTCAGTTGTAGAACAAATTTACAAATGTATGXCCAAATAGA								12631
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TAGTGTTTCAGAATTGTATCAGTTTGGTCTTAGCTTAATGTCAGTTGTAGAACAAATTTACAAATGTATGXCCAAATAGA								12627
Majority	ATTATTCTAATACCAAACTTAATGAAATTCATTTGATGAAGCCACCCATATTTACAGGTGATGTTGACATTTGTAAGCT								
	12650	12660	12670	12680	12690	12700	12710	12720	
BRSV W2.seq	ATTATTCTAATACCAAACTTAATGAAATTCATTTGATGAAGCCACCCATATTTACAGGTGATGTTGACATTTGTAAGCT								12720
BRSV-A2 Gelfi.seq	ATTATTCTAATACCAAACTTAATGAAATTCATTTGATGAAGCCACCCATATTTACAGGTGATGTTGACATTTGTAAGCT								12716
NC sequence.seq	ATTATTCTAATACCAAACTTAATGAAATTCATTTGATGAAGCCACCCATATTTACAGGTGATGTTGACATTTGTAAGCT								12711
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ATTATTCTAATACCAAACTTAATGAAATTCATTTGATGAAGCCACCCATATTTACAGGTGATGTTGACATTTGTAAGCT								12707
Majority	TAAACAGGTGATACAGAAACAGCATATGTTTTACCTGATAAAAATCAGTTTGTCTCAATATGTTGAATGTTCCCTTAGCA								
	12730	12740	12750	12760	12770	12780	12790	12800	
BRSV W2.seq	TAAACAGGTGATACAGAAACAGCATATGTTTTACCTGATAAAAATCAGTTTGTCTCAATATGTTGAATGTTCCCTTAGCA								12800
BRSV-A2 Gelfi.seq	TAAACAGGTGATACAGAAACAGCATATGTTTTACCTGATAAAAATCAGTTTGTCTCAATATGTTGAATGTTCCCTTAGCA								12796
NC sequence.seq	TAAACAGGTGATACAGAAACAGCATATGTTTTACCTGATAAAAATCAGTTTGTCTCAATATGTTGAATGTTCCCTTAGCA								12791
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TAAACAGGTGATACAGAAACAGCATATGTTTTACCTGATAAAAATCAGTTTGTCTCAATATGTTGAATGTTCCCTTAGCA								12787
Majority	ATAAAAAXTTAAGAATAGTCCACATATAAGTTCTAATTTAGTGTTAGTGCACAAAATGCTGATTACTTTTTGCATAAG								
	12810	12820	12830	12840	12850	12860	12870	12880	
BRSV W2.seq	ATAAAAAXTTAAGAATAGTCCACATATAAGTTCTAATTTAGTGTTAGTGCACAAAATGCTGATTACTTTTTGCATAAG								12880
BRSV-A2 Gelfi.seq	ATAAAAAXTTAAGAATAGTCCACATATAAGTTCTAATTTAGTGTTAGTGCACAAAATGCTGATTACTTTTTGCATAAG								12876
NC sequence.seq	ATAAAAAXTTAAGAATAGTCCACATATAAGTTCTAATTTAGTGTTAGTGCACAAAATGCTGATTACTTTTTGCATAAG								12871
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	ATAAAAAXTTAAGAATAGTCCACATATAAGTTCTAATTTAGTGTTAGTGCACAAAATGCTGATTACTTTTTGCATAAG								12867
Majority	TATGTTTTAAGXACAACTTAGCAGGACATTGGATAATGATCATAACXCTTATGAAAGATTCCXAAAGGATTTTTGAGAA								
	12890	12900	12910	12920	12930	12940	12950	12960	
BRSV W2.seq	TATGTTTTAAGXACAACTTAGCAGGACATTGGATAATGATCATAACXCTTATGAAAGATTCCXAAAGGATTTTTGAGAA								12960
BRSV-A2 Gelfi.seq	TATGTTTTAAGXACAACTTAGCAGGACATTGGATAATGATCATAACXCTTATGAAAGATTCCXAAAGGATTTTTGAGAA								12956
NC sequence.seq	TATGTTTTAAGXACAACTTAGCAGGACATTGGATAATGATCATAACXCTTATGAAAGATTCCXAAAGGATTTTTGAGAA								12951
VRSB3761 P8 FINALE 2007.seq	TATGTTTTAAGXACAACTTAGCAGGACATTGGATAATGATCATAACXCTTATGAAAGATTCCXAAAGGATTTTTGAGAA								12947
Majority	GGATTGGGGTGAAGGATATXTAACCTGATCATATGTTTTAGATTAAATGCTCTTTTTGATGCATATAAAACATATTTGT								
	12970	12980	12990	13000	13010	13020	13030	13040	
BRSV W2.seq	GGATTGGGGTGAAGGATATXTAACCTGATCATATGTTTTAGATTAAATGCTCTTTTTGATGCATATAAAACATATTTGT								13040
BRSV-A2 Gelfi.seq	GGATTGGGGTGAAGGATATXTAACCTGATCATATGTTTTAGATTAAATGCTCTTTTTGATGCATATAAAACATATTTGT								13036
NC sequence.seq	GGATTGGGGTGAAGGATATXTAACCTGATCATATGTTTTAGATTAAATGCTCTTTTTGATGCATATAAAACATATTTGT								13031









# BIBLIOGRAPHIE

**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.

**Ahmadian G., Chambers P., Easton A.J.,**

Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses,

*J. Gen. Virol.*, 1999, **80**, 2011–2016

**Alwan, W.H., Record, F.M., and Openshaw, P.J.**

Phenotypic and functional characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins.

*J Immunol*, 1993, **150**, 12, 5211-8.

**Anderson, K., King, A. M., Lerch, R. A. and Wertz, G. W.**

Polylectosaminoglycan 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.

**Antonis A.F., Schrijver R.S., Daus F., Steverink P.J., Stockhofe N., Hensen E.J., Langedijk J.P., Van der Most R.G.,**

Vaccine induced immunopathology during bovine respiratory syncytial virus infection: exploring the parameters of pathogenesis,

*J.Virol.*, 2003, **77**, 12067–12073

**Antonis A.F., De Jong M.C., Van der Poel W.H., Van der Most R.G., Stockhofe-Zurwieden N., Kimman T., Schrijver R.S.**

Age-dependent differences in the pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus infections related to the development of natural immunocompetence.

*J Gen Virol*, 2010, **91**, 2497–2506.

**Arslanagic E., Matsumoto M., Suzuki K., Nerome K., Tsutsumi H., Hung T.,**

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

*Acta Virol*, 1996, **40**, 209–214.

**Baker, J.C., Ames, T.R., and Werdin, R.E.**

Serologic studies of bovine respiratory syncytial virus in Minnesota cattle.

*Am J Vet Res*, 1985, **46**, 2, 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.

**Baker, J.C., Ellis, J.A., and Clark, E.G.**

Bovine respiratory syncytial virus  
*Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1997a, **11**, 425-454.

**Baker, J.C., Ellis, J.A., and Clark, E.G.**

Bovine respiratory syncytial virus  
*Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1997a, **13**, 425-454.

**Barik, S.**

Transcription of human respiratory syncytial virus genome RNA in vitro: requirement of cellular factor(s).  
*J Virol*, 1992, **66**, 11, 6813-8.

**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., Baker, J.C., Patterson, J.S., Walker, R.D., Haines, D.M., and Clark, E.G.**

The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves.  
*J Infect Dis*, 1991, **163**, 3, 470-6.

**Belknap, E.B., Ciszewski, D.K., and Baker, J.C.**

Experimental respiratory syncytial virus infection in calves and lambs.  
*J Vet Diagn Invest*, 1995, **7**, 2, 285-98.  
Belknap *et al.*, 1996

**Bermingham A., 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. USA*, 1999, **96**, 11259–11264.

**Bidokhti, M.R.M., Traven, M., et al.**

Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial viruses from recent outbreaks in feedlot and dairy cattle herds.  
*Arch Virol*, 2012, **157**, 601-607.

**Boxus, M., Letellier, C., Kerkhofs, P.**

Real time RT-PCR for the detection and the quantitation of bovine respiratory syncytial virus.  
*J Virol Methods*, 2005, **125**, 125-130.

**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.

**Bryson, D.G., Evermann, J.F., Liggitt, H.D., Foreyt, W.J., and Breeze, R.G.**

Studies on the pathogenesis and interspecies transmission of respiratory syncytial virus isolated from sheep.

*Am J Vet Res*, 1988, **49**, 8, 1424-30.

**Bryson, D.G., McConnell, S., McAliskey, M., and McNulty, M.S.**

Ultrastructural features of alveolar lesions in induced respiratory syncytial virus pneumonia of calves.

*Vet Pathol*, 1991, **28**, 4, 286-92.

**Buchholz U.J., Finke S., 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**, 251-259.

**Burke, E., Dupuy, L., Wall, C., and Barik, S.**

Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus.

*Virology*, 1998, **252**, 137-148.

**Caldow, G.L., Edwards, S., Nixon, P., and Peters, A.R.**

Associations between viral infection and respiratory disease in young beef bulls.

*Vet Rec*, 1988, **122**, 22, 529-31.

**Caldow, G.L., Edwards, S., Peters, A.R., Nixon, P., Ibata, G., and Sayers, R.**

Associations between viral infections and respiratory disease in artificially reared calves.

*Vet Rec*, 1993, **133**, 4, 85-9.

**Castleman, W.L., Chandler, S.K., and Slauson, D.O.**

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

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

**Castleman, W.L., Lay, J.C., Dubovi, E.J., and Slauson, D.O.**

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

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

**Chanock, R.M., 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.

**Ciszewski, D.K., Baker, J.C., Slocombe, R.F., Reindel, J.F., Haines, D.M., and Clark, E.G.**

Experimental reproduction of respiratory tract disease with bovine respiratory syncytial virus.

*Vet Microbiol*, 1991, **28**, 39-60.

**Collins, P. L., Anderson, K., Langer, S. J. & Wertz, G. W.**

Correct sequence for the major nucleocapsid protein mRNA of respiratory syncytial virus.

*Virology*, 1985, **146**, 69-77.

**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**, 5134-8.

**Collins, J. K., R. Jensen.**

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

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

**Collins P.L., Hill M.G., 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**, 3015–3020.

**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.

*Fields Virology*, 1996. 1313-1346.

**Collins, P. L., Chanock, R. M. & Murphy, B. R.**

Respiratory syncytial virus.

*Fields Virology*, 2001, 1443–1484.

**Cowton, V. M., and Fearn, R.**

Evidence that the respiratory syncytial virus polymerase is recruited to nucleotides 1 to 11 at the 3' end of the nucleocapsid and can scan to access internal signals.

*J Virol*, 2005, **79**, 11311-22.

**Deplanche, M., Lemaire, M., Mirandette, C., Bonnet, M., Schelcher, F., and Meyer, G.**

In vivo evidence for quasispecies distributions in the bovine respiratory syncytial virus genome.

*J Gen Virol*, 2007, **88**, 1260-5.

**Drake, J. W.**

Rates of spontaneous mutations among RNA viruses.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, **90**, 4171-4175.

**Eigen, M. AND Schuster, P.**

The hypercycle - A Principle of Natural Self-organization.

*Springer-Verlag*. New York, 1979.

**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., West, K., Konoby, C., Leard, T., Gallo, G., Conlon, J., and Fitzgerald, N.**

Efficacy of an inactivated respiratory syncytial virus vaccine in calves.

*J Am Vet Med Assoc*, 2001, **218**, 12, 1973-80.

**Ellis, J.A., Belden, E.L., Haven, T.R., and Cavender, J.**

Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in cattle following immunization with modified-live and inactivated vaccines. Analysis of proliferation and secretion of lymphokines by leukocytes in vitro.

*Vet Immunol Immunopathol*, 1992, **34**, 1-2, 21-34.

**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**, 101–105.

**Evans J.E., Cane P.A., Pringle C.R.,**

Expression and characterisation of NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus,

*Virus Res.*, 1996, **43**, 155–161.

**Fearns, R., Collins, P. L., and Peeples, M. E.**

Functional analysis of the genomic and antigenomic promoters of human respiratory syncytial virus.

*J Virol.*, 2000, **74**, 6006-14.

**Fearns, R., Peeples, M. E. & Collins, P. L.**

Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus.

*J Virol*, 2002 **76**, 1663-72.

**Field, E.W. and Smith, M.H.**

Cell-mediated immune response in cattle to bovine respiratory syncytial virus.

*Am J Vet Res*, 1984, **45**, 8, 1641-3.

**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., G. Wertz, R. A. Lerch, and G. Taylor.**

Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus.

*J. Gen.Virol.*, 1994, **75**, 363–370.

**Furze, J. M., S. R. Roberts, G. W. Wertz, and G. Taylor.**

Antigenically distinct G glycoproteins of BRSV strains share a high degree of genetic homogeneity.

*Virology*, 1997, **231**, 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.

**Gershwin, L.J., Dungworth, D.L., Himes, S.R., and Friebertshauser, K.E.**

Immunoglobulin E responses and lung pathology resulting from aerosol exposure of calves to respiratory syncytial virus and *Micropolyspora faeni*.

*Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1990, **92**, 3, 293-300.

**Gershwin L.J., Schelegle E.S., Gunther R.A., Anderson M.L., Woolums A.R., Larochele D.R., Boyle G.A., Friebertshauser K.E., Singer R.S.,**

A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology, *Vaccine*, 1998, **16**, 1225–1236.

**Gershwin L.J.**

Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle

*Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2012, **35**, 253– 257.

**Gould, E.A., Alan, G.M., Logan, E.F., Mc Ferran, J.B.**

Detection of antibody to bovine syncytial virus and respiratory syncytial virus in bovine fetal serum.

*J.Clin.Microbiol.*,1978, **8**, 233-237.

**Graham, B. S., T. R. Johnson, R. S. Peebles**

Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection.

*Immunopharmacology*, 2000, **48**, 237-247.

**Grell, S. N., Riber, U., Tjornehoj, K., Larsen, L. E., and Heegaard, P. M.**

Age-dependent differences in cytokine and antibody responses after experimental RSV infection in a bovine model.

*Vaccine*, 2005a, **23**, 3412-23.

**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., 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, 1705–1714.

**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., Steinhauer D.**

RNA virus population as quasispecies.

*Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1992, **176**, 1-20.

**Horzinek, Marian C.**

Bovine Respiratory Syncytial Virus

*Virus Infections of Ruminants*. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, 1990. 363-375.

**Huang Y, Anderson R.**

A single amino acid substitution in a recombinant G protein vaccine drastically curtails protective immunity against respiratory syncytial virus (RSV).

*Vaccine*, 2003, **21**, 2500-5.

**Hull, J.**

Genetic susceptibility to RSV disease.

*Respiratory syncytial virus*, vol. 14. Elsevier, Amsterdam, 2007, 115-140.

**Inaba, Y., Tanaka, Y., Omori, T., and Matumoto, M.**

Physicochemical properties of bovine respiratory syncytial virus.

*Jpn J Microbiol*, 1973, **17**, 3, 211-6.

**Jacobs, J.W. and Edington, N.**

Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus.

*Res Vet Sci*, 1975, **18**, 3, 299-306.

**Karger A., Schmidt U., Buchholz U.J.,**

Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin,

*J. Gen. Virol.*, 2001, **82**, 631-640.

**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.

**Key, D.W. and Derbyshire, J.B.**

Serological studies of parainfluenza type 3 virus, bovine adenovirus type 3 and bovine respiratory syncytial virus infection in beef calves.

*Vet Microbiol*, 1984, **9**, 6, 587-92.

**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., 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., Straver, P.J., and Zimmer, G.M.**

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., and Straver, P.J.**

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*, 1989b, **22**, 2, 145-60.

**Kimman TG, Sol J, Westenbrink F, Straver PJ.**

A severe outbreak of respiratory tract disease associated with bovine respiratory syncytial virus probably enhanced by vaccination with modified live vaccine.

*Vet Q.* 1989c, **11**, 250-3.

**Knott, I., Weynants, V., Walravens, K., van derPoel, W.H., Kramps, J.A., and Letesson, J.J.**

Immune response of calves experimentally infected with non-cell-culture-passaged bovine respiratory syncytial virus.

*Arch Virol*, 1998, **143**, 6, 1119-28.

**Krempl, C. D., Lamirande, E. W., and Collins, P. L.**

Complete Sequence of the RNA Genome of Pneumonia Virus of Mice (PVM).

*Virus Genes*, 2005, **30**, 237-48.

**Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M. G. & Collins, P. L.**

Effect of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus.

*J Virol*, 1996, **70**, 6892–6901.

**Lambert, D. M. 1988.**

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

*Virology* **164**, 458–466.

**Lambs, R.A., et Kolakofsky, D.**

Paramyxoviridae : the viruses and their replication.

*Fields Virology*, 4<sup>th</sup> Edition, 2000, 1305-1340

**Langedijk, J. P. M., R. H. Melen, G. Taylor, J. M. Furze, and J. T. van Oirschot**

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

*J. Virol.*, 1997, **71**, 4055–4061.

**Lapin, C.D., Hiatt, P.W., Langston, C., Mason, E., and Piedra, P.T.**

A lamb model for human respiratory syncytial virus infection.

*Pediatr Pulmonol*, 1993, **15**, 3, 151-6.

**Larsen LE, Uttenthal, A., Arctander, P., Tjørnehøj, K., Viuff, B., Røntved, C., Rønsholt, L., Alexandersen, S., Blixenkron-Møller, M.**

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 adaption and passages in cell culture or calves.

*Vet Microbiol*, 1998, **62(4)**, 265-79.

**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.

**Le Mercier P.**

Infection expérimentale par le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) : étude des interactions entre adaptation et pouvoir pathogène

Thèse vétérinaire, 2005, Toulouse

**Lehmkuhl H.D., Smith M.H., Cutlip R.C.,**

Morphogenesis and ultrastructure of caprine respiratory syncytial virus,

*Arch. Virol.*, 1980, **65**, 269–276.

**Lerch, R. A., K. Anderson, and G. W. Wertz.**

Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that 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, and 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.

**Malet, I., M. Belnard, et al.**

From RNA to quasispecies: a DNA polymerase with proofreading activity is highly recommended for accurate assessment of viral diversity.

*J Virol Methods*, 2003, **109**, 161-170.

**Malhotra, R., Ward, M., Bright, H., Priest, R., Foster, M. R., Hurle, M., Blair, E., Bird, M.**

Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells.

*Microbes Infect*, 2003, **5**, 123-33.

**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 variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus.

*J Gen Virol*, 1993, **74**, Pt 9, 2001-4.

**Mallipeddi S.K., Lupiani B., 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**, 1019–1023.

**Mars M.H., Brusckhe C.J., Van Oirschot J.T.**

Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions.

*Vet. Microbiol.*, 1999, **66**, 197–207.

**Martínez, I., Dopazo, J. & Melero, J. A.**

Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants.

*J Gen Virol*, 1997, **78**, 2419–2429

**McNulty, M.S., Bryson, D.G., and Allan, G.M.**

Experimental respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: microbiologic and immunofluorescent findings.

*Am J Vet Res*, 1983, **44**, 9, 1656-9.

**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.

**Meyer, G., Delplanche, M., and Schelcher, F.,**

Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development.

*Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2008, **31**, 191-225

**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., Lillie, M.G., and Ingling, A.L.**

Effect of serum and nasal neutralizing antibodies on bovine respiratory syncytial virus infection in calves.

*J Infect Dis*, 1976, **134**, 4, 409-13.

**Morris, J.A., Blount, R.E., Savage, R.E.**

Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza.

*Proc Soc Exp Biol Med.*, 1956, **92**, 3, 544-549.

**Mufson, M. A., C. Orvell, B. Rafner, and E. Norrby.**

Two distinct subgroups of human respiratory syncytial virus.

*J. Gen. Virol.*, 1985, **66**, 2111–2124.

**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.

**Netteleton, P.F., Gilray, J.A., Caldow, G., Gildow, J.R., Durkovic, B. and Vilcek, S., R.**

Recent Isolates of Bovine Respiratory Syncytial Virus from Britain are more Closely Related to Isolates from USA than to Earlier British and Current Mainland European Isolates,

*J Vet. Med*, 2003, **B 50**, 196–199

**Norrby, E., M. A. Mufson, and H. Sheshberadaran.**

Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus.

*J. Gen.Virol.*, 1986, **67**, 2721–2729.

**Olszewska-Pazdrak, B., Pazdrak, K., Ogra, P.L., and Garofalo, R.P.**

Respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells induce eosinophil degranulation by a CD18-mediated mechanism.

*J Immunol*, 1998, **160**, 10, 4889-95.

**Openshaw, P. J.**

Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease.

*Springer Semin Immunopathol*, 1995, **17**, 2-3, 187-201.

**Openshaw, P. J., Tregoning, J., and Harker, J. (2005).**

RSV 2005: Global impact, changing concepts, and new challenges.

*Viral Immunol.*, 2005, **18**, 749-51.

**Openshaw, P.J.M., and Tregoning, J.S.**

Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection.

*Clinical Microbiology Reviews*, 2005, **18**, 541-555

**Otto, P., Elschner, M., Reinhold, P., Kohler, H., Streckert, H.J., Philippou, S., Werchau, H., and Morgenroth, K.**

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. and Jacquier, C.**

A respiratory syncytial virus of bovine origin.

*Arch Gesamte Virusforsch*, 1970, **30**, 4, 327-42.

**Pastey M.K., Samal S.K.,**

Structure and sequence comparison of bovine respiratory syncytial virus fusion protein,

*Virus Res.*, 1993, **29**, 195–202.

**Pastey M.K., 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**, 193–197.

**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.

**Pastey, M.K., Crowe, J.E.JR, Graham, B.S.**

RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus induced syncytium formation.  
*J Virol.*, 1999, **73**, 7262-7270

**Perrin, B., Dannacher, G., and Solsona, M.**

Mise en évidence des anticorps contre le virus respiratoire syncytial chez les bovins français.  
*Rev Med Vet*, 1979, **155**, 465-471.

**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.

**Polack F.P., Teng M.N., Collins P.L., Prince G.A., Exner M., Regele H., Lirman D.D., Rabold R., Hoffman S.J., Karp C.L., Kleeberger S.R., Wills-Karp M., Karron R.A.,**

A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease,  
*J. Exp. Med.*, 2002, **196**, 859–865.

**Prince, G.A., Horswood, R.L., Berndt, J., Suffin, S.C., and Chanock, R.M.**

Respiratory syncytial virus infection in inbred mice.  
*Infect Immun*, 1979, **26**, 2, 764-6.

**Prozzi, D., K. Walravens, J. P. M. Langedijk, F. Daus J. A. Kramps, and J-J. Letesson,**

Antigenic and molecular analyses of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein.  
*J. Gen. Virol.*, 1997, **78**, 359–366.

**Puthothu, B., Forster, J., Heinze, J., Heinzmann, A., Krueger, M.**

Surfactant protein B polymorphisms are associated with severe respiratory syncytial virus infection, but not with asthma.  
*BMC Pulm Med*, 2007, **7**,6

**Puthothu B, Forster J, Heinzmann A, Krueger M.**

TLR-4 and CD14 polymorphisms in respiratory syncytial virus associated disease.  
*Dis Markers*, 2006, **22**, 303-8.



**Puthothu, B., Krueger, M., Heinze, J., Forster, J., Heinzmann, A.**

Haplotypes of surfactant protein C are associated with common paediatric lung diseases.

*Pediatr Allergy Immunol*, 2006, **17**, 572-7.

**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.

**Reinout A. Bem, Joseph B. Domachowske and Helene F. Rosenberg**

Animal models of human respiratory syncytial virus disease.

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, **301**: L148–L156

**Roberts S.R., Lichtenstein D., Ball L.A.,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**, 4538–4546.

**Rueda, P., T. Delgado, A. Portela, J. A. Melero, and B. Garcí'a-Barreno,**

Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies.

*J. Virol.*, 1991, **65**, 3374–3378.

**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.

**Schelcher F., Salat O., Bezille P., Espinasse J.,**

Approche seroépidémiologique des troubles respiratoires épizootiques des veaux d'Aveyron : rôle du virus respiratoire syncytial,

*Rev. Med. Vet.*, 1990, **141**, 117–123.

**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, Matheise JP, Dessy F, Heimann M, Letesson JJ, Coppe P, Collard A.**

High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine.

*J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2000, **47**, 535-50.

**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*, 1996a, **53**, 3-4, 253-60.

**Schrijver, R.S., Langedijk, J.P., van derPoel, W.H., Middel, W.G., Kramps, J.A., and van Oirschot, J.T.**

Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections.

*Clin Diagn Lab Immunol*, 1996b, **3**, 5, 500-6.

**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.

**Sharma R., Woldehiwet Z.,**

Depression of lymphocyte responses to phytohaemagglutinin in lambs experimentally infected with bovine respiratory syncytial virus,

*Res.Vet.Sci.*,1991, **50**, 152–156.

**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.

**Sparer, T. E., S. Matthews, T. Hussel, A. J. Rae, B. Garcia-Barreno, J. A. Melero, and J. M. Openshaw.**

Eliminating a region of respiratory syncytial virus attachment protein allows induction of protective immunity without vaccine-enhanced lung eosinophilia.

*J. Exp. Med.*, 1998, **187**, 1921–1926.

**Spilki FR, Almeida RS, Domingues HG, D'Arce RC, Ferreira HL, Campalans J, Costa SC, Arns CW**

Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein.

*Virus Res.* 2006, **116** (1-2):30-7.

**Srikiatkachorn, A., Chang, W., and Braciale, T.J.**

Induction of Th-1 and Th-2 responses by respiratory syncytial virus attachment glycoprotein is epitope and major histocompatibility complex independent.

*J Virol*, 1999, **73**, 8, 6590-7.

**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.

**Steinhauer, D. A., J. J. Holland**

Rapid evolution of RNA viruses.

*Annu Rev Microbiol*, 1987, **41**, 409-33.

**Stine, L. C., D. K. Hoppe, and C. L. Kelling..**

Sequence conservation in the attachment glycoprotein and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates.

*Vet. Microbiol.*, 1997, **54**, 201–221.

**Stott E.J., Thomas L.H., Collins A.P., Crouch S., Jebbett J., Smith G.S., Luther P.D., Caswell R.,**

A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease,

*J. Hyg.(Lond.)*, 1980, **85**, 257–270.

**Strauss, E.G., Strauss, J.H., Levine A.J.**

Virus Evolution

*InField Virology*, 1996, 153–171.

**Taylor G., Stott E.J., Furze J., Ford J., Sopp P.,**

Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies,

*J. Gen. Virol.*, 1992, **73**, 2217–2223.

**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.

**Techaarpornkul, S., Baretto, N., Peeples, M.E.**

Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene.

*J. Virol*, 2001, **75**, 6825–6834, 2001, **82**,631–640.

**Teng M.N., Collins P.L.,**

Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein,

*J. Virol.*, 1999, **73**, 466–473.

**Teng M.N., Whitehead S.S., Collins P.L.,**

Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo,  
*Virology*, 2001, **289**, 283–296.

**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., Stott, E.J., Collins, A.P., Crouch, S., and Jebbett, J.**

Infection of gnotobiotic calves with a bovine and human isolate of respiratory syncytial virus. Modification of the response by dexamethasone.  
*Arch Virol*, 1984, **79**, 1-2, 67-77.

**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**, 38–44.

**Tjernehoj, K., Uttenthal, A., Viuff, B., Larsen, L.E., Rontved, C., and Ronsholt, L.**

An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves.  
*Res. Vet. Sci.*, 2003, **74**, 1, 55-65.

**Tjernehoj K., Uttenthal A., Viuff B., Larsen L.E., Rontved C., Ronsholt L.,**

An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves,  
*Res. Vet. Sci.*, 2003, **74**, 55–65.

**Trigo, F.J., Breeze, R.G., Evermann, J.F., Gallina, A.M.**

Pathogenesis of experimental bovine respiratory syncytial virus infection in sheep.  
*Am. J. Vet. Res.*, 1984, **45**, 1663-1670.

**Trudel M., Nadon F., Simard C., Belanger F., Alain R., Seguin C., Lussier G.,**

Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus,  
*Arch.Virol.*, 1989, **107**, 141–149.

**Ulloa L., Serra R., Asenjo A., Villanueva N.,**

Interactions between cellular actin and human respiratory syncytial virus (HRSV),  
*Virus Res.*, 1998, **53**, 13–25.

**Valarcher, J. F.**

Persistence in vivo et évolution génétique du virus respiratoire syncytial bovin  
Th: Thèse de doctorat: Lyon: 1999a - 11-70.

**Valarcher, J.F., Bourhy, H., Gelfi, J., and Schelcher, F.**

Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections.

*J Clin Microbiol*, 1999b, **37**, 6, 1858-62.

**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., Furze, J., Wyld, S. G., Cook, R., Zimmer, G., Herrler, G., and Taylor, G.**

Bovine respiratory syncytial virus lacking the virokinin or with a mutation in furin cleavage site RA(R/K)R109 induces less pulmonary inflammation without impeding the induction of protective immunity in calves.

*J Gen Virol*, **87**, 2006, 1659-67.

**Valarcher, J. F., Schelcher, F. and Bourhy, H.**

Evolution of bovine respiratory syncytial virus.

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

**Valarcher J.F., and Taylor, G.,**

Bovine respiratory syncytial virus infection.

*Vet Res*, 2007, **38**, 153-180.

**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**, 719-24.

**Van Der Poel W.H.M, Mourits M.C.M, Nielen M, Frankena K, van Oirschot J.T, Scukken Y.H**

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

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

**Van Der Poel W.H.M., Langedijk J.P.M., Kramps J.A., Middel W.G.J., Brand A., Van Oirschot J.T.,**

Bovine respiratory syncytial virus antibodies in non-bovine species,

*Arch. Virol.*, 1995, **140**, 1549-1555.

**Wellemans, G. and Leunen, J.**

Le virus respiratoire syncytial et les troubles respiratoires des bovins.

*Ann Med Vet.*, 1975, **114**, 89-93

**West, K., Petrie, L., Haines, D., Konoby, C., Clark, E. G., Martin, K., and Ellis, J.A.,**  
The effect of formalin-inactivated vaccine on respiratory disease associated with bovine respiratory syncytial virus infection in calves.  
*Vaccine*, 1999a, **17**, 809-20

**West, K., Petrie, L., Konoby, C., Haines, D.M., Cortese, V., and Ellis, J.A.**  
The efficacy of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves.  
*Vaccine*, 1999b, **18**, 9-10, 907-19.

**West, K., Petrie, L., Konoby, C., Haines, D.M., Cortese, V., and Ellis, J.A.**  
The efficacy of modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccines in experimentally infected calves.  
*Vaccine*, 1999b, **18**, 9-10, 907-19.

**Westenbrink, F., Kimman, T.G., and Brinkhof, J.M.**  
Analysis of the antibody response response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves.  
*J Gen Virol.*, 1989, **70**, 591-601.

**Yunus A.S., Collins P.L., 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**, 2231–2238.

**Yunus A.S., Khattar, S.K., Collins P.L., Samal S.K.,**  
Rescue of bovine respiratory syncytial virus from cloned cDNA : entire genomes sequence of BRSV strain A51908.  
*Virus Genes*, 2001, **23**, 157-64.

**Zamora M., Samal S.K.,**  
Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus, *J.Gen. Virol.*, 1992, **73**, 737–741.

**Zhao X, Chen FP, Sullender WM.**  
Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats.  
*Virology*, 2004, **318**, 608–12.

**Zhao X, Sullender WM.**  
In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab.  
*J Virol* 2005, **79**, 3962–8.