



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Analyse de l'hétérogénéité de souches du Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV) par approche génétique

Bonsir, Laurence

*Award date:*  
1994

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTE DES SCIENCES**

---

**Analyse de l'hétérogénéité de souches du Virus  
Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV) par  
approche génétique**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques**

**Laurence BONSIR  
1994**



## **Analyse de l'hétérogénéité de souches du Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV) par approche génétique**

BONSIR Laurence

### **Résumé**

Le virus respiratoire syncytial bovin ou BRSV est la cause majeure de maladies respiratoires chez les bovins. Récemment, différentes souches ont été typées antigéniquement par le groupe de Taylor et au sein de notre laboratoire. Le BRSV a ainsi été subdivisé en deux sous-groupes antigéniques A et B et un sous-groupe intermédiaire A/B. Cette variabilité est principalement située au niveau du gène G codant pour la glycoprotéine d'attachement.

Ce travail a consisté à étudier la variabilité génétique de deux souches du BRSV (Dorset et BovX) par séquençage du gène G, ces souches ayant été préalablement analysées au niveau antigénique.

Nous avons comparé les séquences nucléotidiques et protéiques du gène G avec 18 autres séquences. Les souches Dorset et BovX ont été rapprochées génétiquement des souches VC-464 et A51908 respectivement. Le nombre de substitutions au niveau nucléotidique et au niveau acides aminés a été calculé. Un arbre évolutif de ces 20 souches a également été dressé. Cinq sous-groupes génétiques ont pu être approximés. Cependant, le pourcentage d'identité minimal de 80 % calculé au niveau de la protéine G des 20 souches du BRSV ne nous permet pas d'étayer l'hypothèse de l'existence de deux sous-groupes comme observés chez le virus respiratoire syncytial humain, ceux-ci ne montrant qu'une identité de 53 %.

L'issue de ce travail nous permet d'espérer la mise au point d'outils de typage génétique des différentes souches du BRSV.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

**Promoteur : J.-J. Letesson**

*Au terme de ce travail, je tiens à remercier le Docteur Jean-Jacques Letesson pour m'avoir accueilli dans son unité de travail et pour avoir accepté de promouvoir ce mémoire.*

*Mes plus vifs remerciements vont à madame Déborah Prozzi pour sa disponibilité et pour m'avoir légué ses connaissances et sa rigueur.*

*Toute ma gratitude va à Jean-Philippe Matheise, Pascal Mertens et Karl Walravens pour leurs conseils judicieux.*

*Un grand merci à tous les membres du laboratoire pour leur bonne humeur et pour l'ambiance dans laquelle ils m'ont permis de travailler.*

*Je tiens à remercier messieurs Coppe, Vandenhautte, Le et Descy d'avoir accepté de lire ce mémoire.*

*Un merci tout particulier va à Marc pour son appui et sa présence de tous les instants ainsi qu'à mes parents pour m'avoir permis d'atteindre ce but.*

*Je remercie enfin tous mes proches pour leur amitié et leur soutien tout au long de ces années.*



# Table des Matières

## INTRODUCTION

1. Historique .....	1
2. Pertes économiques dues aux infections par le BRSV .....	2
3. Etiologie-Réceptivité.....	2
4. Symptomatologie.....	3
4.1. Forme aiguë .....	3
4.2. Forme sub-clinique ou atténuée .....	4
5. Anatomie pathologique .....	4
6. Taxonomie .....	5
7. Structure.....	6
8. Génome.....	6
9. Réplication .....	7
9.1. Attachement et pénétration .....	7
9.2. Transcription.....	7
9.2.1. Transcription séquentielle.....	7
9.2.2. Atténuation de la transcription.....	9
9.3. Réplication de l'ARN .....	9
9.4. Assemblage et sortie du virion.....	10
10. Protéines.....	11
10.1. Les protéines de la nucléocapside.....	11
10.1.1. La protéine de structure .....	11
10.1.2. Les protéines auxiliaires.....	11
10.2. Les protéines de matrice.....	13
10.2.1. La protéine de matrice.....	13
10.2.2. La protéine M2.....	13
10.3. Les protéines non-structurelles .....	14
10.4. Les glycoprotéines d'enveloppe.....	14
10.4.1. La protéine d'attachement .....	14
10.4.2. La protéine de fusion .....	19
10.4.3. La protéine SH .....	20
11. Variabilité.....	22
11.1. Variabilité antigénique .....	22
11.1.1. Variabilité antigénique chez le HRSV .....	22
11.1.2. Variabilité antigénique chez le BRSV .....	23
11.1.3. Relation antigénique entre BRSV et HRSV.....	25
11.2. Variabilité génétique .....	25
11.2.1. Variabilité génétique chez le HRSV .....	25
11.2.2. Variabilité génétique chez le BRSV .....	26
11.2.3. Comparaison BRSV-HRSV .....	27

---



# Table des Matières

<b><u>BUT DU TRAVAIL</u></b> .....	29
<b><u>MATERIEL &amp; METHODES</u></b>	
1. Cultures virales .....	30
1.1. Souches virales du BRSV.....	30
1.2. Cultures des cellules Vero et testiculaires de veau (CTV) .....	30
1.2.1. Origine des cellules Vero et CTV .....	30
1.2.2. Protocole .....	31
1.3. Cultures du BRSV sur des cellules Vero et des CTV .....	31
1.4. Détermination du titre viral.....	32
1.5. Préparation d'une culture virale pour l'extraction d'ARN .....	32
2. Extraction d'ARN .....	32
2.1. Principe .....	32
2.2. Protocole .....	33
2.2.1. Homogénéisation.....	33
2.2.2. Extraction.....	33
2.2.3. Précipitation.....	33
2.2.4. Lavage .....	33
3. Quantification spectrophotométrique.....	34
4. Electrophorèse d'ARN en gel d'agarose.....	34
4.1. Préparation du gel.....	34
4.2. Préparation des échantillons et électrophorèse.....	35
5. RT-PCR .....	35
5.1. Principe .....	35
5.2. Protocole .....	36
5.2.1. Rétro-transcription (RT) .....	36
5.2.2. Polymérisation en chaîne (PCR) .....	37
6. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose .....	38
6.1. Principe .....	38
6.2. Protocole .....	39
7. Purification du produit RT-PCR.....	40
7.1. Extraction au phénol/chloroforme.....	40
7.1.1. Principe .....	40
7.1.2. Protocole .....	40
7.2. Précipitation à l'éthanol .....	40
7.2.1. Principe .....	40
7.2.2. Protocole .....	40
7.3. Wizard PCR Preps DNA Purification System .....	41
8. Isolement et purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose .....	42
8.1. GeneClean II .....	42
8.2. Récupération par "papiers" (Electrophorèse sur DEAE cellulose) .....	43
9. Séquençage direct d'un produit RT-PCR.....	44

---



## Table des Matières

9.1. Principe .....	44
9.2. Protocoles.....	45
9.2.1. Réaction de séquençage .....	45
9.2.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	49
10. Restriction.....	50
10.1. Principe.....	50
10.2. Protocole .....	50
11. Analyse assistée par ordinateur des séquences d'ADN et de protéines .....	51

### RESULTATS

1. Souches cultivées .....	52
2. Extraction de l'ARN total des cellules infectées par le BRSV.....	52
2.1. Quantification de l'ARN isolé.....	52
2.2. Contrôle de qualité de l'ARN isolé .....	52
3. Amplification du gène codant pour la protéine G de trois souches du BRSV.....	53
3.1. Essai d'amplification du gène entier.....	53
3.2. Amplification du gène en deux parties.....	53
4. Séquençage direct des deux fragments.....	54
4.1. fmol DNA Sequencing System .....	54
4.2. Cyclist Exo-Pfu DNA Sequencing System .....	55
4.2.1. Séquençage des souches BovX et Dorset.....	56
4.2.2. Séquençage de la souche 87-13956 .....	56
4.3. Résumé de la première étape de séquençage.....	57
5. Deuxième série d'amplification.....	57
6. Séquence du gène G.....	58
6.1. Souches Dorset et BovX.....	58
6.2. Souche 87-13956.....	58
7. Comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques de G .....	59
7.1. Comparaison des séquences nucléotidiques .....	59
7.1.1. Souche Dorset .....	60
7.1.2. Souche BovX.....	60
7.2. Comparaison des séquences protéiques.....	61
7.2.1. Souche Dorset .....	61
7.2.2. Souche BovX.....	62
8. Arbre évolutif.....	64

### DISCUSSIONS & CONCLUSIONS

1. Essai d'amplification du gène G entier des 3 souches du BRSV .....	66
2. Comparaison des séquences protéiques .....	67
3. Mise en parallèle des résultats génétiques et des données antigéniques.....	68
4. Essai de classification génétique .....	70

---



## Table des Matières

5. Conclusions générales .....	71
6. Perspectives: typage génétique .....	72
6.1. Restriction différentielle .....	72
6.2. Hybridation par sondes spécifiques .....	73
6.3. RT-PCR différentielle .....	74
6.4. Hétéroduplex.....	74
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	75

---

## Liste des abréviations

AA.....	Acides aminés
ADN .....	Acide désoxyribonucléique
ADNc.....	ADN complémentaire à un brin d'ARN
ARN.....	Acide ribonucléique
ARNm.....	ARN messenger
ATCC.....	American Type Culture Collection
BPIA.....	Bronchopneumopathie infectieuse aiguë
BrEt.....	Bromure d'éthidium
BRSV .....	Virus respiratoire syncytial bovin
CTV .....	Cellules testiculaires de veau
ddNTP.....	Didéoxyribonucléotide triphosphate
DI50.....	Dose infectieuse 50
DMSO .....	Diméthylsulfoxyde
dNTP .....	Déoxyribonucléotide triphosphate
DO .....	Densité optique
DO <sup>260</sup> .....	Densité optique à 260 nm
DO <sup>280</sup> .....	Densité optique à 280 nm
HRSV.....	Virus respiratoire syncytial humain
INRV.....	Institut National de Recherches Vétérinaires
M-MLV RTase .....	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
Oligo.....	Amorce oligonucléotidique
PCR .....	Polymerase chain reaction
RNAse .....	Ribonucléase
RNAse-free.....	Exempt de RNAses
RPM .....	Révolutions par minute
RSV.....	Virus respiratoire syncytial
RT .....	Reverse transcription
RTase .....	Reverse transcriptase
UV .....	Ultra-violet

---



# *Introduction*

### 1. Historique

Le premier cas d'isolement d'un virus respiratoire syncytial (RSV) fut relaté en 1956 par Morris et ses collaborateurs lors d'une épidémie de coryza dans un élevage de chimpanzés (Morris *et al.*, 1956). Très rapidement Chanock et Finberg s'aperçurent de l'étroite parenté existant entre le RSV du chimpanzé et un virus responsable d'une infection respiratoire rencontrée surtout chez de très jeunes enfants (Chanock et Finberg, 1957).

Parmi les virus considérés comme les éléments déterminants des bronchopneumopathies infectieuses aiguës (BPIA) des bovins, le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) est le plus récent, puisque son intervention ne fut suspectée qu'en 1968 par Doggett et ses collaborateurs (Doggett *et al.*, 1968).

L'observation de la neutralisation du virus respiratoire syncytial humain (HRSV) par des sérums provenant de bovins a permis pour la première fois de suspecter l'intervention du BRSV dans les BPIA des bovins (Doggett *et al.*, 1968). Cette hypothèse a été confirmée en 1970 par Wellemans et ses collaborateurs avec l'isolement du virus en Belgique chez des bovins malades (Wellemans *et al.*, 1970). La même année, Paccaud et Jacquier mettent en évidence le BRSV chez des bovins en Suisse (Paccaud et Jacquier, 1970).

Depuis, l'intervention du BRSV dans les BPIA a été démontrée ou suspectée dans de nombreux pays en Europe, en Amérique du Nord et en Australie (Brugère-Picoux, 1981) ainsi qu'en Afrique du Nord (Mahin et Wellemans, 1982).

Le RSV a aussi été isolé chez des caprins en 1979 et chez des ovins en 1983. On donna à ce virus le nom de virus respiratoire syncytial ovin (ORSV) (Alansari et Potgieter, 1993). Le ORSV n'est pas décrit en détail au niveau moléculaire et la relation génétique entre le ORSV et le BRSV et HRSV n'est pas connue (Mallipeddi et Samal, 1993b).



## 2. Pertes économiques dues aux infections par le BRSV

L'importance économique des infections au BRSV est non négligeable. En effet, les pertes en têtes de bétail se chiffrent à 2 à 20 % sur le nombre total d'animaux infectés lors d'une épidémie. De plus, les soins vétérinaires et la diminution de la productivité du cheptel bovin (diminution de gain en poids et de production laitière) sont à prendre en compte. Les coûts totaux dus aux infections respiratoires sont, effectivement, estimés à 450 millions d'écus (plus ou moins 17 milliards de francs belges) pour les veaux de moins d'un an dans l'ensemble de la communauté européenne. On estime à un million le nombre de veaux succombant à ces affections. Parmi ces infections, le BRSV occasionne une perte de 25 écus (plus ou moins 1000 francs belges) par veau laitier (Verhoeff *et al.*, 1989).

L'infection semble être très courante dans nos élevages belges. Ainsi, il est virtuellement impossible de trouver un colostrum dépourvu d'anticorps anti-BRSV.

## 3. Etiologie-Réceptivité

Les facteurs de réceptivité intervenant chez les bovins pour favoriser l'apparition d'une maladie respiratoire sont nombreux. Pour le BRSV, les plus importants sont :

- l'âge des animaux (jeunes bovins âgés de 15 jours à 18 mois).
- la saison : la maladie est surtout rencontrée en automne et en hiver, mais on peut également observer des cas au printemps ou en été.
- l'alimentation
- la race : les races à viande semblent plus prédisposées.

(Brugère-Picoux et Hérout, 1985).

La primo-infection au BRSV est notée principalement dans deux groupes d'âges, les tout jeunes veaux et les veaux âgés de 3 à 9 mois (Wellemans, 1982). Une des principales caractéristiques du RSV (BRSV et HSRV confondus) étant le problème des réinfections. En effet, des infections peuvent survenir chez des individus ayant déjà été infectés ou possédant des anticorps maternels anti-RSV. De plus, la plupart du temps



ces réinfections sont asymptomatiques (Hall *et al.*, 1991; Kimman et Westenbrink, 1990) (cette notion de réinfection sera détaillée dans la partie consacrée à la variabilité).

Des études épidémiologiques ont montré que la moitié des enfants sont infectés par le HRSV dans la première année de leur vie et pratiquement tous sont infectés à 2 ans. La plus sévère infection a lieu chez des enfants de 2 à 6 mois (Walsh *et al.*, 1987) parmi lesquels elle est la cause majeure de bronchiolites et pneumonies (Åkerlind-Stopner *et al.*, 1990). Approximativement 40 % des infections primaires chez des enfants dues au HRSV, résultent en une maladie de l'appareil respiratoire inférieur. Plus ou moins 1 % des enfants infectés nécessitent, par ailleurs, une hospitalisation (Meissner, 1994).

## 4. Symptomatologie

La période d'incubation du BRSV peut varier de 2 à 7 jours (Sharma et Woldehiwet, 1991). Il existe deux formes de la maladie :

### 4.1. Forme aiguë

Cette forme peut évoluer en deux phases :

- La première phase correspondant à un syndrome respiratoire de type grippal avec des rejets séreux, une conjonctivite entraînant un larmoiement, une toux sèche, persistante, accompagnée d'une dyspnée et une hyperthermie.
- La deuxième phase varie selon l'âge de l'animal.
  - Chez les animaux âgés de 3 à 9 mois, l'état de l'animal semble s'améliorer 2 à 3 jours après l'apparition de la maladie. Mais chez certains d'entre eux, on peut observer l'apparition d'une dyspnée intense avec 80 à 100 mouvements respiratoires par minute. La détresse respiratoire est aiguë. On observe une salivation importante avec une salive spumeuse parfois teintée de sang. L'animal est anorexique, souvent constipé. Les muqueuses sont cyanosées. Parfois, on note la présence d'un emphysème sous-cutané dans la région de l'épaule et de l'encolure. Le taux de mortalité peut atteindre 30 %. Chez les animaux survivants, une amélioration peut être notée en 2 à 5 jours après le début du deuxième stade (Brugère-Picoux et Hérout, 1985).



- Chez les très jeunes veaux, on observe le plus souvent une bronchopneumonie de type catarrhal qui se complique fréquemment de surinfections bactériennes (Brugère-Picoux et Hérout, 1985).

### 4.2. Forme sub-clinique ou atténuée

La maladie peut être bénigne avec un rejet séreux peu important et une toux sèche, évoluant rapidement en une ou deux semaines vers la guérison. On rencontre le plus souvent cette forme chez les animaux plus âgés ou lors de réinfections qui peuvent survenir dès 2 à 3 mois après une primo-infection (Brugère-Picoux et Hérout, 1985).

## 5. Anatomie pathologique

L'effet cytopathogène principal sur des cultures de cellules infectées par le BRSV est la formation de larges syncytia. Ce sont de larges masses cytoplasmiques avec des noyaux ayant tendance à s'agréger vers le centre. Au fur et à mesure que l'effet cytopathogène progresse, le cytoplasme semble se rétrécir avec des bras cytoplasmiques s'étendant à partir du syncytium. Finalement, le syncytium montre un cytoplasme faiblement taché avec un aspect en dentelles et des nuclei pycnotiques (Sharma et Woldehiwet, 1991).

L'expression individuelle de n'importe quel gène du HRSV ou la co-expression des gènes F et G (ceux-ci seront décrits ultérieurement) ne suffisent pas à la formation de syncytia. Cependant, ces gènes portés par des plasmides dont l'expression est 10 fois plus importante, induisent un niveau faible mais détectable de fusion cellulaire. A l'opposé, la co-expression de F, G et SH (ce dernier gène sera décrit dans la partie concernant les protéines) ensemble induisent une fusion cellulaire ressemblant à celle observée sur des monocouches cellulaires réellement infectées. De plus, la co-expression de F et SH montre un taux de fusion cellulaire significatif bien que son étendue soit moins importante que celle observée dans les cas où G est induit. La fusion cellulaire induite de cette manière par la co-expression de F et SH est spécifique aux protéines du HRSV car les protéines analogues à SH et F d'autres virus n'induisent aucune fusion (Heminway *et al.*, 1994).

Genus	Species	Host
<i>Paramyxovirus</i>	Sendai virus (murine parainfluenza virus type 1)	Mouse
	Human parainfluenza viruses types 1-4	Human
	SV5 (canine parainfluenza virus type 2)	Dog
	Mumps virus	Human
<i>Morbillivirus</i>	Newcastle disease virus	Chicken
	Measles virus	Human
	Canine distemper virus	Dog
<i>Pneumovirus</i>	Rinderpest virus	Cattle
	Respiratory syncytial virus	Human
	Bovine respiratory syncytial virus	Cattle

**Tableau 1.1.** : Classification des *Paramyxoviridae* (Kingsbury, 1990).

Genre	Formes du virion		Hélice de la nucléocapside		Projections membranaires	
	Sphériques et pléomorphes	Filamenteux	Diamètre	Longueur d'un pas	Longueur	Espacement
<i>Pneumovirus</i>	80 - 500	60 - 110*5000	13,5	6,5	12	6 - 10
<i>Paramyxovirus</i>	120 - 300	120*5000	17,5	5	8	8 - 10
<i>Morbillivirus</i>	100 - 250	100*5000	17,5	5	8	8 - 10

**Tableau 1.2.** : Dimensions moyennes (en nm) des différentes structures dans la famille des *Paramyxoviridae* (Stott et Taylor, 1985).



### 6. Taxonomie

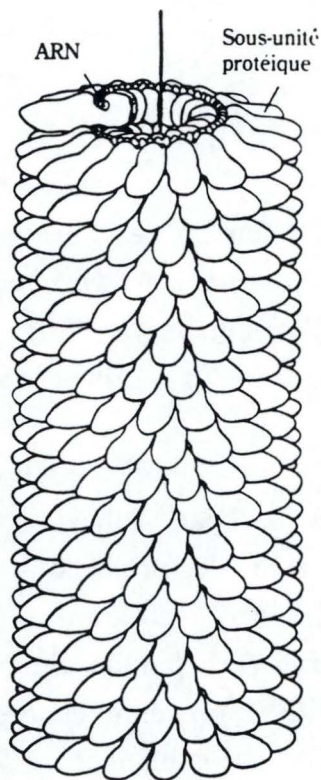
Le RSV (BRSV, HRSV et ORSV) fait partie de la famille des *Paramyxoviridae*. Cette famille est divisée en trois genres : les *Paramyxovirus*, les *Morbillivirus* et les *Pneumovirus* dont fait partie le RSV (tableau 1.1.) (Kingsbury, 1990). Le genre *Pneumovirus* contient également le virus de la pneumonie de la souris et le virus de la rhinotrachéite du dindon (Collins, 1991).

Les *Pneumovirus* diffèrent des *Paramyxovirus* par l'absence d'activité neuraminidase et des *Morbillivirus* par certaines dimensions des projections de surface et de la nucléocapside du virion (tableau 1.2.). Le RSV est aussi déficient en hémagglutinine que l'on retrouve chez les autres membres de la famille (Stott et Taylor, 1985; Huang et Wertz, 1982). Le RSV (BRSV et HRSV) présente encore d'autres particularités par rapport aux *Paramyxovirus* et *Morbillivirus* : la nucléocapside est plus étroite, la protéine M2 n'existe pas chez les deux autres genres et le virion du RSV est extrêmement labile (Collins, 1991).

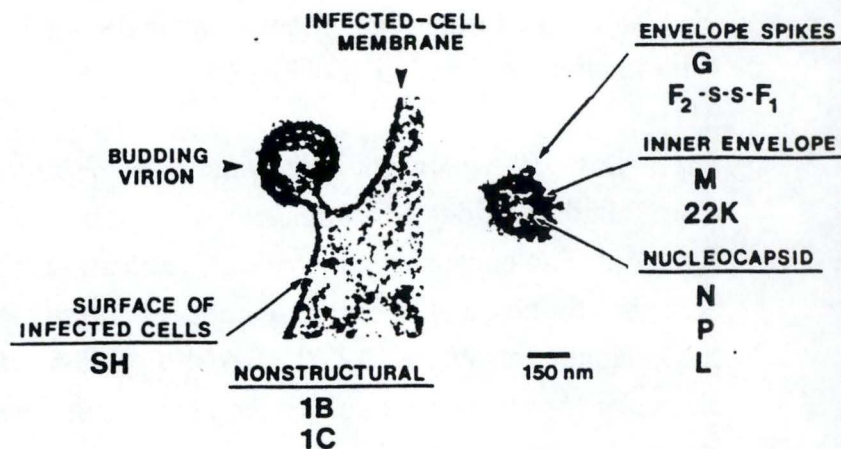
Sur base de la fixation différentielle d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines de structure (celles-ci seront développées dans la partie 8 consacrées aux protéines), le HRSV a été divisé en deux sous-groupes antigéniques A et B (Mallipeddi et Samal, 1993a; Nagai *et al.*, 1993).

Très récemment, le groupe de Taylor a, de la même manière et avec l'utilisation de la radioimmunoprécipitation, identifié deux sous-groupes chez le BRSV. Ces sous-groupes peuvent aussi être différenciés par les valeurs de masse moléculaire de la sous-unité F2 de la protéine F (cette protéine sera développée ultérieurement dans le cadre de l'étude des protéines) (Furze *et al.*, 1994).

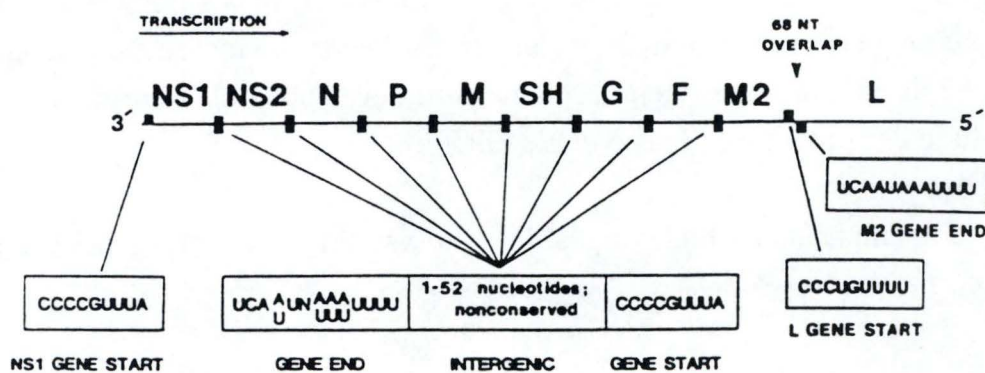
Les implications biologiques de cette variabilité seront également développées ultérieurement.



**Figure 1.1.** : Représentation schématique d'une nucléocapside à symétrie hélicoïdale (Rawn, 1990).



**Figure 1.2.** : Structure du HRSV : micrographie électronique d'un virion bourgeonnant. Cette figure montre aussi la localisation des différentes protéines (Collins, 1991).



**Figure 1.3.** : Carte génétique de la souche A2 du groupe A du HRSV (McIntosh et Chanock, 1990).



Ordre de succession des gènes, 3'-5'	Taille des mRNAs, queue de mRNAs exclue <sup>a</sup>	Nombre d'acides aminés <sup>a</sup>	Poids moléculaire <sup>a,b</sup> kDalton	Emplacement	Fonction	Propriétés additionnelles de la protéine
NS1	528	139	15.6	Pas dans virion	Inconnue	Légèrement acide
NS2	499	124	14.7	Pas dans virion	Inconnue	Basique
N	1197/1196	391/391	43.5/42.6	Nucléocapside	Protéine structurelle de nucléocapside	Abondante et fortement complexée au RNA génomique
P	907	241	27.1	Nucléocapside	Composante de la polymérase?	Phosphorylée, relativement acide, pas de cystéine ni de tryptophane
M	952/938	256/256	28.7/28.7	Partie interne de l'enveloppe virale	Recouvrement de l'enveloppe virale	Relativement basique et hydrophobe. Le gène présente une deuxième ORF qui chevauche partiellement l'extrémité COOH terminale de la région codante du gène M, cette ORF code pour 75 acides aminés
SH	405/566	64/73	7.5/8.4	Surface des cellules infectées	Inconnue	Structure fortement hydrophobe de 28 acides aminés. Insertion dans les cellules infectées via l'extrémité C-terminale
G	918/838	298/257	32.6/28 84-90	Surface de l'enveloppe virale	Attachement au récepteur de la cellule-cible	Haute teneur en sucres, dont 90% sont liés à des résidus Sérine ou Thréonine. La protéine à un taux inhabituellement haut de ces deux acides aminés (31%) et ne comporte pas de séquence-signal NH <sub>2</sub> terminale. Elle semble ancrée dans la membrane via une région hydrophobe.
F	1899/1892	574/572	63.5 68-70	Surface de l'enveloppe virale	Fusion de l'enveloppe virale avec la cellule-cible, formation de syncytia	Domaine d'ancrage COOH-terminal et peptide-signal du côté NH <sub>2</sub> . Clivée en deux sous-unités F <sub>1</sub> et F <sub>2</sub> reliées par pont disulfure. F <sub>2</sub> relativement hydrophile et contenant quatre à cinq sites pour l'addition de sucres N-liés. F <sub>1</sub> présente un domaine de fusion hydrophobe NH <sub>2</sub> -terminal.
M2 (22K)	957/958	194/186	22.2	Enveloppe virale	Inconnue	Hydrophile et très basique. Gène présentant une deuxième ORF capable de coder 90 acides aminés.
L	6578	2165	250	Nucléocapside	Polymérase?	Faible abondance dans les virions et les cellules infectées.

Tableau 1.3. : Caractéristiques des gènes viraux du RSV (BRSV et HRSV) (McIntosh et Chanock, 1990).

<sup>a</sup> Chiffres concernant le HRSV/BRSV

<sup>b</sup> Chiffres montrant la masse moléculaire avant (au-dessus) et après (en dessous) glycosylation.

### 7. Structure

Le RSV (BRSV et HSRV) est hautement pléomorphe (Sharma et Woldehiwet, 1991). Il est, en effet, hétérogène en taille et en forme. Les virions peuvent être des particules sphériques de 80-350 nm de diamètre ou des particules filamenteuses qui font approximativement 60-100 nm de diamètre et jusqu'à 10  $\mu$ m de longueur (Collins, 1991).

Les virions sont constitués de deux modules : un core interne de ribonucléoprotéines ou nucléocapside à symétrie hélicoïdale (figure 1.1.) contenant le génome et une enveloppe externe composée de lipides et de protéines (Kingsbury, 1990).

L'enveloppe est couverte de projections de 7-19 nm ayant la forme de "club de golf" (Sharma et Woldehiwet, 1991). Ces projections, ou "spikes", médient l'attachement et la pénétration du virus (figure 1.2.) (Kingsbury, 1990).

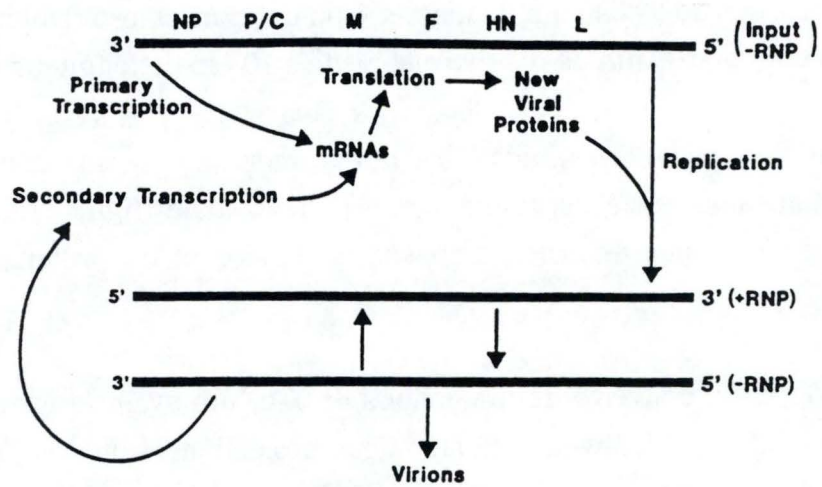
### 8. Génome

La nucléocapside du RSV (BRSV et HRSV) contient un acide ribonucléique (ARN) négatif simple brin (Collins, 1991) dont la masse moléculaire est de  $5.9 \times 10^6$  daltons (Sharma et Woldehiwet, 1991; Huang et Wertz, 1982; Collins *et al.*, 1984).

Pendant l'infection, 10 ARN messenger (ARNm) poly(A) d'une taille allant de 405 à 6500 nucléotides sont transcrits à partir d'un promoteur unique du côté 3'-terminal (McIntosh et Chanock, 1990; Dickens *et al.*, 1984). Le génome contient donc 10 gènes différents (tableau 1.3.) (McIntosh et Chanock, 1990; Collins *et al.*, 1984) pour environ 15000 nucléotides (Kimman et Westenbrink, 1990).

L'ordre de succession des gènes est 3' NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L 5' (figure 1.3.) (McIntosh et Chanock, 1990).





**Figure 1.4. :** Etapes principales de la répliation du paramyxovirus. Les lignes horizontales symbolisent les brins viraux positifs (+) ou négatifs (-) de la matrice (RNP=ribonucléoprotéine) (Kingsbury, 1990).

# 9. Réplication

Les protéines nécessaires au processus de réplication seront détaillées ultérieurement. Le site et le mode de maturation du BRSV sont les mêmes que pour le HRSV (Sharma et Woldehiwet, 1991).

## 9.1. Attachement et pénétration

La protéine G médie l'attachement du virion à la cellule hôte (Levine *et al.*, 1987). Les récepteurs ne sont pas encore définis mais semblent être abondants (Stott et Taylor, 1985; Walsh *et al.*, 1984). A 37°C approximativement 60 % du HRSV est absorbé par la cellule hôte dans les 30 premières minutes mais l'absorption complète requiert jusqu'à 10-12 heures (Stott et Taylor, 1985; Sharma et Woldehiwet, 1991).

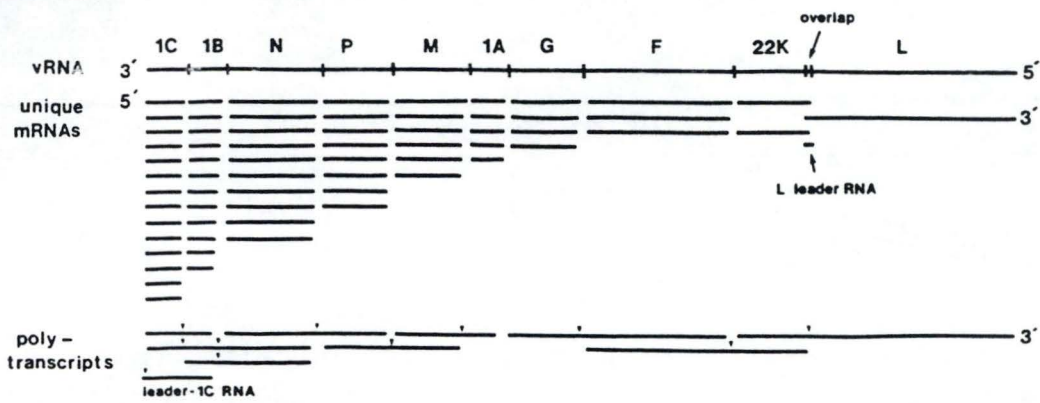
Le processus de pénétration du HRSV, médié par la protéine F, est terminé 45 minutes après l'absorption (Stott et Taylor, 1985; Sharma et Woldehiwet, 1991). Il se fait par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte (Collins, 1991). La nucléocapside virale est alors libérée dans le cytoplasme, laissant les antigènes de l'enveloppe dans la membrane plasmique (Routledge *et al.*, 1987).

## 9.2. Transcription

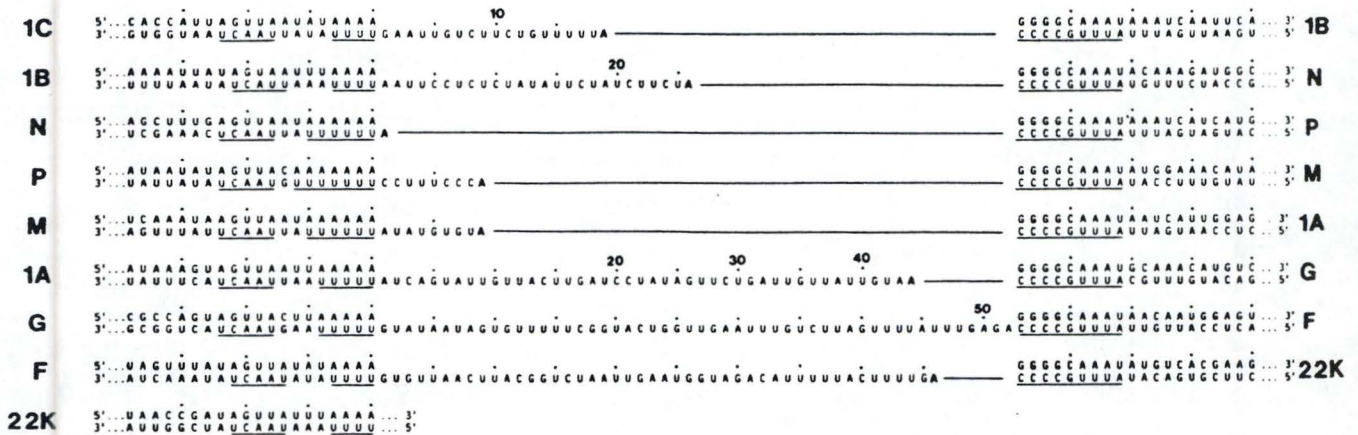
### 9.2.1. Transcription séquentielle

La transcription s'effectue grâce à une polymérase virale transportée par le virion. Elle constitue la première étape dans l'expression génomique du HRSV qui suit la libération de la nucléocapside. La transcription est initiée à partir d'un promoteur unique du côté 3' avec initiation et terminaison de la synthèse d'ARN aux frontières de chaque gène (figure 1.4.). Ainsi, la polymérase après avoir reconnu le promoteur, se déplace le long du génome sans rien synthétiser. Dès qu'elle rencontre une séquence "gene start", elle synthétise un ARNm jusqu'à une séquence "gene end" qui bloque la polymérase et dirige la synthèse d'une queue de poly(A). A cet endroit, la polymérase peut soit se décrocher, soit continuer à se déplacer le long du génome jusqu'à la prochaine séquence "gene start". Occasionnellement, elle peut transcrire dans la région





**Figure 1.5.** : Atténuation de la transcription avec représentation schématisée de l'abondance décroissante des ARN leader et messagers en fonction de la distance entre le gène et l'extrémité 3' du génome. La figure montre aussi des polytranscrits (Collins, 1991).



**Figure 1.6.** : Comparaison des séquences intergéniques et des gènes adjacents du HRSV. Les séquences "gene start" et "gene end" conservées sont soulignées (Collins *et al.*, 1986).



**Figure 1.7.** : Alignement des séquences nucléotidiques, dans l'orientation 3' 5', de 7 régions intergéniques des souches A2 du HRSV sous-groupe A, 18537 du HRSV sous-groupe B et A51908 du BRSV (Zamora et Samal, 1992a).



## Introduction

intergénique et générer des polytranscrits (figure 1.5.) (Kingsbury, 1990; Collins, 1991).

Ces sites d'initiation et de terminaison sont représentés par des séquences consensus qui semblent analogues aux signaux d'initiation et de terminaison de transcription des gènes encodés par de l'acide désoxyribonucléique (ADN) cellulaire ou viral comme les "TATA box" (Kingsbury, 1990). La séquence "gene start" de chaque gène du HRSV contient 9 nucléotides conservés : 3' CCCC GUUUA 5'. L'examen des séquences "gene end" révèle des variations entre les gènes NS2, F, M2 d'un côté et les gènes NS1, N, P, M, SH, G de l'autre (L n'étant pas encore séquencé). Le motif observé est 3' UCAU/AUAU/AAUUUU 5' pour les premiers et 3' UCAAUU/GU/AU/AU/AUUUU 5' pour les seconds. La séquence "gene end" se termine par un groupe d'oligo(U) allant de 4 à 7 résidus. La queue de poly(A) des ARNm serait synthétisée par le copiage répété de ces résidus (figure 1.6.) (Collins *et al.*, 1986).

Les régions intergéniques du HRSV varient en longueur, allant de 1 (région intergénique N-P) à 52 nucléotides (région intergénique G-F). Les séquences ne sont pas conservées sauf un résidu adénosine à la fin de chaque séquence (du côté 5'). Elles sont riches en uridine (Collins *et al.*, 1986).

Les séquences nucléotidiques de 7 jonctions génomiques (N-P, P-M, M-SH, SH-G, G-F, F-M2, M2-L) de la souche A51908 du BRSV ont été comparées avec les séquences consensus du HRSV (figure 1.7.). Les séquences "gene start" et "gene end" ont été trouvées dans tous les ARNm du BRSV. Il y a appariement parfait entre le BRSV et le HRSV dans toutes les séquences "gene start" sauf deux séquences : la séquence du gène SH qui contient un nucléotide différent chez le BRSV comparé avec la souche A2 du HRSV ainsi que la séquence "gene start" du gène L qui possède un nucléotide en moins chez le BRSV. Les séquences "gene end" semblent moins conservées. L'analyse des régions intergéniques montre un haut degré de divergence dans la séquence nucléotidique entre le BRSV et le HRSV. Cependant, la longueur en nucléotides est similaire pour une jonction génomique donnée (Zamora et Samal, 1992a).

Ceci supporte l'hypothèse que les mécanismes de transcription des deux virus sont identiques et que les résultats obtenus en étudiant le HRSV pourraient être extrapolés au BRSV.



### 9.2.2. Atténuation de la transcription

Chez les *Paramyxoviridae*, il existe une régulation transcriptionnelle déterminée par l'organisation génomique. L'efficacité de la transcription d'un gène diminue comme sa distance de l'extrémité 3' du génome augmente. Ce phénomène étant probablement dû au relargage de la polymérase au niveau des séquences intergéniques (figure 1.5.) (Kingsbury, 1990). La variation dans les régions intergéniques virales permettrait de moduler le degré d'atténuation (Collins *et al.*, 1986). Cet effet de polarité sur la synthèse d'ARNm est probablement le facteur majeur qui détermine la quantité de chaque ARNm et de chaque protéine (Collins, 1991).

Un autre mécanisme d'atténuation de l'expression d'un gène au niveau transcriptionnel a été découvert au niveau du gène L du HRSV (Collins *et al.*, 1987). Sa séquence "start" est située dans le gène M2 qui le précède; ces deux gènes se chevauchent sur 68 nucléotides (figure 1.5.). La plupart des transcrits qui sont initiés au site start du gène L se terminent au site end du gène M2. Ainsi, une minorité des transcrits produits contiennent le gène L complet. Le mécanisme de l'initiation de la transcription du gène L est encore inconnu (Kingsbury, 1990; Collins, 1991). Une possibilité serait que la polymérase, d'une façon ou d'une autre, puisse quitter le gène M2 et accéder au gène L sans se dissocier du brin matrice. Alternativement, la présence d'un autre promoteur pour le gène L a été suggérée (Collins, 1991).

Ce chevauchement est aussi observé chez le BRSV. Dans les deux cas, les positions relatives des séquences "gene start" et "gene end" sont identiques. Ceci suggère que le BRSV utilise un mécanisme similaire à celui du HRSV pour l'atténuation de la transcription du gène L (Collins *et al.*, 1987).

### **9.3. Réplication de l'ARN**

La transcription initiale de l'information génétique contenue dans la nucléocapside fournit des protéines utilisées pour les étapes suivantes de la reproduction du virus. L'étape ultérieure est la réplication du génome qui produit des matrices supplémentaires pour la transcription et pour d'autres réplifications. Ceci amplifie la quantité de macromolécules spécifiques du virus dans la cellule et fournit de grandes quantités de génome pour l'incorporation dans de nouvelles particules virales.



Lors de la réplication du génome, toute la séquence en bases du brin d'ARN négatif doit être conservée comme une seule entité. Dès lors, les séquences qui ne sont pas transcrites en ARNm doivent être incorporées dans un brin d'ARN positif (antigénome) qui sert d'intermédiaire pour la synthèse des génomes à brin négatif (figure 1.4.). Ceci nécessite que la machinerie de synthèse de l'ARN entre dans un mode antiterminaison, ignorant tous les signaux des régions qui flanquent les gènes. Rien n'est connu pour expliquer ce changement (Kingsbury, 1990).

### **9.4. Assemblage et sortie du virion**

L'assemblage de la nucléocapside a aussi lieu dans le cytoplasme. Elle se fait en deux étapes : association des unités de structure de la nucléocapside avec l'ARN génomique pour former une hélice de ribonucléoprotéine puis addition des protéines auxiliaires de la nucléocapside (Kingsbury, 1990).

L'assemblage du second module qui compose le virion, l'enveloppe, se fait à la surface cellulaire. Là, les glycoprotéines virales, modifiées par glycosylation pendant leur transport à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, remplacent la plupart des protéines transmembranaires endogènes dans la bicouche lipidique membranaire. Les protéines M et M2 viennent s'agréger sur la face interne de l'enveloppe naissante. Finalement, les nucléocapsides arrivent à la surface et participent à la formation de virions en bourgeonnant à partir de la membrane cellulaire (Kingsbury, 1990). Le bourgeonnement a lieu en des sites spécifiques où plusieurs virions bourgeonnent successivement (Bachi, 1988).

Comme le virion bourgeonne, la surface membranaire de la cellule se recouvre de projections virales. Si l'environnement contient des protéases du type de la trypsine, le précurseur F0 de la protéine F se trouvant à la surface cellulaire peut être clivé pour donner la protéine F active. Celle-ci peut alors permettre la fusion avec les autres cellules contiguës. Ce type de fusion cellulaire médiée par virus, appelée fusion de l'intérieur (Gallaher et Bratt, 1974), peut impliquer un grand nombre de cellules formant ainsi des syncytia (Kingsbury, 1990).

	BRSV/HRSV A		BRSV/HRSV B	
	Nucléotides	AA	Nucléotides	AA
<b>N</b> <sup>(1, 3, 5)</sup>	80.7	93.3	80.7	93.3
<b>M</b> <sup>(1, 3)</sup>	80	89		
<b>M2</b> <sup>(1, 3, 5)</sup>	69	80	69	80
<b>G</b> <sup>(2, 3, 5)</sup>	51.7	29	50.8	30
<b>F</b> <sup>(2, 4, 5)</sup>	75	80	74	81
<b>SH</b> <sup>(1, 3, 5)</sup>	53	38	60	36

**Tableau 1.4.** : Identités entre les diverses séquences disponibles pour le RSV (HRSV et BRSV).

(1): souche A51908 du BRSV; (2): souche 391-2 du BRSV; (3): souche A2 du HRSV sous-groupe A; (4): souches A2, RSS2 et Long du HRSV sous-groupe A; (5): souche 18537 du HRSV sous-groupe B (références voir texte).



# 10. Protéines

La composition en protéines du BRSV et du HRSV est très similaire. Elle comporte néanmoins des différences mineures dans la masse moléculaire entre les protéines correspondantes (Furze *et al.*, 1994).

## 10.1. Les protéines de la nucléocapside

### 10.1.1. La protéine de structure

La protéine N ou Nucléoprotéine (McIntosh et Chanock, 1990) est l'unité de structure de la nucléocapside (Kingsbury, 1990). Le gène codant du BRSV présente une taille de 1196 nucléotides (1197 pour le HRSV (McIntosh et Chanock, 1990)) et contient une seule phase ouverte de lecture allant du nucléotide 16 au nucléotide 1188. La protéine (BRSV et HRSV confondus) contient 391 acides aminés correspondant à une masse moléculaire d'environ 43050 daltons (Samal *et al.*, 1991; McIntosh et Chanock, 1990). Cette protéine est fortement complexée à l'ARN génomique (McIntosh et Chanock, 1990).

La protéine N joue un rôle dans l'immunité protectrice par sa participation dans la réponse cellulaire cytotoxique. Elle sert en effet de cible pour les lymphocytes T cytotoxiques (King *et al.*, 1987).

La comparaison de la séquence nucléotidique du gène N entre le BRSV (souche A51908) et le HRSV (souche A2 pour le sous-groupe A et souche 18537 pour le sous-groupe B) montre une identité de 80.7 %. Il y a 93.3 % de d'identité au niveau acides aminés (tableau 1.4.). Ces deux résultats montrent que le gène N est hautement conservé dans les souches humaines et bovines du RSV. On observe une cross-réactivité antigénique pour cette protéine entre le HRSV et le BRSV (Samal *et al.*, 1991).

### 10.1.2. Les protéines auxiliaires

Les protéines auxiliaires de la nucléocapside sont les protéines P et L. Elles possèdent l'activité ARN polymérase ARN dépendante responsable de la synthèse des ARNm et de la réplication. Elles ont également les activités enzymatiques requises pour



## Introduction

l'addition d'une queue de poly(A) du côté 3' de chaque messenger viral et pour les modifications post-transcriptionnelles du côté 5' (Kingsbury, 1990).

La protéine P ou Phosphoprotéine du RSV (BRSV et HRSV) est appelée ainsi car c'est la seule protéine à être fortement phosphorylée (McIntosh et Chanock, 1990). Il a été montré par l'étude de la souche Long du HRSV sous-groupe A que la protéine P est phosphorylée sur des résidus sérine principalement localisés près de l'extrémité COOH-terminale et dans la région centrale (Villanueva *et al.*, 1994). Elle a une masse moléculaire de 27.1 kilodaltons avant phosphorylation et provient d'un ARN pré-messenger de 907 nucléotides codant pour une protéine de 241 acides aminés. Elle ne contient ni cystéine, ni tryptophane et est acide (McIntosh et Chanock, 1990). Son rôle exact est encore inconnu. Sa taille permet de penser qu'elle peut avoir une ou plusieurs des activités enzymatiques citées précédemment. Il est aussi possible qu'elle ait une fonction mécanique comme faciliter l'allongement local de la nucléocapside (Kingsbury, 1990). On observe aussi une cross-réactivité antigénique pour cette protéine entre le BRSV et le HRSV (Walravens *et al.*, 1990).

La protéine L ou "Large protein" du RSV (BRSV et HRSV) est présente en plus faible quantité par rapport à la protéine P. Elle est composée de 2165 acides aminés provenant d'un ARNm de 6578 nucléotides et a une masse moléculaire de 250 kilodaltons. Elle est relativement hydrophobe (McIntosh et Chanock, 1990). La taille de la protéine est compatible avec plusieurs des activités enzymatiques citées précédemment (Kingsbury, 1990).

L'extrémité 5' du gène L du HRSV chevauche l'extrémité 3' du gène M2 (détaillé plus bas) sur 68 nucléotides. Ceci pourrait être un mécanisme de régulation de la transcription du gène L. Au niveau nucléotidique, l'identité pour la région du chevauchement entre le BRSV et le HRSV est de 84 % (Zamora et Samal, 1992b).

Il y a 10 fois plus de protéines P que de protéines L associées à chaque nucléocapside. Les protéines P sont rassemblées en groupes dont beaucoup contiennent des molécules L. Peut-être que des interactions parmi les molécules P sont requises pour que ces complexes allongent localement le brin matrice, exposant ainsi les bases aux activités catalytiques du complexe protéique L-P (Kingsbury, 1990).



### **10.2. Les protéines de matrice**

#### 10.2.1. La protéine de matrice

La protéine M du RSV (BRSV et HRSV) est analogue aux protéines de la matrice des autres virus à ARN enveloppés. Elle a une masse moléculaire de 28.7 kilodaltons et son ARN pré-messager contient 952 nucléotides (938 pour le BRSV) codant pour une protéine de 256 acides aminés. Elle est relativement basique et modérément hydrophobe. Elle recouvre la surface intérieure du virion (McIntosh et Chanock, 1990).

On observe une identité de 80 % au niveau nucléotidique et de 89 % au niveau acides aminés entre le BRSV (souche A51908) et le HRSV (souche A2 du sous-groupe A) (tableau 1.4.) (Samal et Zamora, 1991). On montre aussi pour cette protéine une cross-réactivité antigénique entre les deux virus (Lerch *et al.*, 1990).

#### 10.2.2. La protéine M2

La protéine M2 du HRSV, aussi appelée 22K (Sharma et Woldehiwet, 1991), contient 194 acides aminés (186 pour le BRSV) codé par un gène de 957 nucléotides (958 pour le BRSV). Sa masse moléculaire est de 22.2 kilodaltons. On la trouve au niveau de l'enveloppe virale mais sa fonction reste inconnue à ce jour (McIntosh et Chanock, 1990).

Elle est hydrophile et très basique. Le gène présente une deuxième phase de lecture capable de coder pour 90 acides aminés. Des études en immunofluorescence ont montré que M2 est exprimée à la surface de la cellule infectée tard dans le cycle infectieux (McIntosh et Chanock, 1990).

L'alignement des séquences nucléotidiques et des séquences en acides aminés déduits entre le BRSV (souche A51908) et le HRSV (souche A2 pour le sous-groupe A et souche 18537 pour le sous-groupe B) montre 69 % d'identité au niveau nucléotidiques et 80 % d'identité au niveau acides aminés (tableau 1.4.) (Zamora et Samal, 1992b).



### 10.3. Les protéines non-structurelles

La protéine NS1 du RSV (BRSV et HRSV), aussi connue sous le nom de 1C pour le HSRV (Sharma et Woldehiwet, 1991), est composée de 139 acides aminés pour 528 nucléotides. Sa masse moléculaire est de 15.6 kilodaltons. Elle est légèrement acide (McIntosh et Chanock, 1990).

La comparaison entre les gènes 1C du ORSV et du HRSV sous-groupes A et B a montré une identité de 70 % et 65 % respectivement tandis qu'au niveau acides aminés on observe 68 % et 69 % respectivement (Alansari et Potgieter, 1994).

La protéine NS2 du RSV (BRSV et HRSV), aussi nommée 1B chez le HSRV (Sharma et Woldehiwet, 1991), est codée par un ARNm de 499 nucléotides dont la phase ouverte de lecture code pour 124 acides aminés. Elle a une masse moléculaire de 14.7 kilodaltons et est basique (McIntosh et Chanock, 1990).

L'analyse du gène 1B du ORSV a montré une identité de 70 % et 72 % respectivement avec les gènes du HRSV sous-groupe A et B. Au niveau acides aminés, on observe 79 % d'identité entre le ORSV et le HRSV quel que soit le sous-groupe (Alansari et Potgieter, 1994).

Les valeurs d'identité entre les gènes NS1 et NS2 du BRSV et ORSV n'ont pas encore été déterminées car ces 2 gènes n'ont pas encore été séquencés chez le BRSV (Alansari et Potgieter, 1994).

Ces deux protéines se retrouvent dans les cellules infectées mais pas dans les virions. Leurs fonctions sont encore inconnues (McIntosh et Chanock, 1990).

### 10.4. Les glycoprotéines d'enveloppe

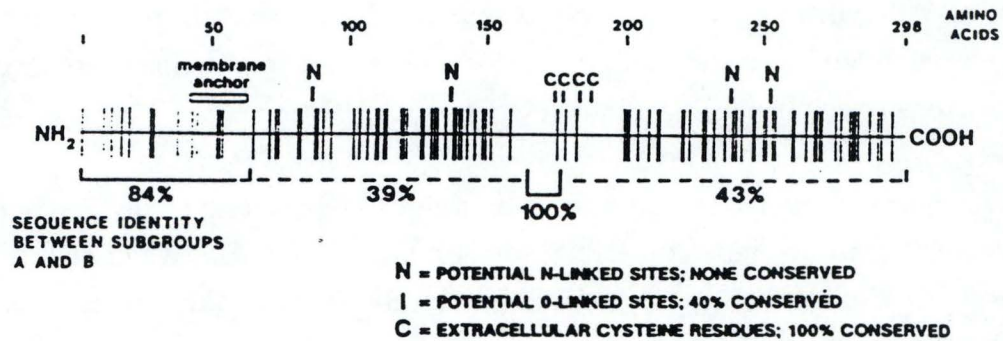
#### 10.4.1. La protéine d'attachement

La protéine G (G pour Glycoprotéine) du HRSV contient 298 acides aminés pour le sous-groupe A et 292 pour le sous-groupe B (257 pour le BRSV (Lerch *et al.*, 1990)) pour un gène de 918 nucléotides (838 pour le BRSV (Lerch *et al.*, 1990)) et est exprimée

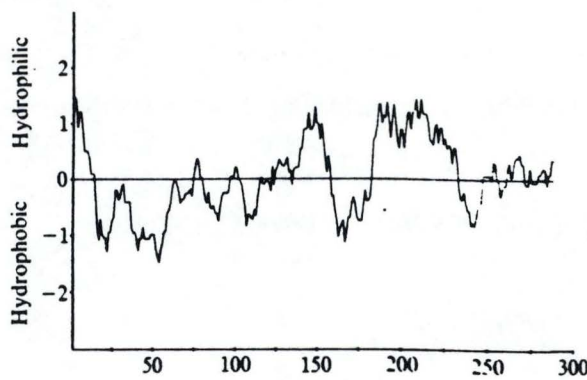


	CYTO-PLASMIC	TRANS-MEMBRANE	EXTRACELLULAR	COOH	TOTAL
<b>BOVINE vs HUMAN A2</b>	43%	59%	21%		29%
<b>BOVINE vs HUMAN 18537</b>	43%	59%	22%		30%
<b>HUMAN A2 vs HUMAN 18537</b>	81%	86%	44%		53%

**Figure 1.8.** : Identités au niveau acides aminés entre les protéines G du BRSV et du HRSV (souches A2 pour le sous-groupe A et 18537 pour le sous-groupe B) (Lerch *et al.*, 1990).



**Figure 1.9.** : Structure linéaire de la protéine G de la souche A2 du groupe A du HRSV et comparaison avec la protéine correspondante de la souche 18537 du groupe B (McIntosh et Chanock, 1990).



**Figure 1.10.** : Graphique des régions hydrophobes et hydrophiles dans la protéine G du HRSV (Wertz *et al.*, 1985).

## Introduction

à la surface de l'enveloppe virale (McIntosh et Chanock, 1990; Rueda *et al.*, 1991). Il existe une souche particulière du BRSV, A51908, dont la protéine G est plus longue de 6 acides aminés du côté 3' par rapport aux autres souches (Mallipedi et Samal, 1993a).

La protéine G contient 3 domaines : le domaine interne ou cytoplasmique allant de l'acide aminé 1 à l'acide aminé 37, le transmembranaire allant de l'acide aminé 38 à 66 et l'externe commençant à l'acide aminé 67 jusqu'à l'extrémité COOH-terminale, ce dernier domaine représentant ainsi les 3/4 du polypeptide (figure 1.8.). Elle est orientée avec le côté NH<sub>2</sub>-terminal vers la face interne de la membrane et l'extrémité COOH-terminale du côté externe (Lerch *et al.*, 1990). Il lui manque la séquence signal hydrophobe NH<sub>2</sub>-terminale pour insérer le polypeptide natif dans la membrane ainsi que la région d'ancrage hydrophobe transmembranaire. Ces deux régions sont remplacées par une séquence hydrophobe (correspondant au domaine transmembranaire) s'étendant des acides aminés 38 à 66 près de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale qui joue les rôles de zone d'ancrage et de séquence signal (figure 1.9.; figure 1.10.) (McIntosh et Chanock, 1990; Stott *et al.*, 1986; Wertz *et al.*, 1989; Wertz *et al.*, 1985; Olmsted *et al.*, 1989). Cette orientation en membrane, dite de type II, est la seule caractéristique structurelle commune avec les protéines d'attachement des autres *Paramyxoviridae* (Collins et Mottet, 1992; Hendricks *et al.*, 1988). La protéine ne contient pas non plus la région hydrophobe de la partie COOH-terminale (figure 1.10.) (Wertz *et al.*, 1985).

La protéine G a un contenu appréciable en carbohydrates comme le montre la différence de masse moléculaire entre les deux formes de la protéine : 32.6 kilodaltons (28.6 pour le BRSV (Lerch *et al.*, 1990)) pour la forme immature du HRSV et 84-90 kilodaltons pour la forme mature, BRSV et HRSV confondus (McIntosh et Chanock, 1990) avec une exception pour les souches A51908 et Md-X du BRSV où on a une masse moléculaire de 90-100 kilodaltons pour la forme mature (Mallipedi et Samal, 1993c). Il y a d'abord synthèse dans le réticulum endoplasmique rugueux de la forme de 32.6 kilodaltons avec attachement cotranslationnel de sucres "high-mannose" N-liés pour former un intermédiaire avec une masse moléculaire de 45 kilodaltons. On a ensuite conversion dans l'appareil de Golgi des sucres N-liés en une forme complexe et addition des oligosaccharides O-liés pour donner la forme mature (Wertz *et al.*, 1989; Gruber et Levine, 1985).



## Introduction

Nonante pour-cent des carbohydrates sont O-liés, attachés à la chaîne polypeptidique aux résidus sérine et thréonine. La protéine G a d'ailleurs un contenu inhabituel en résidus sérine et thréonine (31 %), 85 % de ceux-ci, soit 71 résidus, se trouvant dans le domaine extracellulaire (Lerch *et al.*, 1990; Sullender *et al.*, 1991; Wertz *et al.*, 1989; Collins, 1990; Martin-Gallardo *et al.*, 1993). Le reste des carbohydrates est N-lié, attaché aux résidus asparagine du site accepteur asparagine-x-sérine/thréonine (x étant habituellement une proline ou un acide aspartique (Olmsted *et al.*, 1989)), les 4 sites se trouvant dans le domaine extracellulaire (figure 1.9.) (McIntosh et Chanock, 1990; Wertz *et al.*, 1989; Ball *et al.*, 1986; Collins, 1990; Martin-Gallardo *et al.*, 1993). Ainsi, la glycosylation N-liée représente 3 % de la masse moléculaire de G, alors que la participation de la glycosylation O-liée est de 55 % (Lerch *et al.*, 1990; Lambert, 1988). Des expériences d'infection avec le RSV après traitement avec des enzymes comme l'endoglycosidase F ou l'endo- $\alpha$ -N-acétylgalactosaminidase qui enlèvent les oligosaccharides N-liés ou O-liés ont été réalisées. Elles ont montré que, même si des petites variations de la masse moléculaire ont été observées, l'infektivité du virus est grandement réduite. Donc, ces oligosaccharides jouent un rôle important dans l'attachement de G et donc dans le processus infectieux (Lambert, 1988). De plus, les carbohydrates O-liés sont nécessaires pour la liaison de la plupart des anticorps anti-G (Palomo *et al.*, 1991).

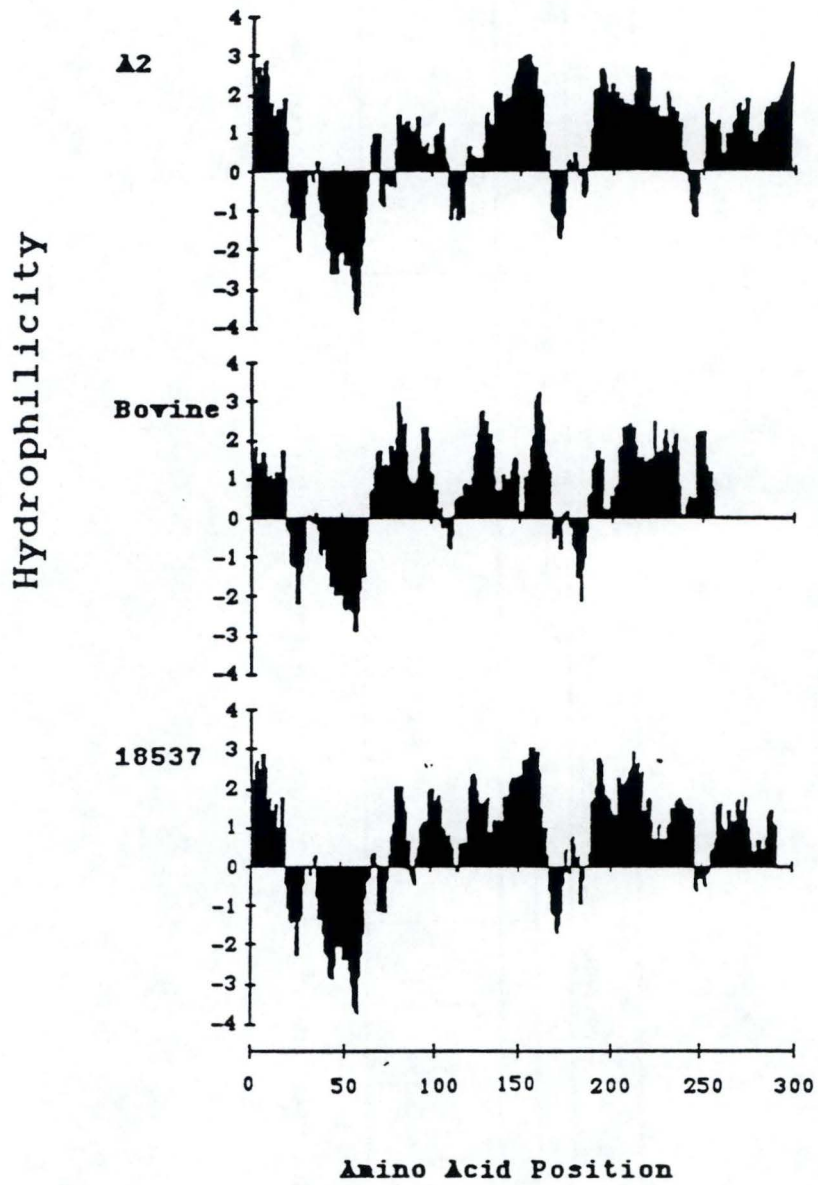
La protéine a aussi un important contenu en proline. Ces résidus représentent en effet 10 % des acides aminés (Lerch *et al.*, 1990; Wertz *et al.*, 1989). Ces prolines constitueraient un déterminant majeur dans la structure tridimensionnelle de cette protéine (Wertz *et al.*, 1985).

La glycoprotéine G du HRSV possède 4 cystéines localisées aux mêmes positions dans chaque souche : deux dans la séquence conservée aux positions 173 et 176 et les deux autres en 182 et 186 (figure 1.9.). Donc, 4 cystéines sont conservées comme un groupe à l'intérieur d'une région de 14 acides aminés (résidus 173-186) (McIntosh et Chanock, 1990). Cette séquence est certainement importante pour la structure et la fonction de la protéine (Collins, 1991). De plus, cette région est flanquée de résidus proline conservés, est déficiente en sites accepteurs de carbohydrates O-liés et est distante des sites accepteurs de carbohydrates N-liés (McIntosh et Chanock, 1990). Cette localisation de 4 résidus cystéine dans le domaine extracellulaire est commune aux virus bovin et humain (Sullender *et al.*, 1991).

Souches du HRSV		Pourcentages d'identité des séquences nucléotidiques (et au niveau des séquences en acides aminés) entre la souche A2 du sous-groupe A (isolée en 1961) du HRSV et les différentes souches présentées											
Sous-groupe	Nom (et date d'isolement)	Région codante des gènes indiqués								Chevauchement M2-L	Régions "gene start" et "gene end"	Régions non codantes	Région(s) intergénique(s)
		NS1	NS2	N	P	SH	G	F	M2				
B	18537 (1962)	78 (87)	78 (92)	86 (96)		72 (76)	67 (53)	79 (89)	78 (92)	93	90	32-50	42
A	Long (1956)			100	97 (98)		96 (93)	98 (98)					
	RSS2 (1976)							97 (97)	97 (98)				
	Edinburgh (1977)				98 (99)					84			

**Tableau 1.5.** : Identités aux niveaux nucléotidique et acides aminés de séquences, entre ou au sein des sous-groupes du HRSV (McIntosh et Chanock, 1990).





**Figure 1.11.** : Diagrammes d'hydrophilicité pour la protéine G du BRSV (souche 391-2) et du HRSV (souches A2 pour le sous-groupe A et 18537 pour le sous-groupe B) (Lerch *et al.*, 1990).

## Introduction

La division de la famille des *Paramyxoviridae* en trois genres est due aux propriétés de la protéine G. En effet, celle-ci est dépourvue d'activité hémagglutinante présente chez les *Paramyxovirus* et *Morbillivirus* et neuraminidase des *Paramyxovirus* (Morrison, 1988).

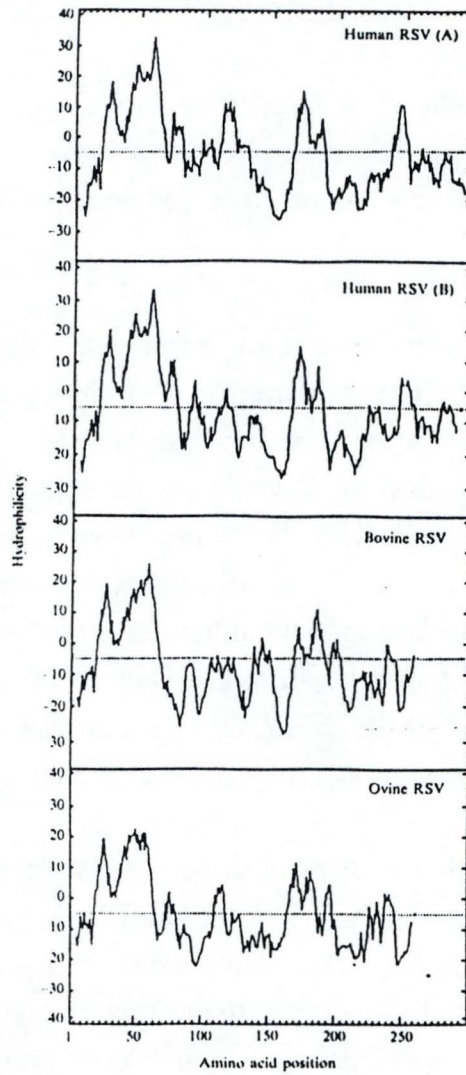
Chez le HRSV, les signaux requis pour le transport et la présentation en surface de la cellule de la protéine se trouvent dans les 71 premiers acides aminés de G, une région contenant seulement quelques acides aminés de l'ectodomaine. Des comparaisons entre l'ectodomaine de 2 virus du sous-groupe antigénique A (94 % d'identité) et un du sous-groupe B (53 % d'identité avec les souches du sous-groupe A) ont permis l'identification d'une région qui pourrait être impliquée dans la liaison aux récepteurs de la cellule hôte. Celle-ci serait longue de 13 acides aminés, s'étendant de la position 164 à 176 (figure 1.9.) (McIntosh et Chanock, 1990; Lerch *et al.*, 1990). Cette région n'est pas conservée chez le BRSV et cela pourrait être en rapport avec la spécificité pour l'hôte (Lerch *et al.*, 1990; Mallipeddi et Samal, 1993a).

Puisque G est la protéine d'attachement du virus, il est possible que les différences entre les protéines G du BRSV et du HRSV soient responsables de la différence dans l'attachement et la gamme d'hôtes observés entre les deux virus. Ainsi, le BRSV a une gamme d'hôtes étroite et infecte seulement les bovins alors que le HRSV peut infecter beaucoup de types cellulaires et d'animaux expérimentaux (Lerch *et al.*, 1990).

Les antisera pour la protéine G du BRSV ne reconnaissent pas la protéine G du HRSV et vice-versa ce qui explique le manque de cross-réactivité antigénique de cette protéine entre le BRSV et le HRSV (Lerch *et al.*, 1990).

La protéine G du BRSV (souche 391-2) partage 29 % d'identité avec celle du sous-groupe A (souche A2) du HRSV et 30 % avec celle du sous-groupe B (souche 18537) tandis qu'il y a 53 % d'identité quand on compare ensemble les sous-groupes A (souche A2) et B (souche 18537) du HRSV (tableau 1.4.; tableau 1.5.; figure 1.8.) (Johnson *et al.*, 1987). Malgré cette différence de 30 %, le profil d'hydrophilicité des deux protéines est très semblable (figure 1.11.). Il est donc possible que leurs structures générales soient semblables. Au niveau nucléotidiques, on observe 51.7 % pour la comparaison entre le BRSV et le HRSV sous-groupe A et 50.8 % pour la comparaison entre le BRSV et le HRSV sous-groupe B (Lerch *et al.*, 1990).





**Figure 1.12.** : Diagrammes d'hydrophilicité pour la protéine G du BRSV (souche A51908), HRSV (souches A2 pour le sous-groupe A et 18537 pour le sous-groupe B) et ORSV (souche WSU 83-1578) (Mallipedi et Samal, 1993b).

## Introduction

Le maximum de divergence pour les souches du BRSV est trouvé dans le domaine extracellulaire, domaine le plus exposé à la surveillance immunitaire de l'hôte (figure 1.8.) (Mallipeddi et Samal, 1993a; Sullender *et al.*, 1991). On observe le même phénomène pour le HRSV où les changements dans l'ectodomaine de G sont localisés dans les deux régions de chaque côté de la région conservée entourant les 4 résidus cystéines. Ceci suggère un effet sélectif de la réponse immunitaire de l'hôte (Sullender *et al.*, 1991).

Le manque apparent de conservation des positions et du nombre des chaînes de carbohydrates O-liées ou N-liées peut aussi contribuer aux différences antigéniques entre souches (Johnson *et al.*, 1987).

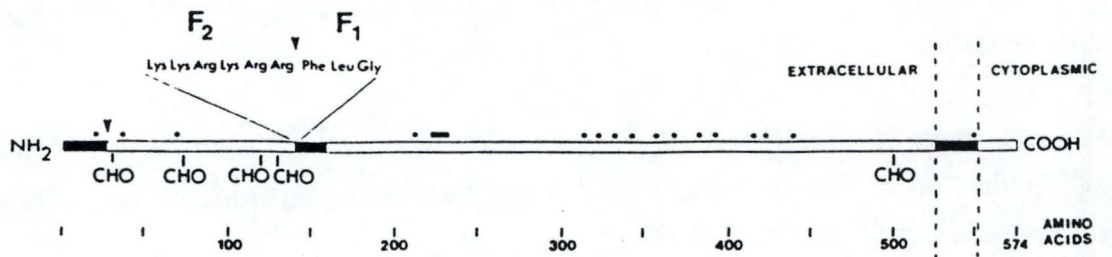
L'analyse entre la souche WSU 83-1578 du ORSV et la souche A51908 du BRSV a été réalisée. Le gène de la protéine G du ORSV comporte 838 nucléotides dont la phase ouverte de lecture donne une protéine de 263 acides aminés pour 29 kilodaltons. La comparaison entre le BRSV et le ORSV montre une identité de 73 % au niveau nucléotidique et 60 % au niveau acides aminés. Les domaines cytoplasmiques et transmembranaire sont les plus conservés avec 89 et 78 % d'identité respectivement au niveau acides aminés. Le domaine extracellulaire montre seulement 53 % d'identité (Mallipeddi et Samal, 1993b).

La comparaison entre le ORSV (numéro d'accès L08470 dans la banque de données GenBank) et le HRSV (souches A2 et Long pour le sous-groupe A et 18537 pour le sous-groupe B) montre 50 à 55 % au niveau nucléotidique et 21-29 % au niveau acides aminés avec G du HRSV (Alansari et Potgieter, 1993).

Malgré la faible identité entre la protéine G du ORSV avec celles du BRSV et du HRSV, il existe des similarités dans les diagrammes d'hydrophilicité (figure 1.12.). On observe entre autres 5 cystéines aux mêmes positions entre les 3 virus ce qui impliquerait peut-être des caractéristiques structurelles similaires entre les 3 protéines (Mallipeddi et Samal, 1993b).

Le ORSV serait relié antigéniquement au BRSV. Une réaction entre la protéine G du ORSV avec un antisérum polyclonal anti-BRSV a montré qu'il y aurait un épitope commun sur G entre les 2 virus (Mallipeddi et Samal, 1993b).





**Figure 1.13.** : Structure linéaire de la protéine F du RSV (HRSV et BRSV) (McIntosh et Chanock, 1990).

### 10.4.2. La protéine de fusion

La protéine F du HRSV comporte 574 acides aminés (572 pour le BRSV) issus d'un gène de 1899 nucléotides (1892 pour le BRSV) et a une masse moléculaire de 63.5 ou 68-70 kilodaltons selon qu'elle soit glycosylée ou non (McIntosh et Chanock, 1990).

Elle est le facteur majeur intervenant dans la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane de la cellule hôte (Kingsbury, 1990) et dans la fusion des cellules infectées avec les cellules adjacentes non-infectées (Taylor *et al.*, 1992). On la trouve à la surface de l'enveloppe virale (McIntosh et Chanock, 1990).

Elle est d'abord synthétisée sous forme d'un précurseur inactif (F0) comprenant entre 540 et 580 acides aminés (Kingsbury, 1990) et ayant une masse moléculaire de 70 kilodaltons chez le BRSV pour les souches A51908 et Md-X et chez le HRSV alors que chez le BRSV pour les souches FS-1 et VC-464 et chez les caprins, elle est de 65 kilodaltons (Mallipeddi et Samal, 1993c). Ce précurseur acquiert sa fonction de fusion suite à un processus de clivage post-transcriptionnel médié par une protéase ressemblant à la trypsine. La protéine mature contient ainsi deux sous-unités F1 (48 kilodaltons) et F2 (estimé à 20 kilodaltons pour le HRSV et les souches A51908 et Md-X du BRSV, 17 kilodaltons pour le sous-groupe A du BRSV, 23 kilodaltons pour le sous-groupe B du BRSV et 15.5 kilodaltons pour les souches FS-1 et VC-464 du BRSV et pour le RSV caprin (Furze *et al.*, 1994; Mallipeddi et Samal, 1993c)) liées ensemble par des ponts disulfures (figure 1.13.) (McIntosh et Chanock, 1990; Walravens *et al.*, 1990; Arumugham *et al.*, 1989). Ces différences de masse moléculaire sont dues à des variations dans la glycosylation (Mallipeddi et Samal, 1993c). La longueur et la composition des acides aminés en amont du site de clivage (Lys 131-Lys-Arg-Lys-Arg-Arg 136 : 6 acides aminés basiques chez le HRSV) sont des facteurs importants qui influencent le clivage (Anderson *et al.*, 1992; McIntosh et Chanock, 1990).

Du côté N-terminal de la protéine F du HSRV, on trouve un ensemble de 22 acides aminés hydrophobes (26 pour le BRSV (Lerch *et al.*, 1991)) qui semblent servir de peptide signal pour l'insertion de la protéine native dans le réticulum endoplasmique (Kingsbury, 1990; Anderson *et al.*, 1992). Son orientation en membrane est donc de type I (Wickner et Lodish, 1985). La sous-unité F2 s'étend de la fin de ce peptide signal jusqu'au site de clivage. Le côté N-terminal de la sous-unité F1 commence au résidu 137, contient un large ensemble d'acides aminés hydrophobes (du résidu 137 à 158



pour le BRSV (Lerch *et al.*, 1991)) et serait ainsi le domaine responsable de la fusion en interagissant directement avec la membrane de la cellule hôte (Anderson *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1992).

En plus de ce clivage, on observe d'autres modifications post-transcriptionnelles comme l'attachement covalent de palmitate à la cystéine 550 localisée dans la région d'ancrage transmembranaire (du résidu 522 à 549 pour le BRSV (Lerch *et al.*, 1991)) de la protéine du HRSV et l'addition de carbohydrates N-liés (Anderson *et al.*, 1992). Il y a 4 sites potentiels de glycosylation N-liés sur F2 et 1 sur F1 (Anderson *et al.*, 1992) pour le HRSV alors qu'il n'y en a que 2 sur F2 et 1 sur F1 pour le BRSV (Lerch *et al.*, 1991).

L'identité au niveau acides nucléiques entre le BRSV (souche 391-2) et le HRSV sous-groupe A (souches A2, Long, RSS-2) est de 75 % et de 74 % entre le BRSV et le HRSV sous-groupe B (souche 18537). La protéine F du BRSV partage 80 % d'identité en acides aminés avec le HRSV sous-groupe A et 81 % avec le sous-groupe B (tableau 1.4.). On observe 89 % d'identité dans F1 entre le BRSV et le HRSV quel que soit le sous-groupe. Pour F2, seulement 67 à 68 % pour le sous-groupe A et 68 % pour le sous-groupe B sont observés. La position et le nombre des résidus cystéine dans F1 et F2 sont conservées parmi toutes les protéines F (Lerch *et al.*, 1991). Il semble donc qu'il y ait eu une grande pression de sélection pour la conservation de l'activité de fusion localisée dans F1 (Walravens *et al.*, 1990). On observe aussi une cross-réactivité antigénique pour cette protéine entre les souches bovines et humaines (Lerch *et al.*, 1991).

La protéine F est le plus important antigène protecteur car elle participe à la fois à l'immunité cellulaire et humorale (McIntosh et Chanock, 1990). Elle est décrite comme l'antigène majeur de neutralisation (Walravens *et al.*, 1990). On a ainsi mis en évidence deux épitopes de neutralisation sur la protéine F du HRSV aux acides aminés 212-232 et 283-299. Le premier épitope est exactement conservé chez le BRSV. Dans le second épitope, il y a trois changements qui sont conservés entre les souches bovines (Lerch *et al.*, 1991).

### 10.4.3. La protéine SH

La protéine SH ou "Small Hydrophobic" du HRSV, aussi appelée 1A (Sharma et Woldehiwet, 1991), est produite à partir d'un ARNm de 405 nucléotides (566 pour le BRSV) dont la phase ouverte de lecture code pour 64 acides aminés (73 pour le BRSV).



## Introduction

Elle contient un core hydrophobe de 28 acides aminés qui serait le site d'interaction avec les membranes (McIntosh et Chanock, 1990).

Cette protéine est composée, comme pour la protéine G, de 3 domaines. La comparaison entre les protéines SH du BRSV, HRSV et ORSV a montré que le domaine C-terminal est le moins conservé. On observe ainsi au niveau nucléotidique 68-69 % d'identité entre le ORSV et le BRSV et 47-51 % entre le ORSV et le HRSV. Au niveau acides aminés, on a une identité de 56 % entre le ORSV et le BRSV et de 33-47 % entre le ORSV et le HRSV (Alansari et Potgieter, 1994).

La protéine SH du HRSV s'accumule intracellulairement sous forme de 4 espèces:

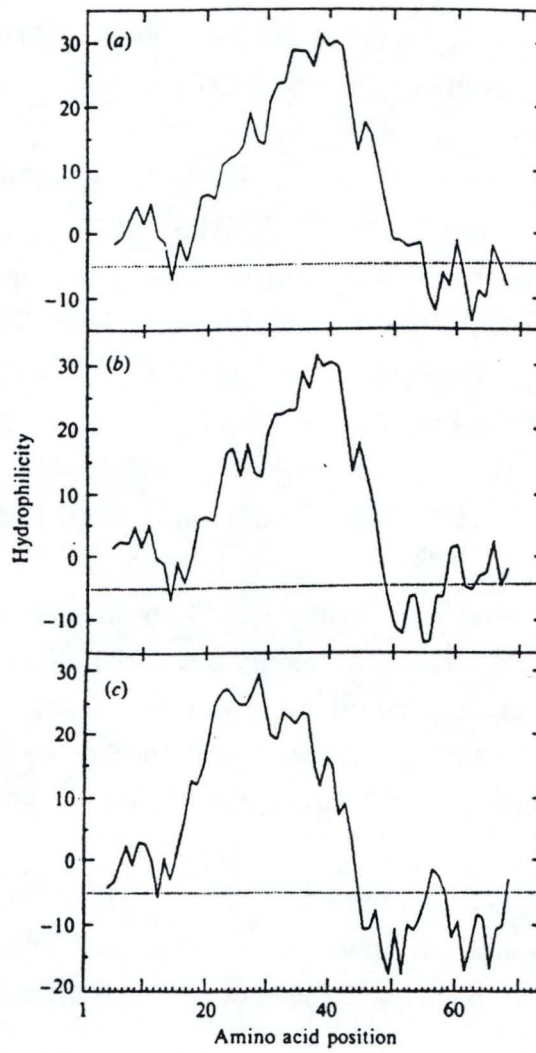
- 4.8 et 7.5 kilodaltons : non glycosylées et différentes en longueur car en ce qui concerne la forme 4.8, la synthèse commence à une deuxième méthionine.
- 13-15 et 21-30 kilodaltons : qui contiennent une chaîne de carbohydrates N liée. La forme 13-15 est convertie en 21-30 par addition post-transcriptionnelle de polylactosamine à la chaîne N-liée (McIntosh et Chanock, 1990).

Toutes les formes sont insérées dans la membrane cellulaire indépendamment du fait d'être glycosylées ou non. Toutes les formes, sauf celle de 4.8 kilodaltons, sont transportées à la surface cellulaire avec les côtés C-terminaux orientés vers l'extérieur (McIntosh et Chanock, 1990).

La protéine SH est ainsi différente des autres protéines par la multiplicité des formes intracellulaires et par le fait que beaucoup restent non glycosylées. Ces deux caractéristiques inhabituelles ont peut-être une signification fonctionnelle (McIntosh et Chanock, 1990). Il a été aussi montré que SH interagit avec G et F pour la formation de syncytia (Heminway *et al.*, 1993). Elle induirait un changement conformationnel dans F la rendant ainsi capable d'exercer son activité de fusion. L'addition de G dans ce système augmenterait significativement cette fusion (Heminway *et al.*, 1994).

On observe une haute divergence entre le BRSV et le HRSV. Ainsi, il n'y a que 38 % d'identité au niveau acides aminés entre le BRSV (souche A51908) et le HRSV sous-groupe A (souche A2) et 36 % avec le sous-groupe B (souche 18537). Au niveau nucléotidique, on observe 53 % d'identité entre le BRSV et le HRSV sous-groupe A et 60





**Figure 1.14.** : Diagrammes d'hydrophilicite pour la proteïne SH du BRSV (souche A51908 (c)) et du HRSV (souches A2 (a) pour le sous-groupe A et 18537 (b) pour le sous-groupe B) (Samal et Zamora, 1991).

% avec le sous-groupe B (tableau 1.4.). Malgré cela, les profils d'hydrophilicité des 2 virus sont semblables (figure 1.14.) (Samal et Zamora, 1991).

## 11. Variabilité

### 11.1. Variabilité antigénique

#### 11.1.1. Variabilité antigénique chez le HRSV

Deux sous-groupes, désignés A et B, du HRSV ont été identifiés. Ils diffèrent dans leur réactivité contre des anticorps monoclonaux dirigés contre au moins 4 protéines qui sont la glycoprotéine G, la protéine de fusion F, la nucléoprotéine N et la phosphoprotéine P. Les analyses entre autres de masse moléculaire montrent des différences importantes entre les sous-groupes A et B au niveau des protéines F et P. Le produit de clivage F1 et la protéine P ont une masse moléculaire plus importante pour les souches du sous-groupe A (Mufson *et al.*, 1987).

Mais la différence antigénique majeure se trouve au niveau de la protéine G (Sullender et Wertz, 1991; Sullender *et al.*, 1993). En effet, les protéines G des sous-groupes A (souches A2 et Long) et B (souche 18537) ont 5% de parenté antigénique alors qu'on observe 53% pour la protéine F (Muelenaer *et al.* 1991).

En étudiant la réactivité des deux sous-groupes A et B face à des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine F, Anderson et ses collaborateurs ont montré qu'il existait aussi une variabilité antigénique au sein même des sous-groupes A et B. Cette variabilité fut mise en évidence en utilisant des anticorps monoclonaux contre la protéine G. Ainsi on dénombre 6 subdivisions dans le sous-groupe A et 3 dans le sous-groupe B (Anderson *et al.*, 1991). Certains isolats n'ont cependant pas pu être classés comme appartenant au sous-groupe A ou B (Baker *et al.*, 1992).

Une expérience d'infection sur 15 adultes ayant déjà été atteints naturellement par le HRSV a montré que deux mois après celle-ci la moitié des individus pouvait subir une réinfection. Le haut titre en anticorps neutralisants F et G avant la réinfection serait responsable de la protection contre celle-ci. Cependant, même chez les individus avec



## Introduction

un haut titre, le risque de réinfection était de 25 %. Il semble donc que cette protection soit loin d'être complète et de courte durée (Hall *et al.*, 1991).

Les anticorps sécrétés par l'enfant en réponse au HRSV souvent ne parviennent pas à neutraliser le virus. Comme l'individu grandit, des réinfections multiples semblent induire une meilleure résistance (McIntosh et Chanock, 1990).

Chez les rats cotons, il a été montré que la réplication du HRSV dans l'appareil respiratoire stimule la production d'anticorps anti-F et protège contre une infection avec un virus du même sous-groupe (A ou B). Ainsi, si chez des enfants, on sait qu'une seconde infection avec des souches de l'un ou l'autre sous-groupe ne provoque pas une maladie respiratoire sévère, on voit aussi que l'infection avec le sous-groupe A fournit une protection face à une deuxième infection avec une souche A mais pas avec B et inversement. On peut ainsi attribuer la facilité de réinfections aux différences antigéniques qui existent entre les souches (Mufson *et al.*, 1987).

### 11.1.2. Variabilité antigénique chez le BRSV

L'idée de subdiviser le BRSV en deux sous-groupes fut d'abord introduite par Lerch et ses collaborateurs. Ceux-ci avaient en effet remarqué qu'un antisérum polyclonal dirigé contre la protéine G de la souche 391-2 ne reconnaissait pas la protéine G d'une autre souche (Lerch *et al.*, 1989).

Une autre étude a montré des variations dans la masse moléculaire des protéines P et F parmi 9 isolats du BRSV (Baker *et al.*, 1992).

Récemment, une étude réalisée par le groupe de Taylor a apporté les preuves supplémentaires. Un ensemble de 23 anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine G du BRSV furent ainsi utilisés pour déterminer l'hétérogénéité antigénique de 19 isolats du BRSV provenant du monde entier sur une période de 20 ans. La réactivité de ces isolats déterminée par ELISA permet de séparer les 19 isolats en deux sous-groupes A et B. Ceci fut confirmée par radioimmunoprécipitation et par l'utilisation de séra polyclonaux obtenus à partir de bétail hyperimmunisé avec des souches des deux sous-groupes du BRSV (Furze *et al.*, 1994).





Anticorps		391-2	RB94	BovX
A	44	■	■	
	48	■	■	
	55	■	■	
	59	■	■	
	60	■	■	
	64	■	■	
B	50	■	■	
	56	■	■	
C	62	■		
	66	■	■	
	46	■		
	47	■		
	52	■	■	
	58	■	■	
	63	■	■	
	67	■	■	
D	49	■	■	
	57	■		
	54	■	■	
E	53	■		
F	61	■		
	69	■		
	70		■	■

**Tableau 1.6.** : Analyse de la réactivité de 3 souches de BRSV à l'encontre d'anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes variables (reproduit de Furze *et al.*, 1994).  
La souche 391-2 est originaire des USA, RB94 de Belgique et BovX de Suisse.



souches/Anticorps	48	52	20	57	61	70	20F12	15H6	MM F2	Type antigénique
NMK7 (Japon)									17 <sup>5</sup>	A <sup>2</sup>
85-1330 (USA)									ND	A <sup>2</sup>
87-13956 (USA)									ND	ND
Dorset (UK)									ND	Atypique <sup>2</sup>
FS-1 (USA)									15.5 <sup>4</sup>	A <sup>2</sup>
A51908 (USA)									20 <sup>4</sup>	A <sup>2</sup>
RB94 (Belgique)									23 <sup>3</sup>	A/B <sup>1</sup>
Lelystad (Pays-Bas)									23 <sup>5</sup>	A/B <sup>2</sup>
MVR553 (Belgique)									ND	A/B <sup>2</sup>
BovX (Suisse)									23 <sup>3</sup>	B <sup>1</sup>
VC-464 (USA)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15.5 <sup>4</sup>	ND

Motifs:

	Fluorescence négative.
	Faible intensité de fluorescence à faible dilution d'anticorps.
	Intensité de fluorescence moyenne pour une dilution intermédiaire de l'anticorps.
	Forte intensité de fluorescence à forte dilution de l'anticorps.

**Tableau 1.7.** : Analyse de la réactivité de souches de BRSV à l'encontre d'anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes variables. Les anticorps ont été testés en immunofluorescence indirecte sur des cellules pulmonaires bovines infectées par les différents isolats viraux et fixées. La masse moléculaire apparente (MM) en kilodaltons de la sous-unité F2 de la protéine F est indiquée pour quelques souches.

<sup>1</sup> : Typage antigénique décrit dans Furze *et al.* (1994)

<sup>2</sup> : Typage antigénique réalisé au sein de notre laboratoire

<sup>3</sup> : Masse moléculaire de la sous-unité F2 décrite dans Furze *et al.* (1994)

<sup>4</sup> : Masse moléculaire de la sous-unité F2 décrite dans Mallipeddi et Samal (1993c)

<sup>5</sup> : Masse moléculaire de la sous-unité F2 déterminée au sein de notre laboratoire

ND : non déterminé

La souche Dorset est dite atypique car son profil de réactivité antigénique sort du canevas défini dans la littérature.

Anticorps Mon.	Origine	Spécificité
20	CDI Lelystad	anti-G
48	NIAH Compton	anti-G
52	NIAH Compton	anti-G
57	NIAH Compton	anti-G
61	NIAH Compton	anti-G
70	NIAH Compton	anti-G
AL15H6	FUNDP Namur	anti-F
AL20F12	FUNDP Namur	anti-G

**Tableau 1.8.** : Caractéristiques des anticorps monoclonaux utilisés pour tester un ensemble d'isolats de BRSV.



## Introduction

Le tableau 1.6. présente les résultats cités dans l'article de Furze *et al.* (1994) pour les souches (391-2, RB94, BovX) que nous avons analysés au cours de ce mémoire. La souche 391-2 réagit avec les anticorps 44-69 et non avec l'anticorps 70. Par contraste, l'isolat BovX réagit uniquement avec l'anticorps 70. La souche 391-2 a ainsi été définie comme appartenant au sous-groupe A et la souche BovX au sous-groupe B. La souche RB94 est un intermédiaire entre ces 2 souches puisqu'elle réagit avec tous les anticorps sauf les 62, 46, 47, 57, 53, 61 et 69. Cette souche est classée comme sous-groupe intermédiaire A/B (Furze *et al.*, 1994).

Le tableau 1.7. montre, entre autres, les résultats obtenus au sein de notre laboratoire sur les souches RB94 et BovX déjà étudiées par le groupe de Taylor, qui les nomme respectivement 220/69 et C881, et d'autres utilisées dans ce travail. Le tableau 1.8. résume les caractéristiques des anticorps utilisés ici. Ainsi, les anticorps 48, 52, 57, 61 et 70 sont ceux utilisés par le groupe de Taylor et nous ont été fournis par le NIAH de Compton, l'anticorps 20 par le CDI de Lelystad et les anticorps AL15H6 et AL20F12 ont été produits dans notre laboratoire. Les résultats du groupe de Taylor sur les souches RB94 et BovX ont pu être reproduits. Le sous-groupe de certaines des souches a aussi pu être déterminé en suivant la classification définie par le groupe de Taylor. Les souches NMK7 et 85-1330 présentant le même type de réactivité que la souche 391-2 avec les anticorps du groupe de Taylor ont ainsi été classées dans le sous-groupe A. Le même raisonnement a aussi permis de classer les souches Lelystad et MVR553 dans le sous-groupe intermédiaire A/B.

Les sous-groupes définis par le groupe de Taylor peuvent aussi être différenciés par l'analyse de la masse moléculaire du produit F2 résultant du clivage post-transcriptionnel de la protéine de fusion F. Ainsi, on observe des valeurs de 17 kilodaltons pour le sous-groupe A (exemple : souche 391-2) et 23 kilodaltons pour le sous-groupe B (type lourd, exemple : souche BovX). Le sous-groupe intermédiaire A/B (exemple : souche RB94) montre, lui, une masse moléculaire de 23 kilodaltons (Furze *et al.*, 1994). Mais, on peut encore rencontrer d'autres valeurs: pour la souche A51908 (sous-groupe A) on observe une masse moléculaire de 20 kilodaltons alors que pour les souches FS-1 (sous-groupe A) et VC-464 on trouve des valeurs de 15.5 kilodaltons, cette dernière souche n'étant pas encore caractérisée au niveau antigénique (Mallipeddi et Samal, 1993c). La faible résolution des gels nous permet d'approximer les masses moléculaires des souches possédant une sous-unité F2 situées entre 15.5 et 20 kilodaltons (type léger) comme appartenant au sous-groupe A.



Les classifications des souches NMK7 et Lelystad en sous-groupes A et A/B ont pu ainsi être vérifiées dans notre laboratoire par la détermination de la masse moléculaire de la sous-unité F2 de la protéine F. Ainsi, la souche NMK7 montre, comme pour la souche 391-2, une masse moléculaire de 17 kilodaltons. La souche Lelystad présente aussi la même masse moléculaire que la souche RB94 (23 kilodaltons).

### 11.1.3. Relation antigénique entre BRSV et HRSV

A l'heure actuelle, les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine G des sous-groupes A et B du HRSV n'ont jamais montré aucune réactivité avec la protéine G des différentes souches du BRSV. Par contre, la plupart des anticorps monoclonaux dirigés contre les autres protéines de structure des 2 sous-groupes du HRSV réagissent avec toutes les souches du BRSV. On voit donc que, même si les souches bovines ont beaucoup d'épitopes communs avec les souches humaines (sous-groupes A et B), elles sont différentes au niveau antigénique (Örvell *et al.*, 1987).

## **11.2. Variabilité génétique**

### 11.2.1. Variabilité génétique chez le HRSV

Il existe pour plusieurs protéines une correspondance entre les différences antigéniques observées et les variations dans leur séquence. En effet, un changement d'un seul acide aminé peut induire une perte de réactivité avec un anticorps monoclonal (Sullender *et al.*, 1990).

Une comparaison de séquences entre une souche du sous-groupe A (A2) et une souche du sous-groupe B (18537) a été réalisée pour définir l'importance de la dissemblance pour 7 protéines : NS2, N, M2, NS1, SH, F et G (tableau 1.5.). Pour les 6 premières, cette dissemblance était faible (NS2, N, M2) à modérée (NS1, SH, F), alors que pour la protéine G on observait seulement 53 % d'identité au niveau acides aminés. Il faut remarquer que 56 % de ces différences sont concentrées dans le domaine extracellulaire (McIntosh et Chanock, 1990; Collins *et al.*, 1990) bien qu'il existe dans celui-ci une région conservée entre les différentes souches qui pourrait avoir une signification fonctionnelle (Olmsted *et al.*, 1989). Les domaines cytoplasmiques et transmembranaires sont, quant à eux, mieux conservés avec respectivement 81 et 86 %



	A51908	391-2	FS-1	VC464	
A51908		90,3	90,9	93,2	2
391-2	84,8 (81,2)		95,3	96,2	
FS-1	84,4 (81,2)	92 (89,5)		97,1	
VC464	87,9 (84,8)	94 (92,7)	95,2 (94,2)		

1

1 : Pourcentages d'identités au niveau acides aminés, ( )=identités dans le domaine extracellulaire

2 : Pourcentages d'identités au niveau nucléotidique

**Tableau 1.9.** : Identités aux niveaux nucléotidique et acides aminés pour la protéine G entre 4 souches du BRSV (Mallipeddi et Samal, 1993a).

## Introduction

d'identité au niveau acides aminés (figure 1.8.) (Johnson *et al.*, 1987) ce qui laisse supposer que ces régions contiennent des séquences ou des structures conservées importantes pour le transport, la fonction ou la maturation de la protéine G (Olmsted *et al.*, 1989).

Des différences entre sous-groupes existent aussi dans les régions non codantes du génome. Par exemple, les régions intergéniques sont hautement divergentes (44-50 % d'identité). A l'opposé, les séquences "gene-start" et "gene-end" et la région de chevauchement entre les protéines M2 et L sont hautement conservées (McIntosh et Chanock, 1990).

Tous ces éléments laissent également supposer que les 2 sous-groupes auraient évolué séparément.

On observe moins de divergence entre souches du même sous-groupe (tableau 1.5.) (Johnson *et al.*, 1987; Lopez *et al.*, 1988). La comparaison entre 5 protéines de souches du sous-groupe A avec les protéines correspondantes pour la souche A2 a montré qu'entre 2 de ces souches l'identité au niveau acides aminés pour la protéine G était de 93 % (tableau 1.5.) (McIntosh et Chanock, 1990) mais on peut observer des valeurs allant jusqu'à 80 % pour des comparaisons entre d'autres souches du sous-groupe A. Entre souches du sous-groupe B, on trouve des chiffres atteignant 91 % (Cane *et al.*, 1991; Sullender *et al.*, 1991). D'autres valeurs peuvent être citées comme 97-98 % pour la protéine F et 98-99 % pour la protéine P (tableau 1.5.) (Lopez *et al.*, 1988; Lambden, 1985).

### 11.2.2. Variabilité génétique chez le BRSV

Suite aux données amassées sur le HRSV et la protéine G, des études ont été entreprises sur le BRSV.

Les séquences nucléotidiques de la protéine G de 4 souches du BRSV (A51908, VC-464, FS1 et 391-2) ont été comparées (Mallipeddi et Samal, 1993a) (tableau 1.9.). A remarquer que cette comparaison a été faite avant la répartition du BRSV en sous-groupes et donc avant la caractérisation antigénique des souches. L'alignement a montré qu'elle est hautement conservée avec 90-97 % d'identité. Une identité allant de 84 à 95 % a été observée au niveau acides aminés. Ces pourcentages sont nettement plus



élevés que pour le HRSV (53 % d'identité au niveau acides aminés entre les sous-groupes A et B) ce qui permet de supposer que ces souches appartiendraient au même sous-groupe. Comme pour le HRSV, le maximum de divergence pouvant aller jusqu'à 19 % a été trouvé au niveau des domaines extracellulaires, les domaines cytoplasmiques et transmembranaires étant, quant à eux, hautement conservés avec plus de 95 % d'identité (Mallipeddi et Samal, 1993a).

### 11.2.3. Comparaison BRSV-HRSV

L'ARNm de la protéine G du BRSV est plus petit que celui du HRSV et partage 51 % d'identité avec toutes les protéines G humaines séquencées (Lerch *et al.*, 1990).

Bien que la composition globale en acides aminés de la protéine G du BRSV soit proche de celle du HRSV, la séquence du BRSV a un faible niveau d'identité avec le HRSV quel que soit le sous-groupe (A ou B). Il y a seulement 29-30 % d'identité (figure 1.8.; tableau 1.4.) alors qu'il y a 53 % d'identité quand on compare les sous-groupes du HRSV entre eux (tableau 1.5.). Malgré ces 29-30 %, les profils d'hydrophilicité des 2 protéines sont très semblables ce qui permet d'avancer l'hypothèse de caractéristiques structurales communes (figure 1.11.) (Lerch *et al.*, 1990).

De hauts niveaux d'identité au niveau acides aminés sont observés quand on compare les domaines cytoplasmiques et transmembranaires mais à nouveau ces valeurs ne sont pas aussi élevées que pour la comparaison de ces mêmes régions entre les sous-groupes A et B du HRSV (figure 1.8.) (Lerch *et al.*, 1990).

Toutes ces valeurs obtenues en comparant le BRSV avec le HRSV sont égales que l'on prenne une souche du sous-groupe A (A2) ou B (18537) du HRSV. On ne peut donc pas rapprocher le BRSV à un des 2 sous-groupes. Ceci suggère que ces deux virus se seraient différenciés avant l'apparition de 2 sous-groupes différents pour le HRSV (Lerch *et al.*, 1990).

D'autres protéines ont été comparées. On peut citer, par exemple, la protéine F qui partage 80-81 % d'identité entre les 2 virus (souches 391-2 pour le BRSV, RSS-2, A2, Long pour le sous-groupe A et 18537 pour le sous-groupe B du HRSV) (tableau 1.4.) alors qu'elle est de 89 % pour les 2 sous-groupes du HRSV (tableau 1.5.) (Lerch *et al.*,

## Introduction

1991). Ceci suggère aussi que le BRSV constitue une entité bien définie différente du HRSV (Walravens *et al.*, 1990).

Une autre protéine est hautement divergente entre le BRSV et le HRSV. En effet, il y a seulement 38 % d'identité au niveau acides aminés entre les protéines SH du BRSV (souche A51908) et du HRSV sous-groupe A (souche A2) et 36 % entre le BRSV et le HRSV sous-groupe B (souche 18537) (tableau 1.4.). Malgré ces faibles valeurs, on observe, comme pour la protéine G, les mêmes profils d'hydrophilicité entre les 2 virus (figure 1.14.) (Samal et Zamora, 1991).



*But du  
travail*

## But du travail

La variabilité antigénique et génétique du BRSV se situe principalement au niveau de la protéine G.

Différentes souches du BRSV ont été typées antigéniquement par le groupe de Taylor (Furze *et al.*, 1994) et au sein de notre laboratoire à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés principalement contre la protéine G. Ce typage a permis de suggérer l'existence de deux sous-groupes antigéniques A et B et un sous-groupe intermédiaire A/B. Cette répartition antigénique semblerait, de plus, associée à une variabilité de la masse moléculaire de la sous-unité F2 de la protéine F du BRSV.

Dans le cas du HRSV, la variabilité au niveau antigénique reflète la variabilité génétique. En effet, plusieurs gènes de protéine G ont été séquencés et les pourcentages en acides aminés déduits à partir de ces séquences permettent de classer les souches en deux sous-groupes A et B. On observe 50 % d'identité entre les sous-groupes A et B tandis que les pourcentages d'identité varient de 80 à 90 % au sein des sous-groupes.

Le but de ce travail est d'étudier la variabilité au niveau génétique par l'analyse de la séquence du gène G de différentes souches du BRSV. Les pourcentages d'identités en acides aminés obtenus pour ces différents gènes nous permettront ainsi d'établir si la variabilité génétique observée correspond à une variabilité inter-groupe ou intra-groupe. De plus, les données obtenues seront corrélées avec les résultats antigéniques obtenus précédemment.

Ainsi, nous séquencerons le gène G de deux souches du BRSV : la souche BovX classée antigéniquement dans le sous-groupe B (première souche de ce sous-groupe à être séquencée) et la souche Dorset dont le profil antigénique est atypique. Ces données contribueront à l'analyse de l'hétérogénéité génétique du BRSV. La mise en parallèle de l'hétérogénéité génétique et antigénique permettra finalement d'établir l'existence ou non de sous-groupes distincts au niveau du BRSV.



*Matériel*

*&*

*Méthodes*

SOUCHES	LIEU D'ISOLEMENT	DATE D'ISOLEMENT
Lelystad	Pays-Bas	—
A51908	Maryland, USA	1975
BovX	Suisse	1967
RB94	Belgique	1970
Dorset	Royaume-Uni	1971
NMK7	Japon	1969
85-1330	USA	—
MVR553	Belgique	1983
391-2	Caroline du Sud, USA	1985
FS-1	Iowa, USA	1975
VC-464	Missouri, USA	1974
87-13956	USA	—
L084 :10-17	Non Communiqué	Non Communiqué
L10925	Non Communiqué	Non Communiqué

Tableau 2.1. : Noms, lieux et dates d'isolement des souches du BRSV utilisées pour ce travail.



## 1. Cultures virales

### 1.1. Souches virales du BRSV

Différentes souches virales du BRSV sont disponibles au laboratoire : BovX (fournie par Paccaud, Genève), Dorset (fournie par Jacobs, Londres), RB94 (isolée à l'Institut National de Recherches Vétérinaires ou INRV, Bruxelles), A51908 (disponible dans la collection American Type Culture Collection ou ATCC sous le numéro VR-794), NMK7 (fournie par Inaba, NIAH, Tokyo), Lelystad (isolat des Pays-Bas, fourni par le Docteur van Oirschot, CVI, Lelystad), FS-1 (disponible dans la collection ATCC sous le numéro VR-855), les souches 85-1330 et 87-13956 (fournies par SmithKline Beecham Animal Health, USA) et MVR553 (fournie par Wellemans, INRV Bruxelles). D'autres souches sont connues par la littérature ou la banque de données GenBank. Ainsi la souche VC-464 est citée dans un article de Mallipeddi et Samal (1993a), les souches L084 : 10-17 ont été analysées par Stine et Kelling (1992), la souche L10925 a été analysée par Duncan et Potgieter (1994) et la souche 391-2 est citée dans un article de Lerch *et al.* (1990). Le tableau 2.1. reprend le nom, l'année d'isolement et l'origine des isolats.

### 1.2. Cultures des cellules Vero et testiculaires de veau (CTV)

Les souches de BRSV sont multipliées *in vitro* sur des cellules Vero ou des CTV. Chaque souche a été ainsi passée 4 à 10 fois sur ces cellules pour obtenir un stock viral.

#### 1.2.1. Origine des cellules Vero et CTV

Les cellules Vero sont issues de fibroblastes de reins de singe vert africain, transformées pour fournir une lignée cellulaire continue. Elles ont été obtenues à l'ATCC sous le numéro CRL 1587.

Les CTV constituent une lignée primaire isolée à partir de testicules de veau. Elles nous ont été fournies par l'INRV.

**Solution 1 : Milieu de culture des cellules Vero ou CTV**

- Milieu DMEM (Gibco) 500 ml
- Sérum de veau foetal décomplémenté (Gibco) 50 ml
- Solution d'antibiotiques/antimycotiques  
100 fois concentrée (solution 2) 5 ml
- L-glutamine (Gibco) 200 mM  
100 fois concentrée 5 ml

**Solution 2 : Solution d'antibiotiques/antimycotiques 100 fois concentrée**

- Pénicilline (Gibco) 1000 unités/ml
- Streptomycine (Gibco) 10000 µg/ml
- Fungizone (Gibco) 25 µg/ml

**Solution 3 : Solution de trypsine-EDTA 3 fois concentrée**

- Trypsine-EDTA 10 fois concentré (Gibco) 100 ml
- PBS (phosphate-buffered saline) (Gibco) 233 ml



### 1.2.2. Protocole

- Les cellules Vero et les CTV sont ensemencées en flacon de Roux de 75 cm<sup>2</sup> dans 20 ml de milieu de culture (solution 1). La culture est incubée à 37°C dans un incubateur à 5% en CO<sub>2</sub>,
- Le tapis cellulaire, une fois à confluence, est rincé avec 2 ml de solution de trypsine-EDTA 3 fois concentrée (solution 3),
- Remettre 2 ml de solution de trypsine-EDTA 3 fois concentrée et incubé 10 minutes à 37°C,
- Laver les cellules détachées dans du milieu de culture,
- Après centrifugation à basse vitesse, le culot de cellules est remis en suspension dans 10 ml de milieu de culture et réparti dans 10 nouveaux flacons de Roux de 75 cm<sup>2</sup> contenant chacun 19 ml de milieu de culture,
- Incuber la préparation dans un incubateur à 37°C, 5% en CO<sub>2</sub>.

### **1.3. Cultures du BRSV sur des cellules Vero et des CTV**

- Prendre une culture de cellules subconfluentes et rincer les cellules à l'aide de PBS 1 fois concentré,
- Inoculer le virus dilué en milieu d'inoculation (composition identique au milieu de culture des cellules Vero ou des CTV excepté l'absence de sérum de veau foetal) à raison de 0.1 dose infectieuse 50 (DI50) de RSV par cellule,
- Laisser la préparation 1 heure à 37°C pour permettre l'adsorption du virus,
- Enlever le surnageant de culture et remettre du nouveau milieu d'inoculation (10 ml par boîte de Roux de 75 cm<sup>2</sup>),
- Incuber à 37°C jusqu'à ce que de nombreux syncytia bien développés soient observables,
- A ce stade, la culture est soumise à un cycle de congélation-décongélation afin de libérer les virions,
- Récupérer le contenu de la culture lysée et clarifier cette préparation par centrifugation à basse vitesse (500 g, 10 minutes),
- La suspension virale ainsi obtenue est titrée par la méthode des dilutions limites puis éventuellement stockée à -70°C.

### 1.4. Détermination du titre viral

La méthode des dilutions limites est réalisée en inoculant une culture cellulaire en microplaques avec des dilutions virales croissantes d'ordre 10. Lors de l'apparition de l'effet cytopathogène du virus, le pourcentage de puits infectés est déterminé. La dilution pour laquelle 50 % des puits présentent un effet cytopathogène correspond à une DI50. La DI50 est calculée par la formule suivante :

$$\text{Log de DI50} = a + b(s - 0.5)$$

a =  $\log_{10}$  de la première dilution  
b =  $\log_{10}$  du facteur de dilution  
s = somme des pourcentages des puits de cellules infectés à chaque dilution  
0.5 = facteur constant à retrancher.

### 1.5. Préparation d'une culture virale pour l'extraction d'ARN

- Inoculer des cellules Vero ou des CTV confluentes avec une DI50 de BRSV par cellule et incuber la culture en milieu d'inoculation à 37°C pendant 20 heures,
- Eliminer le surnageant puis récupérer les cellules infectées à l'aide de trypsine-EDTA 3 fois concentrée. Le culot de cellules est stocké à -70°C.

## 2. Extraction d'ARN

### 2.1. Principe

Les ribonucléases (RNAses) étant omniprésentes, toute manipulation d'ARN nécessite des conditions de travail rigoureuses. Ainsi, tips, eppendorf, ... doivent être exempts de ces RNAses (RNase-free). Le port de gants est indispensable et nous traiterons la cuve d'électrophorèse et la cuvette du spectrophotomètre au SDS (sodium dodecyl sulfate, Fluka) 2%. Il est important d'autoclaver la verrerie et d'utiliser des nouvelles bouteilles pour les solutions.



Nous avons utilisé la solution Ultraspec RNA (Biotechx) pour isoler l'ARN total des cultures cellulaires. Cette solution est basée sur la propriété qu'a l'ARN de rester soluble dans une solution à pH 4 contenant une concentration élevée en sels de guanidine, en présence d'une phase organique de phénol/chloroforme. Dans ces conditions, la plupart des protéines et les petits fragments d'ADN (de 50 paires de bases à 10 kilobases) restent dans la phase organique, alors que les plus grands fragments d'ADN et quelques protéines restent à l'interface.

### **2.2. Protocole**

#### 2.2.1. Homogénéisation

Resuspendre le culot de cellules dans de l'Ultraspec RNA (1 ml/5-10 x 10<sup>6</sup> cellules).

#### 2.2.2. Extraction

- Laisser 5 minutes à 4°C,
- Ajouter 0.2 ml de chloroforme (UCB) /1 ml d'Ultraspec RNA,
- Secouer vigoureusement pendant 15 secondes,
- Laisser 5 minutes à 4°C,
- Centrifuger à 13000 révolutions par minutes (RPM) à 4°C pendant 15 minutes.

#### 2.2.3. Précipitation

- Transférer la phase aqueuse dans un autre eppendorf,
- Ajouter un volume d'isopropanol (UCB),
- Bien mélanger,
- Centrifuger à 13000 RPM à 4°C pendant 10 minutes.

#### 2.2.4. Lavage

- Enlever le surnageant,
- Laver avec de l'éthanol (Merck) 70 % froid, (1ml/1ml d' Ultraspec RNA)
- Bien mélanger,
- Centrifuger à 13000 RPM à 4°C pendant 5 minutes,

**Solution 4 : Tampon MOPS 10 fois concentré**

- |                |         |
|----------------|---------|
| - MOPS (Sigma) | 20.93 g |
| - NaAc (UCB)   | 2.05 g  |
| - EDTA (UCB)   | 1.861 g |

Porter à 500 ml avec de l'eau bidistillée RNase free

Mettre à pH 7



( répéter ces 4 opérations 2 fois )

- Enlever le surnageant,
- Sécher le culot sous vide,
- Dissoudre le culot dans de l'eau RNase-free.

L'ARN est conservé à -20°C.

### 3. Quantification spectrophotométrique

La mesure d'absorbance ou densité optique (DO) à 260 nm permet de calculer la quantité d'acides nucléiques. Une absorbance à 260 nm ( $DO^{260}$ ) égale à 1 correspond à une concentration de 40  $\mu\text{g}$  d'ARN par ml. Une autre mesure d'absorbance à 280 nm ( $DO^{280}$ ) nous donne la quantité de protéines. Le rapport entre les 2 absorbances permet une estimation de la pureté de la préparation. Des préparations pures ont un rapport  $DO^{260}/DO^{280}$  compris entre 1.8 et 2.

### 4. Electrophorèse d'ARN en gel d'agarose

Ce type d'électrophorèse va nous permettre de vérifier la qualité de l'ARN isolé. Le principe général des électrophorèses d'acides nucléiques en gels d'agarose sera explicité ultérieurement au point 6.1..

#### 4.1. Préparation du gel

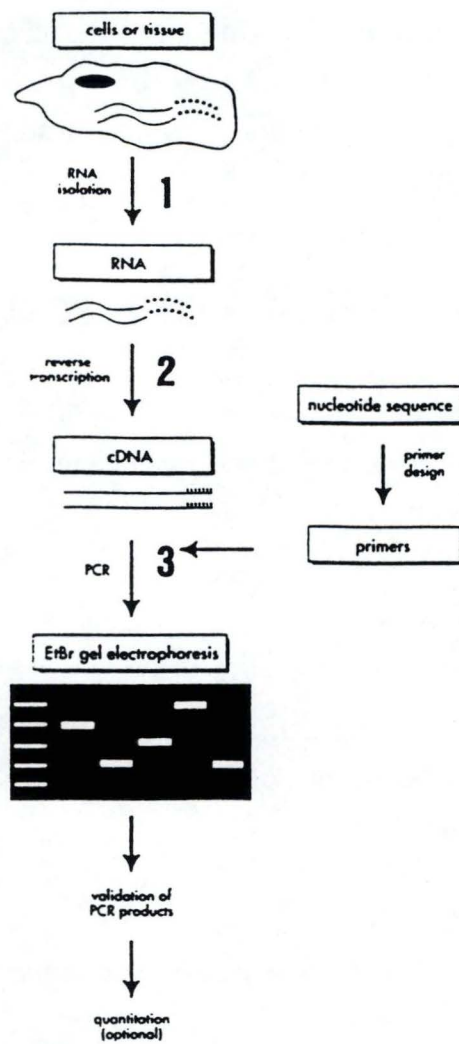
- Pour un gel de 100 ml, dissoudre 1 g d'agarose (Boehringer) dans 10 ml de tampon MOPS 10 fois concentré (solution 4) et 87 ml d'eau,
- Faire fondre l'agarose en le chauffant,
- Le laisser refroidir à 65 °C,
- Ajouter 5.1 ml de formaldéhyde (UCB) 37 %,
- Couler le gel dans un moule équipé d'un peigne afin de créer des puits,
- Laisser plus ou moins une heure pour que le gel durcisse.

**Solution 5 : Tampon d'échantillons ARN (ESB)**

- Formamide déionisée (UCB)	0.75 ml
- MOPS 10 fois concentré (solution 4)	0.15 ml
- Formaldéhyde	0.25 ml
- Eau bidistillée RNase free	0.1 ml
- Glycérol (UCB)	0.1 ml
- Bleu de bromophénol 10 % (UCB)	0.08 ml

**Solution 6 : Solution de bromure d'éthidium (BrEt)**

- Bromure d'éthidium (Sigma)	1 mg
- Eau bidistillée	1 ml



**Figure 2.1.** : Diagramme schématique de la méthode de RT-PCR.



### 4.2. Préparation des échantillons et électrophorèse

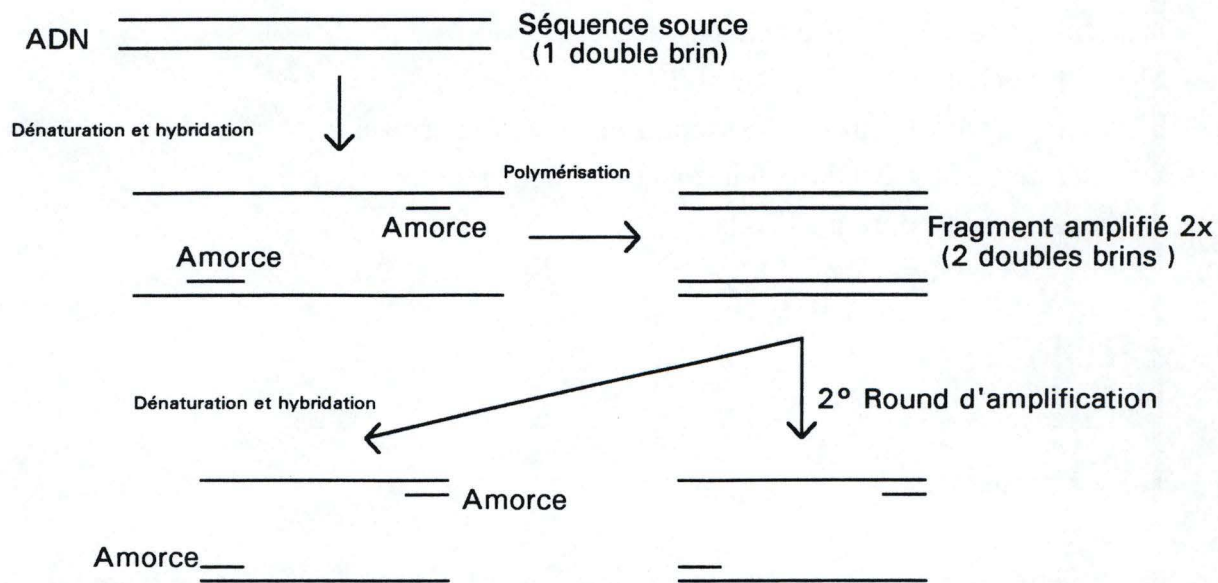
- Dans un eppendorf, mélanger :
  - 10 à 30  $\mu\text{g}$  d'ARN
  - 5 volumes de ESB (solution 5)
  - 1  $\mu\text{l}$  de bromure d'éthidium (BrEt) à 1 mg/ml (solution 6)
- Passer les échantillons 15 minutes à 65°C,
- Les remettre de suite sur glace,
- Mettre les échantillons dans les puits,
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse (LKB-Pharmacia),
- Y couler de tampon MOPS 1 fois concentré pour recouvrir le gel,
- Laisser migrer 1 heure à 80 volts.

## 5. RT-PCR

### 5.1. Principe

Cette technique consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire du brin d'ARN à détecter (transcription inverse ou reverse transcription (RT)) ce type d'ADN est appelé ADNc. Ensuite, ce brin est amplifié, et par la suite son brin complémentaire, par réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR, polymerase chain reaction).

La transcription inverse se fait ici à l'aide d'une enzyme, la reverse transcriptase (RTase) (moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Gibco), qui synthétise un brin d'ADN complémentaire à un brin d'ARN (ADNc) à condition de fournir au système une amorce d'ADN oligonucléotidique (ou oligo) de quelques dizaines de bases (20-30) complémentaire à la région 3'-terminale de l'ARN. La RTase allonge l'extrémité 3' de l'amorce en ajoutant des nucléotides complémentaires à la matrice d'ARN. Si on considère que la séquence de l'ARN est une séquence "sense" c'est-à-dire codante, la séquence complémentaire est une séquence "anti-sense". L'oligo capable de s'hybrider à la région 3'-terminale de l'ARN doit donc être "anti-sense". Comme illustré à la figure 2.1., l'ARN est tout d'abord isolé des cellules, cet ARN va servir de matrice à la transcription inverse en ADNc.



**Figure 2.2.** : Représentation schématique d'un cycle d'amplification PCR.



La réaction de PCR permet d'amplifier jusqu'à un million de fois un fragment d'ADN double brin. Cette technique repose sur l'action d'une ADN polymérase capable de copier un brin d'ADN à haute température (72°C) (*Thermus brockianus* ADN polymérase (DyNAZyme)). La stratégie consiste à faire fonctionner cette enzyme à partir d'un petit fragment d'ADN complémentaire d'une des extrémités de la région à amplifier. Cette amorce va s'hybrider à l'ADN et pourra être allongée par son extrémité 3'-OH libre par addition de nucléotides complémentaires à la séquence d'ADN matrice. Si on fait de même 50 à 2500 nucléotides plus loin sur l'autre brin, à l'autre extrémité de la zone à amplifier, avec une amorce spécifique à cette extrémité, et que l'on alterne sur un cycleur thermique des cycles de dénaturation des doubles brins, d'hybridation des amorces et de polymérisation, le nombre de doubles brins augmentera de manière exponentielle.

Les produits majeurs de cette réaction sont donc des doubles brins d'ADN d'une séquence comprise entre les deux amorces (figure 2.2.). En plus de ces fragments majoritaires, il peut y avoir production de fragments de longueurs variables mais le nombre de ces types de brins augmentera au cours des cycles de manière linéaire alors que le nombre des brins homologues augmentera de manière exponentielle. C'est la taille de ces doubles brins majoritaires qui sera visualisée, par après, sur un gel d'agarose.

### 5.2. Protocole (Le L., communication personnelle)

#### 5.2.1. Rétro-transcription (RT)

Dans un eppendorf PCR, pour un volume final de 20  $\mu$ l, mélanger :

- |  |           |
|--|-----------|
| - ARN (dénaturé à 100°C 4 minutes puis mis à 4°C de suite)                           | 5 $\mu$ g |
| - Tampon M-MLV RT 5 fois concentré (Gibco)   | 4 $\mu$ l |
| - DTT (dithiothréitol) (Gibco)   | 2 $\mu$ l |
| - dNTP (déoxyribonucléotide triphosphate)<br>10 mM (Boehringer)                      | 2 $\mu$ l |
| - Oligo 3' (100 picomoles)   | 1 $\mu$ l |
| - Inhibiteur de RNAses (human placental ribonucleases<br>inhibitor, HPRI) (Amersham) | 4 unités  |

## Matériel & Méthodes

- Eau RNase free x µl
- M-ML RTase (Gibco) 200 unités.

La RT se fait sur un cycleur thermique (Techne PHC-3, New Brunswick Scientific) par le cycle suivant :

- 23° pendant 10 minutes (hybridation de l'oligo)
- 37° pendant 60 minutes (température optimale pour la RTase)
- 95° pendant 5 minutes (arrêt de la réaction par dénaturation de la RTase).

### 5.2.2. Polymérisation en chaîne (PCR)

A ces 20 µl réactionnels de la RT, pour un volume final de 100 µl, ajouter :

- Tampon PCR/DyNAZyme 10 fois concentré (TechGen) 10 µl
- dNTP 10 mM 1 µl
- Oligo 3' (100 picomoles) 1 µl
- Oligo 5' (100 picomoles) 1 µl
- Eau bidistillée x µl
- Polymérase DyNAZyme (TechGen) 4 unités

Recouvrir la réaction avec 100 µl d'huile minérale (Sigma).

La PCR se fait par cycles de :

- 95°C pendant 10 minutes (permet la dénaturation des deux brins d'ADN)
- 36 fois le cycle :
  - 95°C 1 minute (permet la dénaturation des deux brins d'ADN)
  - x°C 1 minute \* (température d'hybridation des oligos)
  - 72°C 1 minute (température optimale d'activité de la polymérase)
- 72°C pendant 10 minutes (élongation finale).

\* : on programme ici la température moyenne de fusion des différents oligos qui se calcule selon la formule suivante pour chaque oligo :

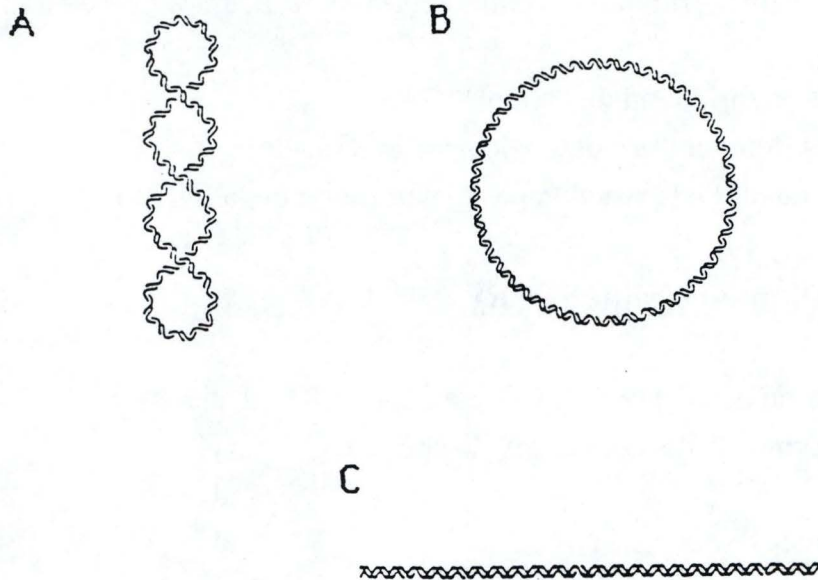
$$T_f (^{\circ}C) = [(nombre\ de\ A\ et\ T) \times 2] + [(nombre\ de\ C\ et\ G) \times 4]$$

(Thein et Wallace, 1986)

Stocker à -20°C.

Déposer 10-20 µl du produit de la RT-PCR sur gel agarose 2 % .





**Figure 2.3.** : Configurations de l'ADN plasmidique.

A : la forme CCC

B : la forme OC

C : la forme OL.

## 6. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

### 6.1. Principe

Cette méthode de séparation des fragments d'ADN permet l'évaluation de la taille et de la quantité des fragments. Les groupements phosphates confèrent à l'ADN une charge globale négative. L'ADN migre donc vers l'électrode positive dans un champ électrique. Le rapport entre la charge et la masse des molécules d'ADN étant constant, il est nécessaire de réaliser cette électrophorèse dans un gel d'agarose pour séparer les molécules suivant leur taille, les pores du gel limitant la migration. Dès lors, la vitesse de migration des acides nucléiques dans le gel dépend des quatre facteurs suivants :

- Le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. En cas de voltage trop important, la résolution diminue.
- La concentration en agarose. Les gels à haute concentration (1.5-2 %) permettent de séparer des molécules d'ADN de petite taille (100-1500 paires de bases). Les gels à faible concentration (0.8-1 %) permettent de séparer des molécules de tailles supérieures (500 paires de bases à plus de 10 kilobases).
- Le poids moléculaire des fragments d'ADN. Les molécules d'ADN double brin linéaires migrent à vitesse inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.
- La conformation de l'ADN. S'il est superenroulé, circulaire ou linéaire, il freine plus ou moins son déplacement au sein du gel (figure 2.3.). Les formes plasmidiques superenroulées ou CCC ("Completely Closed Circular"), circulaires cassées sur un seul brin ou OC ("Open Circular") et OL ("Open Linear") migrent à des vitesses différentes. La mobilité relative de ces bandes dépend de différents facteurs et notamment des tours de superhélicité de la forme CCC; l'ordre de succession du plus mobile au plus lent sera CCC, OL et OC.

Le repérage des bandes se fera sous ultra-violet (UV, longueur d'onde=302 nm). Le BrEt a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN et permet de repérer les bandes d'ADN car il fluoresce rose-orange sous UV.



**Solution 7 : Tampon TBE (Tris borate EDTA) 10 fois concentré**

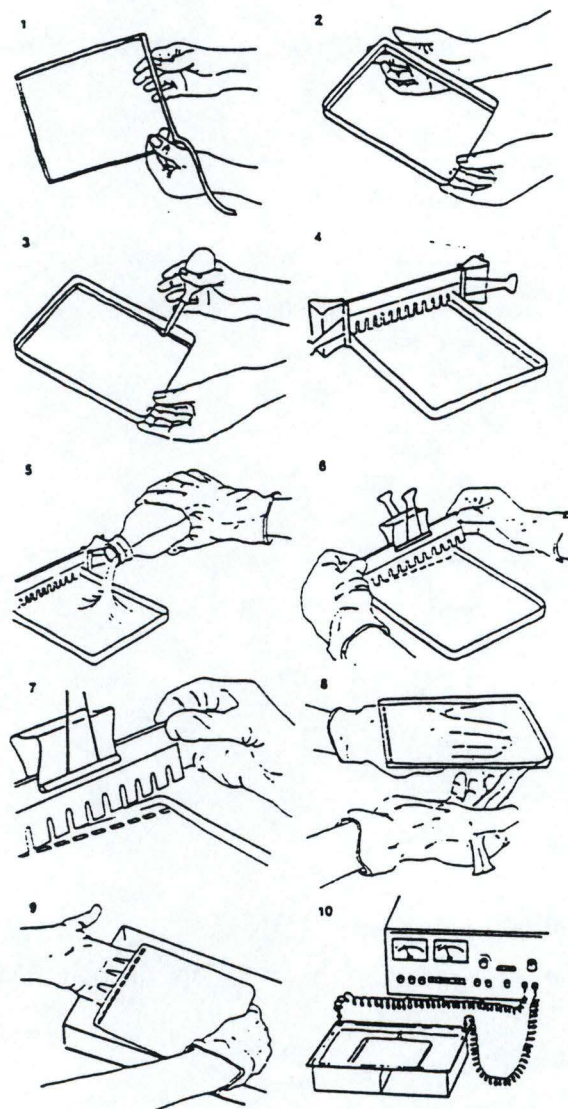
- Tris (Boehringer) 108 g
- Acide borique (Merck) 55 g
- EDTA 9.3 g

Porter à 1 l avec de l'eau bidistillée

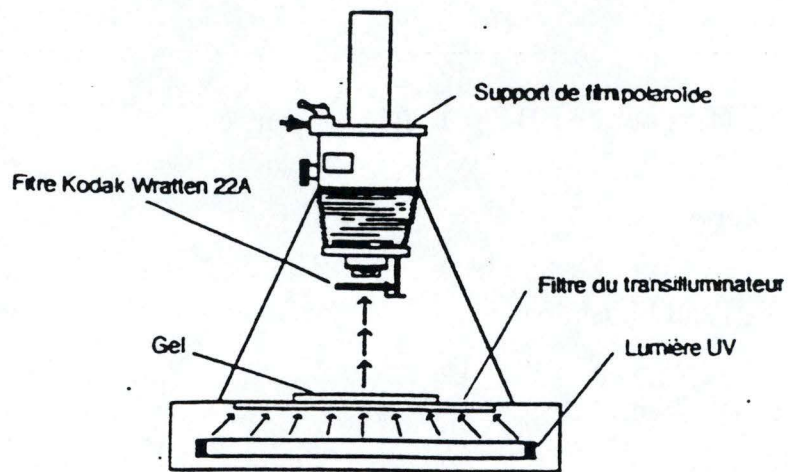
**Solution 8 : Tampon d'échantillons ADN**

- Bleu de bromophénol 25 mg
- EDTA 1M 0.5 ml
- Glycérol 5 ml

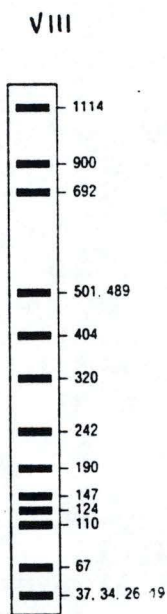
Porter à 10 ml avec de l'eau bidistillée



**Figure 2.4. :** Coulage d'un gel d'agarose horizontal.



**Figure 2.5.** : Photographie d'un gel d'agarose sous trans-illumination UV.



**Figure 2.6.** : Marqueur de poids moléculaire ADN.

VIII : Marqueur n°VIII de Boehringer Mannheim (ADN du pUCBM21 digéré par *Hpa* II, *Dra* I et *Hind* III).



### 6.2. Protocole

- Ajouter l'agarose à du TBE (solution 7) et chauffer jusqu'à obtention d'un liquide clair,
- Laisser refroidir à 65°C,
- Couler le gel encore liquide dans un moule sur lequel on a placé un peigne permettant de former des puits dans le gel refroidi et solidifié (figure 2.4.) et y ajouter du BrEt à 1 mg/ml. La taille des dents du peigne est choisie selon le volume des échantillons à déposer sur gel,
- Quand le gel est solidifié, retirer le peigne et introduire l'échantillon d'ADN alourdi par l'adjonction de 1/10 du volume final de tampon d'échantillon d'ADN (solution 8) dans un des puits. Le bleu de bromophénol qui migre à la même vitesse que les plus petits fragments visibles sur le gel permet de contrôler la migration,
- Appliquer une différence de potentiel de 80 volts aux extrémités de la cuve pendant 30 minutes à 1 heure,
- Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur UV pour visualiser les bandes d'ADN. Il est possible de photographier ce gel avec un appareil Polaroid MP4 Land Camera équipé d'un film Polaroid 667 Prof Iso 3000/36°, d'un filtre Kodak Wratten numéro 22 et réglé sur un quart de seconde d'exposition et 8 d'ouverture (figure 2.5.).

Deux évaluations peuvent être faites :

- La taille des fragments. Dans un des puits du gel, on place un standard de poids moléculaire qui est une molécule d'ADN coupée par une enzyme de restriction générant des fragments de taille connue. La figure 2.6. montre le résultat de la migration du marqueur que nous avons utilisé.
- La quantité d'ADN. La fluorescence étant proportionnelle à la quantité de BrEt intercalé dans l'ADN, elle sera d'autant plus intense que les fragments d'ADN d'une bande sont grands et nombreux. La quantité d'ADN du marqueur étant connue, il sera facile d'estimer par comparaison la quantité d'ADN de l'échantillon étudié.

### **Solution 9 : Phénol/chloroforme**

1. Saturer le phénol (Merck) au TEN (solution 10). Ajouter un volume de phénol à un volume de TEN. Mélanger et centrifuger, éliminer la phase supérieure et recommencer jusqu'à ce que le pH du mélange soit supérieur à 7.8.
2. Ajouter à ce mélange un volume de chloroforme et 1/24 volume d'alcool isoamylique (UCB).

### **Solution 10 : TEN**

- Tris-HCl pH 8	10 mM
- EDTA	1 mM
- NaCl	10 mM



## **7. Purification du produit RT-PCR**

Pour la suite des manipulations, il est important de purifier l'ADN résultant de la RT-PCR. Plusieurs méthodes sont à notre disposition :

### **7.1. Extraction au phénol/chloroforme**

#### 7.1.1. Principe

L'extraction au phénol, qui dénature efficacement les protéines comme la polymérase et dissout les protéines dénaturées, est utilisée pour déprotéiniser une solution d'ADN. Le chloroforme dénature aussi les protéines.

#### 7.1.2. Protocole

- Ajouter 4.5 volumes d'eau bidistillée au reste de la RT-PCR,
- Additionner à ce mélange un volume de phénol/chloroforme (solution 9),
- Agiter et centrifuger 5 minutes à 13000 RPM,
- Récupérer la phase aqueuse supérieure.

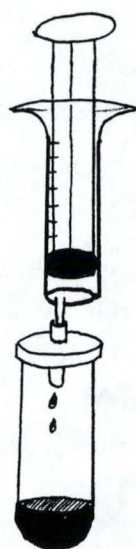
### **7.2. Précipitation à l'éthanol**

#### 7.2.1. Principe

En présence de concentrations relativement élevées de cations monovalents, l'éthanol induit une transition structurale dans les molécules d'acide nucléique qui les fait s'agréger et précipiter en solution. Comme la plupart des sels et des petites molécules organiques sont solubles dans l'éthanol 70 %, la précipitation de l'éthanol et le lavage du culot désaleront effectivement l'ADN.

#### 7.2.2. Protocole

- Ajouter 1/10 du volume en acétate de sodium 3M pH 4.8 (porté à pH avec de l'acide acétique 99-100 % (UCB)),



**Figure 2.7.** : Représentation schématique du montage pour Wizard PCR Preps.



- Rajouter 2.5 volumes en éthanol 100 % froid,
- Laisser précipiter 1/4 à 1/2 heure à -70°C,
- Centrifuger 20 minutes à 13000 RPM,
- Enlever le surnageant,
- Laver avec 500  $\mu$ l d'éthanol 70 % froid,
- Centrifuger 10 minutes à 13000 RPM,
- Enlever le surnageant,
- Sécher sous vide.

### 7.3. Wizard PCR Preps DNA Purification System

La méthode du Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) permet d'éliminer les molécules indésirables qui peuvent encore subsister après les traitements au phénol/chloroforme et à l'éthanol. Une des solutions utilisées contient entre autres de la guanidine qui permet de dénaturer les protéines. Cette méthode utilise une résine où s'adsorbent réversiblement les acides nucléiques.

- Resuspendre le culot dans 100  $\mu$ l d'eau bidistillée,
- Ajouter 100  $\mu$ l de buffer direct purification et 1 ml de magic PCR DNA resin,
- Agiter 3 fois sur une minute,
- Sur un eppendorf déposer une mini-colonne, elle-même reliée à une seringue (figure 2.7.),
- Déposer le mélange dans la seringue,
- Faire passer doucement sur la mini-colonne,
- Laver avec 2 ml d'isopropanol 80 %,
- Disposer la mini colonne sur un eppendorf et centrifuger pour éliminer le reste d'isopropanol,
- Mettre la mini-colonne sur un autre eppendorf,
- Ajouter 50  $\mu$ l d'eau bidistillée,
- Laisser incuber 5 minutes à température ambiante,
- Centrifuger quelques secondes à 13000 RPM, on récupère ainsi l'ADN purifié dans l'eppendorf,
- Stocker à -20°C.

## 8. Isolement et purification d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose

Certaines amplifications par RT-PCR peuvent générer de multiples bandes. Deux méthodes permettent d'isoler sur un gel la bande d'intérêt.

### 8.1. GeneClean II

Ce kit GeneClean II (Westburg) utilise une résine (Glass-milk) sur laquelle s'adsorbent réversiblement les acides nucléiques.

- Faire migrer à 80 volts l'échantillon sur un gel d'agarose jusqu'à séparation des différentes bandes,
- Récupérer la bande d'intérêt et la peser,
- En considérant qu'un gramme correspond à 1 ml, ajouter 1/2 volume de TBE Modifier et 4.5 volumes de NaI,
- Incuber dans un bain à 55°C jusqu'à dissolution du gel,
- Ajouter 10  $\mu$ l de la solution de Glass-milk si la quantité d'ADN est inférieure à 5  $\mu$ g ou 20  $\mu$ l si la quantité d'ADN est supérieure à 5  $\mu$ g,
- Mélanger et laisser incuber 30 minutes sur glace en mélangeant toutes les 5 minutes,
- Centrifuger quelques secondes à 13000 RPM pour éliminer le surnageant,
- Laver 3 fois avec la solution New préparée avec 7 ml de New Wash, 165 ml d'éthanol absolu et 140 ml d'eau distillée :
  - Resuspendre le culot dans 10 à 50 volumes de solution New,
  - Centrifuger quelques secondes à 13000 RPM et éliminer le surnageant,
- Eluer 2 fois l'ADN du Glass-milk :
  - Resuspendre le culot dans 15  $\mu$ l d'eau bidistillée,
  - Incuber 2 à 3 minutes à 55°C,
  - Centrifuger quelques secondes à 13000 RPM et récupérer le surnageant,
- Stocker à -20°C.



**Solution 11 : Solution d'élution "High Salt Buffer"**

- Tris.Cl 1M pH 7.5 2 ml
- EDTA 0.5M 200  $\mu$ l
- NaCl 5M 30 ml

Porter à 100 ml avec de l'eau bidistillée

## 8.2. Récupération par "papiers" (Electrophorèse sur DEAE cellulose) (Dretzen *et al.*, 1981)

- Faire migrer l'échantillon sur gel d'agarose à 80 volts jusqu'à séparation des différentes bandes,
- Inciser au-dessus et en-dessous de la bande d'intérêt. Insérer dans ces deux fentes du papier Whatman traité de la manière suivante :
  - Laisser tremper des morceaux de papier Whatman DE81 pendant 3 heures dans du NaCl 2.5M (Merck),
  - Laver ces papiers plusieurs fois à l'eau,
  - Les conserver dans de l'EDTA 1 mM à 4°C,
- Relancer l'électrophorèse pour permettre à la bande d'entrer dans le papier (vérifier la fluorescence des papiers sous UV),
- Récupérer les papiers et les rincer dans de l'eau glacée pour éliminer le tampon d'électrophorèse,
- Sécher les papiers sur du papier Whatman 1 Chr,
- Les placer dans un eppendorf,
- Ajouter 400  $\mu$ l de High Salt Buffer (solution 11),
- Mettre 2 heures à 37°C en mélangeant quelques fois afin d'obtenir une pâte, les anions du sel vont ainsi déplacer l'ADN du papier vers la solution,
- Percer le fond de l'eppendorf avec une épingle chauffée et le placer sur un second eppendorf,
- Centrifuger les deux tubes dans cette disposition 5 minutes à 13000 RPM, la solution contenant l'ADN passe ainsi dans le deuxième eppendorf alors que le papier reste dans le premier eppendorf,
- Ajouter au surnageant 1 ml de butanol (Lamers et Pleuger) saturé en eau,
- Agiter et centrifuger 2 minutes à 13000 RPM,
- Eliminer la phase supérieure (le butanol permet d'extraire le BrEt),
- Ajouter 1 ml d'éthanol absolu,
- Mélanger et laisser précipiter 20 minutes à -70°C,
- Centrifuger 20 minutes à 13000 RPM,
- Eliminer le surnageant,
- Laver 2 fois le culot avec 500  $\mu$ l d'éthanol 70%,
- Centrifuger 10 minutes à 13000 RPM,
- Enlever le surnageant,
- Sécher sous vide,



- Resuspendre le culot dans 10  $\mu$ l d'eau bidistillée,
- Stocker à -20°C.

## 9. Séquençage direct d'un produit RT-PCR

### 9.1. Principe

La méthode enzymatique de séquençage est basée sur la capacité qu'une ADN polymérase a d'allonger l'oligo hybridé à la matrice qui doit être séquencée, jusqu'à ce qu'un nucléotide de terminaison de chaîne soit incorporé. Chaque détermination de séquence est réalisée comme un ensemble de 4 réactions séparées, chacune contenant les 4 déoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) avec une quantité limitée d'un didéoxyribonucléotide triphosphate différent (ddNTP). Les ddNTP ne possédant pas le groupe 3'-OH nécessaire pour l'élongation de la chaîne, l'oligo en croissance est terminé sélectivement à G, A, T ou C selon le ddNTP présent dans la réaction.

Les fragments résultants, chacun avec une origine commune, mais se terminant par un nucléotide différent, sont séparés selon la taille par un gel d'électrophorèse dénaturant à haute résolution.

L'incorporation d'un élément radioactif ( $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ) dans la chaîne oligonucléotidique permet la visualisation du produit de séquençage par autoradiographie.

Nous avons utilisé un cycleur thermique qui offre plusieurs avantages par rapport aux stratégies de séquençage classiques :

- On pratique une amplification linéaire de la matrice d'ADN réduisant ainsi la quantité d'ADN requise, ce qui minimise les impuretés et donc réduit la quantité d'ADN à préparer.
- La haute température utilisée pendant chaque cycle de dénaturation permet de ne pas passer par les étapes de dénaturation alcaline et de précipitation à l'éthanol. Les cycles de dénaturation évitent les problèmes de re liaison rapide des simples brins d'ADN entre eux.
- Les hautes températures d'hybridation augmentent l'efficacité de la liaison de l'oligo.

- La haute température de polymérisation diminue les structures secondaires des matrices d'ADN et donc permet la polymérisation dans des régions hautement structurées.

L'amplification linéaire est donc une variation de la PCR. Il existe 3 différences principales entre cette technique de séquençage et l'amplification par PCR :

- La présence d'un seul oligo utilisé pour amorcer la synthèse d'un brin d'ADN. On obtient ainsi une augmentation du signal généré pendant la réaction.
- La présence de didéoxynucléotide triphosphates qui créent les terminaisons bases spécifiques.
- L'ajout d'un nucléotide triphosphate radioactif qui est incorporé dans le brin d'ADN en croissance.

En général, des oligos longs ou ayant un contenu important en GC donnent des artéfacts. Des résultats optimaux sont obtenus en utilisant des oligos de minimum 24mer qui ont approximativement 50 % de GC.

## 9.2. Protocoles

### 9.2.1. Réaction de séquençage

Deux kits sont à notre disposition :

#### **A. *fmol* DNA Sequencing System**

##### **A.1. Principe**

Le kit *fmol* DNA Sequencing System (Promega) utilise les propriétés d'une ADN polymérase isolée à partir de *Thermus aquaticus*. Cette enzyme, appelée ADN polymérase *Taq*, est encore fonctionnelle à 95°C. Elle est a été modifiée par Promega pour donner de meilleurs résultats sur des matrices d'ADN double brin (Sequencing Grade *Taq*). Elle réplique l'ADN à 70°C. La préparation est exempte de toute activité exonucléasique et est débarrassée des nucléases non spécifiques ainsi que des endonucléases *TaqI*.



## Matériel & Méthodes

Ce kit propose 2 protocoles pour séquencer de l'ADN : l'incorporation directe de l'élément radioactif et l'utilisation de l'oligo marqué en position 5'-terminale par une T4 kinase. Les avantages du  $^{35}\text{S}$  sont souvent préférés à ceux du  $^{32}\text{P}$ . La faible énergie de ce radio-isotope du soufre permet une meilleure résolution des bandes, réduit l'exposition aux émissions radioactives et les dommages au niveau de l'ADN et permet le stockage sans perte significative de l'activité de l'isotope au cours du temps. Malheureusement, le séquençage avec un oligo marqué au  $^{35}\text{S}$  en position terminale demande une plus longue exposition autoradiographique (4-5 jours) et plus de matrice. Promega recommande plutôt d'utiliser la méthode d'incorporation directe. Ce protocole donne une meilleure incorporation et ainsi une exposition de 12 heures suffit. C'est cette dernière solution que nous avons choisi.

Le *fmol* DNA Sequencing System contient des mélanges de nucléotides deaza. Ceux-ci résolvent les compressions de bandes associées avec des régions riches en GC.

### **A.2. Protocole pour l'incorporation directe du $^{35}\text{S}$**

Pour chaque réaction de séquençage,

- Préparer 4 eppendorfs PCR A, C, G, T. Y ajouter 2  $\mu\text{l}$  du d/ddNTP correspondant et stocker sur glace,
- Mélanger les réactifs suivants dans un autre eppendorf :

ADN	40 femtomoles
Oligo	3 picomoles
$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ (>1000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
Tampon 5 fois concentré de séquençage <i>fmol</i>	5 $\mu\text{l}$
- Porter à 16  $\mu\text{l}$  avec de l'eau stérile,
- Ajouter 1  $\mu\text{l}$  d'ADN polymérase Sequencing Grade *Taq* (5 unités/ $\mu\text{l}$ ) à ce mélange,
- Répartir 4  $\mu\text{l}$  de ce mélange dans chaque eppendorf PCR,
- Recouvrir d'huile minérale,
- Placer les tubes dans un cycleur thermique préchauffé à 95°C.

## Matériel & Méthodes

Deux profils de réaction sont de nouveau proposé selon la longueur de l'oligo. Si l'oligo fait moins de 24 bases :

95°C pendant 2 minutes,

30 cycles composé de :

- dénaturation : 95°C pendant 30 secondes,
- hybridation : 42°C pendant 30 secondes,
- extension : 70°C pendant 1 minute.

Si l'oligo fait 24 bases ou plus :

95°C pendant 2 minutes,

30 cycles composé de :

- dénaturation : 95°C pendant 2 minutes,
- hybridation/extension : 70°C pendant 30 secondes.

Quand la réaction est terminée, ajouter 3  $\mu$ l de solution stop dans chaque eppendorf PCR et stocker à -20°C.

Remarque : Le nombre de nanogrammes équivalent à 1 femtomole d'ADN double brin est calculé par la formule suivante :

$$1 \text{ femtomole} = (6.6 \times 10^4 \text{ ng}) \times n$$

où n est le nombre de paires de bases dans la matrice d'ADN.

### **B. Cyclist Exo<sup>-</sup> Pfu DNA Sequencing Kit**

#### ***B.1. Préparation de la matrice***

Si sur un gel d'agarose, le produit RT-PCR ne donne qu'une bande et que l'on veut le séquencer avec le kit Cyclist Exo<sup>-</sup> Pfu (Stratagene), on peut le purifier selon la méthode indiquée dans ce kit :

- A 25  $\mu$ l du produit RT-PCR, ajouter 25  $\mu$ l d'acétate d'ammonium (UCB) 5M et 50  $\mu$ l d'alcool isopropylique (UCB),
- Incuber 10 minutes à température ambiante,
- Centrifuger 15 minutes à 13000 RPM,
- Enlever le surnageant et sécher sous vide,
- Resuspendre dans 25  $\mu$ l de 5 mM Tris-HCl (pH 8) et 0.1 mM EDTA,
- Stocker à -20°C.



## Matériel & Méthodes

### B.2. Protocole

Pour chaque réaction de séquençage,

- Préparer 4 eppendorfs PCR A, C, G, T, y mettre 3  $\mu\text{l}$  du ddNTP correspondant et garder sur glace,
- Combiner les composants suivants dans un autre eppendorf sur glace :

Matrice	200 femtomoles
Oligo	1 picomole
Tampon 10 fois concentré de séquençage Cyclist	4 $\mu\text{l}$
[ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ] dATP (>1000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )	10 $\mu\text{Curies}$
Exo <i>Pfu</i> ADN polymérase	1 $\mu\text{l}$ (2.5 unités)
- Porter à 26  $\mu\text{l}$  avec de l'eau stérile
- DMSO (diméthylsulfoxyde) 4  $\mu\text{l}$
- Aliquoter 7  $\mu\text{l}$  du mélange dans chaque eppendorf PCR,
- Recouvrir d'huile minérale.

Cette réaction de séquençage se fait selon le cycle suivant :

dénaturation initiale	95°C pendant 5 minutes,
30 fois : dénaturation	95°C pendant 30 secondes,
hybridation	température d'hybridation définie pour la RT-PCR pendant 30 secondes,
extension	72°C pendant 60 secondes.

Quand la réaction est terminée, ajouter 5  $\mu\text{l}$  de solution stop et stocker à -20°C.

- Remarques : - Il est important d'ajouter le DMSO en dernier pour éviter la précipitation et pour bien mélanger tous les composants de la réaction avant d'aliquoter dans les eppendorfs PCR.
- Quand on séquence des petits fragments PCR (inférieurs à 500 paires de bases), Stratagene recommande d'utiliser 5  $\mu\text{l}$  de ddNTP dans chaque eppendorf PCR. Ceci augmente la concentration en ddNTP dans la réaction de séquençage. Le volume final du mélange doit être ajusté à 22  $\mu\text{l}$ ; 5  $\mu\text{l}$  de ce mélange sont alors ajoutés dans chaque eppendorf PCR.

**Solution 12 : Gel d'acrylamide**

- Solution acrylamide/bis 30 % (solution 13) 15 ml
- TBE 10 fois concentré (solution 7) 10 ml
- Urée (Merck) 42 g

Porter à 100 ml avec de l'eau bidistillée

Filtrer par pompe à eau sur filtre de 0.45  $\mu\text{m}$  (Gelman-Sciences)

- Persulfate d'ammonium 10 % (Merck) 600  $\mu\text{l}$
- N, N, N', N'-Tétraméthyl-éthylendiamine 25  $\mu\text{l}$   
(temed) (Merck)

**Solution 13 : Solution d'acrylamide/bis 30 %**

- Acrylamide (Gibco) 29 g
- N, N' méthylène-bis-acrylamide (Gibco) 1 g

Porter à 100 ml avec de l'eau bidistillée



### 9.2.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

#### **A. Montage des plaques**

- Laver successivement les deux plaques de verre à l'eau bidistillée puis au norvanol (Vel). Siliconer les faces en contact avec le gel avec 10 ml de Repel-Silane (Pharmacia Biotech) et laisser sécher,
- Déposer les "spacers" sur la plus grande des deux plaques et appliquer la petite plaque sur les "spacers",
- Coller du papier adhésif (Gibco) à la jonction des deux plaques.

#### **B. Coulage du gel**

- Aspirer le gel d'acrylamide (solution 12) avec une seringue et le couler entre les deux plaques,
- Serrer les deux plaques avec des pinces et laisser polymériser pendant une à deux heures.

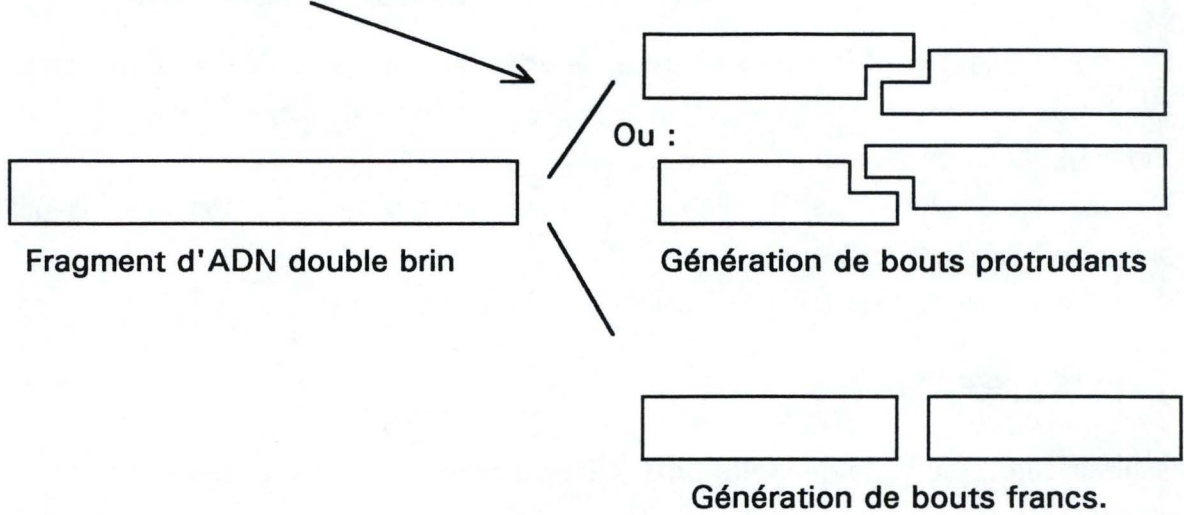
#### **C. Migration**

- Retirer le papier adhésif et installer les plaques dans la cuve (BRL modèle S2) et couler du tampon TBE 1 fois concentré de telle sorte que celui-ci baigne le haut et le bas du gel,
- Faire chauffer le gel pendant 30 minutes (prérin) avec une puissance de 65 watts et une tension de 1350 volts,
- Après avoir arrêté la source de tension, placer les peignes et nettoyer les puits pour enlever l'urée, les bulles et les impuretés,
- Chauffer les échantillons (4 eppendorfs : A C G T) 3 minutes à 90°C pour permettre la séparation du double brin d'ADN,
- Déposer 3  $\mu$ l d'échantillon de chaque eppendorf par puit,
- Rebrancher la source de tension et laisser migrer l'échantillon pendant 1 heure ou plus.

#### **D. Révélation**

- Après migration, recueillir le gel sur une des deux plaques de verre. Le faire tremper dans un mélange acide acétique 10 %-méthanol 10 % (Vel) pendant 10 minutes afin

Action d'une enzyme de restriction



**Figure 2.8.** : Représentation schématique des types de coupures engendrées par les enzymes de restriction.



- d'empêcher les bandes de diffuser dans le gel et de retirer le maximum d'urée,
- Transférer le gel sur un papier buvard Whatman 17 Chr et le couvrir d'un film plastique,
  - Sécher sous vide pendant 1 heure ou plus à 80°C,
  - Placer le gel adhérent au buvard et débarassé du film plastique dans une cassette à autoradiographie avec un film autoradiographique (Fuji 35x43 cm) et laisser impressionner pendant un temps qui varie selon l'isotope radioactif utilisé,
  - Retirer le film de la cassette, le plonger dans un bain révélateur (Kodak radio LX24) pendant 3 minutes, rincer à l'eau puis passer le film révélé dans un bain de fixateur (Kodak radio AL4) durant 15 minutes,
  - Rincer abondamment le film avec de l'eau et sécher.

## 10. Restriction

### 10.1. Principe

Les enzymes de restriction peuvent couper avec précision de l'ADN en reconnaissant des séquences spécifiques. La plupart des enzymes de restriction ont une séquence de reconnaissance palindromique de 4 à 6 paires de bases. Il y a deux types d'enzymes, celles qui coupent au centre de cette séquence générant des bouts francs ou celles qui coupent à quelques nucléotides de distance générant, elles, des bouts protrudants (figure 2.8.). C'est ce dernier type d'enzyme que nous avons utilisé.

### 10.2. Protocole

- Déposer l'ADN à restreindre dans un eppendorf de 1.5 ml,
- Ajouter du tampon de restriction 10 fois concentré pour que le mélange final soit à une concentration en tampon une fois concentré,
- Introduire 1 à 10 unités d'enzyme de restriction pour 1 µg d'ADN,
- Porter à volume avec de l'eau,
- Incuber 2 heures à 37°C,
- La réaction peut être arrêtée en inactivant l'enzyme soit par chauffage pendant 15 minutes à 65°C ou à 85°C si elle est thermosensible, sinon par extraction au phénol,
- Stocker à -20°C.

## 11. Analyse assistée par ordinateur des séquences d'ADN et de protéines

Les séquences nucléotidiques lues à partir des autoradiogrammes sont analysées par le programme DNA Strider 1.2. Le logiciel GelAssemble (Sequence Analysis Software Package, Genetic Computer Group version 8.0 (GCG)) a été utilisé pour positionner les séquences déterminées les unes par rapport aux autres, il établit un consensus recouvrant ces séquences.

Les séquences nucléotidiques et protéiques qui ont été comparées dans ce travail ont été importées de la banque compilée de séquences nucléotidiques GenEMBL (GenBank, version 84.0 et EMBL, version 39.0).

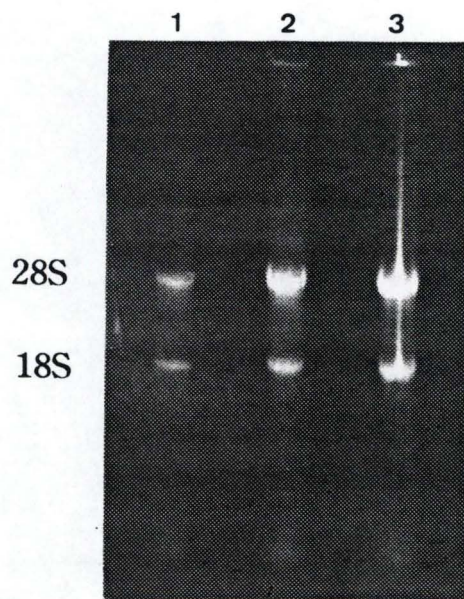
L'alignement des séquences nucléotidiques et protéiques a été réalisé avec le programme PileUp (GCG) dont les valeurs de paramètres par défaut ont été choisies. L'algorithme utilisé est l'UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) pour le calcul d'un arbre. Les alignements de paires de séquences sont calculés par l'algorithme de Needleman et Wunsch.

Après alignement, le programme Distances (GCG) a été utilisé. Le paramètre "Uncorrected Distance" a été choisi.

Un arbre évolutif a pu être dressé selon la méthode "Neighbor-Joining" (GCG). Cette méthode permet de calculer un arbre d'évolution minimale pour une série de séquences alignées.



# *Résultats*



**Figure 3.1.** : Electrophorèse en gel d'agarose 1 % représentant les ARN ribosomiaux 18S et 28S des cellules infectées par les souches Dorset, BovX et 87-13956.

Piste 1 : Souche Dorset

Piste 2 : Souche BovX

Piste 3 : Souche 87-13956.



### 1. Souches cultivées

Des cellules Vero ou CTV ont été infectées au laboratoire par Karl Walravens avec les souches Dorset, BovX et 87-13956 du virus BRSV. Ce seront les trois souches que nous manipulerons. Ainsi, de 5 à 10 millions de cellules infectées sont récoltées après culture et nous servent de source d'ARN.

### 2. Extraction de l'ARN total des cellules infectées par le BRSV

La méthode d'extraction par Ultraspec nous a permis d'isoler l'ARN total des cellules infectées contenant entre autres l'ARN génomique viral. Nous avons traité à chaque préparation un culot cellulaire de 5 à 10 millions de cellules infectées avec 1 ml d'Ultraspec. L'ARN isolé est resuspendu dans 20  $\mu$ l d'eau.

#### 2.1. Quantification de l'ARN isolé

L'ARN a été quantifié par mesure d'absorption spectrophotométrique à 260 nm. Pour ce faire, un aliquote d'ARN est dilué de 25 à 50 fois. Les concentrations obtenues sont de l'ordre de 0.32 à 4.5  $\mu$ g d'ARN par  $\mu$ l, soit un rendement de 10 à 100  $\mu$ g pour 5 à 10 millions de cellules.

#### 2.2. Contrôle de qualité de l'ARN isolé

Un vingtième du volume d'isolat (soit 1  $\mu$ l) est alors déposé sur un gel "ARN" 1% en agarose. L'ARN total est séparé par électrophorèse à 70 volts en présence de BrEt. L'observation sous UV nous assure de la faible dégradation de notre préparation par la présence et l'intensité de deux bandes d'ARN majoritaires, correspondant aux ARN ribosomiaux 28S et 18S des cellules infectées (Figure 3.1.). La fluorescence diffuse observée dans la partie inférieure du gel correspond à de l'ARN dégradé lors des étapes précoces de l'extraction. Les traînées signalent la présence d'ARN de longueurs variables entre autres des ARNm cellulaires et de l'ARN viral.

A

Nom oligo	Séquence	T <sub>f</sub> (°C)	Sens	Zone d'hybridation sur le brin codant de la séquence de G de la souche A51908 (en nucléotides à partir de l'ATG jusqu'au stop)
D1	5' CGGGATCCCCGACATGTACTGCAAGGCACA 3'	56	AS	510-528
OL3	5' GGGGATCCATGTCCAACCATAACCCAT 3'	52	S	1-21
OL5	5' CCGAATTCATGTCCAACCATAACCCAT 3'	52	S	1-21
34447	5' TGGGAAATGCTAAAGCC 3'	50	S	291-307
34446	5' TGTGCCTTGCAGTACATG 3'	54	S	510-527
D2	5' GGAATTCGATATTATATGGAGGTGTG 3'	52	AS	778-796
D3	5' CGGGATCCCCAAGGTAATCTTGCTTGC 3'	52	S	529-546
LB1	5' CCCCAAACCACACCCCA 3'	58	S	347-364
LB2	5' GGTTCTGTGGTAGATTGT 3'	52	AS	652-669
33916	5' GCTTGGCTTTAGCATT 3'	48	AS	295-311

B

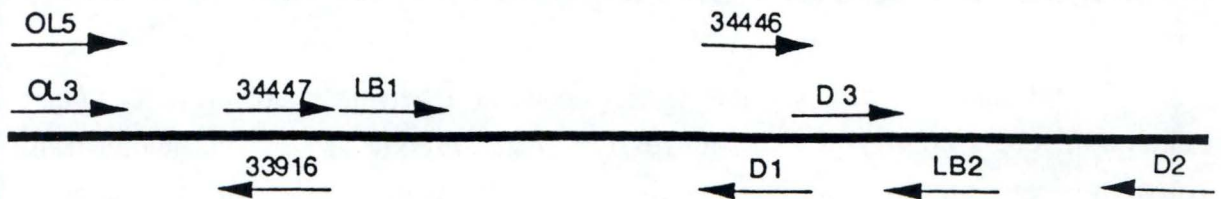


Tableau 3.1. : Caractéristiques des oligos utilisés.

A. AS : antisens

S : sens

Tous ces oligos ont été déterminés à partir de la séquence de la souche RB94 sauf les oligos LB1 et LB2 qui ont été définis à partir de la séquence de la souche BovX et l'oligo D2 qui a été déterminé à partir de la séquence de la souche A51908.

B. Schéma représentant la position des oligos sur le gène G.

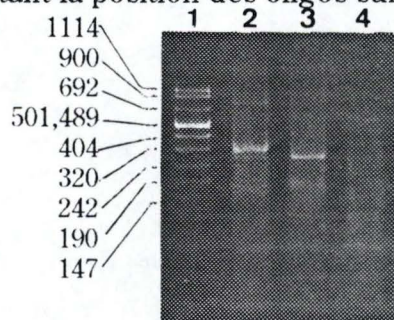


Figure 3.2. : Electrophorèse en gel d'agarose 2 % représentant l'amplification du gène G avec les oligos OL5 et D2.

Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire VIII

Piste 2 : Souche Dorset

Piste 3 : Souche BovX

Piste 4 : Souche 87-13956.



Pour pouvoir séquencer le gène G, il nous faut transformer l'ARN viral en ADN (ADNc) et l'amplifier pour en avoir des quantités suffisantes.

### 3. Amplification du gène codant pour la protéine G de trois souches du BRSV

La technique de RT-PCR a été choisie pour sa capacité à synthétiser une séquence d'ADN complémentaire à un brin d'ARN et à l'amplifier par PCR. La RT-PCR par hybridation d'oligos spécifiques au gène G va ainsi nous permettre d'obtenir de l'ADNc en grande quantité à partir de l'ARN total que nous avons isolé.

#### 3.1. Essai d'amplification du gène entier

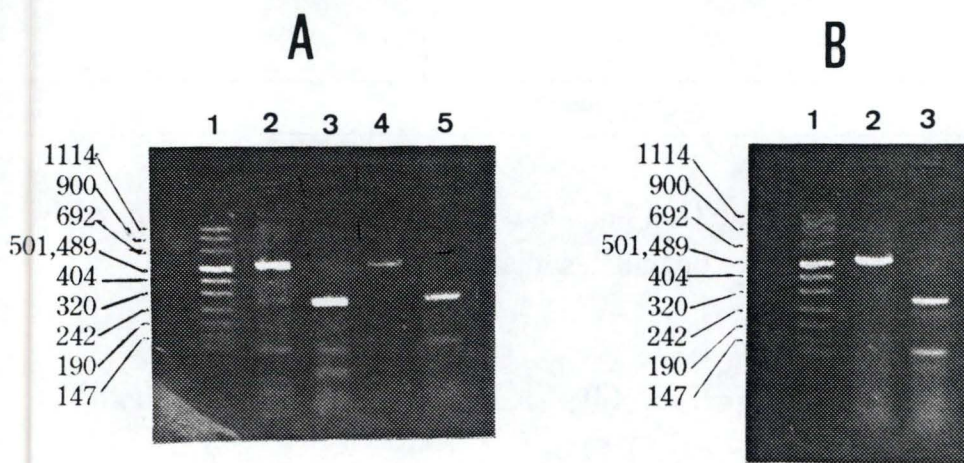
Les différents oligos utilisés dans ce travail sont décrits au tableau 3.1..

Initialement, nous avons envisagé d'amplifier le gène G entier des trois souches. Ainsi, l'oligo OL5 se positionnant sur l'ATG et l'oligo D2 s'hybridant sur les nucléotides 778 à 796 de la souche A51908 ont été choisis. Cinq microgrammes d'ARN ont été engagés dans la RT-PCR avec comme température d'hybridation 52°C. L'électrophorèse à 80 volts d'un dixième (10 µl) de ces réactions sur gel d'agarose 2 % a été réalisée (figure 3.2.). Elle a révélé pour la souche Dorset une bande à la taille attendue de 796 paires de bases mais en quantité trop faible et accompagnée d'une bande aspécifique plus intense correspondant à un fragment de plus ou moins 320 paires de bases. Pour la souche BovX, nous n'avons observé que des bandes aspécifiques alors que la souche 87-13956 n'a montré, elle, aucune amplification.

Nous avons alors changé de stratégie et décidé d'amplifier le gène en deux fragments grâce à deux couples d'oligos.

#### 3.2. Amplification du gène en deux parties

Cette tactique ayant déjà fait ses preuves sur les souches MVR553, NMK7 et 85-1330 séquencées au laboratoire, nous avons opté pour l'amplification du gène G en deux fragments, ceci nous facilitant par ailleurs le séquençage par la plus petite taille de ces



**Figure 3.3.** : Electrophorèses en gel d'agarose 2 % représentant les amplifications du gène G en 2 parties grâce aux couples d'oligos OL3+D1 et 34446+D2.

**A.** Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire VIII

Piste 2 : Souche Dorset amplifiée avec les oligos OL3 et D1

Piste 3 : Souche Dorset amplifiée avec les oligos 34446 et D2

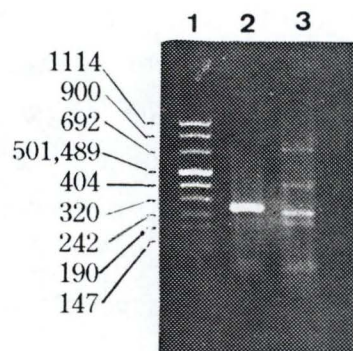
Piste 4 : Souche BovX amplifiée avec les oligos OL3 et D1

Piste 5 : Souche BovX amplifiée avec les oligos 34446 et D2

**B.** Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire VIII

Piste 2 : Souche 87-13956 amplifiée avec les oligos OL3 et D1

Piste 3 : Souche 87-13956 amplifiée avec les oligos 34446 et D2.



**Figure 3.4.** : Electrophorèse en gel d'agarose 2 % représentant l'amplification du gène G des souches Dorset et BovX par les oligos D3 et D2.

Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire VIII

Piste 2 : Souche Dorset

Piste 3 : Souche BovX.



## Résultats

fragments. Ainsi les oligos OL3 et D1 d'une part et 34446 avec D2 donnant respectivement des fragments de 528 et 287 paires de bases ont été testés sur 5 µg d'ARN des trois souches. La RT-PCR a été réalisée avec une température d'hybridation de 53°C. La figure 3.3. montre les résultats de la migration de 10 µl de chaque réaction sur gel d'agarose 2 %. Nous observons pour chaque amplification un fragment plus intense à la taille attendue et parfois des fragments aspécifiques.

L'oligo D3 peut aussi être utilisé, à la place de l'oligo 34446, avec l'oligo D2. La première base de cet oligo s'hybride 2 bases plus loin que la dernière base de l'oligo 34446. L'oligo D3 a été synthétisé afin de permettre le clonage, l'oligo 34446 ne comportant, lui, pas de sites de restriction. L'amplification D3+D2 a ainsi été réalisée sur 5 µg des souches Dorset et BovX avec une température d'hybridation de 52°C. La figure 3.4. présente le résultat de l'électrophorèse de 10 µl de ces réactions. Pour la souche Dorset, l'essai est concluant. On constate une bande attendue à plus ou moins 300 paires de bases, la souche BovX ne montrant que des fragments aspécifiques. L'oligo D3 a donc été uniquement utilisé pour la souche Dorset.

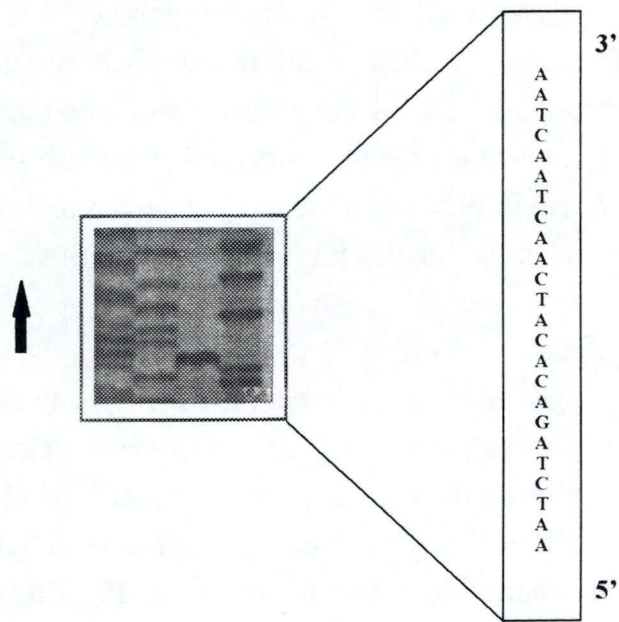
Nous disposons à présent, pour chaque souche, de deux fragments représentant ensemble le gène G entier. Nous pouvons maintenant passer aux différentes étapes de purification. Une double extraction au phénol a d'abord été réalisée suivi d'une précipitation à l'éthanol et d'un Wizard PCR Preps DNA Purification System. En ce qui concerne les amplifications aspécifiques, le fragment correspondant à la bonne amplification a été récupéré par papiers ou par GeneClean II.

## 4. Séquençage direct des deux fragments

Après les différentes étapes de purification, l'ADN a été séquencé. Deux kits ont été utilisés : le kit *fmol* DNA Sequencing System et le kit Cyclist Exo-*Pfu* DNA Sequencing System.

### 4.1. *fmol* DNA Sequencing System

Le kit *fmol* DNA Sequencing System a été le premier kit que nous avons utilisé pour séquencer l'ADN des trois souches. Plusieurs tentatives ont échoué (résultats non montrés). Ce kit nous a permis, par incorporation directe du <sup>35</sup>S, d'obtenir la séquence



**Figure 3.5.** : Exemple de lecture d'un film photo sur le séquençage du fragment amplifié par les oligos 34446 et D2 du gène G de la souche Dorset.



## Résultats

du nucléotide 682 à 774 du fragment amplifié par les oligos 34446 et D2 de la souche Dorset. La figure 3.5. montre un exemple de lecture réalisé sur cette amplification. Ceci a été rendu possible par l'augmentation de la quantité d'ADN requise (200 femtomoles au lieu de 40 femtomoles ce qui équivaut à 40 ng) et le nombre de cycles (40 au lieu de 30). Cette réaction de séquençage a été réalisée avec l'oligo 34446 selon le protocole appliqué aux oligos faisant moins de 24 bases. Quatre microlitres de chaque eppendorf pour PCR, désignés A, C, G, T ont été engagés en électrophorèse, sous un voltage de 1.35 kilovolts et une puissance de 65 watts, sur un gel 6 % en acrylamide. La migration a duré 1 heure 30. Ce gel, après séchage, a été placé en cassette d'autoradiographie afin d'impressionner un film photo pendant quelques jours. La révélation de ce film faite, la lecture nous a donc permis de lire une centaine de bases jusqu'au stop de traduction.

Vu le faible rendement obtenu avec ce kit et les modifications que nous avons dû y apporter pour obtenir un seul résultat, nous avons alors utilisé le kit Cyclist Exo<sup>-</sup>Pfu DNA Sequencing System. Le mélange réactionnel de ce kit est à une concentration de 10 mM en KCl alors que les kits classiques, comme le kit *fmol* DNA Sequencing System, basés sur l'utilisation de la *Taq* polymérase nécessite une concentration en KCl de 60 mM. Pour cette raison, les températures d'hybridation ne requièrent que peu d'ajustement pour maximiser la réaction de polymérisation avec l'enzyme Exo<sup>-</sup>Pfu DNA polymérase.

### 4.2. Cyclist Exo<sup>-</sup>Pfu DNA Sequencing System

Le kit Cyclist Exo<sup>-</sup>Pfu DNA Sequencing System par utilisation du <sup>35</sup>S a été notre principal outil pour séquencer le gène G des souches BovX, Dorset et 87-13956.

Pour cela, 200 femtomoles de chaque fragment ont été séquencés selon le protocole approprié, ce dernier différant selon la longueur du fragment (plus ou moins de 500 paires de bases). Différents temps de migration appliqués à 4  $\mu$ l de chaque tube pour PCR désignés A, C, G, T sur gel 6 % en acrylamide ont été choisis. Les gels ont ensuite été séchés puis mis en cassette pour autoradiographie afin d'impressionner un film photo pendant quelques jours. Ensuite, le gel a été révélé afin de permettre la lecture.



### 4.2.1. Séquençage des souches BovX et Dorset

Nous avons ainsi séquencé les 2 fragments amplifiés avec les oligos OL3+D1 et 34446+D2 et D3+D2. Nous avons essayé de séquencer avec chacun de ces cinq oligos.

Un temps de migration de 1 heure 30 a d'abord été choisi. Il s'est avéré que les oligos sens c'est-à-dire les oligos OL3, 34446 et D3 donnent des résultats nettement plus lisibles. Nous avons ainsi lu pour ces deux souches entre 100 et 200 bases de ces réactions séquencées avec les oligos OL3 et 34446 ou D3, ces zones commençant plus ou moins à 50 paires de bases après la fin de l'oligo sens.

D'autres temps de migration plus longs ont alors été choisis afin de pouvoir lire les parties manquantes. Les parties séquencées avec les oligos 34446 ou D3 ont pu ainsi être lues jusqu'au stop de traduction. L'oligo OL3 nous a permis, lui, de lire plus ou moins 200 bases de plus du côté 3' du fragment.

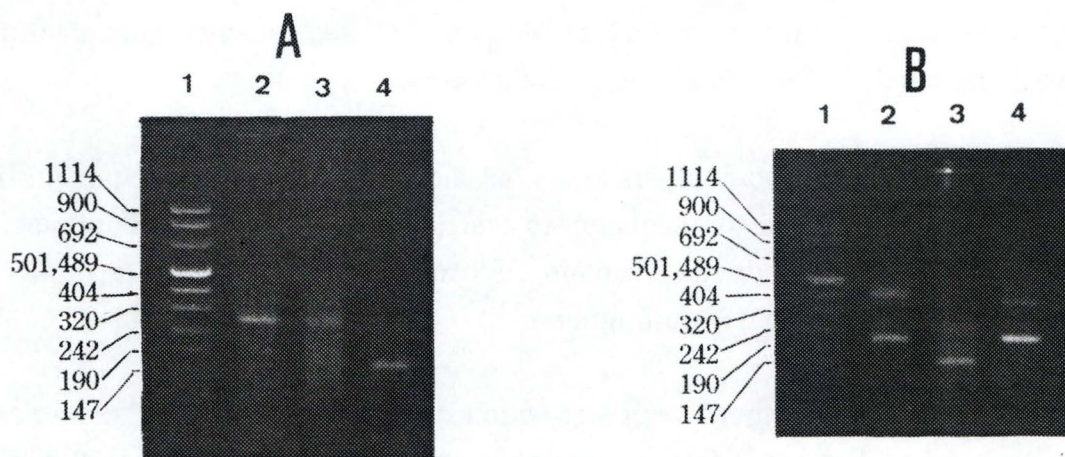
Un autre oligo a également servi au séquençage : l'oligo 34447. Le séquençage avec cet oligo a été réalisé sur le fragment amplifié en RT-PCR par les oligos OL3 et D1 à une température d'hybridation de 53°C. En effet, l'oligo 34447 s'hybride entre les séquences reconnues par les oligos OL3 et D1. Ceci a uniquement été essayé sur la souche BovX. Cet oligo 34447, ainsi que l'oligo D1 déjà testé précédemment, ont été utilisés pour les réactions de séquençage mais à nouveau, c'est l'oligo sens, c'est-à-dire l'oligo 34447, qui a donné le meilleur résultat.

Un temps de migration plus court a permis la lecture d'une vingtaine de bases en plus du côté 5' quelque soit le fragment.

### 4.2.2. Séquençage de la souche 87-13956

Le fragment amplifié avec les oligos OL3 et D1 de la souche 87-13956 a été partiellement séquencé. Deux temps de migration ont été choisis : 1 heure 30 et 2 heures 15. Le séquençage avec les oligos OL3 et D1 à une température d'hybridation de 54°C nous a permis une lecture nettement meilleure avec l'oligo OL3. Ce dernier nous a permis de lire 300 bases.





**Figure 3.6.** : Electrophorèses en gel d'agarose 2 % représentant les amplifications du gène G des souches Dorset et BovX par les couples d'oligos OL3+33916, LB1+D1 et D3 ou 34446 +LB2.

**A.** Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire VIII

Piste 2 : Souche Dorset amplifiée avec les oligos LB1 et D1

Piste 3 : Souche BovX amplifiée avec les oligos LB1 et D1

Piste 4 : Souche BovX amplifiée avec les oligos 34446 et LB2

**B.** Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire VIII

Piste 2 : Souche Dorset amplifiée avec les oligos OL3 et 33916

Piste 3 : Souche Dorset amplifiée avec les oligos D3 et LB2

Piste 4 : Souche BovX amplifiée avec les oligos OL3 et 33916.

Par manque de temps, nous nous sommes uniquement consacrés aux souches Dorset et BovX.

### 4.3. Résumé de la première étape de séquençage

Nous disposons à présent du gène G partiellement séquencé pour les souches Dorset et BovX. Pour compléter ces séquences, d'autres amplifications ont dû être réalisées avec d'autres oligos. C'est ainsi que nous avons fait synthétiser 2 nouveaux oligos LB1 et LB2 à partir des fragments de séquence du gène G de la souche BovX. L'oligo 33916 déjà utilisé au laboratoire a aussi été employé.

## 5. Deuxième série d'amplification

Différentes amplifications ont donc été lancées avec 3 autres couples d'oligos sur 5 µg d'ARN des souches Dorset et BovX. Ces couples sont les suivants : OL3+33916, LB1+D1 et D3 ou 34446 +LB2. Ces amplifications à une température d'hybridation de 53°C génèrent respectivement des fragments d'environ 211, 282, 140 ou 160 paires de bases. La figure 3.6. montre le résultat de l'électrophorèse sur 10 µl de ces réactions. Il apparaît que ces amplifications produisent bien les fragments attendus accompagnés d'autres fragments aspécifiques.

Deux cents femtomoles de ces amplifications ont été séquencées avec le kit Cyclist Exo *Pfu* DNA Sequencing System par utilisation du <sup>35</sup>S. A nouveau ces réactions ont été essayées avec chaque oligo à une température d'hybridation de 53°C. La migration de 4 µl de chaque tube PCR nommé A, C, G, T pour chaque réaction sur un gel 6 % en acrylamide a montré que les oligos OL3, 33916, LB1, D3 et 34446 permettent d'effectuer une lecture nettement meilleure que celles obtenues avec les oligos D1 et LB2. Différents temps de migration ont été utilisés.

Une heure 30 de migration pour les réactions de séquençage en utilisant l'oligo LB1 ont permis pour les deux souches de compléter du côté 3' le fragment déjà connu de l'amplificat OL3+D1.

Le même temps de migration a aussi été choisi pour le séquençage réalisé avec les oligos 34446 et D3. Ces oligos ont permis, pour les deux souches, la lecture de



**A**

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	atgtccaacc	atacccatCA	TCAATTAATTC	AAGACATTAA	AGAGGGCTTG	GAAAGCCTCA	AAATACITCA	TAGTAGGAT	80
81	ATCATGTTTA	TATAAGTTCA	ATTTAAAATC	CCTTGTCCAA	ACGGCTTTGA	CTACCTTAGC	AATGATAACC	TTGACATCAC	160
161	TCGTCATAaC	AGCCATTATt	TACATTAGTG	TGGGTAAATGC	TAAAGCCAAG	CCCACATCCA	AACCAACCAT	CCAACAAACA	240
241	CAACAGCCCC	AAAACCATAC	CTCACCATtt	ttCACAGAGC	ACAACCTACAA	ATCAACTCAC	ACATCAAITTC	AAAGCACCAC	320
321	ACTGTCCCAA	CTACCAAACA	CAGACACCAC	TAGAGGAACA	CCATACGGTC	AATCAATCGA	CGAAACCCAA	AACAGAAAAA	400
401	TCAAAAGCCA	ATCCAATCTA	CCCGCCACCA	GAAAACCACC	AATCAACCCA	TCGGGAAGCA	ACCCCTCGA	AAACCACCAA	480
481	GACCACAACA	ACTCCCAAAC	ACTCCCTAT	gtgccttgca	gtacatgtga	aggtaatctt	gcttgc****	***TCTGCCA	560
561	AATCGGGCCG	GAGAGAGCAC	CAAGCAGAGC	CCCTACAATC	ACCCTCAAAA	AGACTCCAAA	ACCGAAAACC	ACCAAAAAGC	640
641	CAACTACAAC	AACAATCCAC	CACAGAACCA	GCCCCGAAGC	CAAACCTGGAA	CCCAAAAACA	ACACGG**CC	TCaACAACAA	720
721	GGCATCCTAT	CTTCACCAGA	ACACCACACA	AATCAATCAA	CTACACAGAT	CTAA			774

**B**

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	atgtccaacc	atacccatCA	TCCTAAATTC	AAGACATTAA	AGAGGGCTTG	GAAAGCCTCA	AAATACITCA	TAGTAGGAT	80
81	ATCATGTTTA	TATAAGTTCA	*TTTAAAGTC	CCTTGTCCAA	ACGGCTTTGA	CCTCCITAGC	AATGATAACC	TTGACATCAC	160
161	TCGTCATAAC	AGCCATTATt	TACATTAGTG	TGGGAATGC	TAAAGCCAAG	CCCACATCCA	AACCAACCCAC	CCAACAAACA	240
241	CAACAGCCCC	AAAACCACAC	CCCCTACTTT	CCCACAGAGC	ACAACCACAA	ATCAACTCAC	ACATCAACCC	AAAG*****C	320
321	ACTGTCCCAA	CCACCAAACA	TAGACACCAC	TAGTGGAACT	ACATACGGTC	ACCCAATCAA	CAGAACCCAA	AACAGAAAAA	400
401	TcAAAAGCCA	ATCTACTCAC	CTTGCCACCC	GTAAACTACC	AATCAACCCA	CTGGAAAGCA	ACCCCTCCGA	AAACCACCAA	480
481	GACCACAACA	ACTCCCAAAC	ACTCCCTCAT	gtgccttgca	gtacatgt**	*****	*****	*****	560
561	*****	***AGAGCAC	CAAGCAGAGC	TCCCACAATC	ACCCTcAAAA	AGGCTCCAAA	ACCCAACCC	*CCAACAAAC	640
641	CAACCAAGAC	AACAATCTAC	CACAGAACCA	GCCCCGAAGC	CAAACCTGCAA	ACCAAAAAA	ACACGGCAAC	TCCACAACAA	720
721	GGCATCCTCT	CTTCACCAGA	ACACCAAACA	AATCAATCTA	CTACACAGAT	CTAa			774

**Figure 3.7.** : Séquence du gène G des souches Dorset (A) et BovX (B).

\* : nucléotide non déterminé

minuscule : incertitude ou zone d'hybridation des oligos.

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	**CATAGTAG	GATATATCATG	TTTTATATAAG	TTCAATTTAA	AATCCCTTGT	CCAAACG*CT	TTGTCCACCC	TAGCAATGAT	80
81	AACCTTGACA	TCACTCGTCA	TAACAGCTAT	TATTTACAITT	AGTGTGGG*A	ATGCTAAAGC	CAAGCCCAACA	TCCAACCAA	160
161	CCATCCAACA	AACACAACAG	CCCCAAAACC	ATACCTCACC	TcT***CACA	GAGCACAACT	ACAAATCAAC	TCACACTTCA	240
241	ATCCAAGCA	CCACACTGTC	CCAACACTA	AAC***GACA	CCACTAGAGG	AACTACA***	*GT		303

**Figure 3.8.** : Fragment de la séquence du gène G de la souche 87-13956.

\* : nucléotide non déterminé

minuscule : incertitude.

## Résultats

quelques bases supplémentaires du côté 5' du fragment déjà connu grâce au séquençage de l'amplificat 34446 ou D3 +D2.

Une migration de 2 heures 15 des réactions séquencées avec l'oligo 33916 a complété du côté 5' le fragment déjà connu par le séquençage de l'amplification OL3+D1.

Un morceau de séquence supplémentaire pour la souche Dorset a pu être déterminé du côté 5' grâce à la migration pendant une heure de la réaction de séquençage réalisée avec l'oligo D3.

Voyons à présent le résultat final de ces différents séquençages.

## 6. Séquence du gène G

### 6.1. Souches Dorset et BovX

Au terme de ces réactions de séquençage, nous avons pu déterminer avec certitude la majeure partie de la séquence du gène G pour les souches Dorset et BovX du BRSV (figure 3.7.). Ainsi, pour la souche BovX, il nous manque encore 52 nucléotides (représenté par des "\*\*") et des incertitudes subsistent toujours sur 5 nucléotides (représenté par des minuscules). Pour la souche Dorset, 7 incertitudes et 9 inconnues existent encore.

Les séquences présentées montrent d'autres minuscules : il s'agit des nucléotides 1 à 18 et 492 à 528 pour la souche Dorset et 1 à 18 et 492 à 510 pour la souche BovX. Ces minuscules correspondent la position des différents oligos utilisés: OL3, D1, 34446 et D3.

### 6.2. Souche 87-13956

La situation est différente pour la souche 87-13956. Nous n'avons séquencé qu'environ 300 nucléotides (figure 3.8.). Ce faible nombre ne nous autorise pas à faire



1 5 0

Dorset	.....CA	TCAATTATTC	AAGACATTAA	AGAGGGCTTG
VC-464	.....	.....	.....	.....
391-2	ATGTCCAACC	ATACCCAT	-TAA	.....
L08412	.....	.....	-CTAA	.....
L08417	.....	.....	-TAA	.....T
L08415	.....	.....	-TAA	.....T
L08416	.....	.....	-TAA	.....T
85-1330	.....	.....	-TAA	.....T
L08414	.....	.....	-TAA	.....T
L08410	.....	.....	-TAA	.....
L08411	.....	.....	-TAA	.....
FS-1	.....	.....	-TAA	.....
L08413	.....	.....	-TAA	.....
L10925	ATGTCCAACC	ATACCCAT	-TAA	.....GG
MVR553	.....	.....	-TAA	.....
RB94	ATGTCCAACC	ATACCCAT	-TAA	.....
NMK7	.....	.....	-TAA	.....
Lelystad	ATGTCCACCC	ATACCCAT	-TAA	.....C
A51908	ATGTCCAACC	ACACCCAT	-CTAA	.....
BovX	.....	.....	-CTAA	.....

5 1 1 0 0

Dorset	GAAAGCCTCA	AAATACTTCA	TAGTAGGATT	ATCATGTTTA	TATAAGTTCA
VC-464	.....	.....	.....	.....	.....
391-2	.....	.....T	.....	.....	.....
L08412	.....	.....	.....	.....	.....G
L08417	.....	.....	.....	.....	.....
L08415	.....	.....	.....	.....	.....
L08416	.....	.....	.....	.....	.....
85-1330	.....	.....	.....	.....	.....
L08414	.....	.....	.....	.....	.....
L08410	.....	.....	.....	.....	.....
L08411	.....	.....	.....	.....	.....
FS-1	.....T	.....	.....	.....	.....
L08413	.....	.....	.....	.....	.....
L10925	.....C-G	.....	.....	.....	.....
MVR553	.....	.....	.....	.....	.....
RB94	.....	.....	.....	.....	.....
NMK7	.....	.....	.....	.....	.....
Lelystad	.....	.....	.....	.....	.....
A51908	.....	.....	.....	.....	.....
BovX	.....	.....	.....	.....	.....

1 0 1 1 5 0

Dorset	ATTTAAAATC	CCTTGTCCAA	ACGGCTTTGA	CTACCTTAGC	AATGATAACC
VC-464	.....	.....	.....	-C	.....
391-2	.....	.....	.....T	-C	.....C
L08412	.....	.....	.....T	-C	.....C
L08417	.....	.....	.....T	-C	.....C
L08415	.....	.....	.....T	-C	.....C
L08416	.....	.....	.....T	-C	.....C
85-1330	.....	.....	.....T	-C	.....C
L08414	-C	.....A	.....T	-C	.....C
L08410	.....	.....	-A	-C	.....C
L08411	.....	.....	-A	-C	.....C
FS-1	.....	.....	.....T	-C	.....C
L08413	.....	.....	.....T	-C	.....C
L10925	.....	.....	.....T	-C	.....C
MVR553	.....	.....	.....	-C	.....
RB94	.....	.....	.....	-C	.....
NMK7	.....	.....	.....	-C	.....
Lelystad	.....	.....	.....	-C	.....
A51908	.....G	.....	.....	-CT	.....
BovX	*.....G	.....	.....	-CT	.....

	1 5 1				2 0 0
Dorset	TTGACATCAC	TCGTCATAaC	AGCCATTAT t	TACATTAGTG	TGGGTAATGC
VC-464	-----	-----	---A-----	-----	---A-----
391-2	-----	-----C-----	-----	-----	---A-----
L08412	-----	-----C-----	-----	-T-----	---AG-----
L08417	-----	-----C-----	-----	-T-----	---A-----
L08415	-----	-T-----	---T-----	-----	---A-----
L08416	-----	-T-----G-	---T-----	-----	---A-----
85-1330	-----	-----	---T-----	-----	---A-----
L08414	-----	-----	---T-----	-----	---A-----
L08410	-----C-----	-----	-----	-----	---A-----
L08411	-----C-----	-----	-----	-----	---A-----
FS-1	-----	-----	---A-----	-----	---A-----
L08413	-----	-----	-----	-----	---A-----
L10925	-----	-----	-----	-----	---A--GT-
MVR553	-----	-----	---c-----	-----	---A-----
RB94	-----	-----	---C-----	-----	---A-----
NMK7	-----	-----	-----	-----	---A-----
Lelystad	-----	-----	-----	-----	---A-----
A51908	-----	-----	---A-----	-----	---A-----
BovX	-----	-----	-----	-----	---A-----

	2 0 1				2 5 0
Dorset	TAAAGCCAAG	CCCACATCCA	AACCAACCAT	CCAACAAACA	CAACAGCCCC
VC-464	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	-----	-----	-----	-----	-----
L08412	-----	-----	-----	-----	-----
L08417	-----	-----	-----	-----	---A-----
L08415	-----	-----	---G-----	-----	-----
L08416	-----	-----	---G-----	-----	-----
85-1330	-----	-----	-----	-----	-----
L08414	-----	-----	-----	-----	-----
L08410	-----	-----	-----	-----	-----
L08411	-----	-----	-----	-----	-----
FS-1	-----	-----	-----	-----	-----
L08413	-----	-----	-----	-----	-----
L10925	-----	-----	-----	-----	-----
MVR553	-----	-----	-----	-----	---G-----
RB94	-----	-----	-----	-----	---G-----
NMK7	-----	-----	-----	-----	-----
Lelystad	-----	-----	-----	-----	-----
A51908	-----	-----	---C-----	-----	-----
BovX	-----	-----	---C-----	-----	-----

	2 5 1				3 0 0
Dorset	AAAACCATAC	CTCACCAT t t	t tCACAGAGC	ACAAC TACAA	ATCAACTCAC
VC-464	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	-----	-----	-----	-----	-----
L08412	-----	-----	-----	-----	-----
L08417	-----	-----	---T-----	-----	-----
L08415	-----	-----	-----	-----	-----
L08416	-----	-----	-----	-----	-----
85-1330	-----	-----	-----	-----	-----
L08414	-----	-----	---A---	---T---	-----
L08410	-----	-----	---A---	-----	-----
L08411	-----	-----	---A---	-----	-----
FS-1	-----	-----	---A---	-----	-----
L08413	-----	-----	---A---	-----	-----
L10925	-----	-----	---A---	-----	-----
MVR553	-----	---TC---	-----	-----	-----
RB94	-----	---TC---	-----	-----	-----
NMK7	---T---	---C---	-----	-----	-----
Lelystad	-----	---TC---	-----	-----	-----
A51908	---C---	-C--T-C-	CC-----	---C---	-----
BovX	---C---	-C--T-C-	CC-----	---C---	-----



	3 0 1				3 5 0
Dorset	ACATCAATTC	AAAGCACCAC	ACTGTCCCAA	CTACCAAACA	CAGACACCAC
VC-464	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	-----	-----	-----	-----T-----	T-----T-----
L08412	-----	-----	-----	-----T-----	T-----G-T-----
L08417	-----	-----	-----	-----T-----	T-----G-T-----
L08415	-T-----	-----	-----T-----	-----T-----	T-----T-----
L08416	-T-----	-----	-----T-----	-----T-----	T-----T-----
85-1330	-----	-----	-----	-----T-----	T-----T-----T-----
L08414	-----	-----	-----	-----T-----	T-----T-----
L08410	-----	-----	-----T-----	-C-AT-----	T-----T-----
L08411	-----	-----	-----T-----	-C-AT-----	T-----T-----
FS-1	-----	-----	-----T-----	-AT-----	T-----T-----
L08413	-----	-----	-----T-----	-AT-----	T-----T-----
L10925	-----	-----	-----T-----	-AT-----	T-----T-----
MVR553	-----C-----	-----	-----	-----T-----	T-----
RB94	-----C-----	-----	-----	-----T-----	T-----
NMK7	-----C-----	-----	-----	-----T-----	T-----
Lelystad	-----C-----	-----	-----	-----T-----	T-----
A51908	-----CC-----	-----	-----	-C-----	T-----
BovX	-----CC-----	-----*****-----	-----	-C-----	T-----

	3 5 1				4 0 0
Dorset	TAGAGGAACA	CCATACGGTC	AATCAATCGA	CGAAACCCAA	AACAGAAAAA
VC-464	-----T A-----	T-----C-----	-----	-----	-----
391-2	-----TT A-----	T-----C-----	-C-----C-A-----	-----	-----
L08412	-----TT A-----	T-----C-----	-C-----C-A-----	-----	-----T-----
L08417	-----TT A-----	T-----C-----	-C-----C-A-----	-----	-----T-----
L08415	-----T A-----	-TA-----C-----	-C-----C-A-----	T-----	-----
L08416	-----T A-----	-TA-----C-----	-C-----C-A-----	T-----	-----
85-1330	-----T A-----	-TA-----C-----	-C-----C-A-----	T-----	-----
L08414	-----G-T A-----	-TA-C-----C-----	-C-----C-A-----	T-----	-----
L08410	-----T A-----	T-----C-----	-----	-----	-G-----
L08411	-----T A-----	T-----C-----	-----	-----	-G-----
FS-1	-----T A-----	T-----C-----	-----	-----	-G-----
L08413	-----C A-----	T-----C-----	-----	-----	-G-----
L10925	-----T A-----	T-----C-----	-----	-----	-G-----
MVR553	-----T A-----	-A-----CC-----	-C-----	T-----	-----
RB94	-----T A-----	-A-----CC-----	-C-----	T-----	-----
NMK7	-----T A-----	-----CC-----	-CT-----	-G-----	-----
Lelystad	-----T A-----	-A-----CC-----	-C-----	T-----	-----
A51908	---T-----T A-----	-----CC-----	-A-----	-AG-----	-----
BovX	---T-----T A-----	-----CC-----	-A-----	-AG-----	-----

	4 0 1				4 5 0
Dorset	TCAAAAAGCCA	ATCCACTCTA	CCCGCCACCA	GAAAACCACC	AATCAACCCA
VC-464	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	-----G-----	-----	-----	-----	-----T-----
L08412	-----G-----T	-----	-----	-----	-----T-----T-----
L08417	-----G-----	-----	T-----	-----	-----T-----T-----
L08415	-----	-----	-----	-----	-----T-----T-----
L08416	-----	-----	-----	-----	-----T-----T-----
85-1330	-----	-----	-----	-----	-----T-----T-----
L08414	-----	-----	-----T-----	-----	-----T-----T-----
L08410	-----	-----	-----A-----	-----	-----T-----
L08411	-----	-----	-----A-----	-----	-----T-----
FS-1	-----	-----	-----A-----	-----	-----T-----
L08413	---G-----	-----T-----	-----A-----	-----	-----T-----
L10925	-----	-----G-----	-----A-----	-----	-----T-----
MVR553	-----	-----	-----	-----C-----	-----
RB94	-----	-----	-----	-----C-----	-----
NMK7	-----	-----	-----	-----G-----	-----
Lelystad	-----	-----	-----	-----C-----	-----T-----
A51908	-----	-----T-----C-----	-TT-----	-C-----	-T-----
BovX	-----	-----T-----AC-----	-TT-----	-C-----	-T-----T-----

4 5 1 5 0 0

Dorset	TCGGGAAGCA	ACCCCCCTGA	AAACCACCAA	GACCACAACA	ACTCCCAAAC
VC-464	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	-----	T-----	-----	-----	-----T-----
L08412	-----	-----	-----	-----	-----T-----
L08417	-----	-----C-----	-----	-----	-----CT-----
L08415	-----	-----	-----	-----	-----T-----
L08416	-----	-----	-----	-----	-----T-----
85-1330	-----	-----	-----	-----	-----T-----
L08414	-----	-----	-----	-----	-----CT-----
L08410	-----A-----	-----	-----	-----	-----T-----
L08411	-----A-----	-----	-----	-----	-----T-----
FS-1	-----A-----	-----	-----	-----	-----T-----
L08413	-----A-----	-----	-----	-----	-----T-----
L10925	-----A-----	-----	-----	-----	-----T-----
MVR553	-----T-----	-----	-----	-----	-----
RB94	-----T-----	-----	-----	-----	-----
NMK7	-----A-----	-----	-----	-----	-----
Lelystad	-----T-----	-----	-----	-----	-----T-----
A51908	CT-A-----	-----	-----	-----	-----
BovX	CT-A-----	-----C-----	-----	-----	-----

5 0 1 5 5 0

Dorset	ACTCCCCTA	gtgccttgca	gtacatgtga	aggtaatctt	gcttgc****
VC-464	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
391-2	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
L08412	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
L08417	-----	-----C-----	-----	-----	-----TTAT
L08415	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
L08416	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
85-1330	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
L08414	-----	-----T-----	-----	-----	-----TTAT
L08410	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
L08411	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
FS-1	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
L08413	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
L10925	-----	-----A-----	-----	-----	-----TTAT
MVR553	-----	-----	-----	-----	-----TCAT
RB94	-----	-----	-----	-----	-----TCAT
NMK7	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
Lelystad	-----	-----	-----	-----	-----TTAT
A51908	-----TC-----	-----C-----	-----C-----	-----C-----	-----C-----C-----TTCAC
BovX	-----TC-----	-----	-----**-----	-----*****-----	-----*****-----

5 5 1 6 0 0

Dorset	***TCTGCCA	AATCGGGCCG	GAGAGAGCAC	CAAGCAGAGC	CCCTACAATC
VC-464	CAC-----	-----	-----	-----	-----
391-2	CAC-----	T--T-A-A--	-----	-----	-----
L08412	CAC-----	---T-A-A-A	-----	-----	-----
L08417	CAC-----	---T-A-A-A	-----	-----	-----
L08415	CAC-----	-----A	-----	-----	-----
L08416	CAC-----	-----A	-----	-----	-----
85-1330	CAC-----	-----A	-----A-----	-----	-----
L08414	CAC-----	-----A	-----	-----T-----	-----
L08410	CAC-----	-G-T-----	-G-----	-----	-----
L08411	CAC-----	-G-T-----	-G-----	-----	-----
FS-1	CAC-----	-G-T-----	-GA-----	-----	-----
L08413	CAC-----	-G-T-----	-GA-----	-----	-----
L10925	CAC-----	-G-T-----	-GA-----	-----	-----
MVR553	CAC-----	-----T-----	-----	-----	-----C-----
RB94	CAC-----	-----T-----	-----	-----	-----C-----
NMK7	CAC-----	-----	-----	-----	-----C-----
Lelystad	CAC-----	-----G-----	-----	-----	-----C-----
A51908	CAC-----	-----T-----	-----	-----	-----T-C-----
BovX	-----*****	-----*****	-----***-----	-----	-----T-C-----



	6 0 1				6 5 0
Dorset	ACCCTCAAAA	AGACTCCAAA	ACCGAAAACC	ACCAAAAAGC	CAACTACAAC
VC-464	-----	-----	---C-----	-----	----C-AG--
391-2	-----	-----	---C-----	--T-----	----C-AG--
L08412	-----	-----	---C-----	--T-----	----C-AG--
L08417	-----	-----	---C-----	--T-----	----C-AG--
L08415	-----	-----	---C-----	--T-----	----C-AG--
L08416	-----	-----	---C-----	--T-----	----C-AG--
85-1330	--T-----	-----	---C-----	--T-----	----C-AG--
L08414	-----	---A-----	--TC-----	--T-----	----C-AG--
L08410	-----	-----	---C-----	--T-----	---TC-AG--
L08411	-----	-----	---C-----	--T-----	---TC-AG--
FS-1	-----	-----	---C-----	--T-G-----	---TC-AG--
L08413	-----	-----	---C-----	--T-----	---TC-AG--
L10925	-----	-----	---C-----	--T---G---	---TC-AG--
MVR553	-----	--G-----	---C-----	-----A-	---C-AG--
RB94	-----	--G-----	---C-----	-----A-	---C-AG--
NMK7	-----	-----	---C-----	-T-----	---C-AG--
Lelystad	-----	--G-----	---C-----	--A---A-	---C-AG--
A51908	-----	--G-----	---C-----	-----A-	---C-AG--
BovX	-----	--G-----	---C-----	*---c---A-	---C-AG--

	6 5 1				7 0 0
Dorset	AACAATCCAC	CACAGAACCA	GCCCCGAAGC	CAAACCTGGAA	CCCCAAAACA
VC-464	-----	-----	---T-----	-----C-	-----
391-2	-----	-----	---T---A-	-----C-	--T-----
L08412	-----	-----T-	---T---A-	-----C-	--T-----
L08417	-----	-----	---T---A-	-----C-	--T-----
L08415	-----	-----	-----A-	-----C-	-----
L08416	-----	-----	-----A-	-----C-	-----
85-1330	-----	-----	---T---A-	-----C-	-----T-
L08414	-----	-----	-----	-----C-	-----T-
L08410	-----	-----	---T-----	-----AC-	-----
L08411	-----	-----	---T-----	-----AC-	-----
FS-1	-----	-----	---T-----	-----C-	-----
L08413	-----	-----	---T-----	-----AC-	-----
L10925	-----	-----	---T-----	-----AC-	-----
MVR553	-----	-----	---T-----	-----C-	-----
RB94	-----	-----	---T-----	-----C-	-----
NMK7	-----	-----	---T-----	-----C-	-----
Lelystad	-----	-----	---T-----	-----C-	--T-----
A51908	-----T-	-----	---T-----	-----C-	A-----A-
BovX	-----T-	-----	---T-----	-----C-	A-----A-

	7 0 1				7 5 0
Dorset	ACACGG**CC	TCaACAACAA	GGCATCCTAT	CTTCACCAGA	ACACCACACA
VC-464	-----CA--	---C-----	-----C-	-----	-----
391-2	---A-CAA-	---C-----	-----C-	---A---	--T-----
L08412	---A-CAA-	---C---G---	-----C-	---A---	--T-----
L08417	---A-CAA-	---C-----	-----C-	---A---	--T-----
L08415	---CAT-	---C-----	A-----C-	-----	-----
L08416	---CAT-	---C-----	A-----C-	-----	-----
85-1330	---CAA-	---C-----	-----C-	-----	-----
L08414	---CAA-	---C-----	-----C-	-----	---A-----
L08410	---CAG-	---C-----	-----C-	-----	A-----
L08411	---CAG-	---C-----	-----C-	-----	A-----
FS-1	---CA-	---C-----	-----C-	-----	A-----
L08413	---CAG-	---C-----	-----C-	-----	A-----
L10925	---CAG-	---C-----	-----C-	-----	A-----
MVR553	---CAG-	---C-----	-----C-	-----	-----
RB94	---CAG-	---C-----	-----C-	-----	-----
NMK7	---CAG-	---C-----	-----C-	-----	-----
Lelystad	---C-AG-	---C-----	-----C-	---A---	--T-----
A51908	---CAA-	---C-----	-----C-	-----	A-----
BovX	---CAA-	---C-----	-----C-	-----	A-----

	7 5 1			7 9 2
Dorset	AATCAATCAA	CTACACAGAT	CTAA . . . . .	. . . . .
VC-464	- - - - -	- - - - -	- - - - -	. . . . .
391-2	- - - - -	- - - - -	- - - G . . . . .	. . . . .
L08412	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
L08417	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
L08415	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
L08416	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
85-1330	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
L08414	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
L08410	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
L08411	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
FS-1	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
L08413	- - - - -	. . . . .	. . . . .	. . . . .
L10925	- - - - -	- - - - -	- - - G . . . . .	. . . . .
MVR553	- - - - -	- - - - -	- - - - -	. . . . .
RB94	- - - - -	- - - - -	- - - - -	. . . . .
NMK7	- - - - -	- - - - -	- - - - -	. . . . .
Lelystad	- - - - -	- - - - -	- - - G . . . . .	. . . . .
A51908	- - - - - T -	- - - - -	- - C - CAACAC	ACCTCCATAT AA
BovX	- - - - - T -	- - - - -	- - - - -	. . . . .

**Figure 3.9.a :** Alignement des séquences du gène G de la souche Dorset avec les 19 autres séquences disponibles par le programme PileUp (GCG).

minuscules: nucléotides incertains ou zone d'hybridation des oligos

\*: nucléotide non déterminé

- : nucléotide commun

. : nucléotide manquant.



1 5 0

BovX	.....CA	TCCTAAATTC	AAGACATTAA	AGAGGGCTTG
A51908	ATGTCCAACC ACACCCAT	- - - - -	- - - - -	- - - - -
391-2	ATGTCCAACC ATACCCAT	- - T - - - -	- - - - -	- - - - -
L08412	.....	- - - - -	- - - - -	- - - - -
L08417	.....	- T - - - - -	- - T - - - -	- - - - -
L08415	.....	- T - - - - -	- T - - - - -	- - - - -
L08416	.....	- T - - - - -	- T - - - - -	- - - - -
85-1330	.....	- T - - - - -	- T - - - - -	- - - - -
L08414	.....	- T - - - - -	- T - - - - -	- - - - -
L08410	.....	- T - - - - -	- - - - -	- - - - -
L08411	.....	- T - - - - -	- - - - -	- - - - -
FS-1	.....	- T - - - - -	- - - - -	- - - - -
L08413	.....	- T - - - - -	- - - - -	- - - - -
L10925	ATGTCCAACC ATACCCAT	- - T - - - -	- - - - GG - -	- - - - G - -
MVR553	.....	- T - - - - -	- - - - -	- - - - -
RB94	ATGTCCAACC ATACCCAT	- - T - - - -	- - - - -	- - - - -
NMK7	.....	- T - - - - -	- - - - -	- - - - -
Lelystad	ATGTCCACCC ATACCCAT	- - T - - - C - -	- - - - -	- - - - -
VC-464	.....	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Dorset	.....	- - AATT - - - -	- - - - -	- - - - -

5 1 1 0 0

BovX	GAAAGCCTCA	AAATACTTCA	TAGTAGGATT	ATCATGTTTA	TATAAGTTCA
A51908	.....	.....	.....	.....	.....
391-2	.....	..... T -	.....	.....	.....
L08412	.....	.....	.....	.....	..... G -
L08417	.....	.....	.....	.....	.....
L08415	.....	.....	.....	.....	.....
L08416	.....	.....	.....	.....	.....
85-1330	.....	.....	.....	.....	.....
L08414	.....	.....	.....	.....	.....
L08410	.....	.....	.....	.....	.....
L08411	.....	.....	.....	.....	.....
FS-1	..... T -	.....	.....	.....	.....
L08413	.....	.....	.....	.....	.....
L10925	..... C - G -	.....	.....	.....	.....
MVR553	.....	.....	.....	.....	.....
RB94	.....	.....	.....	.....	.....
NMK7	.....	.....	.....	.....	.....
Lelystad	.....	.....	.....	.....	.....
VC-464	.....	.....	.....	.....	.....
Dorset	.....	.....	.....	.....	.....

1 0 1 1 5 0

BovX	*TTTAAAGTC	CCTTGTCCAA	ACGGCTTTGA	CCTCCTTAGC	AATGATAACC
A51908	A - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
391-2	A - - - - A -	- - - - -	- - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
L08412	A - - - - A -	- - - - -	- - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
L08417	A - - - - A -	- - - - -	- - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
L08415	A - - - - A -	- - - - -	- - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
L08416	A - - - - A -	- - - - -	- - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
85-1330	A - - - - A -	- - - - -	- - - - - T - T -	- A - C - - -	- - - - -
L08414	AC - - - - A -	- - - - A - - - -	- - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
L08410	A - - - - A -	- - - - -	- A - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
L08411	A - - - - A -	- - - - -	- A - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
FS-1	A - - - - A -	- - - - -	- - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
L08413	A - - - - A -	- - - - -	- - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
L10925	A - - - - A -	- - - - -	- - - - - T -	- A - C - - -	- - - - -
MVR553	A - - - - A -	- - - - -	- - - - -	- A - - - -	- - - - -
RB94	A - - - - A -	- - - - -	- - - - -	- A - - - -	- - - - -
NMK7	A - - - - A -	- - - - -	- - - - -	- A - - - -	- - - - -
Lelystad	A - - - - A -	- - - - -	- - - - -	- A - - - -	- - - - -
VC-464	A - - - - A -	- - - - -	- - - - -	- A - - - -	- - - - -
Dorset	A - - - - A -	- - - - -	- - - - -	- TA - - - -	- - - - -

	1 5 1				2 0 0
BovX	TTGACATCAC	TCGTCATAAC	AGCCATTATT	TACATTAGTG	TGGGAAATGC
A51908	-----	-----	---A-----	-----	-----
391-2	-----	-----C-----	-----	-----	-----
L08412	-----	-----C-----	-----	---T-----	-----G-----
L08417	-----	-----C-----	-----	---T-----	-----
L08415	-----	---T-----	---T-----	-----	-----
L08416	-----	---T-----G-----	---T-----	-----	-----
85-1330	-----	-----	---T-----	-----	-----
L08414	-----	-----	---T-----	-----	-----
L08410	-----C-----	-----	-----	-----	-----
L08411	-----C-----	-----	-----	-----	-----
FS-1	-----	-----	---A-----	-----	-----
L08413	-----	-----	-----	-----	-----
L10925	-----	-----	-----	-----	-----GT-----
MVR553	-----	-----	---c-----	-----	-----
RB94	-----	-----	---C-----	-----	-----
NMK7	-----	-----	-----	-----	-----
Lelystad	-----	-----	-----	-----	-----
VC-464	-----	-----	---A-----	-----	-----
Dorset	-----	-----	-----	-----	-----T-----

	2 0 1				2 5 0
BovX	TAAAGCCAAG	CCCACATCCA	AACCAACCAC	CCAACAAACA	CAACAGCCCC
A51908	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	-----	-----	-----T-----	-----	-----
L08412	-----	-----	-----T-----	-----	-----
L08417	-----	-----	-----T-----	-----	-----A-----
L08415	-----	-----	-----GT-----	-----	-----
L08416	-----	-----	-----GT-----	-----	-----
85-1330	-----	-----	-----T-----	-----	-----
L08414	-----	-----	-----T-----	-----	-----
L08410	-----	-----	-----T-----	-----	-----
L08411	-----	-----	-----T-----	-----	-----
FS-1	-----	-----	-----T-----	-----	-----
L08413	-----	-----	-----T-----	-----	-----
L10925	-----	-----	-----T-----	-----	-----
MVR553	-----	-----	-----T-----	-----	-----G-----
RB94	-----	-----	-----T-----	-----	-----G-----
NMK7	-----	-----	-----T-----	-----	-----
Lelystad	-----	-----	-----T-----	-----	-----
VC-464	-----	-----	-----T-----	-----	-----
Dorset	-----	-----	-----T-----	-----	-----

	2 5 1				3 0 0
BovX	AAAACCACAC	CCCCTACTT	CCCACAGAGC	ACAACCACAA	ATCAACTCAC
A51908	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	-----T-----	---T---C-T---	TT-----	-----T-----	-----
L08412	-----T-----	---T---C-T---	TT-----	-----T-----	-----
L08417	-----T-----	---T---C-T---	TTT-----	-----T-----	-----
L08415	-----T-----	---T---C-T---	TT-----	-----T-----	-----
L08416	-----T-----	---T---C-T---	TT-----	-----T-----	-----
85-1330	-----T-----	---T---C-T---	TT-----	-----T-----	-----
L08414	-----T-----	---T---C-T---	TT---A---	-----TT-----	-----
L08410	-----T-----	---T---C-T---	TT-----A	-----T-----	-----
L08411	-----T-----	---T---C-T---	TT-----A	-----T-----	-----
FS-1	-----T-----	---T---C-T---	TT-----A	-----T-----	-----
L08413	-----T-----	---T---C-T---	TT-----A	-----T-----	-----
L10925	-----T-----	---T---C-T---	TT-----A	-----T-----	-----
MVR553	-----T-----	---T---CT---	TT-----	-----T-----	-----
RB94	-----T-----	---T---CT---	TT-----	-----T-----	-----
NMK7	-----TT-----	---T---C---	TT-----	-----T-----	-----
Lelystad	-----T-----	---T---CT---	TT-----	-----T-----	-----
VC-464	-----T-----	---T---C-T---	TT-----	-----T-----	-----
Dorset	-----T-----	---T---C-T---	tt-----	-----T-----	-----



3 0 1

3 5 0

BovX	ACATCAACCC	AAAG*****C	ACTGTCCCAA	CCACCAAACA	TAGACACCAC
A51908	-----	-----CACCA-	-----	-----	-----
391-2	-----TT-	-----CACCA-	-----	-T-T-----	-----T-
L08412	-----TT-	-----CACCA-	-----	-T-T-----	-----G-T-
L08417	-----TT-	-----CACCA-	-----	-T-T-----	-----G-T-
L08415	-T-----TT-	-----CACCA-	-----T--	-T-T-----	-----T-
L08416	-T-----TT-	-----CACCA-	-----T--	-T-T-----	-----T-
85-1330	-----TT-	-----CACCA-	-----	-T-T-----	-----T-T-
L08414	-----TT-	-----CACCA-	-----	-T-T-----	-----T-
L08410	-----TT-	-----CACCA-	-----T--	--AT-----	-----T-
L08411	-----TT-	-----CACCA-	-----T--	--AT-----	-----T-
FS-1	-----TT-	-----CACCA-	-----T--	-T-AT-----	-----T-
L08413	-----TT-	-----CACCA-	-----T--	-T-AT-----	-----T-
L10925	-----TT-	-----CACCA-	-----T--	-T-AT-----	-----T-
MVR553	-----T-	-----CACCA-	-----	-T-T-----	-----
RB94	-----T-	-----CACCA-	-----	-T-T-----	-----
NMK7	-----T-	-----CACCA-	-----	-T-T-----	-----
Lelystad	-----T-	-----CACCA-	-----	-T-T-----	-----
VC-464	-----TT-	-----CACCA-	-----	-T-----	C-----
Dorset	-----TT-	-----CACCA-	-----	-T-----	C-----

3 5 1

4 0 0

BovX	TAGTGGAACT	ACATACGGTC	ACCCAATCAA	CAGAACCCTAA	AACAGAAAAA
A51908	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	---A---T-	-----T---	-T---C---	-GA-----	-----
L08412	---A---T-	-----T---	-T---C---	-GA-----	-----T---
L08417	---A---T-	-----T---	-T---C---	-GA-----	-----T---
L08415	---A-----	-----TA---	-T---C---	TGA-----	-----
L08416	---A-----	-----TA---	-T---C---	TGA-----	-----
85-1330	---A-----	-----TA---	-T---C---	TGA-----	-----
L08414	---A---G-	-----TA-C-	-T---C---	TGA-----	-----
L08410	---A-----	-----T---	-T---C-G-	-GA-----	-G-----
L08411	---A-----	-----T---	-T---C-G-	-GA-----	-G-----
FS-1	---A-----	-----T---	-T---C-G-	-GA-----	-G-----
L08413	---A-----C	-----T---	-T---C-G-	-GA-----	-G-----
L10925	---A-----	-----T---	-T---C-G-	-GA-----	-G-----
MVR553	---A-----	-----A---	-----C-G-	TGA-----	-----
RB94	---A-----	-----A---	-----C-G-	TGA-----	-----
NMK7	---A-----	-----	-----CTG-	-G-----	-----
Lelystad	---A-----	-----A---	-----C-G-	TGA-----	-----
VC-464	---A-----	-----T---	-T-----G-	-GA-----	-----
Dorset	---A-----A	C-----	-AT-----G-	-GA-----	-----

4 0 1

4 5 0

BovX	TcAAAAGCCA	ATCTACTCAC	CTTGCCACCC	GTAAACTACC	AATCAACCCA
A51908	-----	-----CA	-----	-A-----	-----
391-2	-----G---	---C---TA	-CC-----A	-A---C---	-----T---
L08412	-----G---T	---C---TA	-CC-----A	-A---C---	---T---T---
L08417	-----G---	---C---TA	TCC-----A	-A---C---	---T---T---
L08415	-----	---C---TA	-CC-----A	-A---C---	---T---T---
L08416	-----	---C---TA	-CC-----A	-A---C---	---T---T---
85-1330	-----	---C---TA	-CC-----A	-A---C---	---T---T---
L08414	-----	---C---TA	-C-----A	-A---C---	---T---T---
L08410	-----	---C---TA	-CCA-----A	-A---C---	---T-----
L08411	-----	---C---TA	-CCA-----A	-A---C---	---T-----
FS-1	-----	---C---TA	-CCA-----A	-A---C---	---T-----
L08413	---G-----	---CT---TA	-CCA-----A	-A---C---	---T-----
L10925	-----	---CG---TA	-CCA-----A	-A---C---	---T-----
MVR553	-----	---C---TA	-CC-----A	-AC---C---	-----
RB94	-----	---C---TA	-CC-----A	-AC---C---	-----
NMK7	-----	---C---TA	-CC-----G	-A---C---	-----
Lelystad	-----	---C---TA	-CC-----A	-AC---C---	-----T---
VC-464	-----	---C---TA	-CC-----A	-A---C---	-----
Dorset	-----	---C---TA	-CC-----A	-A---C---	-----

4 5 1 5 0 0

BovX	CTGGAAAGCA	ACCCCCCGA	AAACCACCAA	GACCACAACA	ACTCCCAAAC
A51908	-	-	-	-	-
391-2	TC - G -	T - - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -
L08412	TC - G -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -
L08417	TC - G -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - CT -
L08415	TC - G -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - C -	- - - T -
L08416	TC - G -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - C -	- - - T -
85-1330	TC - G -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - C -	- - - T -
L08414	TC - G -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - C -	- - CT -
L08410	TC -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
L08411	TC -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
FS-1	TC -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
L08413	TC -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
L10925	TC -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
MVR553	TC - G - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
RB94	TC - G - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
NMK7	TCA - G -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
Lelystad	TC - G - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
VC-464	TC - G -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -
Dorset	TC - G -	- - - - T -	- - - - T -	- - - - T -	- - - T -

5 0 1 5 5 0

BovX	ACTCCCTCA t	gtgccttgca	gtacatgt**	*****	*****
A51908	- - - - - C -	- C - - - - CGA	AGGCAATCCT	GCCTGTTCAC	
391-2	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
L08412	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
L08417	- - - - - CT -	- - - - - C -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT
L08415	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
L08416	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
85-1330	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
L08414	- - - - - CT -	- - - - - T -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT
L08410	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
L08411	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
FS-1	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
L08413	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
L10925	- - - - - CT -	- A - - - - -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT
MVR553	- - - - - CT -	- - - - - ga	aggtaatcct	gcttgctcat	
RB94	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTCAT	
NMK7	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
Lelystad	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
VC-464	- - - - - CT -	- - - - - GA	AGGTAATCCT	GCTTGCTTAT	
Dorset	- - - - - CT -	- - - - - ga	aggtaatcct	gcttgctc - - -	

5 5 1 6 0 0

BovX	*****	*****	***AGAGCAC	CAAGCAGAGC	TCCCACAATC
A51908	CACTCTGCCA	AATCGGGCTG	GAG - - - - -	- - - - -	- - - - -
391-2	CACTCTGCCA	TATTGAGACG	GAG - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
L08412	CACTCTGCCA	AATTGAGACA	GAG - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
L08417	CACTCTGCCA	AATTGAGACA	GAG - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
L08415	CACTCTGCCA	AATCGGGCCA	GAG - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
L08416	CACTCTGCCA	AATCGGGCCA	GAG - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
85-1330	CACTCTGCCA	AATCGGGCCA	GAG - A - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
L08414	CACTCTGCCA	AATCGGGCCA	GAG - - - - -	- - - - T - - - -	C - - T - - - -
L08410	CACTCTGCCA	AGTTGGGCCG	GGG - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
L08411	CACTCTGCCA	AGTTGGGCCG	GGG - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
FS-1	CACTCTGCCA	AGTTGGGCCG	GGA - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
L08413	CACTCTGCCA	AGTTGGGCCG	GGA - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
L10925	CACTCTGCCA	AGTTGGGCCG	GGA - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
MVR553	CACTCTGCCA	AATCGGGCTG	GAG - - - - -	- - - - -	C - - - - -
RB94	CACTCTGCCA	AATCGGGCTG	GAG - - - - -	- - - - -	C - - - - -
NMK7	CACTCTGCCA	AATCGGGCCG	GAG - - - - -	- - - - -	C - - - - -
Lelystad	CACTCTGCCA	AATCGGGCCG	GAG - - - - -	- - - - -	C - - - - -
VC-464	CACTCTGCCA	AATCGGGCCG	GAG - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -
Dorset	- - - TCTGCCA	AATCGGGCCG	GAG - - - - -	- - - - -	C - - T - - - -



6 0 1

6 5 0

BovX	ACCC t c A A A A	AGGCTCCAAA	ACCCAAAACC	* C C A A c A A A C	CAACCAAGAC
A51908	-----	-----	-----	A - - - A - - -	-----
391-2	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - A - - G -	-----
L08412	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - A - - G -	-----
L08417	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - A - - G -	----- T - - - -
L08415	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - A - - G -	-----
L08416	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - A - - G -	-----
85-1330	- - - T - - - - -	- A - - - - -	-----	A - T - - A - - G -	-----
L08414	-----	- A - A - - - -	- - T - - - - -	A - T - - A - - G -	-----
L08410	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - A - - G -	----- T - - - -
L08411	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - A - - G -	----- T - - - -
FS-1	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - G - - G -	----- T - - - -
L08413	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - A - - G -	----- T - - - -
L10925	-----	- A - - - - -	-----	A - T - - A - G G -	----- T - - - -
MVR553	-----	-----	-----	A - - - - A - - - -	-----
RB94	-----	-----	-----	A - - - - A - - - -	-----
NMK7	-----	- A - - - - -	----- T	A - - - - A - - - -	-----
Lelystad	-----	-----	-----	A - A - - A - - - -	-----
VC-464	-----	- A - - - - -	-----	A - - - - A - - G -	-----
Dorset	-----	- A - - - - -	- - - G - - - - -	A - - - - A - - G -	----- T - C A - -

6 5 1

7 0 0

BovX	AACAATCTAC	CACAGAACCA	GCCCTGAAGC	CAAACCTGCAA	ACCAAAAAAAAA
A51908	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	----- C - -	-----	----- A -	-----	----- C - T - - - - C -
L08412	----- C - -	----- T -	----- A -	-----	----- C - T - - - - C -
L08417	----- C - -	-----	----- A -	-----	----- C - T - - - - C -
L08415	----- C - -	-----	----- C - A -	-----	----- C - - - - - C -
L08416	----- C - -	-----	----- C - A -	-----	----- C - - - - - C -
85-1330	----- C - -	-----	----- A -	-----	----- C - - - - - T -
L08414	----- C - -	-----	----- C -	-----	----- C - - - - - T -
L08410	----- C - -	-----	-----	----- A -	----- C - - - - - C -
L08411	----- C - -	-----	-----	----- A -	----- C - - - - - C -
FS-1	----- C - -	-----	-----	-----	----- C - - - - - C -
L08413	----- C - -	-----	-----	----- A -	----- C - - - - - C -
L10925	----- C - -	-----	-----	----- A -	----- C - - - - - C -
MVR553	----- C - -	-----	-----	-----	----- C - - - - - C -
RB94	----- C - -	-----	-----	-----	----- C - - - - - C -
NMK7	----- C - -	-----	-----	-----	----- C - - - - - C -
Lelystad	----- C - -	-----	-----	-----	----- C - T - - - - C -
VC-464	----- C - -	-----	-----	-----	----- C - - - - - C -
Dorset	----- C - -	-----	----- C - - - -	----- G - -	----- C - - - - - C -

7 0 1

7 5 0

BovX	ACACGGCAAC	TCCACAACAA	GGCATCCTCT	CTTCACCAGA	ACACCAAACA
A51908	-----	-----	-----	-----	-----
391-2	----- A - - - -	-----	-----	----- A - - - -	----- T - - C - - -
L08412	----- A - - - -	----- G - - - -	-----	----- A - - - -	----- T - - C - - -
L08417	----- A - - - -	-----	-----	----- A - - - -	----- T - - C - - -
L08415	----- T - - - -	-----	A - - - -	-----	----- C - - - -
L08416	----- T - - - -	-----	A - - - -	-----	----- C - - - -
85-1330	-----	-----	-----	-----	----- C - - - -
L08414	-----	-----	-----	-----	----- A - - C - - -
L08410	----- G - - - -	-----	-----	-----	----- A - - C - - -
L08411	----- G - - - -	-----	-----	-----	----- A - - C - - -
FS-1	----- C - - - -	-----	-----	-----	----- A - - C - - -
L08413	----- G - - - -	-----	-----	-----	----- A - - C - - -
L10925	----- G - - - -	-----	-----	-----	----- A - - C - - -
MVR553	----- G - - - -	-----	-----	-----	----- C - - - -
RB94	----- G - - - -	-----	-----	-----	----- C - - - -
NMK7	----- G - - - -	-----	-----	-----	----- C - - - -
Lelystad	----- C - A G C -	-----	-----	----- A - - - -	----- T - - C - - -
VC-464	----- C - - - -	-----	-----	-----	----- C - - - -
Dorset	----- * * C -	----- a - - - -	-----	----- A - - - -	----- C - - - -

	7 5 1			7 9 2
BovX	AATCAATCTA	CTACACAGAT	CTAa . . . . .	. . . . .
A51908	-----	-----	- C - CAACAC	ACCTCCATAT AA
391-2	-----A-	-----	- G . . . . .	. . . . .
L08412	-----	-----	. . . . .	. . . . .
L08417	-----	-----	. . . . .	. . . . .
L08415	-----	-----	. . . . .	. . . . .
L08416	-----	-----	. . . . .	. . . . .
85-1330	-----A-	-----	. . . . .	. . . . .
L08414	-----	-----	. . . . .	. . . . .
L08410	-----	-----	. . . . .	. . . . .
L08411	-----	-----	. . . . .	. . . . .
FS-1	-----A-	-----	. . . . .	. . . . .
L08413	-----	-----	. . . . .	. . . . .
L10925	-----A-	-----	- G . . . . .	. . . . .
MVR553	-----A-	-----	. . . . .	. . . . .
RB94	-----A-	-----	. . . . .	. . . . .
NMK7	-----A-	-----	. . . . .	. . . . .
Lelystad	-----A-	-----	- G . . . . .	. . . . .
VC-464	-----A-	-----	. . . . .	. . . . .
Dorset	-----A-	-----	. . . . .	. . . . .

**Figure 3.9.b** : Alignement des séquences du gène G de la souche BovX avec les 19 autres séquences disponibles par le programme PileUp (GCG).

minuscules: nucléotides incertains ou zone d'hybridation des oligos

\*: nucléotide non déterminé

- : nucléotide commun

. : nucléotide manquant.



391-2
L08412
L08417
L08415
L08416
85-1330
L08414
L08410
L08411
FS-1
L08413
L10925
MVR553
RB94
NMK7
Lelystad
VC-464
Dorset
A51908
BovX

**Figure 3.10.** : Ordre des 20 séquences du gène G tel qu'il a été déterminé par le programme PileUp.

une comparaison de ce fragment avec les autres séquences disponibles. Cette souche ne sera donc pas analysée.

Nous sommes ensuite passé à la comparaison des souches Dorset et BovX aux autres souches disponibles grâce au logiciel GCG et à ses multiples options.

## 7. Comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques de G

### 7.1. Comparaison des séquences nucléotidiques

Les séquences du gène G des souches Dorset et BovX ont été comparées aux 18 autres séquences du gène G connues. Il s'agit de séquences déterminées dans notre laboratoire (souches RB94, NMK7, 85-1330, MVR553), connues par la littérature (souches A51908, FS-1, VC-464 (Mallipeddi et Samal, 1993a); souche 391-2 (Lerch *et al.*, 1990)) ou encore fournies dans la banque de données GenBank (souches L084 :10-17 et L10925 séquencées par Stine et Kelling (1992)). Enfin, la séquence du gène G de la souche Lelystad est issue d'une communication personnelle (J. Kramps, Lelystad).

Cette comparaison a été réalisée grâce au programme PileUp (GCG). Le résultat de ces alignements est présenté à la figure 3.9.. Le programme commence par calculer des scores de similarités entre chaque paire de séquences possibles. Ces scores de similarités servent à grouper les séquences. Cet ordre est utilisé pour aligner les 2 premières séquences les plus proches. Ensuite, il aligne la séquence, ou la paire de séquences, la plus proche de ce premier groupe. Une série d'alignements par paire de ce type qui, comprenant des groupes de séquences et des séquences à dissemblance croissante à chaque itération, produit l'alignement final. A l'origine, le programme a classé les 20 séquences selon l'ordre présenté à la figure 3.10..

Pour une meilleure présentation et pour ainsi faciliter la compréhension, nous avons réarrangé cet alignement afin que la séquence BovX se trouve également en première position. Nous avons aussi modifié un autre point dans la présentation : toutes les bases communes à la souche Dorset ou BovX selon la figure ont été remplacées par un ".", les bases manquantes par un " ".



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0.0	1.3	9.0	9.9	10.2	9.6	9.7	9.0	10.2	9.0	9.0	8.7	9.1	10.1	6.7	6.7	6.3	8.0	6.6	8.7
2		0.0	10.0	10.8	10.8	10.0	10.1	9.5	10.5	9.9	9.9	9.7	10.1	11.0	7.1	7.1	7.0	8.8	7.1	9.1
3			0.0	1.9	2.2	4.0	4.1	3.7	5.1	4.5	4.5	4.7	7.8	5.4	5.3	5.2	4.8	4.4	3.7	6.0
4				0.0	1.9	4.5	4.7	4.2	5.6	5.3	5.3	5.5	5.6	6.6	6.4	6.4	5.9	5.6	4.7	7.1
5					0.0	4.8	4.9	4.5	5.6	5.6	5.6	5.8	5.9	6.8	6.7	6.7	6.2	5.9	5.1	7.2
6						0.0	0.1	1.6	2.9	4.2	4.2	4.2	4.5	5.5	4.8	4.8	4.8	5.3	3.6	5.8
7							0.0	1.8	3.0	4.4	4.4	4.4	4.7	5.6	4.9	4.9	4.9	5.5	3.7	6.0
8								0.0	2.6	4.4	4.4	4.3	4.7	5.6	4.5	4.5	4.5	5.2	3.3	5.8
9									0.0	5.6	5.6	5.6	5.9	6.8	5.9	5.9	5.9	6.3	4.7	6.9
10										0.0	0.0	1.4	1.1	2.1	5.2	5.2	4.7	5.9	3.7	6.1
11											0.0	1.4	1.1	2.1	5.2	5.2	4.7	5.9	3.7	6.1
12												0.0	1.1	2.0	5.1	5.1	4.5	5.8	3.1	5.7
13													0.0	1.6	5.2	5.2	4.7	6.2	3.7	6.0
14														0.0	6.1	6.0	5.6	6.9	4.7	7.0
15															0.0	0.0	2.1	2.3	2.8	4.7
16																0.0	2.1	2.3	2.8	4.7
17																	0.0	3.3	2.3	4.3
18																		0.0	3.7	5.5
19																			0.0	2.0
20																				0.0

**Tableau 3.2.** : Pourcentages de substitutions au niveau du gène G des souches Dorset, BovX et des 18 autres souches bovines.  
Calculs réalisés, sur base de l'alignement, par le programme Distances (GCG).

- |           |            |            |              |
|-----------|------------|------------|--------------|
| 1. BovX   | 6. L08415  | 11. L08411 | 16. RB94     |
| 2. A51908 | 7. L08416  | 12. FS-1   | 17. NMK7     |
| 3. 391-2  | 8. 85-1330 | 13. L08413 | 18. Lelystad |
| 4. L08412 | 9. L08414  | 14. L10925 | 19. VC-464   |
| 5. L08417 | 10. L08410 | 15. MVR553 | 20. Dorset   |



## Résultats

Le tableau 3.2. indique les pourcentages de substitutions entre les séquences nucléotidiques des phases ouvertes de lecture des 20 souches comparées. Ces résultats ont été calculés par le programme Distances, la méthode choisie détermine une distance observée entre 2 séquences en calculant un pourcentage de substitutions sans aucune correction mathématique.

Cette comparaison nous montre que la position de l'ATG initiateur de traduction est conservée. Aucun saut de phase n'est à signaler.

Voyons maintenant les résultats en fonction de chaque souche.

### 7.1.1. Souche Dorset

L'analyse de l'alignement présenté à la figure 3.9.a montre un rapprochement entre les souches Dorset et VC-464. Le pourcentage de substitutions est de 2 %, alors que face aux autres souches ces pourcentages s'étendent de 4.3 à 9.1 % (tableau 3.2.). Ces substitutions se situent surtout entre le nucléotide 624 et l'extrémité 3' terminale, zone correspondant à l'extrémité COOH du domaine extracellulaire.

### 7.1.2. Souche BovX

Au premier coup d'oeil, nous voyons que la souche A51908 est la souche la plus proche de la souche BovX (figure 3.9.b). Cette souche A51908 présente la particularité d'avoir son stop de traduction décalé de 18 nucléotides par rapport aux autres souches. Une incertitude persiste pourtant. En effet, puisque la souche BovX est très proche de la souche A51908, il est possible que cette dernière ait aussi la première base de son stop de traduction décalé de 18 nucléotides. Nous n'avons pu le démontrer. L'analyse des films photo ne nous a pas permis une lecture certaine de la troisième base de ce qui constitue le stop des autres souches. Cette base est d'ailleurs symbolisée par un "a" minuscule dans la séquence présentée à la figure 3.7..

Le tableau 3.2. confirme cette proximité des souches A51908 et BovX. On observe, en effet, un pourcentage de substitutions de 1.3 % entre ces deux souches, alors que face aux autres souches ces pourcentages s'étendent de 6.3 à 10.2 %.



**A**

```

      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
1 MSNHTHHQLF KTLKRAWKAS KYFTVGLSCL YKFNLKSLVQ TALITLAMIT LTSLVITAI IYISVGNAKAK PTKPTIQQT 80
81 QQPQNHTSPF FTEHNYKSTH TSIQSTTSLQ LPNTDTTRGT PYGQSIDETQ NRKIKSQSTL PATRKPPINP SGSNPPENHQ 160
161 DHNNSQTLPH VPCSTCEGNL ACXXXCQIGP ERAPSRAPTI TLKKTPKPKT TKKPTTTTIH HRTSPEAKLE PKNNTXPQQ 240
241 GILSSPEHHT NQSTTQIZ 258
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80

B
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
1 MSNHTHHPKF KTLKRAWKAS KYFTVGLSCL YKFXLKSLVQ TALTSLAMIT LTSLVITAI IYISVGNAKAK PTKPTIQQT 80
81 QQPQNHTPLL PTEHNHKSTH TSTQXXXLSQ PPNIDTTSQT TYGHPINRTQ NRKIKSQSTH LATRKLPINP LESNPPENHQ 160
161 DHNNSQTLPH VPCSTCXXXX XXXXXXXXXXXX XRAPSRAPTI TLKKAPKPKT XNKPTKTIY HRTSPEAKLQ TKKNTATPQQ 240
241 GILSSPEHQT NQSTTQIZ 258
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80

```

**Figure 3.11.** : Séquence protéique du gène G des souches Dorset (A) et BovX (B).

x : acide aminé non déterminé

Z : stop de traduction.

A51908
BovX
L08410
L08411
FS-1
L08413
L10925
VC-464
NMK7
MVR553
RB94
Lelystad
L08412
L08417
391-2
L08415
L08416
85-1330
L08414
Dorset

**Figure 3.12.** : Ordre des 20 séquences protéiques du gène G tel qu'il a été déterminé par le programme PileUp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0.0	1.2	13.5	15.6	15.2	15.2	15.6	14.3	15.6	15.2	15.2	13.6	15.2	16.3	11.9	11.9	11.5	12.7	11.0	11.5
2		0.0	15.5	16.9	16.5	16.1	16.5	15.9	16.5	16.9	16.9	15.9	16.9	18.2	12.7	12.4	13.1	14.3	12.5	13.5
3			0.0	3.3	2.9	5.6	6.2	5.2	6.6	9.1	9.1	8.0	9.1	10.5	7.9	7.7	6.8	7.0	6.0	8.0
4				0.0	2.9	7.4	7.8	7.0	8.2	10.7	10.7	9.9	10.7	12.4	9.9	9.9	8.6	8.6	7.5	9.6
5					0.0	7.0	7.4	6.6	7.0	10.3	10.3	9.1	9.9	10.9	9.1	9.1	7.8	8.2	7.1	9.2
6						0.0	0.1	2.9	4.5	8.6	8.6	7.8	8.6	10.7	7.4	7.4	6.6	7.0	5.8	7.9
7							0.0	3.3	4.9	9.1	9.1	8.2	9.1	11.1	7.8	7.8	7.0	7.4	6.2	8.3
8								0.0	4.1	8.6	8.6	7.6	8.6	10.3	7.1	7.1	6.4	6.8	5.6	7.5
9									0.0	9.1	9.1	7.8	8.6	10.7	7.8	7.8	7.0	7.8	6.2	8.3
10										0.0	0.0	2.1	2.5	4.5	9.5	9.1	7.8	9.5	7.1	9.1
11											0.0	2.1	2.5	4.5	9.5	9.1	7.8	9.5	7.1	9.2
12												0.0	1.2	3.2	8.0	8.0	6.4	8.0	4.8	7.2
13													0.0	3.3	8.6	8.7	7.0	9.5	6.2	8.3
14														0.0	10.3	10.1	8.7	11.2	8.0	9.9
15															0.0	0.0	4.0	3.6	5.2	6.7
16																0.0	4.0	3.9	5.2	6.7
17																	0.0	4.8	3.6	5.5
18																		0.0	5.2	7.1
19																			0.0	1.6
20																				0.0

**Tableau 3.3.** : Pourcentages de substitutions au niveau de la séquence protéique du gène G des souches Dorset, BovX et des 18 autres souches bovines.  
Calculs réalisés, sur base de l'alignement, par le programme Distances (GCG).

1. BovX	6. L08415	11. L08411	16. RB94
2. A51908	7. L08416	12. FS-1	17. NMK7
3. 391-2	8. 85-1330	13. L08413	18. Lelystad
4. L08412	9. L08414	14. L10925	19. VC-464
5. L08417	10. L08410	15. MVR553	20. Dorset



Dorset	.....HQLF	KTLKRAWKAS	KYFIVGLSCL	YKFNLKSLVQ	TALTTLAMIT
VC-464	.....	.....	.....	.....	.....
391-2	MSNHTH - LK -	.....	.....	.....	.....S.....
L08412	.....PK -	.....	.....	.....R.....	.....S.....
L08417	.....LK -	.....I.....	.....	.....	.....S.....
L08415	.....LK -	.....	.....	.....	.....S.....
L08416	.....LK -	.....	.....	.....	.....S.....
85-1330	.....LK -	.....	.....	.....	.....V-S.....
L08414	.....LK -	.....	.....	.....I.....	.....S.....
L08410	.....LK -	.....	.....	.....	.....K-S.....
L08411	.....LK -	.....	.....	.....	.....K-S.....
FS-1	.....LK -	.....	.....	.....	.....S.....
L08413	.....LK -	.....	.....	.....	.....S.....
L10925	MSNHTH - LK -	..G.....P..	.....	.....	.....S.....
MVR553	.....LK -	.....	.....	.....	.....
RB94	MSNHTH - LK -	.....	.....	.....	.....A.....
NMK7	.....LK -	.....	.....	.....	.....
Lelystad	MSTHTH - LKL	.....	.....	.....	.....
A51908	MSNHTH - PK -	.....	.....	.....	.....S.....
BovX	.....PK -	.....	.....	.....X.....	.....S.....

Dorset	LTSLVITAI I	YISVGNAAKAK	PTSKPTIQQT	QQPQNHTSPF	FTEHNYKSTH
VC-464	.....	.....	.....	.....	.....
391-2	.....	.....	.....	.....	.....
L08412	.....	.....D.....	.....	.....	.....
L08417	.....	.....	.....	.....	.....
L08415	.....	.....	.....V.....	.....	.....
L08416	.....A.....	.....	.....V.....	.....	.....
85-1330	.....	.....	.....	.....	.....
L08414	.....	.....	.....	.....	.....K.....
L08410	..P.....	.....	.....	.....	.....N.....
L08411	..P.....	.....	.....	.....	.....N.....
FS-1	.....	.....	.....	.....	.....N.....
L08413	.....	.....	.....	.....	.....N.....
L10925	.....	.....KS.....	.....	.....	.....N.....
MVR553	.....L.....	.....	.....	.....R.....L.....	.....
RB94	.....L.....	.....	.....	.....R.....L.....	.....
NMK7	.....	.....	.....	.....L.....L.....	.....
Lelystad	.....	.....	.....	.....	.....L.....
A51908	.....	.....	.....T.....	.....PLL	P.....H.....
BovX	.....	.....	.....T.....	.....PLL	P.....H.....

Dorset	TSIQSTTLSQ	LPNTDTRGT	PYGQSIDETQ	NRKIKSQSTL	PATRKPPINP
VC-464	.....	.....	.....T-H.....	.....	.....
391-2	.....	..L-I.....I	..T-H-TN...	.....G.....	.....
L08412	.....	..L-I-A...I	..T-H-TN...	..I...GL...	.....
L08417	.....	..L-I-A...I	..T-H-TN...	..I...G.....	S.....
L08415	I.....	..L-I.....	..T-SH-TN...	.....	.....S.....
L08416	I.....	..L-I.....	..T-SH-TN...	.....	.....S.....
85-1330	.....	..L-I.....	..T-SH-TN...	.....	.....S.....
L08414	.....	..L-I.....A	..T-SH-TN...	.....	.....S.....
L08410	.....	..P-I.....	..T-H-T.....	S.....	.....T.....
L08411	.....	..P-I.....	..T-H-T.....	S.....	.....T.....
FS-1	.....	..I-I.....	..T-H-T.....	S.....	.....T.....
L08413	.....	..I-I.....	..T-H-T.....	S...R...S...	.....T.....
L10925	.....	..I-I.....	..T-H-T.....	S.....A.....	.....T.....
MVR553	.....	..L-I.....	..T-SHPT...	.....	.....Q.....
RB94	.....	..L-I.....	..T-SHPT...	.....	.....Q.....
NMK7	.....	..L-I.....	..T-SHPT-G...	.....	.....G.....
Lelystad	.....	..L-I.....	..T-SHPT...	.....	.....Q.....
A51908	..T.....	..P-I...S..	..T-HP-NR...	.....P	L...L...
BovX	..T-XXX...	..P-I...S..	..T-HP-NR...	.....H	L...L...

	1 5 1				2 0 0
Dorset	SGSNPPENHQ	DHNNSQTLPY	VPCSTCEGNL	ACXXXCQIGP	ERAPSRAPTI
VC-464	-----	-----	-----	--LSL-----	-----
391-2	--- I -----	--- F -----	-----	--LSL-H-ET	-----
L08412	-----	--- F -----	-----	--LSL---ET	-----
L08417	-----	--- L -----	-----	--LSL---ET	-----
L08415	-----	--- T-F -----	-----	--LSL-----	-----
L08416	-----	--- T-F -----	-----	--LSL-----	-----
85-1330	-----	--- T-F -----	-----	--LSL-----	-K-----
L08414	-----	--- T-L -----	-----	--LSL-----	-----
L08410	-E-----	--- F -----	-----	--LSL-V--G	-----
L08411	-E-----	--- F -----	-----	--LSL-V--G	-----
FS-1	-E-----	-----	-----	--LSL-V--G	-----
L08413	-E-----	-----	-----	--LSL-V--G	-----
L10925	-E-----	-----	E-----	--LSL-V--G	-----
MVR553	-----	-----	-----	--SSL---L	-----
RB94	-----	-----	-----	--SSL---L	-----
NMK7	-----	-----	-----	--LSL-----	-----
Lelystad	-----	--- F -----	-----	--LSL---A	-----
A51908	LE-----	-----H	-----P	--SPL---L	-----
BovX	LE-----	-----H	-----XXXX	XX--XXXXXX	X-----

	2 0 1				2 5 0
Dorset	TLKKT PKPKT	TKKP TTTTIH	HRTSPEAKLE	PKNNXXXXXQQ	GILSSPEHHT
VC-464	-----	--- K -----	-----Q	---TAPP--	-----
391-2	-----	--- K -----	---T-Q	---TATP--	---T---
L08412	-----	--- K -----	---T-Q	---TATP--	---T---
L08417	-----	--- K -----	---T-Q	---TATP--	---T---
L08415	-----	--- K -----	---T-Q	---TASP--	S-----
L08416	-----	--- K -----	---T-Q	---TASP--	S-----
85-1330	-F-----	--- K -----	---T-Q	---TATP--	-----
L08414	-----L--	--- K -----	-----Q	---TATP--	-----Q--
L08410	-----	--- IK-----	-----Q	---TAAP--	-----N--
L08411	-----	--- IK-----	-----Q	---TAAP--	-----N--
FS-1	-----	--- IK-----	-----Q	---TAPP--	-----N--
L08413	-----	--- IK-----	-----Q	---TAAP--	-----N--
L10925	-----	---R- IK-----	-----Q	---TAAP--	-----N--
MVR553	---A-----	--- K -----	-----Q	---TAAP--	-----
RB94	---A-----	--- K -----	-----Q	---TAAP--	-----
NMK7	-----	--- K -----	-----Q	---TAAP--	-----
Lelystad	---A-----	--- K -----	-----Q	---TEPP--	---T---
A51908	---A-----	--- K ---Y	-----Q	T-K-TATP--	-----Q-
BovX	---A-----	XN---K---Y	-----Q	T-K-TATP--	-----Q-

	2 5 1	2 6 4
Dorset	NQSTTQI* . . .	. . .
VC-464	-----	. . .
391-2	-----	. . .
L08412	. . . . .	. . .
L08417	. . . . .	. . .
L08415	. . . . .	. . .
L08416	. . . . .	. . .
85-1330	. . . . .	. . .
L08414	. . . . .	. . .
L08410	. . . . .	. . .
L08411	. . . . .	. . .
FS-1	. . . . .	. . .
L08413	. . . . .	. . .
L10925	. . . . .	. . .
MVR553	. . . . .	. . .
RB94	. . . . .	. . .
NMK7	. . . . .	. . .
Lelystad	. . . . .	. . .
A51908	. . . . .SQH	T S I
BovX	. . . . .	. . .

**Figure 3.13.a** : Alignement des séquences protéiques du gène G de la souche Dorset avec les 19 autres séquences protéiques disponibles.

X: acide aminé non déterminé

- : acide aminé commun

. : acide aminé manquant

\*: stop de traduction.



BovX	.....HPKF	KTLKRAWKAS	KYFIVGLSCL	YKFXLKSLVQ	TALTSLAMIT
A51908	MSNHTH - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - -
391-2	MSNHTH - L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - ST - - - - -
L08412	.....	.....	.....	- R - N - - - - -	- - - - - ST - - - - -
L08417	..... L - -	- I - - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - ST - - - - -
L08415	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - ST - - - - -
L08416	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - ST - - - - -
85-1330	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- V - ST - - - - -
L08414	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - - I -	- - - - - ST - - - - -
L08410	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	K - - ST - - - - -
L08411	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	K - - ST - - - - -
FS-1	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - ST - - - - -
L08413	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - ST - - - - -
L10925	MSNHTH - L - -	- G - - - - - P -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - ST - - - - -
MVR553	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - T - - - - -
RB94	MSNHTH - L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - T - - - - -
NMK7	..... L - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - T - - - - -
Lelystad	MSTHTH - L - L	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - T - - - - -
VC-464	.....	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - T - - - - -
Dorset	..... QL -	- - - - -	- - - - -	- - - - - N - - - - -	- - - - - T - - - - -

BovX	LTSLVITAI I	YISVGNAAKAK	PTSKPTTQQT	QQPQNHTPLL	PTEHNHKSTH
A51908	.....	.....	.....	.....	.....
391-2	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - - - - Y - - - -
L08412	.....	- D - - - - -	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - - - - Y - - - -
L08417	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - - - - Y - - - -
L08415	.....	.....	- V - - - - -	- - - - - SPF	F - - - - Y - - - -
L08416	- - - - - A - - - - -	.....	- V - - - - -	- - - - - SPF	F - - - - Y - - - -
85-1330	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - - - - Y - - - -
L08414	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - K - - Y - - - -
L08410	- P - - - - -	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - N - Y - - - -
L08411	- P - - - - -	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - N - Y - - - -
FS-1	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - N - Y - - - -
L08413	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - N - Y - - - -
L10925	.....	- - - - - KS - - - - -	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - N - Y - - - -
MVR553	..... L - -	.....	- I - - - - -	- R - - - - - SP -	F - - - - Y - - - -
RB94	..... L - -	.....	- I - - - - -	- R - - - - - SP -	F - - - - Y - - - -
NMK7	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - L - SP -	F - - - - Y - - - -
Lelystad	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - SP -	F - - - - Y - - - -
VC-464	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - - - - Y - - - -
Dorset	.....	.....	- I - - - - -	- - - - - SPF	F - - - - Y - - - -

BovX	TSTQXXXLSQ	PPNIDTTS GT	TYGHPINRTQ	NRKIKSQSTH	LATRKL PINP
A51908	..... STT - - -	.....	.....	.....	..... P - - - - -
391-2	- I - STT - - -	LL - - - - - R - I	- - - - - ST - E - -	- - - - - G - - - - L	P - - - - P - - - -
L08412	- I - STT - - -	LL - - - - - A - R - I	- - - - - ST - E - -	- I - - - - - GL - - L	P - - - - P - - - -
L08417	- I - STT - - -	LL - - - - - A - R - I	- - - - - ST - E - -	- I - - - - - G - - - - L	S - - - - P - - - -
L08415	I - I - STT - - -	LL - - - - - R - -	- - S - ST - E - -	- - - - - L	P - - - - P - - - - S
L08416	I - I - STT - - -	LL - - - - - R - -	- - S - ST - E - -	- - - - - L	P - - - - P - - - - S
85-1330	- I - STT - - -	LL - - - - - R - -	- - S - ST - E - -	- - - - - L	P - - - - P - - - - S
L08414	- I - STT - - -	LL - - - - - R - A	- - S - ST - E - -	- - - - - L	P - - - - P - - - - S
L08410	- I - STT - - -	- I - - - - - R - -	- - - - - STDE - -	S - - - - - L	PT - - - P - - - -
L08411	- I - STT - - -	- I - - - - - R - -	- - - - - STDE - -	S - - - - - L	PT - - - P - - - -
FS-1	- I - STT - - -	LI - - - - - R - -	- - - - - STDE - -	S - - - - - L	PT - - - P - - - -
L08413	- I - STT - - -	LI - - - - - R - -	- - - - - STDE - -	S - - - - - R - - - - SL	PT - - - P - - - -
L10925	- I - STT - - -	LI - - - - - R - -	- - - - - STDE - -	S - - - - - AL	PT - - - P - - - -
MVR553	- I - STT - - -	LL - - - - - R - -	- - S - TDE - -	- - - - - L	P - - - - QP - - - -
RB94	- I - STT - - -	LL - - - - - R - -	- - S - TDE - -	- - - - - L	P - - - - QP - - - -
NMK7	- I - STT - - -	LL - - - - - R - -	- - - - - TDG - -	- - - - - L	P - - - - G - P - - - -
Lelystad	- I - STT - - -	LL - - - - - R - -	- - S - TDE - -	- - - - - L	P - - - - QP - - - -
VC-464	- I - STT - - -	L - - T - - - R - -	- - - - - S - DE - -	- - - - - L	P - - - - P - - - -
Dorset	- I - STT - - -	L - - T - - - R - -	P - - QS - DE - -	- - - - - L	P - - - - P - - - -

	1 5 1				2 0 0
BovX	LESNPPENHQ	DHNNSQTLPH	VPCSTCXXXX	XXXXXXXXXX	XRAPSRAPTI
A51908	- - - - -	- - - - -	- - - - -	EGNP	ACSPLCQIGL E - - - - -
391-2	SG - I - - - - -	- - - - F - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCCHIET E - - - - -
L08412	SG - - - - -	- - - - F - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCQIET E - - - - -
L08417	SG - - - - -	- - - - L - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCQIET E - - - - -
L08415	SG - - - - -	- - T - F - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCQIGP E - - - - -
L08416	SG - - - - -	- - T - F - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCQIGP E - - - - -
85-1330	SG - - - - -	- - T - F - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCQIGP EK - - - - -
L08414	SG - - - - -	- - T - L - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCQIGP E - - - - -
L08410	S - - - - -	- - - - F - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCQVGP G - - - - -
L08411	S - - - - -	- - - - F - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCQVGP G - - - - -
FS-1	S - - - - -	- - - - -	- - - - -	EGNL	ACLSLCQVGP G - - - - -
L08413	S - - - - -	- - - - -	- - - - -	EGNL	ACLSLCQVGP G - - - - -
L10925	S - - - - -	- - - - -	Y E - - - - -	EGNL	ACLSLCQVGP G - - - - -
MVR553	SG - - - - -	- - - - -	- - - - -	EGNL	ACSSLCQIGL E - - - - -
RB94	SG - - - - -	- - - - -	- - - - -	EGNL	ACSSLCQIGL E - - - - -
NMK7	SG - - - - -	- - - - -	- - - - -	EGNL	ACLSLCQIGP E - - - - -
Lelystad	SG - - - - -	- - - - F - - - - Y	- - - - -	EGNL	ACLSLCQIGA E - - - - -
VC-464	SG - - - - -	- - - - -	- - - - -	EGNL	ACLSLCQIGP E - - - - -
Dorset	SG - - - - -	- - - - -	- - - - -	EGNL	AC - - - CQIGP E - - - - -

	2 0 1				2 5 0
BovX	TLKKAPKPKT	XNKPTKTTIY	HRTSPEAKLQ	TKKNTATPQQ	GILSSPEHQT
A51908	- - - - -	TK - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
391-2	- - - - T - - - -	TK - - - - - H	- - - - - T - - -	P - N - - - - -	- - - - - T - - H -
L08412	- - - - T - - - -	TK - - - - - H	- - - - - T - - -	P - N - - - - -	- - - - - T - - H -
L08417	- - - - T - - - -	TK - - - - - H	- - - - - T - - -	P - N - - - - -	- - - - - T - - H -
L08415	- - - - T - - - -	TK - - - - - H	- - - - - T - - -	P - N - - - S - - -	S - - - - - H -
L08416	- - - - T - - - -	TK - - - - - H	- - - - - T - - -	P - N - - - S - - -	S - - - - - H -
85-1330	- F - - T - - - -	TK - - - - - H	- - - - - T - - -	P - N - - - - -	- - - - - H -
L08414	- - - - T - - L - -	TK - - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - - -	- - - - - QH -
L08410	- - - - T - - - -	TK - - I - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - A - - -	- - - - - NH -
L08411	- - - - T - - - -	TK - - I - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - A - - -	- - - - - NH -
FS-1	- - - - T - - - -	TK - - I - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - P - - -	- - - - - NH -
L08413	- - - - T - - - -	TK - - I - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - A - - -	- - - - - NH -
L10925	- - - - T - - - -	TKR - I - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - A - - -	- - - - - NH -
MVR553	- - - - -	TK - - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - A - - -	- - - - - H -
RB94	- - - - -	TK - - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - A - - -	- - - - - H -
NMK7	- - - - T - - - -	TK - - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - A - - -	- - - - - H -
Lelystad	- - - - -	TK - - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - EP - - -	- - - - - T - - H -
VC-464	- - - - T - - - -	TK - - - - - H	- - - - - - - - -	P - N - - - P - - -	- - - - - H -
Dorset	- - - - T - - - -	TK - - T - - - - H	- - - - - - E	P - N - XXXX - -	- - - - - H -

	2 5 1	2 6 4
BovX	NQSTTQI * . . .	. . .
A51908	- - - - - SQH	T S I
391-2	- - - - -	. . .
L08412	. . . . .	. . .
L08417	. . . . .	. . .
L08415	. . . . .	. . .
L08416	. . . . .	. . .
85-1330	- - - - -	. . .
L08414	. . . . .	. . .
L08410	. . . . .	. . .
L08411	. . . . .	. . .
FS-1	- - - - -	. . .
L08413	. . . . .	. . .
L10925	- - - - -	. . .
MVR553	- - - - -	. . .
RB94	- - - - -	. . .
NMK7	- - - - -	. . .
Lelystad	- - - - -	. . .
VC-464	- - - - -	. . .
Dorset	- - - - -	. . .

**Figure 3.13.b** : Alignement des séquences protéiques du gène G de la souche BovX avec les 19 autres séquences protéiques disponibles.

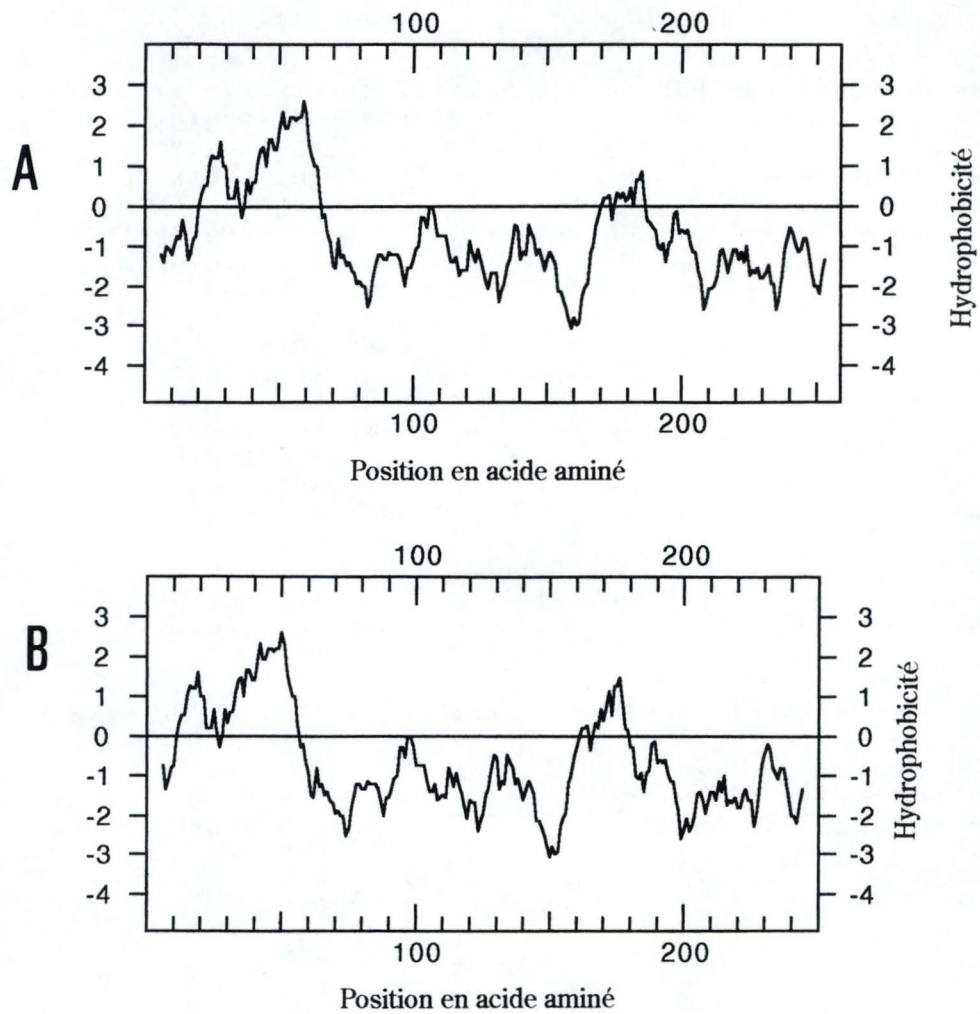
x: acide aminé non déterminé

- : acide aminé commun

. : acide aminé manquant

\*: stop de traduction.





**Figure 3.14.** : Graphes d'hydrophobicité des souches Dorset (A) et VC-464 (B).

### 7.2. Comparaison des séquences protéiques

La séquence en acides aminés de chacune des 20 souches a été déterminée grâce à la traduction de la séquence nucléotidique par l'option translate du programme GCG. Nous avons obtenu ainsi, pour les souches BovX et Dorset, une séquence de 257 acides aminés (figure 3.11.).

Ces deux séquences protéiques ont été comparées aux 18 autres séquences grâce au programme PileUp. L'alignement trouvé par le programme est celui présenté à la figure 3.12.. Comme précédemment, nous avons réarrangé la disposition des souches. Ainsi, pour faciliter la comparaison, nous avons présenté les souches dans le même ordre que pour l'alignement nucléotidique des souches Dorset et BovX (figure 3.13.).

Les pourcentages de substitutions ont aussi été calculés. Les valeurs sont présentées dans le tableau 3.3..

Des graphes d'hydrophobicité ont été réalisés par le programme DNA Strider en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle.

Nous séparerons les analyses en fonction de chaque souche. Mais, nous pouvons déjà remarquer que le maximum de divergence se trouve dans le domaine COOH-terminal correspondant au domaine extracellulaire.

#### 7.2.1. Souche Dorset

En analysant l'alignement à la figure 3.13.a, il apparaît que les conclusions tirées de l'alignement nucléotidique s'appliquent aussi ici. Nous voyons, en effet, que la souche Dorset est proche de la souche VC-464, le pourcentage de substitutions étant seulement de 1.6 % alors que pour les autres comparaisons, nous pouvons observer des valeurs allant de 5.5 à 13.5 % de substitutions (tableau 3.3.).

Nous avons alors comparé les graphes d'hydrophobicité des souches Dorset et VC-464 (figure 3.14.). Ces profils sont fort semblables. Ils indiquent une région hydrophile initiale suivie d'un pic hydrophobe. Ces deux régions correspondent au domaine cytoplasmique (acides aminés 1 à 37). Ce domaine est suivi d'une région très



## Résultats

hydrophobe qui correspond au domaine transmembranaire, domaine servant de zone d'ancrage et de séquence signal (acides aminés 38 à 66). Le reste de la protéine est principalement hydrophile et correspond au domaine extracellulaire (acides aminés 67 à 257). Nous n'observons pas de région hydrophobe dans la partie COOH-terminale, contrairement aux autres protéines de la famille des *Paramyxoviridae*.

Par la superposition des 2 graphes, nous remarquons qu'ils sont pareils sauf une petite zone commençant vers le résidu 170, celle-ci correspondant aux acides aminés que nous n'avons pas pu déterminer pour la souche Dorset. Les graphes sont quelque peu décalés l'un par rapport à l'autre car nous ne disposons pas de la séquence entière pour la souche VC-464 (il nous manque une partie du côté 5').

Pour le nombre d'acides aminés moins ceux des oligos, le contenu en sérine et thréonine est élevé (25 %). On compte 60 résidus sérine et thréonine, dont 49 (81 %) se trouvent dans le domaine extracellulaire. Quatre sites accepteurs Asp-X-Thr se trouvent dans le domaine extracellulaire aux positions 85, 149, 163 et 251. Le site 85 est conservé entre toutes les souches. Le site 251 est présent dans toutes les souches où cette zone est séquencée c'est-à-dire toutes sauf celles dont le nom commence par L0841. Le site 149 est trouvé dans toutes les souches sauf chez BovX et A51908. Enfin, le site 163 n'existe pas dans les souches L08414, L08415, L08416 et 85-1330.

Trois cystéines sont situées aux positions 173, 176 et 182 et déterminées avec certitude dans les autres souches excepté la souche Dorset, mais ce sont des cystéines appartenants aux oligos D1, 34446 et D3. Une quatrième cystéine au résidu 186 est conservé dans 19 des 20 souches comparées, la vingtième étant la souche BovX chez qui cet acide aminé n'a pas pu être déterminé.

On observe enfin un nombre élevé en résidus proline : 9 %. Beaucoup de ceux-ci sont conservés entre les 20 souches.

### 7.2.2. Souche BovX

A nouveau, les conclusions de l'alignement nucléotidique se vérifient au niveau protéique (figure 3.13.b). La souche BovX est proche de la souche A51908. Les pourcentages de substitutions le confirment avec seulement 1.2 % de substitutions entre

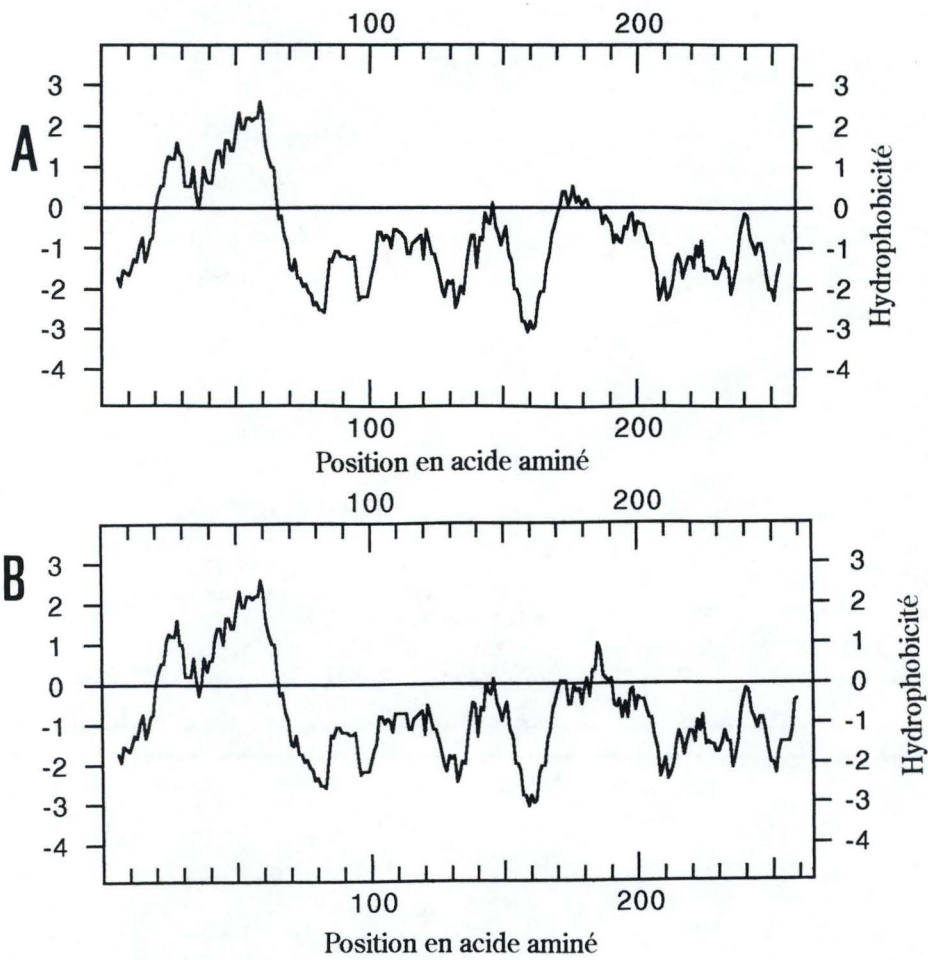


Figure 3.15. : Graphes d'hydrophobicité des souches BovX (A) et A51908 (B).

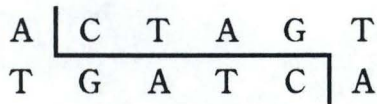


Figure 3.16. : Séquence reconnue par l'enzyme de restriction *SpeI* et site de coupure.

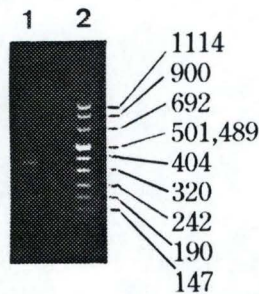
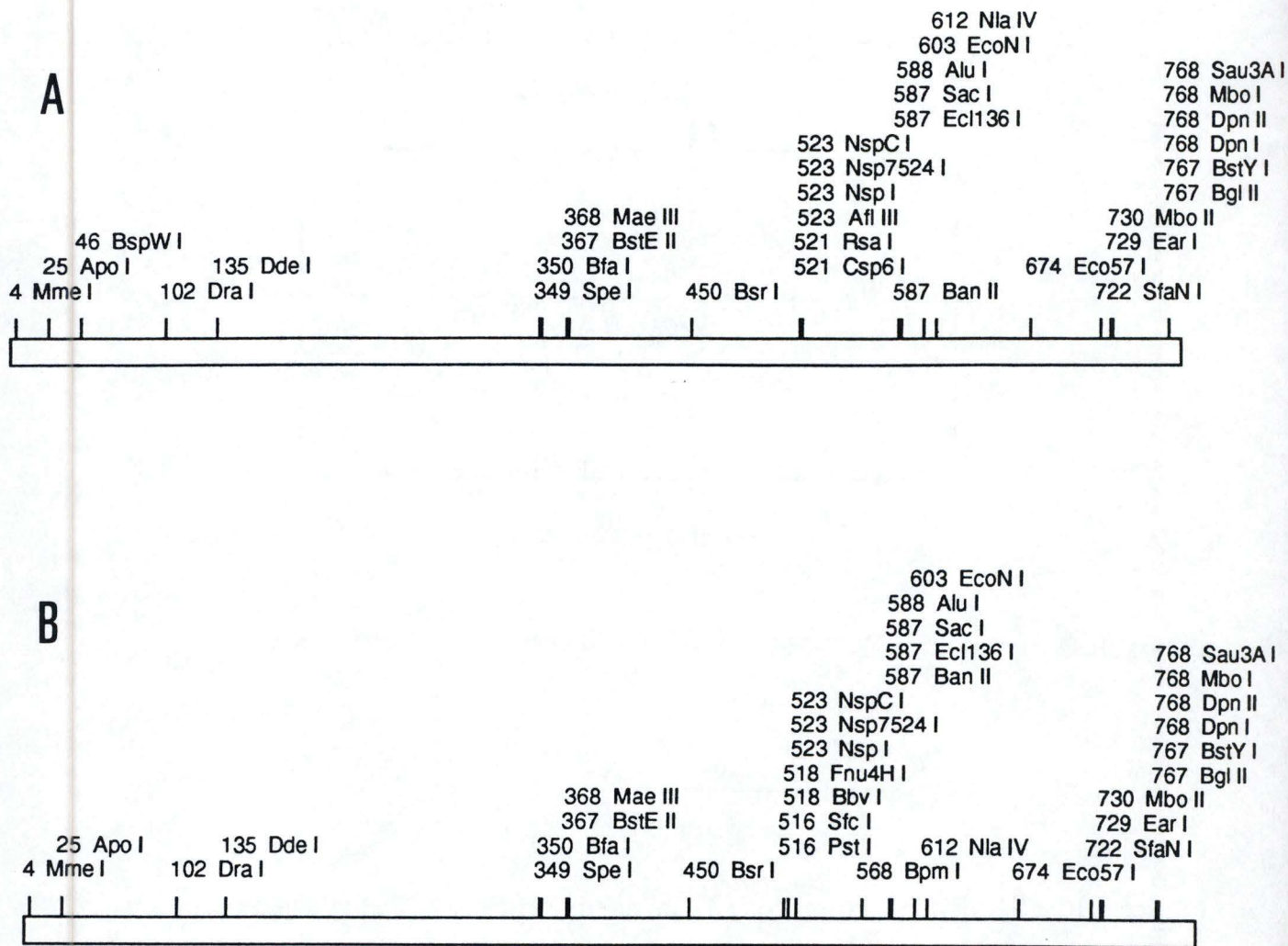


Figure 3.18. : Electrophorèse en gel d'agarose 2 % représentant la restriction *SpeI* sur l'amplification par les oligos OL3 et D1 de l'ARN de la souche BovX.

Piste 1 : Restriction *SpeI*

Piste 2 : Marqueur de poids moléculaire VIII.





**Figure 3.17.** : Cartes des sites uniques de restriction des souches BovX (A) et A51908 (B).

## Résultats

les souches BovX et A51908 alors que l'on peut observer des valeurs allant de 11 à 16.3 pour-cent pour les autres comparaisons (tableau 3.3.).

Les profils d'hydrophobicité des souches BovX et A51908 ont été établis (figure 3.15.). Nous retrouvons les 3 mêmes domaines. La région hydrophobe COOH-terminale est aussi absente. Si l'on superpose les 2 graphes, on voit que seule une zone s'étendant des résidus 180 à 200 diffère, celle-ci correspondant aux acides aminés que nous n'avons pas pu déterminer pour la souche BovX. Le graphe se prolonge un peu vers la droite pour la souche A51908 car sa protéine G est plus longue de 6 acides aminés.

Pour le nombre d'acides aminés moins ceux des oligos, 23 % des résidus déterminés sont des sérines ou des thréonines, soit 56. Quarante-quatre de ces résidus se trouvent dans le domaine extracellulaire, soit 79 %. Trois sites de glycosylation N-liée sont observés et se trouvent aussi dans le site extracellulaire aux positions 85, 127 et 251. Les mêmes observations que précédemment s'appliquent évidemment ici pour les sites 85 et 251. Le site 127 n'est présent que dans les souches BovX, A51908, 391-2, L08412, L08414, L08415, L08416, L08417 et 85-1330.

Les résidus 117 et 118, correspondants à une thréonine et une sérine respectivement, ont été vérifiés. Ceux-ci représentent, en effet, un site *SpeI* (figure 3.16.) qui n'existe que chez les souches BovX et A51908 (figure 3.17.). La restriction sur quelques µg d'ADN amplifié de la souche BovX par les oligos OL3 et D1 a été réalisée. La migration de 1 µl de cette réaction sur un gel d'agarose a montré 2 fragments à 179 et 349 paires de bases correspondant à la bonne restriction (figure 3.18.). Ceci confirme à nouveau la proximité entre les souches BovX et A51908.

Nous observons 2 cystéines aux positions 173 et 176 mais correspondant à des cystéines se trouvant dans les oligos D1 et 34446. Ces 2 cystéines se trouvent avec certitude dans toutes les souches sauf la souche Dorset.

Neuf pour-cent de résidus proline sont aussi constatés pour la souche BovX.



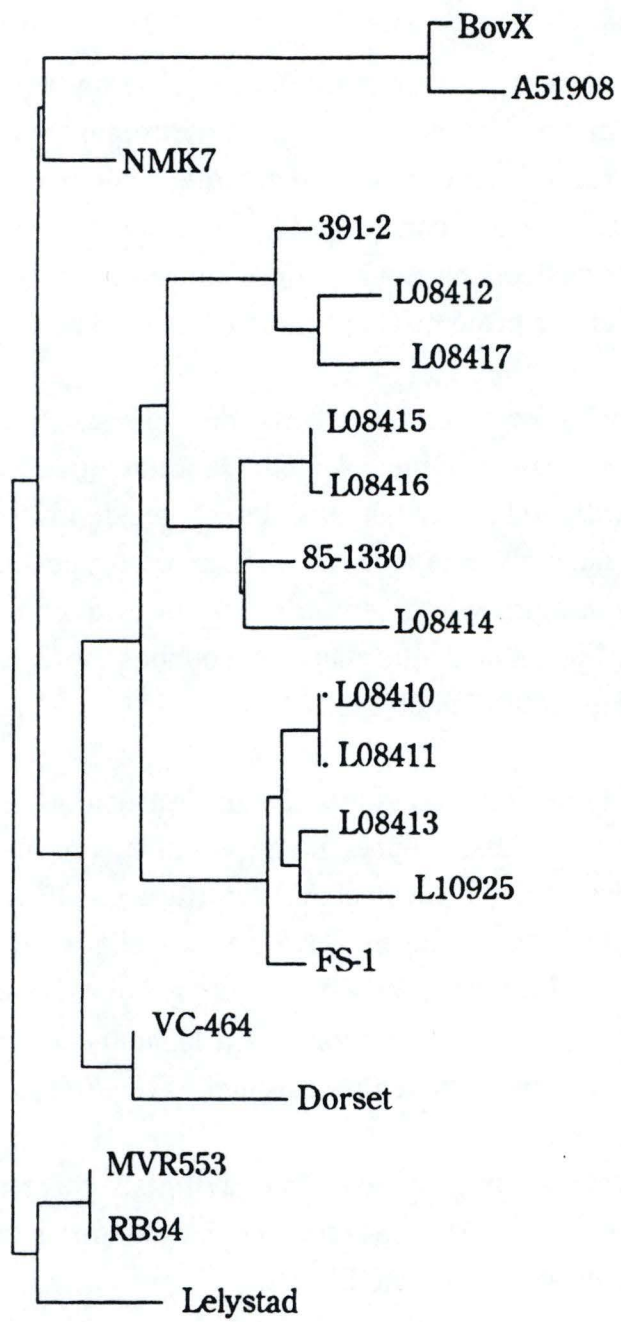


Figure 3.19. : Arbre évolutif des 20 souches utilisées dans ce travail.

### 8. Arbre évolutif

La commande "Growtree" (GCG) nous a permis de dresser un arbre évolutif sur base des séquences du gène G des 20 souches de BRSV dont nous disposons. L'option "Neighbor-Joining" a été choisie. Celle-ci calcule approximativement un arbre phylogénique en minimisant la somme des longueurs de branches de l'entièreté de l'arbre et en permettant de visualiser les distances entre les séquences (longueurs des branches). Le paramètre par défaut aurait uniquement créé des paires de séquences en groupant simplement les séquences les plus proches.

La figure 3.19. nous montre cet arbre. Il faut avant tout rappeler que certains nucléotides des souches Dorset et BovX ne sont pas déterminés avec certitude.

Cet arbre nous confirme bien la proximité entre les souches BovX et A51908 d'une part et Dorset et VC-464 d'autre part.

Les souches BovX et Dorset sont éloignées l'une de l'autre vu la longueur des branches à parcourir pour les réunir et leurs pourcentages de substitutions (8.7 %).

La longueur des branches nous permet de déduire que la souche BovX est plus proche des 18 autres souches que la souche A51908 ne l'est. Les pourcentages de substitutions sont d'ailleurs inférieurs pour la souche BovX.

La même conclusion peut aussi s'appliquer à la souche VC-464, les pourcentages de substitutions étant inférieurs pour cette dernière.

A la vue de cet arbre, nous pouvons tirer des conclusions sur les autres souches.

Les souches MVR553 et RB94 semblent être la même souche. On observe d'ailleurs 0 % de substitutions. De plus, ces 2 souches sont belges. On observe la même chose pour les souches L08410 et L08411.

D'autres souches sont, elles, très proches comme L08415 et L08416 pour lesquelles 0.1 % de substitutions sont calculés.



## Résultats

Le pourcentage de substitutions le plus élevé (11.0) est attribué au couple A51908 et L10925. L'arbre évolutif nous le confirme par la longueur du chemin à suivre pour les relier.

La souche NMK7 semble être la souche la plus proche du couple A51908-BovX. Cela se vérifie en regardant le pourcentage de substitutions.

L'analyse des pourcentages de substitutions montre que cette souche NMK7 semble aussi être la souche la plus proche du couple VC-464-Dorset avec cependant un pourcentage plus faible avec la souche Dorset qu'avec la souche BovX.

Conclusions

&

Discussions



### 1. Essai d'amplification du gène G entier des 3 souches du BRSV

L'essai d'amplification du gène G avec les oligos OL5 et D2 n'a pas été concluant (figure 3.2.). Le bon fragment n'a été synthétisé que pour la souche Dorset mais en très faible quantité. Nous pouvons soulever différentes hypothèses pour expliquer ce problème.

Des structures secondaires pourraient empêcher l'étape d'élongation. Les oligos bien positionnés, l'élongation peut commencer puis rencontrer une structure secondaire ce qui arrêterait la polymérase qui se détacherait alors. Rien ne serait ainsi détecté après RT-PCR sur un gel d'agarose. Ceci pourrait expliquer l'absence d'amplification pour la souche 87-13956.

L'oligo D2 a été synthétisé pour se positionner juste après le stop de traduction donc dans une séquence non codante, séquence habituellement moins conservée. L'oligo D2 a été déterminé à partir de la séquence de la souche A51908. Il se peut que la séquence normalement reconnue par D2 soit différente chez nos souches. Cette hypothèse n'est pourtant pas à retenir puisque pour les amplifications en 2 fragments, l'oligo D2 se positionne à la bonne place pour les 3 souches.

Une autre hypothèse serait que l'amplification OL5+D2 donne préférentiellement un fragment plus court. L'analyse des séquences de l'oligo D2 et du gène G de la souche Dorset nous a montré une zone vers le nucléotide 320 où l'oligo D2 peut également aller s'hybrider. La polymérase donnant le plus souvent des fragments courts avant de se détacher de la matrice, l'oligo D2 aura plus de possibilités de donner le fragment de 320 paires de bases. Ceci expliquerait les bandes à 320 et 796 paires de bases visibles sur le gel d'agarose pour la souche Dorset.

Pour la souche BovX, aucune de ces hypothèses ne semble expliquer l'aspécificité que nous observons.



## 2. Comparaison des séquences protéiques

Il faut d'abord rappeler que, pour nos souches BovX et Dorset, les 257 acides aminés ne sont pas tous déterminés avec certitude.

La protéine G mature a été décrite par Lerch comme une protéine fortement glycosylée (Lerch *et al.*, 1990). Nous avons analysé cette possibilité sur nos souches BovX et Dorset. Celles-ci ont un contenu inhabituel en résidus sérine et thréonine (23 et 25 % respectivement) qui sont les résidus où se fixent les carbohydrates O-liés chez les autres souches. Ce type de glycosylation représente 90 % des carbohydrates liés à la protéine G du BRSV et 55 % de sa masse moléculaire (Lerch *et al.*, 1990). Ceci suggère que la protéine G des 2 souches étudiées soit, elle aussi, O-glycosylée.

La glycosylation N-liée représente 3 % de la masse moléculaire de la protéine G (Lerch *et al.*, 1990). Elle a lieu sur des résidus asparagine du site accepteur asparagine-x-thréonine (Olmsted *et al.*, 1989) du domaine extracellulaire (McIntosh et Chanock, 1990). Pour les souches BovX et Dorset, nous avons trouvé 4 sites pour la souche Dorset et 3 pour la souche BovX. Nous pouvons en déduire que la protéine G de nos 2 souches est aussi N-glycosylée.

Quatre cystéines sont conservées aux positions 173, 176, 182 et 186 entre les souches de BRSV et cette localisation est commune avec le HRSV (Sullender *et al.*, 1991; McIntosh et Chanock, 1990). Pour nos 2 souches, nous l'avons démontré uniquement pour le résidu 186 de la souche Dorset, les 3 autres appartenant aux oligos D1, 34446 et D3. Pour la souche BovX, les 2 seules cystéines que nous avons déterminées appartiennent aux oligos 34446 et D1.

Dix pour-cent de résidus proline composent habituellement la protéine G du BRSV (Lerch *et al.*, 1990), ceux-ci étant vraisemblablement un déterminant majeur dans la structure tridimensionnelle de la protéine G. L'analyse de la séquence protéique du gène G des souches Dorset et BovX nous a montré 9 % en résidus proline.

Une région longue de 13 acides aminés (acides aminés 164 à 176) a été identifiée chez le HRSV comme une région qui pourrait être impliquée dans la liaison aux récepteurs de la cellule hôte (McIntosh et Chanock, 1990; Lerch *et al.*, 1990). Cette



Souche	Masse moléculaire de la sous-unité F2 de la protéine F (X 10 <sup>3</sup> )	Typage antigénique
BovX	23	B
A51908	20	A
391-2	17	A
L084 : 11-17	ND	ND
L10925	ND	ND
FS-1	15.5	A
MVR553	ND	A/B
RB94	23	A/B
NMK7	17	A
Lelystad	23	A/B
VC-464	15.5	ND
Dorset	ND	Atypique
85-1330	ND	A

**Tableau 4.1.** : Masse moléculaire de la sous-unité F2 en kilodaltons et typage antigénique des 20 souches utilisées dans ce travail.

région semble moins conservée chez le BRSV (figure 3.13.) et ceci pourrait être en rapport avec la spécificité pour l'hôte.

Le maximum de divergence pour la protéine G du BRSV et du HRSV est observé au niveau du domaine extracellulaire, domaine le plus exposé à la surveillance immunitaire de l'hôte (Mallipeddi et Samal, 1993a; Sullender *et al.*, 1991). L'analyse de ce domaine (s'étendant de l'acide aminé 67 à l'extrémité COOH-terminale de la protéine) sur les alignements présentés à la figure 3.13. le prouvent aussi pour les souches Dorset et BovX. Par la diversité de son domaine extracellulaire, le BRSV a ainsi trouvé un mécanisme pour déjouer la réponse immunitaire de l'hôte. Nous pouvons aussi remarquer que la majorité des changements en nucléotides ont lieu au niveau de la première et deuxième base du codon impliquant ainsi un changement en acides aminés, caractéristique supplémentaire démontrant la sélection positive des variations dans la protéine G.

Il semblerait donc, à la vue de ces différents points, que la protéine G des souches Dorset et BovX partage les mêmes caractéristiques générales avec la protéine G des autres souches du BRSV.

### 3. Mise en parallèle des résultats génétiques et des données antigéniques

Le tableau 4.1. décrit, selon la souche, la masse moléculaire de la sous-unité F2 de la protéine F et le typage antigénique. Ces 2 critères ont été définis comme étant ceux qui différencient les sous-groupes A, B et A/B au sein des souches du BRSV. Pour rappel, certaines souches (exemple: Dorset) ont un profil antigénique qui ne s'apparente avec aucun des types définis et que l'on qualifiera d'atypique.

L'analyse au niveau génétique a montré la proximité entre les souches BovX et A51908. Pourtant, leur type antigénique diffère bien que leur sous-unité F2 soit du type lourd que Furze *et al.* lient au seul groupe B.

Nous ne pouvons rien conclure pour les souches Dorset et VC-464. Nous ne connaissons que la masse moléculaire de la souche VC-464 sans avoir pu déterminer son type antigénique.



## Discussions & Conclusions

Les souches MVR553 et RB94 sont identiques au niveau génétique. Le tableau nous montre que ces souches appartiennent au même sous-groupe antigénique : A/B. La détermination de la masse moléculaire de la sous-unité F2 pour la souche MVR553 serait un pas de plus dans la vérification de l'identité entre les 2 souches.

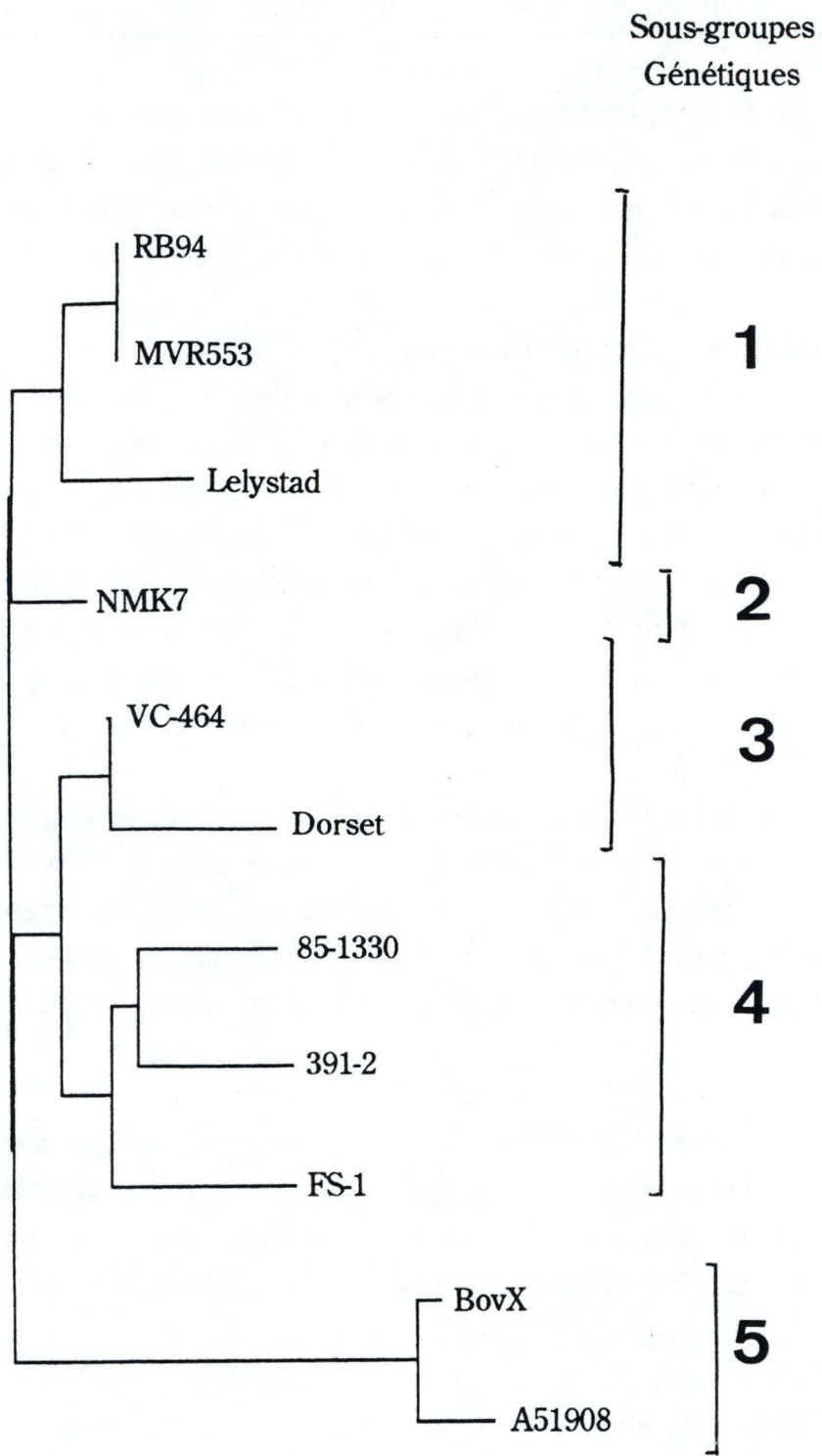
La souche NMK7 est, parmi les 18 autres souches, la plus proche à la fois des souches Dorset et BovX au niveau génétique avec cependant un pourcentage de substitutions plus faible par rapport à la souche Dorset. Cette proximité n'est pas apparente dans les données antigéniques. Par contre, rien n'est commun avec la souche BovX. En effet, BovX présente une masse moléculaire pour la sous-unité F2 de 23 kd et un typage antigénique B alors que NMK7 présente une masse moléculaire de 17 kd pour la sous-unité F2 et est de type A. En ce qui concerne la souche Dorset, ne disposant pas de données au niveau de la masse moléculaire de F2, nous ne pouvons que constater que le typage antigénique la distingue de la souche NMK7.

Les souches Lelystad et RB94 font partie du même sous-groupe antigénique. En effet, elles ont la même masse moléculaire pour la sous-unité F2 et partagent le même typage antigénique: A/B. On observe par ailleurs un faible pourcentage de substitutions. La souche MVR553, puisque probablement identique à la souche RB94, appartiendrait également au même sous-groupe. Cela se vérifie au niveau du typage antigénique (A/B).

Les souches 391-2 et NMK7 ont la même masse moléculaire pour la sous-unité F2 et font partie du même sous-groupe antigénique A. Pourtant l'analyse génétique ne semble pas rapprocher particulièrement ces 2 souches, les pourcentages de substitutions étant tous plus ou moins égaux pour les comparaisons de ces 2 souches avec les 18 autres.

Les souches FS-1 et VC-464 ont toutes les deux une masse moléculaire pour la sous-unité F2 de 15.5 kd. Il semblerait donc qu'elles font partie du même sous-groupe antigénique. Le typage antigénique de ces 2 souches nous prouverait la pertinence de cette conclusion. On observe d'ailleurs un faible pourcentage de substitutions par rapport aux autres comparaisons d'une de ces souches avec les 18 autres.

Ces analyses nous indiquent donc qu'il faut être prudent et ne pas extrapoler, outre mesure, des résultats génétiques aux résultats antigéniques. Il est cependant



**Figure 4.1.** : Arbre phylogénique montrant un essai de classification génétique.



important de signaler que la mise en parallèle réalisée entre les données antigéniques et les résultats génétiques a été effectuée sur la protéine entière et non sur les acides aminés reconnus par les anticorps ayant servis à distinguer les 2 sous-groupes antigéniques A et B. En effet, ces zones ne sont à l'heure actuelle qu'en cours d'étude. Dès que ces épitopes nous seront connus, étape non nécessaire dans le cas du HRSV, il est vraisemblable que ces 2 types d'approches de l'hétérogénéité puissent se recouper de manière plus nette que celle présentée ici.

Il existe de plus des exceptions à la classification de Furze *et al.* (1994). Selon cette dernière, les souches du sous-groupe A présentent une masse moléculaire de 17 kd. Cela se vérifie ici pour les souches NMK7 et 391-2. Par contre, la classification selon laquelle une souche présentant une masse moléculaire de 23 kd pour la sous-unité F2 ferait partie du sous-groupe B ne s'applique pas pour toutes les souches, sauf pour la souche BovX. C'est le cas pour la souche A51908 qui appartient au sous-groupe A et pour les souches Lelystad et RB94 qui font partie du sous-groupe intermédiaire A/B. C'est certainement aussi le cas pour la souche MVR553 qui est au niveau génétique identique à la souche RB94.

### 4. Essai de classification génétique

Il est possible de répartir les souches présentées en 5 sous-groupes génétiques (figure 4.1.). Nous pouvons constater qu'il est difficile de positionner les sous-groupes antigéniques A, B et intermédiaire A/B sur l'arbre phylogénique représenté à cette figure. Ainsi, si le sous-groupe génétique 4 pourrait concorder avec le sous-groupe A, celui-ci contenant les souches 391-2, FS-1 et 85-1330, ni la souche NMK7, ni la souche A51908 ne semblent rentrer dans cette classification génétique. Le sous-groupe antigénique B pourrait coïncider avec le sous-groupe génétique 5 contenant la souche BovX déjà typée antigéniquement mais contenant la souche A51908 typée A. Le sous-groupe génétique 1 correspondrait au sous-groupe antigénique intermédiaire A/B contenant les souches MVR553, RB94 et Lelystad. Par contre, il est difficile de rapprocher un sous-groupe génétique du groupe antigénique B; ce dernier ne comporte d'ailleurs que la souche BovX.

En outre, les données concernant le HRSV semblent contester cette classification. En effet, entre les souches des sous-groupes A et B du HRSV, on peut



observer des valeurs de seulement 50 % d'identité au niveau de la séquence de la protéine G. Par ailleurs, il a été calculé au sein même des sous-groupes A et B, des valeurs d'identité de l'ordre de 80 % et 90 % respectivement (Mallipedi et Samal, 1993a). Pour les 20 souches du BRSV analysées dans ce travail, nous constatons des valeurs d'identité très élevées, les plus faibles étant de l'ordre de 80 %. Un tel pourcentage correspond chez le HRSV à la variabilité intra-sous-groupes. Il semblerait donc que, malgré les rapprochements tentés ci-dessus, ces 20 souches appartiendraient à un seul sous-groupe génétique si du moins nous pouvons extrapoler les résultats du HRSV au BRSV.

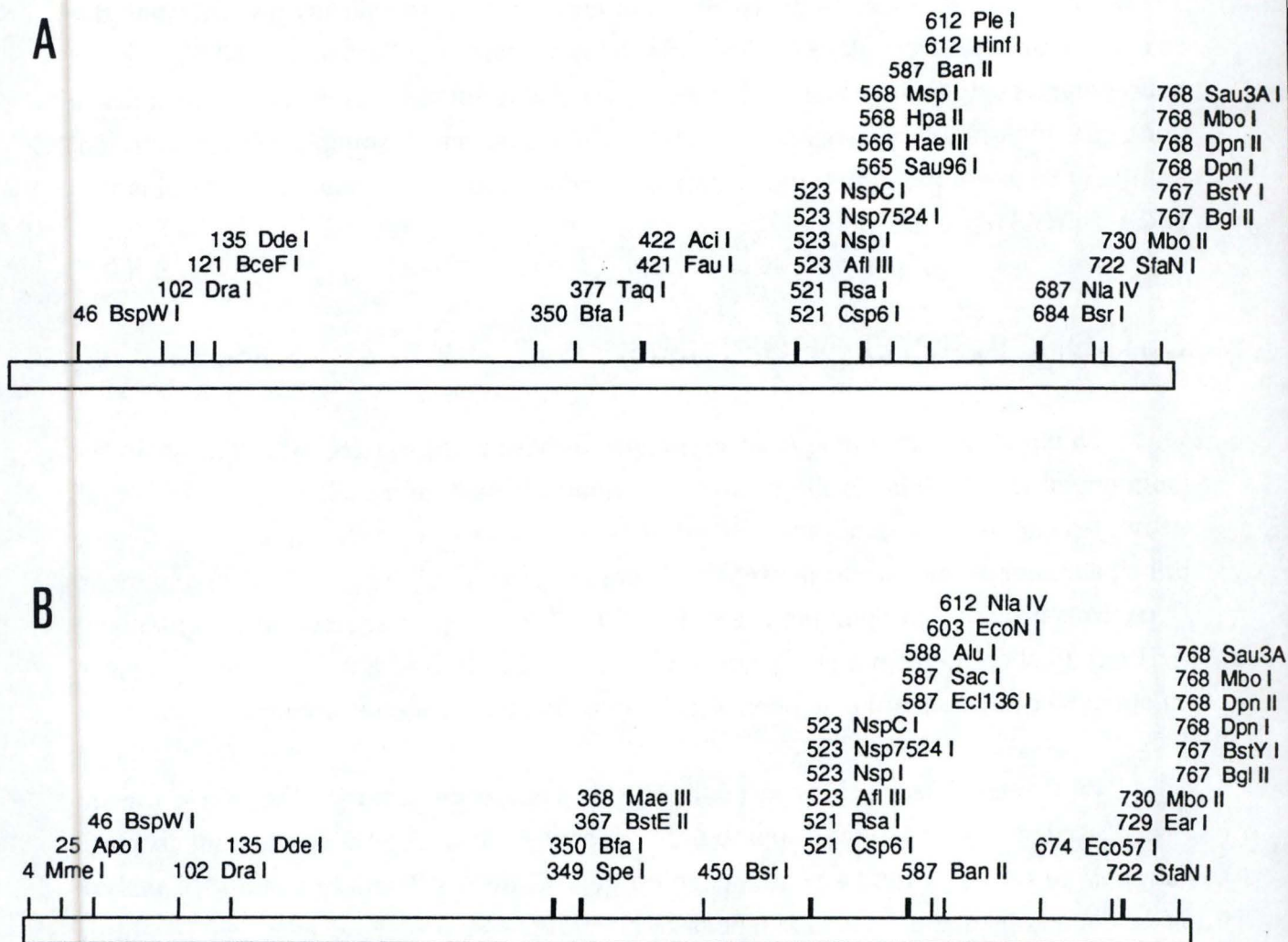
### 5. Conclusions générales

La variabilité antigénique et génétique de virus respiratoire syncytial bovin est longuement décrite dans la littérature. Cependant, jamais de parallélisme n'a été établi entre les approches antigéniques et génétiques. Cette hétérogénéité se situe principalement au niveau de la protéine G codant pour la glycoprotéine d'attachement. Deux sous-groupes antigéniques A et B et un sous-groupe antigénique intermédiaire A/B ont ainsi été déterminés (Furze *et al.*, 1994; Mallipedi et Samal, 1993c). Il existe, en outre, des souches qui échappent à cette classification (souches atypiques).

Ce travail s'inscrit dans la continuité de l'étude de la variabilité génétique du BRSV sur les souches BovX, appartenant au sous-groupe B, et Dorset, dont le profil antigénique est atypique. Le séquençage du gène G de ces 2 souches réalisé, l'analyse de la comparaison de leurs séquences nucléotidique et protéique avec les 18 autres séquences disponibles au laboratoire a été entreprise et nous a montré le rapprochement entre les souches Dorset et VC-464 d'une part et BovX avec A51908 d'autre part.

L'étude de l'hétérogénéité des souches ne nous a pas permis de mettre en évidence l'existence de sous-groupes génétiques associables au typage antigénique comme c'est le cas chez le HRSV. Cette étude tenterait même à appuyer l'hypothèse de leur appartenance à un seul et même sous-groupe génétique. Mais dans quelle mesure ne pourrions nous pas associer la variabilité antigénique observée au sein du BRSV à une variabilité intra-sous-groupe comme cela a été décrit chez le HRSV par l'utilisation d'anticorps anti-G. D'ailleurs, le typage antigénique en sous-groupes A et B chez le





**Figure 4.2.** : Cartes des sites uniques de restriction des souches Dorset (A) et BovX (B).

HRSV a été réalisé avec des anticorps anti-F qui sont beaucoup moins discriminants que les anti-G. Ces anti-F sont d'ailleurs principalement utilisés pour le typage inter-sous-groupes alors les anti-G montrent un profil de réactivité plus fin permettant une discrimination intra-sous-groupes. Il serait utile de séquencer d'autres souches du sous-groupe B afin d'avoir de plus amples d'informations à ce sujet.

La capacité de discriminer ou non des sous-groupes au sein du BRSV pourrait avoir une importance cruciale dans la compréhension de la pathologie, de l'épidémiologie et de l'immunologie associées aux infections et réinfections par le BRSV. Les données obtenues pourraient également avoir d'importantes répercussions sur les futures stratégies vaccinales.

Les comparaisons réalisées, ainsi que le séquençage total du gène G des souches Dorset et BovX, vont pouvoir servir pour mettre au point des outils de typage pour différencier génétiquement différentes souches du BRSV.

## 6. Perspectives: typage génétique

Des outils génétiques théoriques vont être ici développés sur base de l'analyse des souches Dorset et BovX. Si ces types d'outils de typage s'avèrent être applicables, l'étude pourrait s'étendre à l'ensemble des souches connues.

Les outils génétiques semblent plus approprié pour le terrain par rapport aux outils antigéniques basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Les techniques de détection par anticorps monoclonaux nécessitent, en effet, des étapes de culture en laboratoire. Par la rapidité et la simplicité d'analyse, les outils génétiques sont ainsi un atout pour le suivi épidémiologique et le typage des souches de terrain.

### 6.1. Restriction différentielle

Le programme DNA Strider nous a permis de dresser une carte des sites uniques de restriction du gène G des souches Dorset et BovX. Celles-ci se trouvent à la figure 4.2.. Nous remarquons beaucoup de sites communs tels que *DraI*, *RsaI* ou encore *BglII*. Mais d'autres sites ne sont présents que chez seulement une des 2 souches. Nous pouvons ainsi mettre au point des outils pour différencier ces 2 souches.



En voici quelques exemples, en considérant que nous pouvons amplifier le gène G en un seul fragment du nucléotide 1 à 774.

Le site *FauI* existe au nucléotide 350 chez la souche Dorset. La restriction sur quelques  $\mu\text{g}$  de matériel génétique amplifié de chaque souche nous donnerait sur un gel d'agarose pour la souche Dorset 2 fragments de 350 et 424 paires de bases alors que pour la souche BovX, un seul fragment de 774 paires de bases serait visible. La même chose peut être réalisée avec l'enzyme *SpeI* qui n'est présente que chez la souche BovX. Deux fragments de 349 et 425 seraient détectés sur un gel d'agarose 2 %.

Entre les 2 souches, le site *BsrI* est commun mais se trouve à 2 endroits différents chez les 2 souches. La restriction sur quelques  $\mu\text{g}$  de matériel génétique amplifié de chaque souche et sa visualisation sur un gel d'agarose 2 % montrerait pour la souche Dorset 2 fragments de 684 et 90 paires de bases alors que pour la souche BovX, on pourrait voir 2 fragments de 450 et 324 paires de bases.

Plusieurs combinaisons d'enzymes peuvent aussi être choisies pour nos 2 souches. Ainsi une restriction avec les enzymes *TaqI*, *SacI* et *RsaI* donnerait sur un gel d'agarose 2 % pour la souche Dorset des fragments à 377, 144 et 253 paires de bases. Pour la souche BovX, des fragments à 521, 66 et 187 paires de bases seraient visibles.

### 6.2. Hybridation par sondes spécifiques

On pourrait envisager d'utiliser les techniques d'hybridations moléculaires dans le but de discriminer les différentes souches du BRSV. Ainsi des sondes ADN pourraient être déterminées pour s'hybrider spécifiquement à une séquence donnée d'une souche et pas d'une autre. Il existe, pour cela, différentes stratégies telles que le Southern Blot, le Northern Blot ou la technique de lyse cellulaire et de fixation de l'ARN viral sur filtre en une étape comme celle utilisée pour le HRSV (Sullender *et al*, 1990).

Néanmoins, ces techniques nécessitent une zone d'hybridation assez longue (15-20 nucléotides) qui ne se reproduise pas autre part dans le génome. Dans le cas présent, nous ne voyons pas de zone qui réponde à ces critères et qui ne se reproduise pas dans le génome d'une autre souche. En effet, les zones de non-identité entre le gène G des 2 souches sont de trop petite taille pour remplir ces conditions.

Il est cependant possible de combiner la technique du Southern Blot à celle de la restriction différentielle. Ainsi, les bandes de restriction visibles sur gel et donnant des premières informations quant à l'identité de la souche, pourraient être révélées spécifiquement à l'aide d'une sonde même commune aux deux souches.

### **6.3. RT-PCR différentielle**

Des oligos spécifiques d'une des 2 souches pourraient nous servir à les différencier. Ceux-ci engagés en RT-PCR sur 5  $\mu$ g d'ARN de chaque souche nous donneraient, sur un gel d'agarose 2 %, une amplification pour la souche ayant servi à synthétiser ces oligos et rien pour l'autre souche. A nouveau, aucune zone dans le gène G des 2 souches ne peut répondre à ces exigences.

### **6.4. Hétéroduplex**

L'analyse par retard sur gel de la formation d'hétéroduplex à partir de l'amplification de nos 2 souches nous prouverait que celles-ci sont différentes. En effet, si à tel nucléotide nous avons A pour une souche et C pour l'autre souche, la création d'un hybride par dénaturation des 2 brins de chaque souche et hybridation libre de chaque brin d'une souche avec son brin homologue ou avec un des 2 brins de l'autre souche nous montrerait 2 bandes sur un gel d'agarose. Celles-ci correspondraient à la bonne réhybridation d'un brin d'une souche avec son brin homologue d'une part et à l'hybridation d'un brin d'une souche avec un brin de l'autre souche d'autre part, cette dernière subissant un retard de migration au sein d'un gel.



# *Bibliographie*

## Bibliographie

ÅKERLIND-STOPNER, B., UTTER, G., MUFSON, M. A., ÖRVELL, C., LERNER, R. A. & NORRBY, E. (1990). A subgroup-specific antigenic site in the G protein of respiratory syncytial virus forms a disulfide-bonded loop. *J. Virol.* (octobre), 5143-5148.

ALANSARI, H. & POTGIETER, L. N. D. (1993). Nucleotide sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus G glycoprotein gene. *Virology* 196, 873-877.

ALANSARI, H. & POTGIETER, L. N. (1994). Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus non-structural 1C and 1B genes and the small hydrophobic protein gene. *J. Gen. Virol.* 75, 401-404.

ANDERSON, L. J., HENDRY, R. M., PIERIK, L. T., TSOU, C. & McINTOSH, K. (1991). Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 163, 687-692.

ANDERSON, K., STOTT, E. J. & WERTZ, G. W. (1992). Intracellular processing of the human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein : amino acid substitutions affecting folding, transport and cleavage. *J. Gen. Virol.* 73, 1177-1188.

ARUMUGHAM, R. G., HILDERETH, S. W. & PARADISO, P. R. (1989). Interprotein disulfide bonding between F and G glycoproteins of human respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.* 105, 65-79.

BACHI, T. (1988). Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy. *J. Cell. Biol.* 107, 1689-1695.

BAKER, J. C., WILSON, E. G., McKAY, G. L., STANEK, R. J., UNDERWOOD, W. J., VELICER, L. F. & MUFSON, M. A. (1992). Identification of subgroup of bovine respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1120-1126.

BALL, L. A., YOUNG, K. K. Y., ANDERSON, K., COLLINS, P. L. & WERTZ, G. W. (1986). Expression of the major glycoprotein G of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 246-250.

BRUGERE-PICOUX, J. (1981). Le virus respiratoire syncytial bovin. Une revue. *Rec. Méd. Vét.* 157, 875-882.



## Bibliographie

BRUGERE-PICOUX, J. & HEROUT, C. (1985). Le virus respiratoire syncytial bovin. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France* 69, 31-49.

CANE, P. A., MATTHEWS, D. A. & PRINGLE, C. R. (1991). Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* 72, 2091-2096.

CHANOCK, A. M. & FINBERG, L. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzees coryza agent (CCA) : II Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Amer. J. Hyg.* 66, 291-300.

COLLINS, P. L., HUANG, Y. T. & WERTZ, G. W. (1984). Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes. *J. Virol.* 49, 572-578.

COLLINS, P. L., DICKENS, L. E., BUCKLER-WHITE, A., OLMSTED, R. A., SPRIGGS, M. K., CAMARGO, E. & COELINGH, K. V. W. (1986). Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4594-4598.

COLLINS, P. L., OLMSTED, R. A., SPRIGGS, M. K., JOHNSON, P. R. & BUCKLER-WHITE, A. J. (1987). 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.* 84, 5134-5138.

COLLINS, P. L. (1990). O glycosylation of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus is specified within the divergent ectodomain. *J. Virol.* 64, 4007-4012.

COLLINS, P. L., HILL, M. G. & JOHNSON, P. R. (1990). 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.* 71, 3015-3020.

COLLINS, P. L. (1991). The molecular biology of human respiratory syncytial virus (RSV) of the genus Pneumovirus. *The Viruses, The Paramyxoviruses*, chap. 4, édité par David W. Kingsbury, Plenum Press, New York et Londres, 103-162.

## Bibliographie

COLLINS, P. L. & MOTTET, G. (1992). Oligomerization and post-translational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus : altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. *J. Gen. Virol.* 73, 849-863.

DICKENS, L. E., COLLINS, P. L. & WERTZ, G. W. (1984). Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 52, 364-369.

DOGGETT, J. E., TAYLOR-ROBINSON, D. & GALLOP, R. G. C. (1968). A study of an inhibitor in bovine serum active against respiratory syncytial virus. *Arch. Ges. Virusforsch.* 23, 126-137.

DRETZEN, G., BALLARD, M., SASSONE-CORSI, P. & CHAMBON, P. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 12, 2523-2528.

DUNCAN, R. B. & POTGIETER, L. N. D. (1994). Heterogeneity of respiratory syncytial virus G glycoprotein : antigenic and molecular analysis. Résultats non publiés.

FURZE, J., WERTZ, G., LERCH, R. & TAYLOR, G. (1994). Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 75, 363-370.

GALLAHER, W. R. & BRATT, M. A. (1974). Conditional dependance of fusion from within and other cell membrane alterations by Newcastle disease virus. *J. Virol.* 14, 813-820.

GRUBER, C. & LEVINE, S. (1985). Respiratory syncytial virus polypeptides. IV. The oligosaccharides of the glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 66, 417-432.

HALL, C. B., WALSH, E. E., LONG, C. E. & SCHNABEL, K. C. (1991). Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 163, 693-698.

HEMINWAY, B. R., YU, Y., TANAKA, Y., PERRINE, K. G., GUSTAFSON, E., BERNSTEIN, J. M. & GALINSKI, M. S. (1993). Role of the human respiratory syncytial virus small hydrophobic protein in membrane fusion. *Communications au 9ème congrès de virologie, Glasgow.*



## Bibliographie

HEMINWAY, B. R., YU, Y., TANAKA, Y., PERRINE, K. G., GUSTAFSON, E., BERNSTEIN, J. M. & GALINSKI, M. S. (1994). Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* 200, 801-805.

HENDRICKS, D. A., McINTOSH, K. & PATTERSON, J. L. (1988). Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 62, 2228-2233.

HUANG, Y. T. & WERTZ, G. W. (1982). The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J. Virol.* 43, 150-157.

JOHNSON, P. R., SPRIGGS, M. K., OLMSTED, R. A. & COLLINS, P. L. (1987). The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5625-5629.

KIMMAN, T. G. & WESTENBRINK, F. (1990). Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.* 112, 1-25.

KING, A. M. Q., STOTT, E. J., LANGER, S. J., YOUNG, K. K. Y., BALL, L. A. & WERTZ, G. W. (1987). Recombinant vaccinia viruses carrying the N gene of human respiratory syncytial virus : studies of gene expression in cell culture and immune response in mice. *J. Virol.* 61, 2885-2890.

KINGSBURY, D. W. (1990). Paramyxoviridae and their replication. *Virology*, 2ème édition, chap. 34, édité par B. N. Fields, D. M. Knipe *et al.*, Raven Press Ltd., New York, 945-962.

LAMB DEN, P. R. (1985). Nucleotide sequence of the respiratory syncytial virus phosphoprotein. *J. Gen. Virol.* 66, 1607-1612.

LAMBERT, D. M. (1988). Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology* 164, 458-466.

## Bibliographie

LERCH, R. A., STOTT, E. J. & WERTZ, G. W. (1989). Characterization of bovine respiratory syncytial virus proteins and mRNAs and generation of cDNA clones to the viral mRNAs. *J. Virol.* 63, 833-840.

LERCH, R. A., ANDERSON, K. & WERTZ G. W. (1990). Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 64, 5559-5569.

LERCH, R. A., ANDERSON, K., AMANN, V. L. & WERTZ, G. W. (1991). Nucleotide sequence analysis of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein mRNA and expression from a recombinant vaccinia virus. *Virology* 181, 118-131.

LEVINE, S., KLAIBER-FRANCO, R. & PARADISO, P. R. (1987). Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 68, 2521-2524.

LOPEZ, J. A., VILLANUEVA, N., MELERO, J. A. & PORTELA, A. (1988). Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial virus Long strain : evidence of subtype genetic heterogeneity. *Virus Res.* 10, 249-262.

MAHIN, L. & WELLEMANS, G. (1982). Serological evidence for the intervention of bovine respiratory syncytial virus in a respiratory disease outbreak in Moroccan cattle. *Zhl. Vet. Med. B.* 29, 76-79.

MALLIPEDDI, S. K. & SAMAL, S. K. (1993a). Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 74, 2001-2004.

MALLIPEDDI, S. K. & SAMAL, S. K. (1993b). Analysis of the ovine respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein gene defines a subgroup of ungulate RSV. *J. Gen. Virol.* 74, 2787-2791.

MALLIPEDDI, S. K. & SAMAL, S. K. (1993c). Structural difference in the fusion protein among strains of bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Microbiol.* 36, 359-367.



## Bibliographie

MARTIN-GALLARDO, A., FLEISCHER, E., DOYLE, S. A., ARUMUGHAM, R., COLLINS, P. L., HILDRETH, S. W. & PARADISO, P. R. (1993). Expression of the G glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus in *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Virol.* 74, 543-458.

McINTOSH, K. & CHANOCK, R. M. (1990). Respiratory syncytial virus. *Virology*, 2ème édition, chap. 38, édité par B. N. Fields, D. M. Knipe *et al.*, Raven Press Ltd., New York, 1045-1072.

MEISSNER, H. C. (1994). Economic impact of viral respiratory disease in children. *J. Pediatr.* 124, 17-21.

MORRIS, J. A., BLOUNT, R. E. & SAVAGE, R. E. (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza (22538). *Proc. Soc. Exp. Biol.* 92, 544-549.

MORRISON, T. G. (1988). Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res.* 10, 113-136.

MUELENAER, P. M., HENDERSON, F. W., HEMMING, V. G., WALSH, E. E., ANDERSON, L. J., PRINCE, G. A. & MURPHY, B. R. (1991). Group-specific serum antibody responses in children with primary and recurrent respiratory syncytial virus infections. *J. Infect. Dis.* 164, 15-21.

MUFSON, M. A., BELSHE, R. B., ÖRVELL, C. & NORRBY, E. (1987). Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1535-1539.

NAGAI, K., TSUTSUMI, H., PATTAMADILOK, S. & CHIBA, S. (1993). Three antigenic variant groups in human respiratory syncytial virus subgroup B isolated in Japan. *Arch. Virol.* 128, 55-63.

OLMSTED, R. A., MURPHY, B. R., LAWRENCE, L. A., ELANGO, N., MOSS, B. & COLLINS, P. L. (1989). Processing, surface expression, and immunogenicity of carboxy-terminally truncated mutants of G protein of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 63, 411-420.

## Bibliographie

ÖRVELL, C., NORRBY, E. & MUFSON, M. A. (1987). Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. *J. Gen. Virol.* 68, 3125-3135.

PACCAUD, M. F. & JACQUIER, C. (1970). A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch. Ges. Virusforsch.* 30, 327-342.

PALOMO, C., GARCÍA-BARRENO, B., PEÑAS, C. & MELERO, J. A. (1991). The G protein of human respiratory syncytial virus : significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. *J. Gen. Virol.* 72, 669-675.

RAWN, J. D. (1990). Conformation des protéines globulaires. *Traité de biochimie*, chap. 5, édité par De Boeck Université, 112.

ROUTLEDGE, E. G., WILLCOCKS, M. M., MORGAN, L., SAMSON, A. C. R., SCOTT, R. & TOMS, G. L. (1987). Expression of the respiratory syncytial virus 22K protein on the surface of infected HeLa cells. *J. Gen. Virol.* 68, 1217-1222.

RUEDA, P., DELGADO, T., PORTELA, A., MELERO, J. A. & GARCÍA-BARRENO, B. (1991). Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. *J. Virol.* 65, 3374-3378.

SAMAL, S. K. & ZAMORA, M. (1991). 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.* 72, 1715-1720.

SAMAL, S. K., ZAMORA, M., McPHILLIPS, T. H. & MOHANTY, S. B. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine respiratory syncytial virus mRNA encoding the major nucleocapsid protein. *Virology* 180, 453-456.

SHARMA, R. & WOLDEHIWET, Z. (1991). Bovine respiratory syncytial virus: a review. *Veterinary bulletin* 61, 1117-1131.

STINE, L. C. & KELLING, C. L. (1992). Sequence diversity of the attachment glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus isolates. Résultats non publiés.



## Bibliographie

STOTT, E. J. & TAYLOR, G (1985). Respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.* 84, 1-52.

STOTT, E. J., BALL, L. A., YOUNG K. K., FURZE, J. & WERTZ, G. W. (1986). Human respiratory syncytial virus glycoprotein G expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects mice against live-virus challenge. *J. Virol.* 60, 607-613.

SULLENDER, W. M., ANDERSON, L. J., ANDERSON, K. & WERTZ, G. W. (1990). Differentiation of respiratory syncytial virus subgroups with cDNA probes in a nucleic acid hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1683-1687.

SULLENDER, W. M. & WERTZ, G. W. (1991). Synthetic oligonucleotide probes differentiate respiratory syncytial virus subgroups in a nucleic acid hybridization assay. *J. Clin Microbiol.* 29, 1255-1257.

SULLENDER, W. M., MUFSON, M. A., ANDERSON, L. J. & WERTZ, G. W. (1991). Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J. Virol.* 65, 5425-5434.

SULLENDER, W. M., SUN, L. & ANDERSON, L. J. (1993). Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1224-1231.

TAYLOR, G., STOTT, E. J., FURZE, J., FORD, J. & SOPP, P. (1992). Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 73, 2217-2223.

THEIN, S. L. & WALLACE, R. B. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnostic of genetic disorders. *Human genetic diseases : a practical approach*, édité par K. E. Davis, IRL Press, Herndon, Virginia, 33-50.

VERHOEFF, J., DIJK, M. & DIJKHUIZEN, A. A. (1989). Proceeding of the second meeting of the association of epidemiology and economy ("Vereniging voor epidemiologie en economie") Utrecht, Netherlands.

## Bibliographie

VILLANUEVA, N., NAVARRO, J., MENDEZ, E. & GARCIA-ALBERT, I. (1994). Identification of a protein kinase involved in the phosphorylation of the C-terminal region of human respiratory syncytial virus P protein. *J. Gen. Virol.* 75, 555-565.

WALRAVENS, K., KETTMANN, R., COLLARD, A., COPPE, P. & BURNY, A. (1990). Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* 71, 3009-3014.

WALSH, E. E., SCHLESINGER, J. J. & BRANDRISS, M. W. (1984). Purification and characterization of GP90, one of the envelope glycoproteins of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 65, 761-767.

WALSH, E. E., BRANDRISS, M. W. & SCHLESINGER, J. J. (1987). Immunological differences between the envelope glycoproteins of two strains of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 68, 2169-2176.

WELLEMANS, G., LEUNEN, J. & LUCHINGER, E. (1970). Isolement d'un virus (220/69) sérologiquement semblable au virus respiratoire syncytial (RS) humain. *Ann. Méd. Vét.* 114, 89-93.

WELLEMANS, G. (1982). Evaluation du programme de vaccination anti-virus respiratoire syncytial bovin en Belgique. *XII world congress on diseases of cattle, Amsterdam*, 146-152.

WERTZ, G. W., COLLINS, P. L., HUANG, Y., GRUBER, C., LEVINE, S. & BALL, L. A. (1985). Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4075-4079.

WERTZ, G. W., KRIEGER, M. & BALL, L. A. (1989). Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *J. Virol.* 63, 4767-4776.

WICKNER, W. T. & LODISH, H. F. (1985). Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* 230, 400-407.



## Bibliographie

ZAMORA, M. & SAMAL, S. K. (1992a). Gene junction sequences of bovine respiratory syncytial virus. *Virus Res.* 24, 115-121.

ZAMORA, M. & SAMAL, S. K. (1992b). 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.* 73, 737-741.