



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Clonage et séquençage de la protéine SH (small hydrophobic) du Virus respiratoire syncytial bovin (BRSV)

Zachary, Eric

Award date:
1995

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.

09 AOUT 1995



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

**Clonage et séquençage de la protéine SH (small hydrophobic) du
Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV).**

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

**ZACHARY Eric
1995**

Clonage et séquençage du gène de la protéine SH (small hydrophobic) du virus respiratoire syncytial bovin (BRSV).

ZACHARY Eric

Résumé

Ce travail s'inscrit dans l'étude de l'hétérogénéité de souches du virus respiratoire syncytial bovin. L'hétérogénéité peut-être étudiée par une approche antigénique ou génétique.

Le gène SH présente le plus de variabilité après la protéine d'attachement (G). Nous avons donc cloné et séquencé le gène codant pour la protéine SH de la souche de BRSV RB-94. Lors du clonage, nous avons obtenu un insert de taille supérieure à celle attendue. Le séquençage de la partie 3' de l'insert a permis de déterminer la séquence codante complète de la protéine SH. La partie 5', quant à elle, ne nous a pas permis d'identifier la présence éventuelle d'un autre gène, même après le sous-clonage de l'insert en deux fragments.

Nous avons procédé à une comparaison des séquences nucléotidique et protéique déduites de la souche RB-94 avec celles d'autres souches de BRSV. Un décalage de phase d'un nucléotide dans le gène de la protéine SH de la souche RB-94 a été mis en évidence ainsi que l'apparition prématurée d'une queue de poly A. En dehors du décalage de phase, la position du codon stop est la même que celle observée chez la souche 391-2 et diverge de la souche A51908 dont la protéine est plus courte de 8 aa. Ces observations sont en corrélation avec les résultats obtenus sur la protéine G en ce qui concerne l'hétérogénéité. De plus, la séquence protéique a été soumise à divers programmes de prédiction de structures secondaires, qui ont permis de mettre en évidence l'existence de deux hélices α .

Le clonage, le séquençage et l'analyse au niveau nucléotidique et protéique de SH de la souche RB-94 viennent étayer la connaissance des protéines SH des pneumovirus et la problématique de l'hétérogénéité des souches de BRSV.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Août 1995

Promoteur : J.-J. Letesson

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier le Docteur Jean-Jacque Letesson pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir fait confiance tout au long de cette année.

Je tiens également remercier Madame Deborah Prozzi ainsi que Karl Walravens pour leurs disponibilités et pour m'avoir légué leurs connaissances et leur rigueur.

Toute ma reconnaissance va à Messieurs Feytmans, Vandenhaute, Jadot et Laloux qui ont accepté de lire ce mémoire.

Je m'en voudrais de ne pas remercier Pil, J-P., Isabelle, Vincent et Anne qui m'ont prodigué leurs conseils.

Merci à tout les membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur.

Je remercie enfin mes parents de m'avoir permis de poursuivre ces études ainsi que mes amis et en particulier Stéphane(s).

Ce mémoire est dédié à Jérémy.

Liste des abréviations usuelles

aa.....	Acides aminés
ADN.....	Acide déoxyribonucléique
ADNc (cDNA).....	ADN complémentaire à un brin d'ARN
ARN.....	Acide ribonucléique
ARNm.....	ARN messenger
ATP.....	Adénosine triphosphate
BRSV.....	Virus respiratoire syncytial bovin
HRSV.....	Virus respiratoire syncytial humain
IPTG.....	Isopropyl β -D thiogalactopyranoside
kb.....	Kilobase
kD.....	KiloDalton
μ Ci.....	microCurie
ml, μ l.....	Millilitre, microlitre
M, mM.....	Molaire, millimolaire
Oligo.....	Amorce oligonucléotide
ORSV.....	Virus respiratoire syncytial ovin
pb.....	Paire de bases
PEG.....	Polyéthylène glycol
PM.....	Poids moléculaire
RPM.....	<i>round per minute</i> , tour par minute
RSV.....	Virus respiratoire syncytial
SDS.....	Sodium dodécyl sulfate
TBE.....	Tris-borate-EDTA
TE.....	Tris-EDTA
tRNA.....	ARN de transfert
U.V.....	Ultraviolet

TABLE DE MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
1) Historique et taxonomie	1
2) Pathologie.....	1
3) Structure du virion	2
4) Proteines virales.....	3
4.1) Les protéines de la nucléocapside L, N et P	3
La protéine L (Large).....	3
La protéine N (Nucléocapside).....	4
La protéine P (Phosphoprotéine).....	4
4.2) Les protéines non - structurales NS1 (1C) et NS2 (1B).....	4
4.3) Les protéines de la matrice.	5
La protéine M(Matrice).....	5
La protéine 22k ou M2	5
4.4) Les protéines de l'enveloppe	6
La glycoprotéine G	6
La protéine de fusion (F).....	6
La protéine SH (Small Hydrophobic)	7
5) Organisation genetique	8
5.1) Réplication de l'ARN.....	9
5.2) Transcription des ARNm viraux.....	9
6) Immunité	10
6.1) Cible antigénique du système immunitaire.....	10
6.2) Réponse à médiation cellulaire	11
6.3) Réponse humorale	11
6.4) Phénomène de réinfection	12
7) Hétérogénéité	12
7.1) Variabilité antigénique chez le HRSV.....	12
7.2) Variabilité antigénique chez le BRSV.....	13
7.3) Variabilité génétique: comparaison de séquences entre les différentes souches de HRSV, BRSV et ORSV	14
7.5) Variabilité structurelle.	17

<u>BUT DU TRAVAIL</u>	18
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	19
1) Phage, souche virale et bactérienne	19
1.1) Souche virale.	19
1.2) Phage	19
1.3) Souche bactérienne	19
2) Milieu de culture lambda broth et top agar :	19
2.1) Milieu liquide	20
2.2) Milieu solide	20
2.3) Top agar	20
3) Criblage et purification d'une banque de cDNA au moyen d'une sonde oligonucléotidique	20
3.1) Marquage de la sonde	20
3.2) Etalement de la banque	21
3.3) Criblage.....	21
Préhybridation	22
Hybridation	22
Lavage	22
3.4) Récupération des phages recombinants	23
3.5) Purification de la banque	23
3.5) Analyse des inserts contenus dans les recombinants positifs	23
3.5.2. Electrophorèse en gel d'agarose.....	25
3.5.3. Réaction de restriction.....	26
3.5.4. Southern blot.	27
3.5.5. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose par la méthode des papiers	27
4) Sous-clonage de l'insert contenant gène codant pour la protéine SH	29
4.1) Plasmide utilisé.	29
4.2) Préparation du plasmide pour la ligation.....	29
4.3) Ligation d'un insert dans un plasmide.....	30
4.4) Transformation bactérienne.	30
4.4.1 Préparation de cellules XL1blue compétentes.	32

4.4.2. Transformation de cellules XL1 blue compétentes.	32
4.5) Minipréparation d'ADN plasmidique.....	33
4.6) Midipréparation d'ADN plasmidique	34
5) Réaction de séquençage	35
Réaction de séquençage	35
a) Dénaturation	36
b) Hybridation.....	37
c) Marquage (labelling).	37
d) Terminaison	37
Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	38
a) Montage des plaques.	38
b) Préparation du gel.....	38
c) Migration et autoradiographie	38
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	40
1) Construction d'une banque de cDNA.	40
2) Criblage de la banque de cDNA.....	40
2.1) Choix de la sonde.....	40
2.2) Criblage	41
2.2.1 Etalement de la banque.....	41
2.2.2 Purification des phages sélectionnés.....	41
2.2.3 Isolation des inserts contenus dans les recombinants positifs.	42
3) Sous-clonage de l'insert dans le plasmide pBluescript.....	43
4) Séquençage de l'insert.	43
4.1) Analyse de la partie 3' de l'insert: gène SH.....	44
4.2) Analyse de la partie 5' de l'insert	49
4.2.1 Réalisation d'un carte de restriction de l'insert.	49
4.2.2 Sous clonage des deux fragments résultant de la restriction par SacI.	50
4.2.3 Séquençage des deux inserts.....	50
4.3) Analyse de la séquence protéique.	50
<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	52

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1) HISTORIQUE ET TAXONOMIE

Le virus respiratoire syncytial fut pour la première fois isolé en 1956 à partir d'un singe qui semblait souffrir d'une simple rhinite. Des études approfondies ont permis de mettre en évidence l'agent pathogène qui fut appelé *chimpanzee coryza agent* (Morris et al., 1956). Quelques années plus tard un virus semblable fut découvert chez des jeunes enfants. Dès lors, le virus fut rebaptisé *Human Respiratory Syncytial Virus* (HRSV) (McIntosh & Chanock, 1990).

En 1970, Paccaud et Jacquier isolèrent pour la première fois le BRSV (*Bovine Respiratory Syncytial Virus*). Il fut dénommé ainsi parce qu'il était responsable de pathologies respiratoires et provoquait la formation de syncytia lors de sa culture *in vitro* (Paccaud et Jacquier, 1970).

Le RSV (*Respiratory Syncytial Virus*) appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, famille qui se subdivise en trois genres: *Morbillivirus*, *Paramyxovirus* et *Pneumovirus*. On retrouve entre autres dans ce dernier genre le HRSV et le BRSV, qui est l'équivalent bovin du HRSV. Le genre des *Pneumovirus* est le genre le plus éloigné des autres *Paramyxoviridae*, car il est caractérisé par l'absence des activités d'hémagglutinine et de neuraminidase ainsi que par la petite taille du virion (Collins, 1991; McIntosh & Chanock, 1990). En 1985, le RSV fut isolé chez les ovins. Il fut donc nommé ORSV (*Ovine Respiratory Syncytial Virus*) (Evermann et al., 1985).

2) PATHOLOGIE

Les infections liées aux BRSV ont un impact économique important. La perte moyenne occasionnée par le BRSV est de plus ou moins 25 ECUS par tête pour les veaux laitiers de moins d'un an, ce qui correspond à des pertes d'environ 450 millions d'ECUS dans l'ensemble de la Communauté Européenne. Des pertes plus importantes existent également au niveau des animaux viandeux du fait de la sensibilité accrue de ces races, mais ces dernières n'ont pas été chiffrées (Verhoeff et al., 1992).

La sensibilité au RSV bovin semble être influencée par l'âge. Les cas de maladie respiratoire aiguë dus au BRSV sont généralement enregistrés chez les veaux âgés de moins de 18 mois, et se caractérisent par l'apparition de foyers de broncho-pneumonie dans la partie supérieure des poumons et d'emphysème dans la partie inférieure. Chez

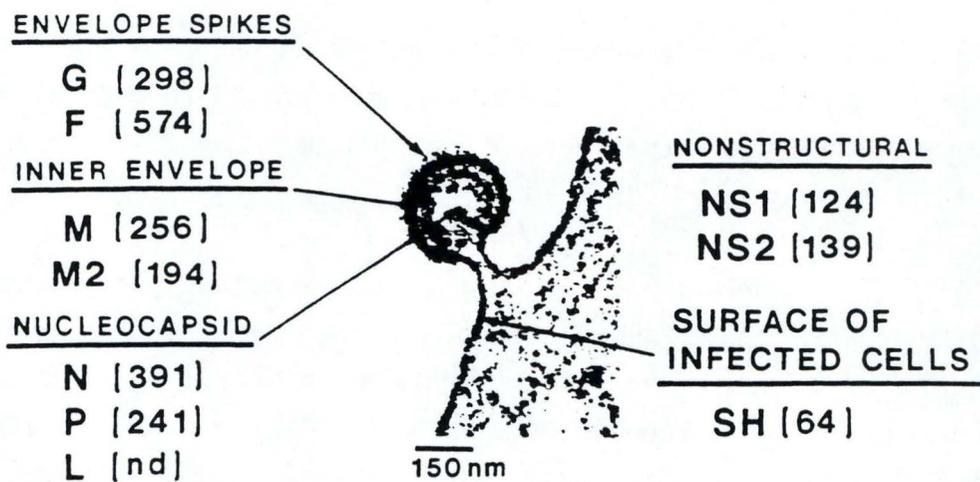


Figure 1: Structure du RSV : micrographie électronique d'un virion bourgeonnant utilisée pour indiquer la localisation et la taille en aa des protéines du RSV (d'après McIntoch et Chanock, 1990).

les animaux adultes, l'infection peut faire apparaître des symptômes aspécifiques (rhinite, toux, jetage nasal) qui peuvent être confondus avec ceux provoqués par d'autres virus tels que le parainfluenza-3 bovin et le virus de la diarrhée bovine (BVDV) (Wellemans, 1990) .

Le BRSV se réplique dans les cellules de la muqueuse nasale, du pharynx, de la trachée et des poumons. Il peut être isolé dans les sécrétions nasales 24 heures après l'infection expérimentale, mais la prolifération maximale apparaît après 4 à 7 jours. Au niveau des poumons, le virus est détecté à partir du 3^{ème} jour (Sharma & Woldehiwet, 1991). Au niveau histologique, on observe, chez les animaux infectés naturellement, la formation de syncytia par les cellules de l'épithélium bronchique et le parenchyme alvéolaire. Les cellules infectées peuvent également contenir des inclusions éosinophiles intracytoplasmiques. La formation de syncytia est également observée lors de la culture du virus, sur tapis cellulaire.

D'autres changements histologiques tels que l'épithélialisation alvéolaire, la prolifération de l'épithélium bronchique et la formation d'oedème au niveau des espaces alvéolaires, peuvent également se produire .

Au niveau des poumons, le virus se localise dans les lobes inférieurs, cependant des lésions peuvent apparaître dans la partie supérieure des poumons. Ces lésions résulteraient d'une réponse immunitaire exacerbée, ce point sera abordé dans le chapitre traitant de l'immunité.

3) STRUCTURE DU VIRION

Le RSV, qu'il soit humain ou bovin, présente une certaine hétérogénéité en ce qui concerne la taille et la forme du virion. Les formes sphériques ont un diamètre d'environ 80 à 350 nm, les formes filamenteuses ont un diamètre de 60 à 100 nm et une longueur de 10 µm. La particule virale est constituée d'une nucléocapside, de forme hélicoïdale, contenue dans une enveloppe lipoprotéique. Le virion, une fois formé, s'entoure d'une membrane provenant de la cellule-hôte et mature par bourgeonnement (figure 1 Collins et al, 1991).

Son génome est constitué d'un ARN simple brin, non segmenté et de polarité négative, codant pour 10 protéines dont 8 se retrouvent au niveau du virion. L'ARN est localisé dans la nucléocapside qui se compose de 3 protéines virales (N,L et P). Entre la nucléocapside et l'enveloppe existent 2 protéines de matrice (M et 22K). L'enveloppe, quant à elle, est recouverte de projections de 7 à 19 nm. Ces projections,

Ordre de succession des gènes, 3'-5'	Taille des mRNAs, queue de mRNAs exclue ^a	Nombre d'acides aminés ^a	Masse moléculaire ^{a,b} kilodalton	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 intérieur 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	Interviendrait dans la formation des syncytia	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 ₂ 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 ₂ . Clivée en deux sous-unités F ₁ et F ₂ reliées par pont disulfure. F ₂ relativement hydrophile et contenant quatre à cinq sites pour l'addition de sucres N-liés. F ₁ présente un domaine de fusion hydrophobe NH ₂ -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.

^a Chiffres concernant le HRSV/BRSV,

^b Chiffres montrant la masse moléculaire avant (au-dessus) et après (en-dessous) glycosylation.

TABLEAU 1
Caractéristiques des gènes et des protéines du RSV (d'après McIntosh & Chanock, 1990)

ou "spikes", sont constitués par les protéine F et G, qui sont responsables de l'attachement et de la pénétration du virus dans la cellule-cible (Sharma & Woldehiwet, 1991). Trois autres protéines sont présentes au niveau des cellules infectées mais non dans le virion : ces protéines sont NS1, NS2 et SH qui se localisent au niveau de la membrane cellulaire (figure 1).

4) PROTEINES VIRALES

Le HRSV et le BRSV sont caractérisés par une composition en protéines fort similaire. Néanmoins de faibles divergences apparaissent au niveau des masses moléculaires des différentes protéines. Les tailles et les rôles de ces protéines sont repris dans le tableau 1.

4.1) Les protéines de la nucléocapside L, N et P .

La protéine L (Large)

L'ARNm de la protéine L du HRSV est constitué de 6578 nucléotides, ce qui conduit à une protéine de 2165 aa et à une masse moléculaire de 250 kD. Le gène codant pour cette protéine chez le BRSV n'a pas encore été isolé (Collins et al., 1991).

Elle interviendrait dans la transcription et la réplication du virus. En effet, d'autres séquences de gènes de protéine L, obtenues à partir de virus à ARN négatif non segmenté, présentent des proportions de résidus basiques et hydrophobes équivalentes et sont de taille semblable. Ainsi, chez les *Paramyxoviridae*, le SV (Sendai Virus) possède une protéine de 2228 aa, le PIV3 (Parainfluenza Virus) en possède une de 2233 aa, le MeV (Measles Virus) en possède une de 2183 aa, le NDV (Newcastle Disease Virus) en possède une de 2204 aa et chez les *Rhabdoviridae*, le VSV (Vesicular Stomatitis Virus) possède une protéine de 2109 aa. Les études entreprises sur la protéine L du virus VSV indiquent que cette protéine serait une ARN polymérase ARN dépendante possédant les activités de coiffage en 5' et de polyadénylation en 3' (McIntosh & Chanock, 1990 ; Kingsbury, 1990) .

La protéine N (Nucléocapside)

L'ARNm de la protéine de nucléocapside du BRSV est constitué de 1196 nucléotides (1197 pour le HRSV). La protéine quant à elle est constituée de 391 aa, ce qui conduit à une masse moléculaire de 42.6 kD (McIntosh & Chanock, 1990).

La protéine N aurait un rôle structural. Lors de l'assemblage du virion, elle se combinerait avec l'ARN génomique pour former une hélice ribonucléoprotéique, à laquelle viendraient s'ajouter les protéines auxiliaires de la capsid (L et P) (McIntosh & Chanock, 1990).

La protéine P (Phosphoprotéine)

Elle semble être la seule protéine du RSV (HRSV et BRSV confondus) qui soit phosphorylée. Le masse moléculaire de la protéine mature est de 27.1 kD et elle atteint 34 kD après phosphorylation (McIntosh & Chanock, 1990).

La phosphorylation se fait au niveau des résidus sérine localisés dans la région centrale et la partie C terminale de la protéine (Villanueva et al., 1994).

Le rôle précis de cette phosphoprotéine dans la synthèse de l'ARN reste encore à définir. Des études réalisées sur le VSV ont montré que l'activité de la protéine L ne se manifeste pas en absence de la protéine P, ce qui suggère qu'elle serait un facteur essentiel à la transcription (Banerjee et al., 1992).

4.2) Les protéines non - structurales NS1 (1C) et NS2 (1B)

Ces protéines se retrouvent dans les cellules infectées, mais pas dans le virion (McIntosh & Chanock, 1990).

La protéine NS1 du RSV humain et bovin a une masse moléculaire de 15.6 kD. Le gène codant pour cette protéine n'a pas encore été identifié chez le BRSV. Par contre, pour le HRSV et le ORSV, le gène a été cloné et séquencé. L'ARNm codant pour NS1, chez le HRSV, est constitué de 528 nucléotides. La séquence nucléotidique du gène chez le ORSV est quant à elle plus courte de 4 nucléotides. La longueur, déduite à partir de la phase ouverte de lecture, de la protéine est de 126 aa chez le ORSV contre 139 aa, pour le HRSV (McIntosh & Chanock, 1990; Alansari et Potgieter, 1994).

La protéine NS2 chez le ORSV, est codée par un ARNm de 490 nucléotides, c'est-à-dire qu'il possède 9 nucléotides en moins que son équivalent au niveau du HRSV. Cependant, la longueur de la phase ouverte de lecture est la même, ce qui conduit à la production d'une protéine de 124 aa. Cette protéine n'a pas encore été caractérisée chez le BRSV.

4.3) *Les protéines de la matrice*

Les protéines M et 22k (appelée aussi M2) sont des composantes internes de l'enveloppe virale .

La protéine M(Matrice)

La protéine M chez le RSV humain et bovin est plus petite (256 aa) que ses homologues des autres genres de *Paramyxoviridae*.

Chez les *Paramyxovirus* et les *Morbillivirus*, la protéine M contient un segment C-terminal hydrophobe, ce qui suggère une interaction avec la membrane. Celle du RSV contient un segment de 25 aa hydrophobes (à partir de l'aa 200), qui pourrait correspondre au segment terminal trouvé chez les autres *Paramyxoviridae* (Collins,1991).

La protéine 22k ou M2

La protéine 22k comme son nom l'indique a une masse moléculaire de 22kD. Le gène codant pour cette protéine a une taille de 957 nucléotides pour le HRSV et 958 pour le BRSV(McIntosh & Chanock, 1990).

Parmi les virus non segmentés à ARN négatif, le RSV est le seul à posséder une protéine de matrice supplémentaire: 22k. Les études réalisées par immunofluorescence suggèrent une interaction entre la protéine 22k et les protéines de la nucléocapside. En effet, les travaux réalisés par Josepha et al. (1993) ont montré que la protéine 22k pouvait s'associer aux protéines N et P tandis que la protéine M interagirait avec les protéines G et F.

Le rôle de reconnaissance et de fixation de la capsid, permettant le bourgeonnement du virion, attribué à la protéine de matrice des autres *Paramyxoviridae* serait réparti, chez le RSV, entre les deux protéines de matrice

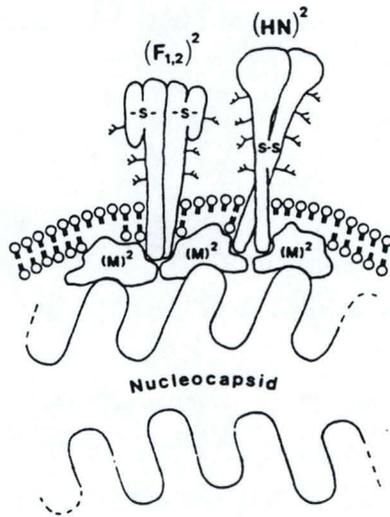


Figure 2: Modèle hypothétique des relations existant entre les protéines F, NH (NH est l'équivalent de la protéine G du RSV), M et la nucléocapside chez le VSV.

(Josepha et al.,1993). C'est chez le VSV que le rôle et la localisation de la protéine de matrice ont été le mieux décrit (figure 2).

4.4) Les protéines de l'enveloppe

La glycoprotéine G

La glycoprotéine G a été identifiée comme étant responsable de l'attachement du virus à la cellule cible. En effet, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine G bloque l'adsorption des particules virales marquées aux cellules (Levine et al., 1987) .

Le gène codant pour la glycoprotéine G chez le HRSV a une taille de 918 nucléotides et de 838 pour le BRSV; la taille déduite de la protéine est donc de 298 aa (257 aa pour le BRSV sauf pour la souche A51908 où la protéine est plus longue de 6 aa du côté C terminal) et sa masse moléculaire théorique de 32 kD. En fait, la masse moléculaire réelle de la protéine, observée sur un gel SDS-PAGE, varie de 84 à 90 kD car la protéine présente une très forte glycosylation N- et O-liées (environ 60% de la masse moléculaire finale) (McIntosh & Chanock, 1990, Lerch et al. 1990).

La séquence en acides aminés de G contient un domaine hydrophobe proche de la région amino-terminale (résidus 38-66). Cette région contiendrait toutes les informations structurales requises pour l'insertion et l'ancrage de la protéine à la membrane (Hendrick et al., 1987). Il existe une forme soluble de la protéine G sécrétée par les cellules infectées, qui diffère de la forme membranaire par l'absence de ce domaine. Cette forme soluble provient d'une initiation de la traduction qui ne commence qu'au second ATG du cadre ouvert de lecture (ORF). Par contre, si la traduction est initiée à partir du premier ATG, la protéine synthétisée se voit associée à la membrane (Roberts, 1994).

Les travaux réalisés par Lambert et al., ont mis en évidence l'importance des chaînes latérales oligosaccharidiques dans les propriétés antigéniques et dans l'attachement du HRSV. En effet, des traitements enzymatiques permettant d'enlever les sucres N- et O- liés diminuaient fortement l'infectivité (Lambert et al.,1988)

La protéine de fusion (F)

La protéine F de RSV (humain ou bovin), non glycosylée, a une masse moléculaire théorique de 63,5 kD .

Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur glycosylé F0 de 70 kD. Ce précurseur acquiert son activité fusogène en étant clivé par une protéase cellulaire. Ce clivage générant deux sous-unités, F1 (MM de 48 kD) et F2 (MM 17, 20 ou 23 kD), liées par des ponts disulfures suivant le canevas: NH₂-F2-ss-F1-COOH. La masse moléculaire de F2 varie selon que l'on soit chez le HRSV ou le BRSV et selon le sous-groupe antigénique dans lequel on se trouve. La MM de la sous-unité F2 est de 20 kD pour le HRSV et pour la souche bovine A51908, elle est de 17 kD pour le sous-groupe A du BRSV et de 23 kD pour le sous groupe B du BRSV (Furze et al., 1994).

Elle intervient dans la fusion des membranes cellulaire et virale permettant ainsi la pénétration du virus à l'intérieur de la cellule, comme le font les protéines de fusion des autres *Paramyxoviridae*. Elle intervient également dans la formation de syncytia permettant la circulation de l'ARN viral vers d'autres cellules (McIntosh & Chanock, 1990; Walsh & Hruska, 1983 et Collins, 1991).

Les études réalisées sur d'autres *Paramyxoviridae*, indiquent que le clivage de F0 est nécessaire pour que la fusion se réalise. Le nombre d'arginine et de lysine semble déterminant pour l'action de la protéase. La protéine F du HRSV et du BRSV a six résidus de ce type (Lys(K)-Lys-Arg(R)-Lys-Arg-Arg) juste en amont du site de clivage (Fig 3). D'autres virus, tels que le VSV (*Rhabdoviridae*) et les *Paramyxoviridae* MeV, MuV (virus des oreillons), PIV3 et SV possèdent respectivement 5, 4, 4, 3 et 1 résidus de ce type (Collins , 1991) .

Elle présente un peptide-signal dans sa région carboxy-terminale et contient un domaine d'ancrage de la protéine à la membrane. La partie NH₂ terminale de la protéine est orientée vers l'extérieur de la cellule (orientation de type I) contrairement à la protéine G où l'orientation est de type II (Collins, 1991).

La protéine SH (Small Hydrophobic)

Cette protéine se compose de trois domaines, un domaine intracellulaire, un core hydrophobique central qui permet l'insertion dans la membrane cellulaire et un domaine C-terminal extracellulaire.

La protéine SH du HRSV est codée par un ARNm de 408 nucléotides pour la souche 18537 et de 405 nucléotides pour la souche A2 (566 pour la souche bovine A51908 et 464 pour la souche ovine). La protéine de la souche 18537 est un aa plus longue (65 aa) que celle de la souche A2 (64 aa) et 8 aa plus courte que la protéine de la souche bovine A51908 (73 aa).

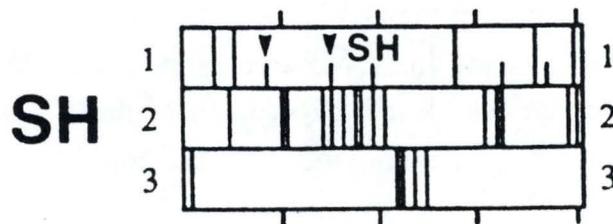


Figure 3: Représentation des phases ouvertes de lecture de la protéine SH du HRSV. Les flèches indiquent les 2 sites d'initiation à la traduction (ATG) (d'après Collins, 1990)

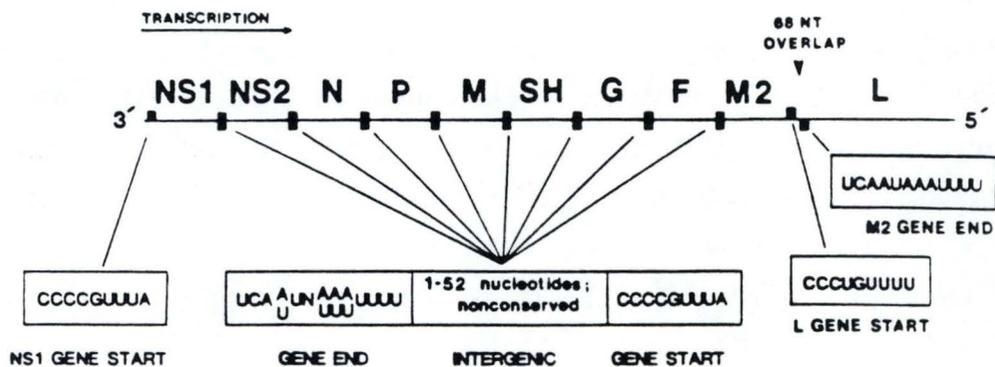


Figure 4: Carte génétique de la souche A2 du HRSV (d'après McIntosh et Chanock, 1990).

Une expérience d'immunoprécipitation, avec des anticorps spécifiques de la protéine SH, a permis de mettre en évidence plusieurs types de protéines différant par leur masse moléculaire. Les espèces de 4.8 kD et 7.5 kD ne subissent aucune glycosylation. Elles diffèrent en taille car l'initiation de la traduction, pour l'espèce de 4.8 kD, débute au second ATG de la séquence (figure 3).

Les deux autres formes, 13-15 kD et 21-30 kD, contiennent des sucres N-liés. La forme de 15 kD provient de la glycosylation de la protéine de 7.5 kD et elle semble être convertie en la forme de 21-30 kD par une addition postraductionnelle de polylectosamine N-lié. Toutes les formes de SH sont insérées dans les membranes intracellulaires et sont, hormis la forme de 4.8 kD, transportées vers la membrane des cellules infectées avec la partie C-terminale tournée vers l'extérieur. Sa localisation, dans l'enveloppe virale n'a pas encore été clairement démontrée (Collins, 1991).

Son rôle serait d'intervenir avec les protéines F et G, dans la formation de syncytia. En effet, les études réalisées par Heminway et al. (1993) indiquent que l'expression de F et G provoquait la formation de très petits syncytia, par contre la coexpression de F, G et SH augmente fortement la fusion entre les cellules cultivées *in vitro*. La protéine SH induirait des modifications conformationnelles de la protéine de fusion, ce qui augmenterait la capacité fusogène de F même en absence de la protéine d'attachement (Heminway et al., 1993).

5) ORGANISATION GENETIQUE .

Le génome du RSV est constitué d'un brin d'ARN négatif monocaténaire d'une masse moléculaire d'environ 5.9×10^6 daltons, codant pour 10 protéines distinctes. L'ordre de succession des gènes de ces protéines, chez le HRSV, est 3' NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'. Les différents gènes sont séparés les uns des autres par une région intergénique non conservée (Collins, 1991)(Figure 4).

Les gènes du RSV ne se chevauchent pas excepté les deux derniers : M2 et L qui se chevauchent sur 68 nucléotides. Dès lors, le "gene end" du gène M2 est contenu dans le gène L. Ce phénomène a pour conséquence une terminaison prématurée d'une partie des transcrits du gène L et une modulation négative de la production de la protéine L (McIntosh & Chanock, 1990).

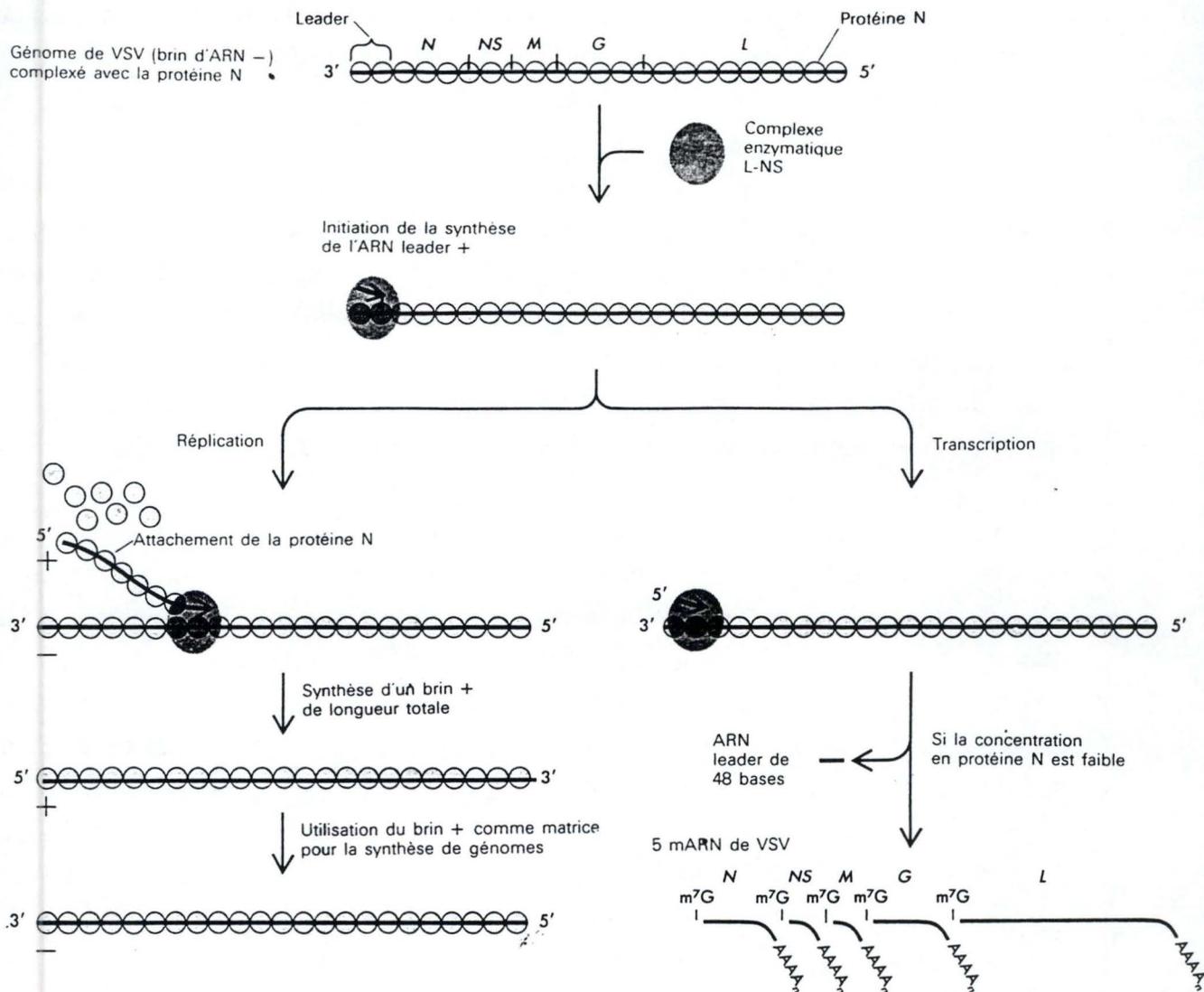


Figure 5: Transcription et répliation du génome du VSV. Le choix entre les deux processus semble être déterminé par la disponibilité en protéine N (d'après Blumberg et al., 1981).

5.1) Réplication de l'ARN.

Lors de la réplication du génome, l'entièreté de la séquence de l'ARN doit être transcrite pour fournir un brin positif (antigénome) qui servira de matrice à la synthèse du génome négatif. Pour se faire, la machinerie de synthèse de l'ARN doit entrer dans un mode d'anti-terminaison en ignorant les signaux se trouvant de part et d'autre des gènes.

Des études ont surtout été réalisées sur la réplication du VSV, où l'on a montré que la région exacistronique 3' du brin négatif (région leader) contient deux signaux différents. Le premier est le promoteur pour la synthèse des ARNm, le second initie l'encapsidation du virus (Mink et al. 1991).

Des travaux ont également été réalisés chez le HRSV, où l'on a observé que la région "leader" contenait des signaux qui agissaient en *cis* pour l'activité du promoteur et de l'encapsidation (Collins et al., 1991)

La synthèse du "template" positif et de l'ARN génomique est étroitement liée à l'encapsidation et est inhibée quand la protéine N devient limitante.

En effet, lorsque la protéine N est présente en grande quantité, elle se fixe au niveau de la région "Leader" et agit directement sur l'ARN polymérase pour la faire passer dans le mode répliatif. Par contre, quand elle est en concentration très faible, la polymérase (protéine L) reconnaît des séquences *consensus* (point 5.2) et synthétise les différents ARNm (Collins et al., 1991). Ce mécanisme a surtout été décrit chez le VSV (figure 5).

5.2) Transcription des ARNm viraux.

La taille des ARNm du BRSV est semblable à celle des messagers du HRSV (Lerch et al., 1989). Aux extrémités des régions intergéniques, on observe des séquences *consensus* appelées "gene start" : 3'-CCCCGUUUA-5' et "gene end" : 3'-UCA (A/U) UN (A/U A/U A/U) UUUU-5' (la lettre N correspondant à n'importe quel nucléotide). Le "gene end" se termine par 4 ou 7 résidus uridine. (McIntosh & Chanock, 1990 ; Collins, 1991).

La transcription des gènes serait initiée à partir d'un seul promoteur qui se situe à l'extrémité 3'. Ce phénomène est également observé chez d'autres virus à ARN

Addition de poly A au mARN de VSV

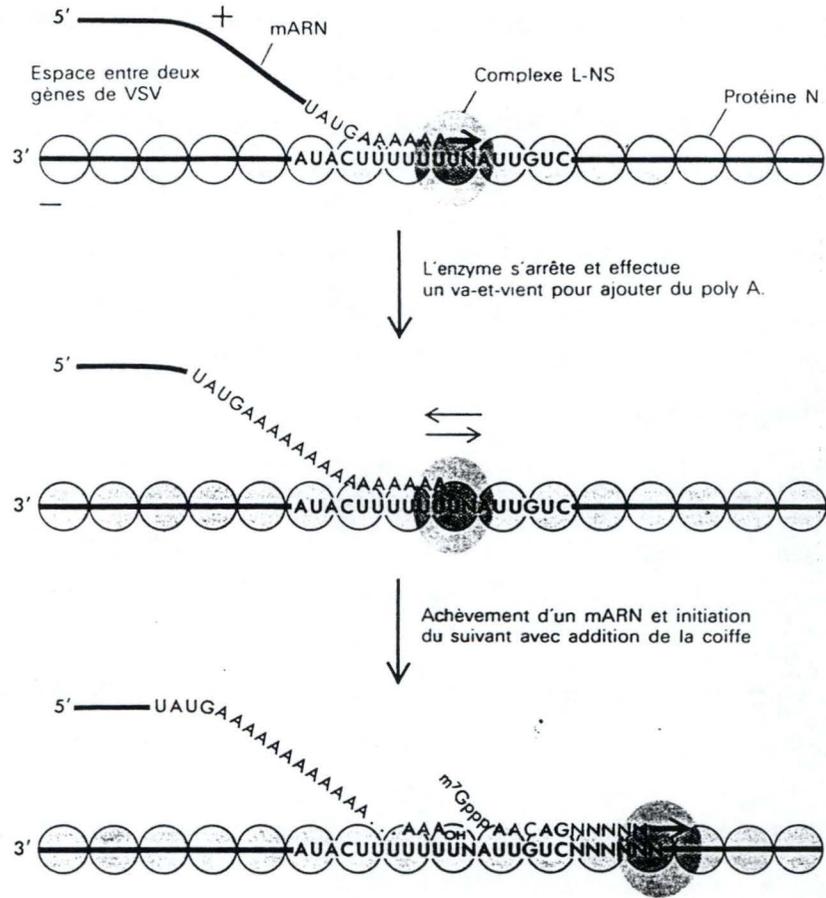


Figure 6: Polyadénylation des ARNm de VSV. La séquence nucléotidique définie sur ce schéma représente le "gene end" se trouvant à l'extrémité de chaque gène (d'après Blumberg et al., 1981).

négatif non segmenté, étudié jusqu'ici, c'est-à-dire une transcription séquentielle du génome (Collins et al.,1986).

Il existe un modèle pour expliquer cette transcription séquentielle : le mécanisme par initiation et terminaison. Ce mécanisme suppose que, après avoir reconnu le promoteur, la polymérase (la protéine L) se déplace sur le génome jusqu'à la rencontre du signal d'initiation (séquence "gene start") qui lui indique que la transcription doit commencer. La polymérase synthétise donc l'ARNm jusqu'au moment où elle rencontre le signal de terminaison (séquence "gene end") , qui lui indique qu'il faut arrêter la synthèse.

Ensuite, la polymérase reste sur l'ARN; elle se déplace sans transcrire et démarre la transcription du gène suivant quand elle rencontre le "gene start".

Les arguments majeurs en faveur de ce modèle "start/end" sont l'existence des séquences *consensus* "gene start " et "gene end" et la mise en évidence de ce mécanisme chez le VSV (Mink et al.,1991). La queue de poly(A) des messagers serait synthétisée par le copiage en "va et vient" des résidus uridine retrouvés à la fin du "gene end"(figure 6).

6) IMMUNITE

6.1) *Cible antigénique du système immunitaire*

Chez les enfants infectés par le HRSV et chez les veaux infectés par le BRSV, les anticorps que l'on observe sont principalement dirigés contre les protéines F, N et G. Dans une moindre mesure, il est possible de trouver des anticorps dirigés contre les protéines M, 22k, L, P et SH (Kimman et al., 1989 ; McIntosh & Chanock,1990).

L'utilisation d'anticorps, dirigés contre les protéines F et G, permet d'inhiber voire même de neutraliser la réplication du HRSV en culture *in vitro* (Taylor et al.,1984).

F et G sont donc les protéines les plus immunogènes et les anticorps qui leur sont spécifiques sont les seules immunoglobulines neutralisantes. La protéine SH quant à elle est peu immunogène et les anticorps dirigés contre elle sont non neutralisants .

Les cibles de la réponse immunitaire à médiation cellulaire sont les protéines 22K, F et N. Cela a été mis en évidence lors d'expériences de protection avec le HRSV dans un modèle murin. Les protéines 22k, F et N exprimées par le virus de la vaccine étaient les principales inductrices de la réponse T cytotoxique (King et al., 1987 ; Openshaw et al., 1990).

6.2) Réponse à médiation cellulaire

La réponse NK (natural killer) qui réalise la lyse non spécifique, se manifeste un jour après infection et persiste jusqu'au troisième jour; cette action reste limitée au poumons (Anderson et al., 1990). Et ils ne mesurent pas d'activité de type NK, ou de lyse spécifique à partir de cellules isolées du sang périphérique ou de la rate .

Il existe un lien temporel entre l'apparition des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) et la disparition du virus. En effet, les travaux réalisées par Anderson en 1990 sur des souris *BALB/c* ont montré que l'activité maximale des LTC se manifestait 7 jours après l'infection , moment où l'on observe la disparition du virus. L'existence de cette relation temporelle montre l'importance des LTC dans l'élimination du virus (Anderson et al. ,1990) .

D'autres travaux sont venus confirmer l'importance de la réponse à médiation cellulaire. Ainsi, chez des souris "nude" (athymique), le HRSV est capable de se maintenir et il peut être éliminé à la seule condition de transférer des LTC appropriés. Un argument supplémentaire provient du fait que les enfants, présentant un système immunitaire déficient pour la réponse à médiation cellulaire, sont incapables de stopper l'infection (McIntosh & Chanock , 1990).

Les lymphocytes auxiliaires (T helper) jouent un rôle dans la composante immunopathologique des lésions pulmonaires. En effet, la déplétion en CD4⁺ conduit à la suppression de l'immunopathologie lors d'une immunisation avec le virus tué à la formaline (Connors et al., 1992).

6.3) Réponse humorale

La réponse humorale apparaît plus tardivement que la réponse cellulaire. La présence d' IgM, spécifiques au BRSV, est détectée 6 à 9 jours après l'infection. L'apparition des IgG, quant à elle, se manifeste environ une semaine après celle des IgM (Sharma & Woldehiwet , 1991).

Les études réalisées par Taylor et al. ont montré que le transfert passif d'anticorps monoclonaux, dirigés contre les protéines F et G, qui permettent de neutraliser le virus en culture *in vitro*, réduit voire empêche la réplication du HRSV dans les poumons de souris. Par contre, on n'observe aucune protection chez les souris où l'on a transféré passivement des anticorps anti-N (Taylor et al. 1984).

L'implication de la réponse humorale dans l'immunopathologie n'est pas encore claire. Ainsi, si certains auteurs ont mis en évidence l'intervention des mastocytes via les IgE et du complément (Kimman et al., 1989; Thomas & Stott, 1981), d'autres ont montré l'existence d'anticorps "non fonctionnels" pouvant se fixer au virus, mais ne neutralisant pas l'infection. Ces anticorps peuvent aggraver la maladie en causant une réaction d'Arthus (hypersensibilité de type III) (Westenbrink, 1990).

La présence d'un haut titre de ces anticorps dans le colostrum ne protège pas totalement le jeune veau (Sharma & Woldehiwet, 1991). Il en est de même chez les enfants infectés par le HRSV, où la transmission d'anticorps maternels diminuerait la sévérité de la maladie sans pour autant protéger (McIntosh & Chanock, 1990). Ces différents éléments suggèrent que la protection ne serait pas nécessairement médiée par la neutralisation (Sharma & Woldehiwet, 1991).

6.4) *Phénomène de réinfection*

Les réinfections dues aux RSV, qu'il soit humain ou bovin, sont courantes. Ce phénomène est lié au moins à deux caractéristiques des RSV.

Les anticorps maternels qui entraveraient le développement d'une réponse immunitaire efficace chez l'enfant et le jeune veau. Et l'existence d'une hétérogénéité entre les souches sauvages, comme Mufson le propose pour les souches de HRSV (Mufson et al., 1987).

7) HETEROGENEITE

7.1) *Variabilité antigénique chez le HRSV*

Mufson et ses collaborateurs (1985) furent les premiers à identifier la présence de deux sous-groupes antigéniques (A et B) parmi les souches de HRSV. Pour ce faire, ils utilisèrent des anticorps monoclonaux spécifiques des protéines les plus immunogènes (F, N et G) du HRSV.

Dans ces études, la différence majeure entre les sous-groupes a été observée pour la protéine G. En effet, seul 1 site antigénique sur 6 de cette protéine était partagé entre les deux sous-groupes. Cette divergence fut également observée pour d'autres protéines. Ainsi, la protéine F partageait 1 site sur 3. La protéine M en partageait 2 sur 6 et N 1 sur 6 (Mufson et al., 1985).

L'existence de variations antigéniques à l'intérieur des sous-groupes a également été mise en évidence par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine G, les deux sous-groupes étant identifiés sur base de leurs profils de réactivité face à des anticorps anti-F. En effet, les études réalisées par Anderson et al. (1991) ont montré l'existence de six subdivisions dans le sous-groupe antigénique A et de trois pour le sous-groupe B.

7.2) Variabilité antigénique chez le BRSV.

C'est en 1989 que Lerch et ses collaborateurs ont introduit l'idée de l'existence de sous-groupes antigéniques chez le BRSV. Ils ont observé qu'un polysérum dirigé contre la protéine G de la souche 391-2 était incapable de reconnaître la protéine d'attachement d'une autre souche .

Des études beaucoup plus récentes ont confirmé ces observations. Ainsi, 23 anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine d'attachement G ont été utilisés afin de déterminer l'existence d'une hétérogénéité parmi 19 souches de BRSV provenant de différentes parties du monde. Les résultats obtenus semblent en faveur de l'existence de deux sous-groupes (Furze et al. 1994).

Des études similaires ont été réalisées dans notre laboratoire. Les résultats obtenus confirment et complètent les observations de Furze et al. (1994). Ces résultats ont été obtenus par l'utilisation de 2 anticorps spécifiques de la glycoprotéine F (AK13A2 et AL15H6) et 2 spécifiques à G (AL11F11 et AL20F12). Ils ont permis de classer 39 souches de BRSV, bien que deux des anticorps les reconnaissaient pratiquement toutes (AK13A2 et AL11F11) et que certains profils de réactivité étaient intermédiaires (Prozzi D, rapport d'activité, 1994).

Il est important de signaler que les anticorps dirigés contre la protéine G des souches des différents sous-groupes de HRSV, ne réagissent pas avec la protéine G du BRSV. Ceci n'est pas le cas pour les autres protéines où l'on peut observer des phénomènes de réactivité croisée (Örvell et al., 1987).

7.3) Variabilité génétique: comparaison de séquences entre les différentes souches de HRSV, BRSV et ORSV

En ce qui concerne les sous-groupes humains A et B, la souche A2 est le prototype du sous-groupe A et la souche 18537 le prototype du sous-groupe B. La plupart des comparaisons de séquences de gènes de BRSV et ORSV sont réalisées vis-à-vis de ces souches humaines. Les comparaisons au sein d'une même espèce virale, HRSV et BRSV, nous montrent l'importance de la variabilité génétique. Les pourcentages d'identité obtenus pour divers gènes, nous indiquent l'ampleur de l'hétérogénéité des souches pour une même espèce virale. Dans ce cadre, le plus grand nombre de comparaisons de séquences a été réalisé pour le gène de la protéine G.

En effet, l'alignement des séquences en aa de la protéine G, entre la souche 391-2 (BRSV) et les souches A2 et 18537 (HRSV) montre un pourcentage d'identité de 29% et de 30% respectivement. La comparaison entre les deux souches humaines nous donne un pourcentage d'identité en aa de 53% (Johnson et al.,1987)(tableau 2).

Pourcentage d'identité de séquencee Nucléotides/Acides aminés		
	G	SH
HRSV A/BRSV ¹		53/38
HRSV B/BRSV ¹		60/36
HRSV A/BRSV ²	51.7/29	
HRSV B/BRSV ²	50.8/30	
HRSV A/HRSV B	67/53	76/78
BRSV/ORSV	73/60	69/56

TABLEAU 2:

Pourcentages d'identité entre les diverses séquences déjà obtenues pour les gènes des protéines G et SH du BRSV (² souche 391-2 et ¹ souche A51908), de l'ORSV et des souches humaines (Les sous-groupes sont représentés par les souches "prototypes", à savoir A2 pour le sous-type A et 18537 pour le sous-type B.).

En ce qui concerne la souche A51908 de BRSV et la souche WSU 83-1578 de ORSV, le pourcentage d'identité entre les deux protéines G est de 60% (Mallipeddi & Samal, 1993).

	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: Pourcentages de substitutions au niveau de la séquence protéique du gène G de 20 souches bovines. Ce calcul est réalisé au moyen du programme "Distances" (GCG) (d'après Bonsir, 1994).

- | | | | |
|-----------|------------|------------|--------------|
| 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 |

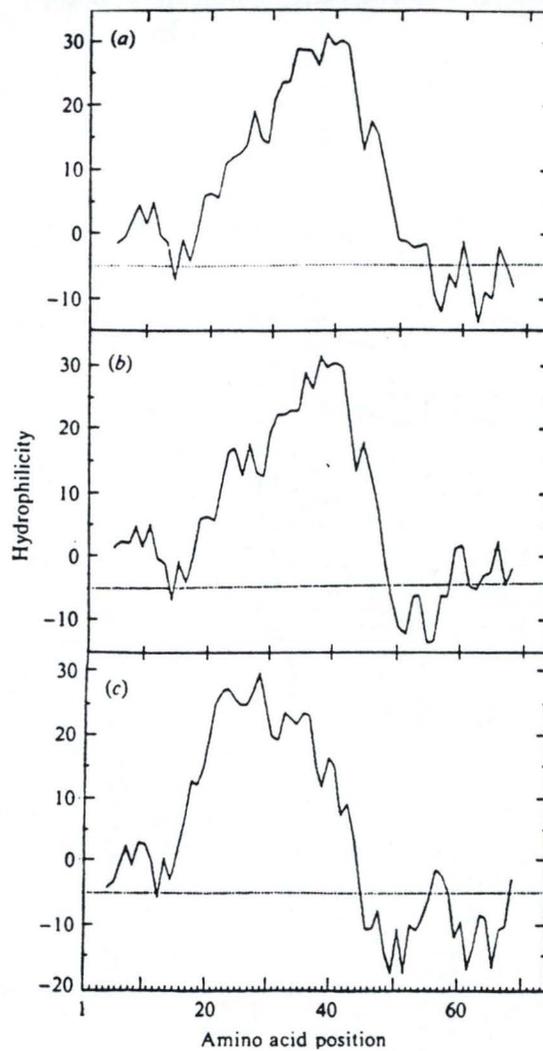


Figure 7: Profil d'hydrophobicité de la protéine SH de HRSV (souche A2 (a) et 18537 (b) et de BRSV (souche A51908 (c)). La distribution des domaines hydrophiles et hydrophobes le long de la séquence en aa est déterminée au moyen de l'algorithme de Kyte et Doolittle avec une fenêtre de 9 aa. L'hydrophobicité est indiquée par des valeurs positives (d'après Samal et al., 1991).

Pourcentages d'identité de séquence Nucléotides/Acides aminés						
	N	NS1	NS2	M	22k ou M2	F
BRSV/HRSV A	81/93			80/89	69/80	75/80
BRSV/HRSV B	81/93				69/80	75/81
HRSV A/HRSV B	86/96					82/90
BRSV/ORSV						
ORSV/HRSV A		70/69	70/79			
ORSV/HRSV B		65/68	72/79			
BRSV ¹ /BRSV ²	99.6/99.7					
BRSV ¹ /BRSV ³	99.1/99.2					

TABLEAU 4

Pourcentages d'identité entre les diverses séquences des gènes et des protéines N, NS1, NS2, M, M2 et F du BRSV (¹ souche RB-94, ² souche 391-2 et ³ souche A51908), de l' ORSV et des souches "prototypes" humaines (à savoir A2 pour le sous-type A et 18357 pour le sous-type B.).

Des études sont actuellement en cours dans notre laboratoire pour essayer de mettre en évidence les bases moléculaires de l'hétérogénéité chez le BRSV. La comparaison de différentes séquences publiées et des séquences obtenues dans notre laboratoire, du gène de protéine G, a montré un pourcentage d'identité de l'ordre de 80% à 100% entre 20 souches différentes. Ce pourcentage correspond, chez le HRSV, à la variation qui est observée à l'intérieur même des sous-groupes. L'analyse de ce gène n' a donc pas permis, à l'heure actuelle, de mettre en évidence une hétérogénéité chez le BRSV. Le tableau 3 illustre les pourcentages de substitution au niveau du gène G de 20 souches bovines (Bonsir, 1994).

SH est la protéine qui présente le plus de variabilité après la protéine G. De ce fait, des études de séquences ont été réalisées par plusieurs groupes afin de mettre en évidence l'existence d'une éventuelle hétérogénéité.

Collins et al. ont réalisé la comparaison des séquences protéiques entre les protéines SH des souches humaines 18537 et A2. Ils ont observé un pourcentage d'identité de 76% (Collins et al., 1990).

Le pourcentage d'identité, au niveau protéique, entre le ORSV (souche WSU 83-1578) et le BRSV (souche A51908) est de 56%. En ce qui concerne la comparaison en aa, entre le ORSV (souche WSU 83-1578) et les souches de HRSV (A2 et 18537), on observe des pourcentages d'identité allant de 33 à 47%. Malgré ces faibles pourcentages d'identité, on observe des profils d'hydrophobicité similaires (figure 7) (Alansari et Potgieter, 1994).

La variabilité est beaucoup moins importante pour les autres protéines. Cependant, des comparaisons de séquences ont quand même été réalisées (tableau 4).

Les études réalisées par Samal et al. ont montré que le gène N est hautement conservé parmi les souches humaines et bovines de RSV. La comparaison des séquences protéiques entre les souches humaines A2 et 18537 montre une identité de 96%. La souche bovine A51908 présente une identité de 93% avec les deux souches humaines (A2 et 18537) (Samal et al., 1991). Les études réalisées dans notre laboratoire ont confirmé les observations de Samal. En effet, la comparaison entre les séquences en aa de la protéine N des souches bovines RB-94 et 391-2 montre une identité de 99,7% et on observe une identité 99,2% entre les souches RB-94 et A51908.

Les séquences des protéines non-structurales sont également bien conservées. Les séquences protéiques de NS1 ont été comparées entre le ORSV et le HRSV. Le pourcentage d'identité entre la souche de ORSV et les souches humaines A2 et 18537 sont respectivement égaux à 69% et 68%. La comparaison des séquences en aa, entre les deux souches humaines, nous montre une identité de 87%. L'analyse de la séquence protéique de NS2 de la souche WSU 83-1578 (ORSV) nous montre une identité de 79% avec les protéines des 2 souches humaines A2 et 18537 (Alansari et Potgieter, 1994).

Les gènes codant pour les deux protéines de matrice (M et 22k) ont été analysés chez les souches de HRSV et chez la souche bovine A51908. La comparaison entre les séquences protéiques de M des souches bovine A51908 et humaine A2 montre une identité de 89% au niveau protéique (Samal & Zamora, 1991). L'analyse de la protéine 22k de la souche bovine A51908 a montré une identité de 80% en aa, avec les deux souches humaines (A2 et 18537)(Zamora & Samal, 1992).

La protéine F a également été étudiée du fait de son importance dans la réponse humorale et cellulaire. On observe que malgré un fort pourcentage d'identité entre les séquences protéiques des souches prototypes des sous-groupes A et B de HRSV (pourcentage supérieur ou égal à 80%), la protéine F des différentes souches virales se distingue par deux régions hétérogènes. En effet, le peptide-signal présente seulement 34% d'identité; cela indique que la fonction serait essentiellement due à l'hydrophobicité et non à la séquence en aa. La seconde région (résidus 111 à 129) présente 50% d'identité entre ces deux souches humaines. Cette région correspond à un site potentiel de glycosylation N-lié (McIntosh & Chanock, 1990). La séquence en aa de la protéine F montre 80% d'identité entre la souche bovine RB-94 et la souche humaine RSS-2 (sous-groupe A) et 81% entre la souche RB-94 et la souche humaine 18537 (sous-groupe B). La sous-unité F1 de la souche RB-94 montre 88% et 89% d'identité en aa avec les souches humaines RSS-2 et 18537, par contre la sous-unité F2 présente un pourcentage beaucoup plus faible (67% et 68%) (Walravens et al.,1990).

7.5) Variabilité structurelle.

Les sous-groupes peuvent également être différenciés par le masse moléculaire de la protéine de fusion et de son produit de clivage. Chez le BRSV, la masse moléculaire de F0, F1 et F2 est respectivement de 73, 46 et 17 kD pour l'un des sous-groupes et 77, 46 et 23 kD pour l'autre. Cette divergence de taille du produit de

clivage de F0 existe également entre les sous-groupes A et B de HRSV. La masse moléculaire de la sous-unité F2 étant plus élevée pour le sous-groupe antigénique A.(Baker et al., 1992 ; Furze et al., 1994) .

L'étude de l'hétérogénéité présente un intérêt à plusieurs niveaux : en effet, elle permettrait d'expliquer, du moins en partie, certains phénomènes tels que les réinfections, la non protection par les anticorps maternels et les échecs rencontrés lors des tentatives d'élaboration de vaccins contre le RSV humain ou bovin.(Baker et al.1992) .

BUT DU TRAVAIL

But du travail

L'existence d'une variabilité antigénique a été observée au niveau du HRSV, où l'existence de deux sous-groupes a été mise en évidence par l'utilisation d'anticorps spécifiques de la protéine F et de la protéine G. Cette variabilité antigénique est corrélée à une variabilité au niveau génétique.

Des études similaires, au niveau antigénique, ont été réalisées sur le BRSV par le groupe de Taylor (Furze et al., 1994). Ainsi, 23 anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine G ont permis de classer 19 souches de BRSV en deux sous-groupes.

Dans notre laboratoire, nous disposons également d'un anticorps anti-F (AL15H6) et d'un anti-G (AL20F12) qui permettent de classer les souches de BRSV en deux sous-groupes antigéniques et un sous-groupe intermédiaire.

Dans la littérature, les bases génétiques de cette hétérogénéité au niveau du BRSV n'ont pas encore été décrites. Au laboratoire, une étude sur le gène G de diverses souches de BRSV est en cours (Prozzi, 1994). Des résultats partiels peuvent être mis en corrélation avec les données antigéniques.

Chez le HRSV, la protéine SH est la protéine qui possède la plus grande variabilité hormis la protéine G. Collins et al.(1990), ont confirmé, par l'étude de la protéine SH, le classement de souches de HRSV en deux sous-groupes. Le BRSV étant très analogue au HRSV, nous nous proposons d'étudier la protéine SH pour confirmer les données génétiques accumulées à ce jour sur la protéine G.

Dès lors, le premier objectif du travail consiste à séquencer le gène codant pour la protéine SH de la souche RB-94 (souche pour laquelle on possède une banque de cDNA).

Tout d'abord, le séquençage du gène SH nous permettra d'avoir une meilleure connaissance des protéines SH de BRSV du fait qu'il n'existait qu'une seule séquence disponible au début de ce travail.

Ensuite, les comparaisons de séquences de gènes SH de BRSV et HRSV consisteront en un premier pas dans l'évaluation de l'hétérogénéité de SH.

Enfin, l'obtention de la séquence permettrait de réaliser des recombinants qui expriment la protéine. Ces recombinants pourront servir pour la production d'anticorps monoclonaux qui seraient utilisés pour des études de fonctions et de localisations.

MATERIEL ET METHODES

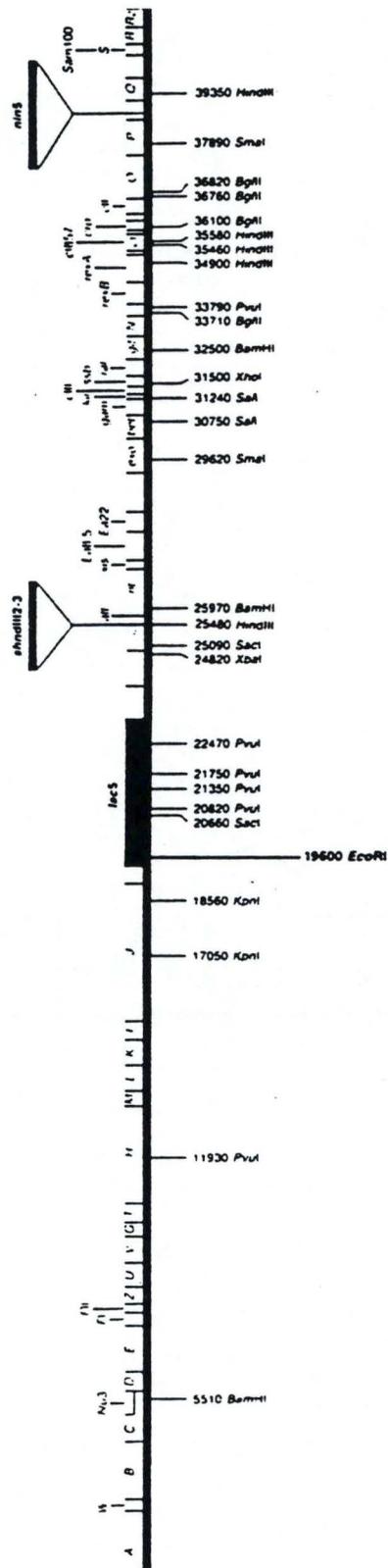


Figure 1: Carte génétique du phage lambda gt11 (Young & Davis, 1983).

MATERIEL ET METHODES

Criblage d'une banque de cDNA

1.) Phage, souche virale et bactérienne

1.1 Souche virale

La souche virale utilisée pour la réalisation de la banque de cDNA est la souche bovine RB-94, souche européenne que le docteur G. Wellemans de l'I.N.R.V. nous a aimablement fournie.

1.2 Phage

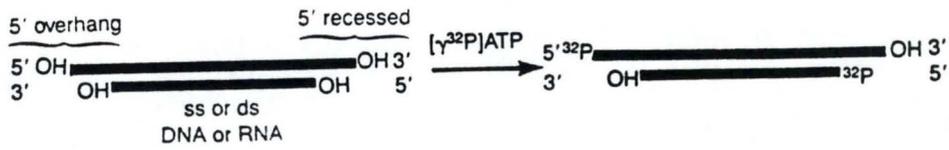
Le phage lambda gt11 (Stratagene) fut utilisé lors de la construction de la banque de cDNA (Walravens et al., 1990). Les détails concernant sa réalisation seront abordés dans le chapitre des résultats. La taille totale de son génome est de 43.7 kb. Il possède un site d'insertion *EcoRI* situé dans le gène *lac Z* (figure 1). Le phage lambda est également caractérisé par la présence du marqueur *Sam100*. Ce dernier présente une mutation "ambre"; dès lors, la lyse ne se produira qu'en présence de souches bactériennes possédant le suppresseur de tRNA "ambre" *Sup f*.

1.3 Souche bactérienne .

La souche utilisée, lors du criblage et la purification des phages recombinants, est *Escherichia coli* Y1090. Elle présente le génotype suivant :

- *Sup f* : correspond au gène codant pour le répresseur de tRNA "ambre". Il provoque l'insertion d'une tyrosine lorsqu'il se trouve devant le codon UAG .
- *hsd R* : correspond au gène qui code pour une des sous-unités de l'enzyme de restriction *Eco K* . Les souches possédant ce gène méthylent l'ADN mais ne le coupent pas .
- $\Delta(lon)$: ce gène code pour une protéase ATP - dépendante. Y1090 est une souche qui ne présente pas d'activité pour cette enzyme .
- $\Delta(lac)$: Les souches présentant ce génotype ne possèdent pas d'activité lactose .
- *Tn10* : est un transposon qui contient le gène codant pour la résistance à la tétracycline .

Il est important de remarquer que la présence de *Sup f* permettra la suppression de *Sam 100* au niveau du phage, permettant de ce fait la lyse .



Example:

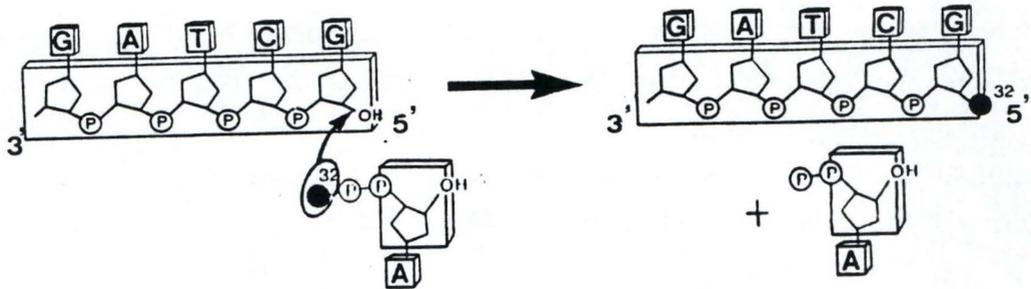


Figure 2: Schéma d'une réaction de marquage au ^{32}P d'un oligonucléotide par la polynucléotide kinase du phage T4 (Richardson, 1981).

2.) Milieu de culture lambda broth et top agar

2.1 Milieu liquide

Tryptone..... 10 g/l.

NaCl 5 g/l.

Porter à un litre avec de l'eau distillée et autoclaver 20 min à 120°C .

2.2 Milieu solide

Tryptone..... 10 g/l.

NaCl 5 g/l.

Agar..... 16 g/l.

Porter à un litre au moyen d'eau distillée et autoclaver 20 min à 120°C .

2.3 Top agar

Tryptone..... 10 g/l;

NaCl 5g/l.

Agar..... 6,4 g/l.

Porter à un litre au moyen d'eau distillée et autoclaver 20 min à 120°C.

3) Criblage et purification d'une banque de cDNA au moyen d'une sonde oligonucléotidique

3.1 Marquage de la sonde (figure 2)

Mélange de réaction .

- 125 pmoles d'oligonucléotide
- 30 pmoles d' ATP marqué au ^{32}P (Amersham)..... 15 μl .
- Tampon de kination (Boehringer) 5 x concentré..... 10 μl .
- T4 Polynucléotide Kinase (Boehringer)..... 2 μl .
- Porter à 50 μl avec de l'eau distillée
- Incuber 1 heure à 37°C .
- Séparer l'oligonucléotide marqué de l'ATP ^{32}P sur une colonne de Séphadex G25, suivre la migration de la radioactivité au moyen d'un compteur Geiger .
- Récupérer les fractions du premier pic en Eppendorf .
- On distingue les Eppendorfs contenant la sonde en mesurant la radioactivité au moyen du compteur Geiger .
- Conserver à -20°C .

3.2 Etalement de la banque .

Solution :

Composition du tampon SM .

- Tris-Cl 1M, pH 7,5 50 ml.
- NaCl..... 5,8 g/l.
- MgSO₄.7 H₂O 2 g/l.
- Gélatine 2% 5 ml .

Porter à 1 litre au moyen d'eau bidistillée.

Méthode :

- Préparer une culture de bactéries Y1090 dans 25 ml de milieu lambda broth, à laquelle on ajoute 250 µl de MgSO₄ 10 mM et 250 µl de maltose 20% (le maltose favorise l'expression des récepteurs, nécessaires pour la pénétration du phage). Les ions Mg²⁺ facilitent la pénétration du phage. Incuber une nuit à 37°C .
- On prélève 1 ml de la culture de Y1090 à laquelle on ajoute 1 ml de phage de la banque, dilués dans du SM de façon à obtenir environ 50000 plages de lyse sur une boîte de Pétri de 20 cm x 20 cm .
- Incuber 20 min à 37°C .
- Ajouter 40 ml du top agar, se trouvant dans un bain à 60°C, au mélange de phages et de bactéries .
- Verser rapidement le mélange sur des boîtes de Pétri contenant du milieu lambda broth solide. Incuber, boîtes retournées, à 37° C durant une nuit .

3.3 Criblage

Solution :

Composition du tampon SSC 20 x concentré

- Citrate de sodium..... 88.2 g .
- NaCl..... 175 . 3 g.
- Porter à 1 litre au moyen d'eau distillée .

Méthode :

- Déposer une membrane de Nylon (Hybond-N, Amersham) sur les boîtes et laisser l'ADN s'adsorber durant 5 min. Il est important de faire des repères sur les membranes et sur les boîtes .
- La membrane est ensuite transférée sur du papier Whatman imprégné de NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M, durant 5 minutes, afin de dénaturer l'ADN .

- On neutralise en déposant la membrane sur un Whatman imbibé de Tris-Cl 0.5 M pH 7, NaCl 3 M, pendant 5 minutes .
- Transférer la membrane sur un Whatman imprégné de 20 x SSC pendant 5 minutes, pour conditionner la membrane .

Préhybridation

Solution :

Composition de la solution de Denhardt 50 x concentrée :

- Ficoll 5 g .
- Polyvinyle pyrrolidone 5 g.
- Albumine Sérique Bovine..... 5 g .
- Porter le volume à 500 ml à l'aide d'eau distillée.

Composition de la solution d'hybridation :

- Tampon 20 x SSC 15 ml .
- Solution de Denhardt 50 x 10 ml .
- ADN de sperme de hareng dénaturé..... 1.6 ml .
- SDS 10 % 0.5 ml.
- Amener à 50 ml avec de l'eau déminéralisée .

Méthode :

- Incuber la membrane, préalablement séchée 2 heures à 80°C, dans un Hybritube (GIBCO) contenant 13 ml de solution d'hybridation durant 3 heures, à la température d'hybridation calculée en fonction de la séquence (voir résultats).

Hybridation

- Dénaturer la sonde 10 min à 100°C
- Changer la solution d'hybridation de l'hybritube et ajouter la sonde à raison de 10 ng/ml.
- Incuber une nuit à la température d'hybridation de la sonde .

Lavage

Les membranes vont être lavées afin d'éliminer le matériel radioactif adsorbé de manière non spécifique .

Méthode :

- Laver 2 x 5 min dans une solution 2 x SSC , 0.1% SDS .
- Laver 2 x 5 min dans une solution 0.2 x SSC , 0.1% SDS .
- Laver 2 x 5 min dans une solution 0.1 x SSC , 0.1% SDS .

En diminuant la concentration en sel, on augmente la stringence de l'hybridation .

- Une fois séchées, les membranes sont placées en autoradiographie durant 16 heures (Film Kodak X-ARS) .
- Retirer le film de la cassette, plonger le dans un bain révélateur (Kodak) pendant 5 min, rincer à l'eau puis passer le film révélé dans un bain de fixateur durant 10 min.
- Rincer abondamment le film avec de l'eau et sécher.

3.4 Récupération des phages recombinants .

- Les plages de lyse qui se sont révélées positives, sont récupérées au moyen d'une spatule stérilisée .
- Les phages sont conservés à 4°C dans une solution contenant 1ml de SM et 100 µl de chloroforme, afin d'empêcher le développement bactérien .

3.5 Purification de la banque .

Les phages sont dilués 100 fois et 1000 fois. Le protocole de purification est le même que celui décrit pour l'étalement de la banque, excepté le fait que l'on travaille avec des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre .

Méthode :

- Prélever 300 µl de bactéries auxquelles on ajoute 100 µl de la dilution de phage .
- Incuber 20 min à 37°C .
- Ajouter le top agar encore liquide et déposer le tout sur le milieu solide en boîte de Pétri

Ce processus de purification est répété jusqu'au moment où toutes les plages de lyse de la boîte de Petri se révèlent être positives en autoradiographie .

3.5 Analyse des inserts contenus dans les recombinants positifs .

3.5.1. Midipréparation d'ADN de phage.

Solution :

Composition du tampon TE ; pH 8

- TRIS 10 mM
- EDTA; pH 8 1 mM.

Composition de la solution de phénol/chloroforme

- Phénol..... 50 ml.
- Chloroforme..... 50 ml.
- Alcool isoamylique 2 ml.

Saturer avec 100 ml de TE, pH 8, centrifuger 5 minutes à 4500 RPM, éliminer le TE et recommencer deux fois (ne pas éliminer le dernier volume de TE).

Conserver à 4°C à l'abri de la lumière .

Méthode :

- Préparer une culture de 50 ml de Y1090 en milieu Lambda broth à laquelle on ajoute 250 µl de MgSO₄ 10 mM et 250 µl de maltose 20%. Incuber une nuit à 37°C .
- La mesure de la densité optique à 600 nm nous permet de connaître le nombre de bactéries par ml .
- Prélever 10¹⁰ bactéries et centrifuger à 6000 RPM (rotor SS34 , Sorvall) pendant 10min.
- Resuspendre le culot dans 1,5 ml de SM .
- Infecter pendant 30 min à 37°C avec le phage à raison d'un indice d'infectivité égal à 1/200 (un phage pour 200 bactéries) .
- Préchauffer 200 ml de milieu lambda broth avec du MgSO₄ 10 mM et du maltose 20% à 37°C.
- Ajouter les bactéries infectées à ce milieu et agiter vigoureusement à 37°C durant 5 à 6 heures .
- Ajouter 500 µl de chloroforme et laisser 30 min à 4°C (afin de provoquer la lyse complète) .
- Ajouter de la RNase A et de la DNase I, chacune à un concentration finale de 10 µg/ml. Incuber 30 min à 37°C.
- Centrifuger à 8000 RPM (rotor SS34 , Sorvall) durant 15 min afin d'éliminer les débris cellulaires .
- Récupérer le surnageant et ajouter 1/3 volume de polyéthylène glycol 8000 30%, NaCl 1.5 M. Incuber la nuit à 4°C pour permettre la précipitation des phages .
- Centrifuger à 5000 RPM (rotor SS34 , Sorvall) durant 10 min.
- Resuspendre le culot dans 15 ml de SM.
- Centrifuger à 8000 RPM (rotor SS34 , Sorvall) durant 10 min.
- Le surnageant est ultracentrifuger à 30000RPM durant 1 heure (rotor TI 60, Beckman) .
- Le culot est resuspendu délicatement, à 4°C durant une nuit, dans 3 ml de SM.
- Pour isoler l'ADN on réalise une extraction au phénol/chloroforme.

Principe:

- Ajouter un volume de phénol/chloroforme.

- Centrifuger durant 10 min à 5000 RPM.
 - Prélever la phase supérieure et recommencer jusqu'à une totale disparition des protéines se trouvant à l'interface .
 - L'ADN est précipiter par addition d'1/10 volume de NaAc 3M; pH 7 et de 2,5 volume d'éthanol absolu .
 - Laisser 30 min à - 80°C.
 - Centrifuger à 13000 RPM durant 20 min et éliminer le surnageant .
 - Le culot est lavé au moyen d'éthanol 70%.
 - Centrifuger à 13000 RPM durant 10 min, éliminer le surnageant et sécher le culot sous vide .
 - Le culot est ensuite resuspendu dans 100 µl d'eau bidistillée .
- On prélève 2µl de cette préparation que l'on charge sur un gel d'agarose afin de vérifier et quantifier l'ADN ainsi récupéré .

3.5.2. Electrophorèse en gel d'agarose.

Principe :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode qui permet de séparer, isoler et identifier des fragments d'ADN ou d'ARN. La mise sous tension provoque la migration des acides nucléiques vers l'anode. Cette migration est fonction de plusieurs facteurs :

- Les fragments migrent d'autant plus vite que leur taille est petite
- Des pourcentages d'agarose élevés ralentissent la migration .
- Une augmentation de voltage accélère la vitesse de migration .
- La force ionique du tampon .

Solution:

Tampon TBE (1x concentré):

- Tris-HCl10.8 g/l.
- Acide Borique5 g/l.
- EDTA0.93 g/l (ou EDTA 0.5 M: 4ml)

Solution d'alourdisseur (pour 10 ml).

- Bleu de bromophénol.....25mg.
- Glycérol5ml.
- EDTA 1 M.....0.5 ml .

Porter le volume à 10 ml au moyen d'eau distillée .

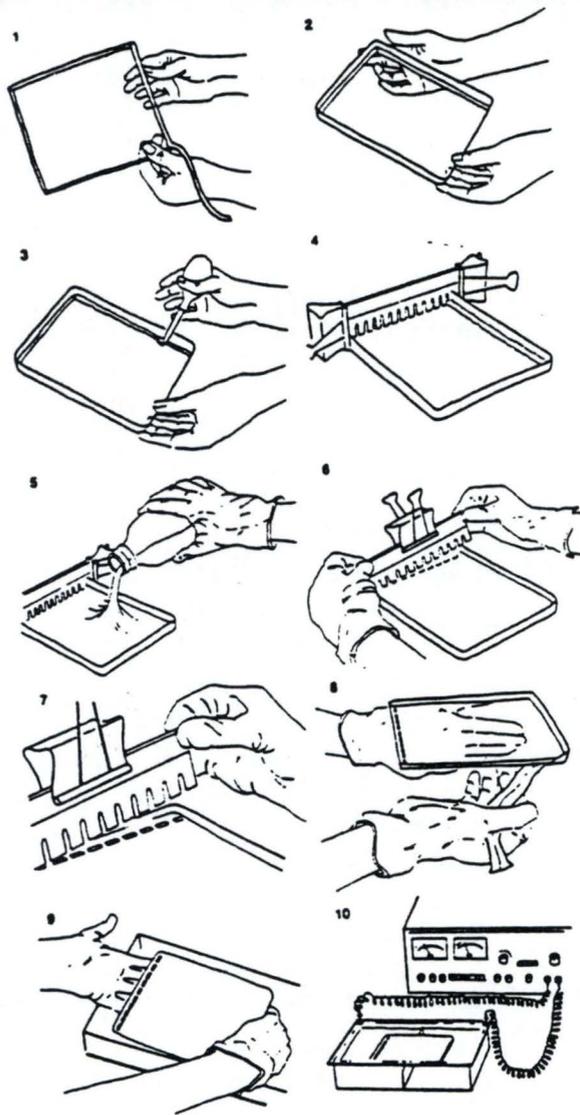


Figure 3: Coulage d'un gel d'agarose

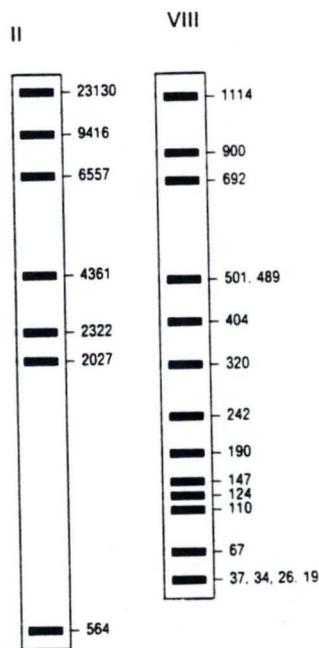


Figure 4: Taille (en paires de bases) des fragments d'ADN contenus dans les marqueurs de tailles n°II et n°VIII.

Méthode:

Préparation des échantillons.

- Resuspendre l'ADN dans un volume désiré d'eau distillée.
- Ajouter 1/10 volume final de solution d'alourdisseur
- Déposer de 10 à 20 μ l de ce mélange sur le gel .

Préparation du gel (Figure 3).

- Dissoudre le nombre de grammes désiré d'agarose dans du tampon TBE. Chauffer jusqu'à l'obtention d'une solution limpide .
- Laisser refroidir à 65°C et couler le gel dans le moule.
- Ajouter une goutte de bromure d'éthidium 0.5 mg/ml et mélanger en évitant la formation de bulles .
- Placer le peigne et laisser solidifier .
- Charger le gel avec les échantillons .
- Placer le gel et son support dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon TBE .
- Appliquer un voltage de 80 volts et laisser migrer .

Le gel est ensuite placé sous illumination UV pour visualiser l'ADN .

Standards de taille (figure 4).

L'utilisation de ces standards permet d'estimer la taille des fragments d'ADN ainsi que leur quantité, en comparant sa fluorescence avec celle du témoin (dont on connaît la quantité qui a été mise sur gel).

Les marqueurs utilisés au laboratoire sont

- Marqueur n°II de Boehringer Manheim : ADN de phage lambda digéré par *Hind* III. (23130 pb , 9416 , 6557 , 4361 , 2322 , 2027 et 564) .
- Marqueur n°VIII de Boehringer Manheim : ADN du pUCBM21 digéré par *Hpa* II et ADN du pUCBM21 digéré par *Dra* I et *Hind* III (1114 pb , 900 , 692 , 501 , 489 , 404 , 320 , 242 , 190 , 147 , 124 , 110 , 67 , (37 , 34 , 26 , et 19 ne forment qu'une seule bande)) .

3.5.3. Réaction de restriction

Pour isoler l'insert contenu dans l'ADN de λ gt 11 on réalise une restriction au moyen de l'enzyme *Eco*RI (Boehringer)(enzyme qui a été utilisée lors de la réalisation de la banque).

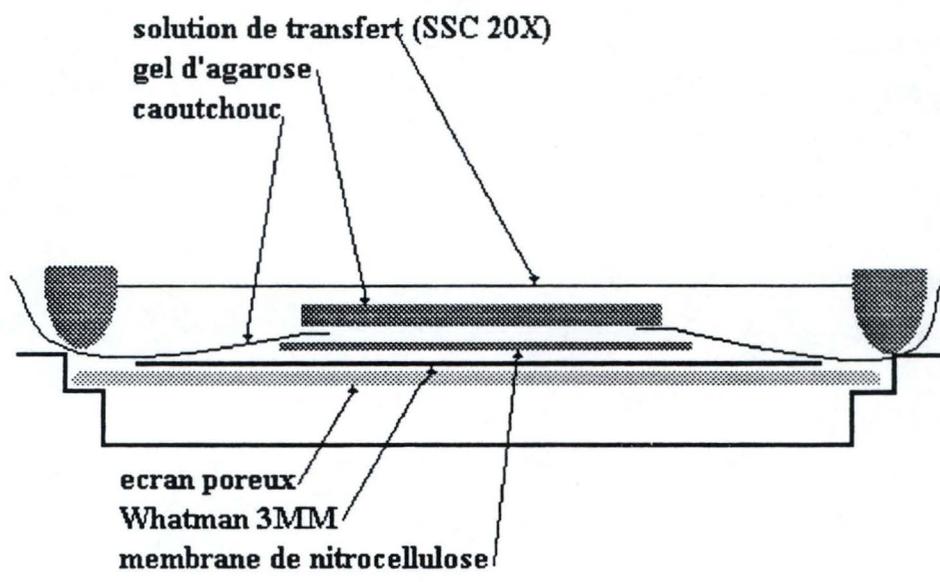


Figure 5: Représentation schématique du montage requis pour la réalisation d'un southern blot

Méthode:

Mélange de réaction :

- ADN à restreindre.
- Tampon de restriction 10x , spécifique de l'enzyme utilisée .
- Enzyme de restriction : entre 5 et 10 unités d'enzyme par μg d'ADN.
- Ajouter de l'eau stérile pour atteindre le volume final.
- Incuber deux heures à la température adéquate pour l'enzyme .
- Stocker les échantillons restreints à -20°C .

3.5.4.Southern blot

Principe:

Pour réaliser le southern nous avons utilisé l'HYBAID (Biozym).

Cet appareil va permettre de transférer l'ADN se trouvant au niveau du gel d'agarose sur la membrane de nitrocellulose par aspiration .

Le montage réalisé est représenté sur la figure 5 .

Méthode:

- Dépurifier l'ADN en plaçant le gel dans le bain suivant:
 - HCl 0,25 M 2X15 min.
- Dénaturer l'ADN en plaçant le gel dans le bain suivant:
 - NaOH 0,5 M et NaCl 1,5 M 2X15 min.
- La neutralisation se fait en déposant le gel dans un bain de:
 - NaCl 1,5 M et Tris-Cl 0,5 M pH 7,4 3 X 10 min.
- Laver ensuite le gel en le plaçant dans du 20 X SSC .
- Effectuer le transfert durant 1 heure .
- Rincer la membrane dans du 2 X SSC.
- Sécher la membrane entre 2 Whatman.
- Les réactions de préhybridation, d'hybridation et d'autoradiographie réalisées ensuite sont identiques à celles décrites précédemment pour le criblage de la banque de phages .

3.5.5. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose par la méthode des papiers (Dretzen, 1981).

Cette méthode va nous permettre de récupérer l'insert contenu dans l'ADN du phage $\lambda\text{gt}11$

Solution:

- Solution d'élution.

Tris 20 mM ; pH 7,5

EDTA 1 mM.

NaCl 1 mM.

Méthode:

- Préparer des bouts de papier DEAE cellulose Whatman DE81 d'environ 1 cm² et les faire tremper 2-3 heures dans une solution de NaCl 2,5 M . Laver ensuite 3x à l'eau stérile avant de les stocker dans une solution d'EDTA 1 mM à 4°C.

- L'électrophorèse ayant séparé les fragments d'ADN, le gel est incisé devant la bande à récupérer (coté électrode positive) et si nécessaire derrière cette bande pour empêcher une contamination par des fragments de plus grande taille. Introduire dans l'incision le papier Whatman. Replacer le gel dans la cuve en vérifiant que le gel reste bien fermé et poursuivre l'électrophorèse jusqu'à ce que l'ADN à récupérer soit entré dans le papier (vérifier la fluorescence des papiers au U.V.).

- Le papier est prélevé avec une pince, rincé à l'eau froide, séché sur papier Whatman et placé dans un Eppendorf (1). Ajouter au tube (1) 500µl de tampon d'élution. Le papier est défait par agitation manuelle et incubé 2 heures à 37°C avec agitation intermittente .

- Percer ensuite le fond du tube (1) avec une épingle chauffée et le placer sur un second Eppendorf (2).

- Centrifuger les deux tubes dans cette disposition 5 min à 13000 RPM. La solution contenant l'ADN passe ainsi dans le tube (2) alors que le papier reste dans le tube (1).

- Ajouter 1 ml de butanol saturé en eau dans le tube (2) et centrifuger 2 min à 13000 RPM puis éliminer la phase supérieure (le butanol permet d'extraire le bromure d'éthidium).

- L'ADN est précipité en ajoutant 1 ml d'éthanol absolu froid (- 20°C) et en le plaçant 15 min à - 80°C .

- Centrifuger ensuite 20 min à 4°C à 13000 RPM. Eliminer le surnageant, sécher sous vide et resuspendre dans 10µl d'eau stérile .

- Mettre 1/10 sur gel pour contrôler la présence et la pureté de l'ADN extrait.

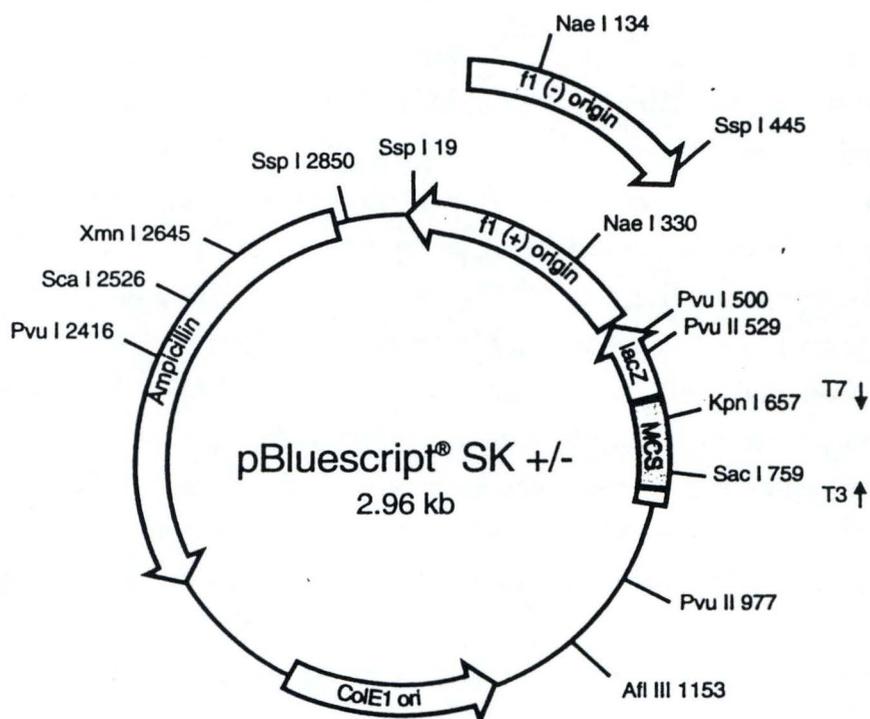


Figure 6: Carte du phagemide pBluescript SK (d'après stratagène)

4) Sous-clonage de l'insert contenant gène codant pour la protéine SH

4.1 Plasmide utilisé

Le plasmide pBluescript fut utilisé pour le sous-clonage de l'insert récupéré. Il s'agit d'un plasmide de 2958 pb dérivé du vecteur pUC19. Il est lui aussi commercialisé par la firme Stratagene.

Il se présente sous deux formes suivant l'orientation du polylinker par rapport à la transcription du gène *Lac Z*. Celles-ci sont dénommées KS (dans ce cas, la transcription va du site de restriction *Kpn I* vers *Sac I*) ou SK (La transcription se déroule depuis *Sac I* vers *Kpn I*). Nous avons utilisé la forme SK⁺ (le symbole ⁺ indique l'orientation de l'origine F1 lors de l'utilisation du phagemide en collaboration avec un phage *helper*)(figure 6).

Le MCS (site multiple de clonage) se trouve inséré entre le gène *Lac I* et une portion du gène *Lac Z*. Ce dernier procure une α -complémentation pour la sélection blanc/bleu de plasmides recombinants. La bactérie hôte doit bien sûr posséder le gène complémentaire pour mettre en oeuvre cette sélection (XL1-blue est un souche bactérienne de ce type).

Le plasmide contient également le gène de résistance à l'ampicilline, ce qui représente une autre méthode de sélection des colonies contenant le plasmide. Enfin, pBluescript contient une origine de répllication ColE1 afin de permettre sa répllication en l'absence de phage *helper*.

4.2 Préparation du plasmide pour la ligation

La préparation de pBluescript consiste à le restreindre au moyen d'un enzyme de restriction, dont le site se trouve dans son MCS .

Méthode:

Le mélange de réaction est le suivant:

- 5 μ g d'ADN plasmidique.
- 2 μ l du tampon approprié (10X concentré).
- 5 à 10 unités d'enzyme.

Porter à 20 μ l au moyen d'eau distillée.

- Incuber 2 heures à la température optimale pour l'enzyme.
- Monter le volume à 400 μ l avec de l'eau distillée et ajouter 400 μ l de phénol/chloroforme.
- Vortexer et centrifuger 10 min à 13000 RPM.

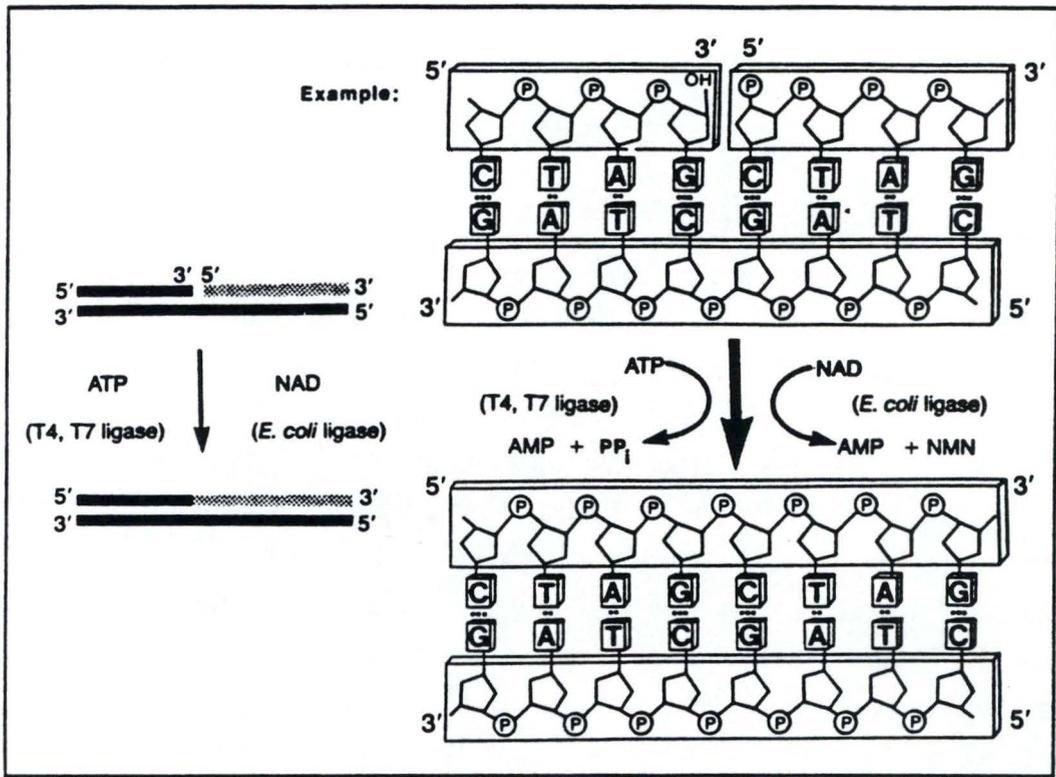


Figure 7: Schéma d'une réaction de ligation (d'après Asubel et al.,1990).

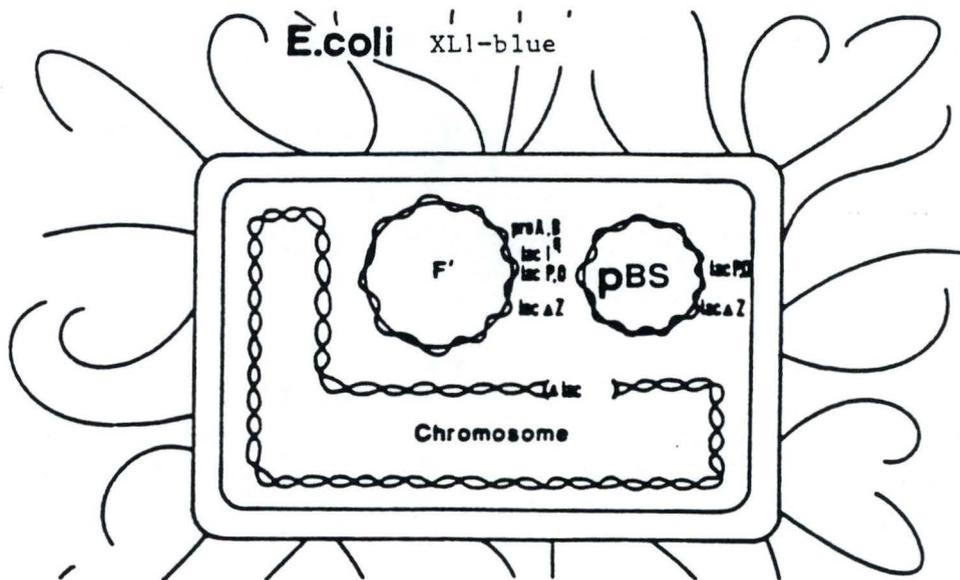


Figure 8: Représentation schématique d'une bactérie *E. coli* XL1-blue.

- Récupérer la phase aqueuse supérieure et précipiter le DNA avec 1/10 volume de NaAc 3M; pH 4,5 et 2,5 volume d'éthanol absolu glacial.
- Laisser 20 min à -80°C.
- Centrifuger 15 min à 13000 RPM.
- Eliminer le surnageant et laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70%.
- Centrifuger 10 min à 13000 RPM.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sous-vide.
- Resuspendre dans 25 µl d'eau bidistillée stérile .
- Vérifier la qualité de la restriction en plaçant 2 µl sur un gel d'agarose.

4.3 Ligation d'un insert dans un plasmide.

La ligation de molécules d'ADN est réalisée grâce à l'activité de l'enzyme ADN ligase du phage T4 (T4 DNA ligase)(figure 7). Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiester entre le phosphate 5' d'une molécule d'ADN et une extrémité hydroxyle 3'. L'enzyme requiert de l'ATP et des cations Mg^{++} pour être active.

Méthode:

La réaction se réalise classiquement comme suit:

- 1U de T4 DNA ligase (Boehringer) 1 µl.

(Une unité de T4 DNA ligase est suffisante pour liguer 5 µg d'ADN)

- tampon de ligation 10X concentré (Boehringer) 2 µl.

- Solution contenant l'ADN plasmidique et l'insert.....19 µl.

(La ligation s'effectue avec une molécule de plasmide pour deux d'insert afin d'augmenter la probabilité d'insertion).

- Incuber une nuit à 14°C .

4.4 Transformation bactérienne.

Souche bactérienne :

La souche utilisée lors de transformation est la souche *Escherichia coli* XL1 blue (figure 8) commercialisée par la firme Stratagene; elle contient l'épisome F'. Son génotype est le suivant :

- *rec A1*: réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre l'ADN exogène et endogène.
- *end A1*: améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléase .
- La souche XL1 blue délétée au niveau de l'opéron lactose, est incapable de métaboliser le lactose (lac^-).

L'épisome F' codant pour des pili sexuels présents en surface de la bactérie porte les caractères suivants :

- *lacI^q ZΔM15*: permet la sélection des colonies contenant un plasmide recombinant par un test coloré bleu-blanc:

- *lacI^q*: mutation augmentant d'environ dix fois la force du promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose.

- *ZΔM15*: gène de la β-galactosidase délété dans sa partie N-terminale et produisant une protéine inactive. Ce fragment du gène *lac Z* donne, par complémentation intragénique avec un plasmide portant un autre fragment du gène *lac Z* (*lac Z'*), une coloration bleue à une colonie en présence du chromogène X-gal. Si au niveau du plasmide, le fragment *lac Z'* est disrupté (plasmide recombinant), la colonie sera blanche en présence de X-gal.

Milieu de culture:

- Milieu LB liquide :

Tryptone (Oxoïd)..... 10 g/l.

NaCl 5 g/l.

Yeast Extract (Oxoïd) 5 g/l.

Porter à volume avec de l'eau distillée.

Autoclavage (20 min, 120°C).

- Milieu LB solide :

De même composition que le LB liquide, ce milieu contient 1,6% d'Agar (Oxoïd). Ce milieu autoclavé et refroidi à 55°C est coulé dans des boîtes de Pétri.

Principe :

La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène (plasmide) dans un micro-organisme. Pour ce faire la membrane bactérienne doit devenir perméable (la bactérie est alors dite compétente).

Escherichia coli peut être rendue compétente par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium. Ces ions vont déstabiliser la paroi et la membrane de la bactérie. Un choc thermique permet l'entrée de l'ADN dans la bactérie.

Les bactéries ainsi transformées doivent être incubées 1 heure à 37°C dans un milieu riche afin de permettre la régénération de la paroi et l'expression des gènes plasmidiques (entre autre les gènes de résistance qui vont permettre la sélection des transformants).

Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu sélectif où seules les bactéries transformées pourront croître .

4.4.1 Préparation de cellules XL1blue compétentes.

Méthode:

- Cultiver la souche sur un milieu LB solide + tétracycline 12,5 µg/ml afin de sélectionner les bactéries possédant l'épisome F'.
- Prélever une colonie pour ensemercer un milieu liquide contenant 10 ml de LB + 12,5 µg/ml de tétracycline. Incuber cette culture 4 à 8 heures à 37°C .
- Cette préculture sert à ensemercer 100 ml de LB + 12,5 µg/ml de tétracycline .
- Agiter fortement la culture pendant 1 à 4 heures à 37°C jusqu'à une absorbance à 550 nm de 0.3 (phase de croissance logarithmique).
- La culture est arrêtée par un passage de 10 min sur glace.
- Centrifuger la culture 5 min à 4000 RPM et à 4°C (rotor SS43 , Sorvall).
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl₂ 50 mM équivalent à la moitié du volume initial (dans ce cas ci 50 ml) . Répéter cette étape une seconde fois.
- Centrifuger 5 min. à 4000 RPM et à 4°C .
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans un volume de CaCl₂ 50 mM 15% glycérol équivalent au dixième du volume initial.
- Aliquoter la suspension de cellules compétentes dans des Eppendorfs stériles et stocker à - 80°C.

4.4.2. Transformation de cellules XL1 blue compétentes

Méthode:

- A 100 µl de cellules compétentes (dégelées sur glace), ajouter le mélange de ligation.
- Incuber 30 min sur glace puis 3 min à 42°C (choc thermique).
- Ajouter 1 ml de LB et incuber 30 à 60 min à 37°C (régénération).
- Etaler sur boîte avec un milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.

Contrôles:

- Contrôle négatif : Des cellules compétentes subissant la transformation sans ADN exogène, sont étalées afin de montrer la validité du milieu sélectif et la proportion de mutants spontanés résistants à l'antibiotique .
- Contrôle positif : On réalise une transformation avec une quantité connue de plasmide afin de contrôler le taux de transformation .
- Contrôle de restriction : On réalise une transformation avec une quantité connue du plasmide restreint non ligué afin de connaître la proportion de vecteur non restreint.

4.5 Minipréparation d'ADN plasmidique

Solution :

Tampon P1:

- RNAse 400 µg/ml.
- Tris HCl pH 8 50 mM.
- EDTA 10 mM.

Tampon P2:

- NaOH 200 mM.
- SDS 1%.

Tampon P3

Préparation de KOAc pH 5 ; 3M.

- KOAc ; 5M 60 ml.
- Acide acétique glacial 11,5 ml.
- Eau distillée 28,5 ml.

Principe:

- Un milieu LB + ampicilline (100 µg/ml) (ou autre antibiotique sélectif) est inoculé avec une colonie de bactéries transformantes. Incuber une nuit à 37°C avec agitation en bouteilles universelles.
 - Prélever 1.5 ml de culture dans un Eppendorf et centrifuger 5 min à 13000 RPM.
 - Eliminer le milieu et resuspendre le culot de bactéries dans 300 µl de tampon P1-RNAase.
 - Ajouter 300 µl de tampon P2 (lyse alcaline) et mélanger délicatement. Incuber 5 min à température ambiante .
 - Ajouter 300 µl de tampon P3 (précipitation des protéines et des débris cellulaires). Incuber 10 min sur glace .
 - Centrifuger à 13000 RPM durant 15 min
 - Récupérer le surnageant et y ajouter 0,7 volume d'isopropanol et laisser 20 min à température ambiante (précipitation de l'ADN plasmidique).
 - Centrifuger à 13000 RPM durant 15 min.
 - Eliminer prudemment le surnageant. Ajouter 1 ml d'éthanol 70% (lavage de l'ADN plasmidique).
 - Centrifuger 10 min à 13000 RPM .
 - Eliminer le surnageant très délicatement et sécher sous vide.
 - Resuspendre dans de l'eau bidistillée .
- Cette méthode permet de récupérer 1 à 5 µg d'ADN plasmidique .

4.6. Midipréparation d'ADN plasmidique

Cette technique est requise si l'on veut obtenir du matériel en grande quantité. Elle utilise le principe d'une chromatographie d'échange d'ions (anions) qui fixe spécifiquement l'ADN et laisse éluer les protéines et l'ARN.

Ces colonnes existent en deux taille ; dans notre cas, nous avons utilisé les colonnes AX 100 (QIAGEN).

Solution:

Les tampons P1, P2 et P3 utilisés lors de la midipréparation d'ADN ont la même composition que ceux utilisés pour la minipréparation d'ADN plasmidique.

Composition du tampon d'équilibration de la colonne (N2).

- NaCl..... 750 mM.
- MOPS 50 mM.
- Ethanol..... 15%.
- Triton X100..... 0,15%.

Le tampon est mis à pH 7.

Composition du tampon de lavage (N3).

- NaCl..... 1 M.
- MOPS 50 mM.
- Ethanol..... 15%.

Le tampon est mis à pH 7.

Composition du tampon d'élution (N5).

- NaCl..... 1,25 M
- Tris-Cl..... 50 mM.
- Ethanol..... 15%.

Méthode :

- Réaliser une culture bactérienne dans 50 ml de milieu LB + 100 µg/ml d'ampicilline.

Incuber une nuit à 37°C.

- Centrifuger 15 min à 4000 RPM .
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de tampon P1.
- Ajouter de suite 4 ml de tampon P2, mélanger doucement et incuber 5 min à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de tampon de lyse P3, mélanger avec douceur et incuber 10 min sur glace.
- Centrifuger 40 min à 12000 RPM, 4°C.
- Equilibrer la colonne Qiagen AX 100 avec 2 ml de tampon N2 .

- Déposer le surnageant (vérifier qu'il est clair) sur la colonne. Laisser couler.
- Laver la colonne avec 2X4 ml de tampon N3.
- Eluer l'ADN avec 2 ml de N5. Récupérer les fractions éluées en Eppendorfs (environ 600 µl par Eppendorfs).
- Précipiter l'ADN avec 0,7 volume d'isopropanol .
- Centrifuger 20 min à 13000 RPM.
- Eliminer le surnageant et laver le culot d'ADN avec 1 ml d'éthanol 70%.
- Centrifuger 10 min à 13000 RPM.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot sous vide.
- Resuspendre dans 25 µl d'eau distillée .
- La pureté de l'ADN obtenu est vérifiée en plaçant un échantillon sur un gel d'agarose .

Le matériel ainsi obtenu peut alors être utilisé pour le séquençage.

5) Réaction de séquençage .

Principe:

La méthode de séquençage que nous avons utilisée lors de ce travail a été mise au point par Sanger (1971).

Une molécule d'ADN bicaténaire est dénaturée. Un des deux brins (brin "template" ou matrice) est hybridé à un oligonucléotide de synthèse ("primer" ou amorce). Celui-ci est en fait complémentaire d'une courte portion du brin à séquencer et est utilisé comme amorce pour l'ADN polymérase .

L'ADN polymérase commence la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire au "template" à partir du "primer" et ce dans un mélange comprenant les quatre désoxynucléotides (A,C,G,T) dont un est radioactif (désoxyadénosine 5' - α - ^{35}S - triphosphates; Amersham) et un des quatre didéoxynucléotides.

Lorsque l'ADN polymérase incorpore un didéoxynucléotide, elle s'arrête et bloque ainsi la synthèse; en effet, le didéoxyribonucléotide ne possédant pas d'hydroxyle en 3', ne peut former une liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant .

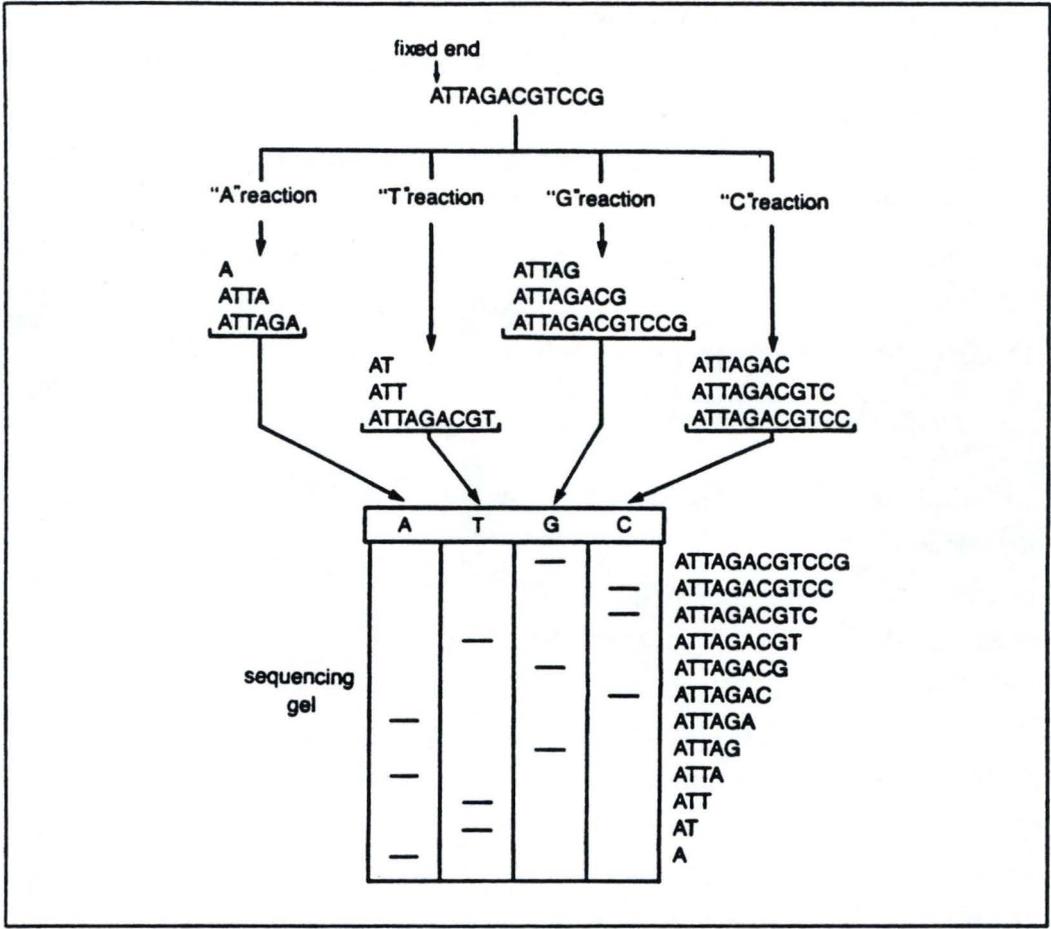


Figure 9: Stratégie général de séquençage d'ADN (d'après Asubel et al.,1990).

Quatre mélanges de polymérisation sont donc utilisés :

Mélange réactionnel	A	C	G	T
désoxyribonucléotides présents	dATP*	dATP*	dATP*	dATP*
	dCTP	dCTP	dCTP	dCTP
	dGTP	dGTP	dGTP	dGTP
	dTTP	dTTP	dTTP	dTTP
didésoxy. présents	ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP

* marqué au ^{35}S .

Dans chaque mélange, les proportions des constituants sont telles que statistiquement, on obtiendra l'arrêt prématuré de la synthèse d'au moins une molécule d'ADN (marquée radioactivement) pour chaque position dans la séquence "template" comportant un nucléotide complémentaire au didésoxyribonucléotide présent .

Pour chaque mélange, on dépose sur un gel de polyacrylamide les brins radioactifs synthétisés. Ils sont ensuite séparés suivant leur taille par électrophorèse .

L'analyse de l'autoradiographie du gel séché permet de déduire la séquence d'environ 250 nucléotides en aval de la portion complémentaire de l'amorce.

Réaction de séquençage (figure 9)

Solution :

Toutes les solutions reprises ci-dessous sont comprises dans le kit de séquençage commercialisé par Pharmacia

Méthode:

a) Dénaturation

Une cassure dans la chaîne d'ADN (ou "nick") offre une extrémité 3' OH qui peut servir de point de départ à l'ADN polymérase. Pour éviter des interférences, la solution d'ADN doit être la plus pure possible .

- Mettre dans un Eppendorf : 3 à 4 μg d'ADN dans un volume de 32 μl (porter à volume avec de l'eau) et 8 μl de NaOH 2N . Laisser incuber 10 min à température ambiante .

- L'ADN dénaturé est précipité en ajoutant :

7 μl d'acétate de Na 3M pH 4,8.

4 μl d'eau distillée stérile.

120 μl d'éthanol 100% froid (-20°C).

- Mélanger et placer 20 min à -80°C .

Centrifuger 15 min à 13000 RPM à 4°C et éliminer le surnageant.

- Laver le culot à l'éthanol 70% puis sécher sous vide (ne pas resuspendre le culot cela entraînerait la réhybridation des brins d'ADN).

b) Hybridation

Cette étape permet l'hybridation du "primer" sur le brin "template".

- Resuspendre le culot séché dans 10 µl d'eau stérile et ajouter rapidement 2 µl de primer (5 à 10 pmoles) et 2 µl d'Annealing Buffer.
- Vortexer, centrifuger et incuber 5 min à 65°C.
- Incuber à 37°C durant 10 min.
- Laisser 5 min à température ambiante .

c) Marquage (labelling)

C'est l'étape de marquage du brin néoformé. la T7 DNA polymérase commence la synthèse en présence des quatres désoxyribonucléotides, dont l'ATP marqué, permettant la formation d'un court brin marqué (le "primer" et quelques dizaines de nucléotides) .

- Ajouter au mélange d'Annealing :

"Labelling Mix"(solution de dCTP, de dGTP et de dTTP)..... 3 µl.
[α- ³⁵S] dATP 1 µl.
3 unités de T7 DNA polymérase diluée dans son tampon
de dilution (dilution 1,5 U par µl). 2 µl.

- Incuber 5 min à température ambiante .

d) Terminaison

Lors de cette étape, l'ensemble T7 DNA polymérase et brin template avec le primer allongé sont mis en présence de dNTP et de ddNTP .

Dans quatres Eppendorfs , on a 2,5 µl de :

"Short A" pour l'Eppendorf A (dNTP + ddATP).

"Short C" pour l'Eppendorf C (dNTP + ddCTP).

"Short G" pour l'Eppendorf G (dNTP + ddGTP).

"Short T" pour l'Eppendorf T (dNTP + ddTTP).

- Ces quatres Eppendorfs sont préincubés à 37°C.
- A chaque Eppendorf, ajouter 4,3 µl du mélange obtenu après labelling .
- Incuber 5 min à 37°C.
- Ajouter 5 µl de solution de "bleu stop"(arrête la réaction).
- Stocker à -20°C.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

a) Montage des plaques.

- Laver successivement les deux plaques de verre : à l'eau de ville .
à l'eau distillée.
à l'éthanol.
- Siliconer les plaques (sur la face qui sera en contact avec le gel) avec 10 ml de Repel-Silane (Pharmacia).
- Laisser sécher les plaques.
- Déposer les "spacers" sur la plus grande des deux plaques et appliquer la petite plaque sur les "spacers".
- Coller du tape à la jonction entre les deux plaques .

b) Préparation du gel.

- Dans un Berlin , ajouter à 42 g d'urée :
10 ml de TBE 10X.
15 ml d'acrylamide 30% bisacrylamide 0,8%.
45 ml d'eau distillée.
- Après dissolution de l'urée , filtrer la solution au Buchner (filtre millipore 0,45 μ m (GelmanScience)).
- Ajouter rapidement 600 μ l de persulfate d'ammonium (10%) puis 30 μ l de TEMED .
- Aspirer la solution avec une seringue de 100 ml et la couler entre les deux plaques. Serrer les deux plaques avec des pinces.

c) Migration et autoradiographie .

- Le gel est chauffé pendant 30 min. ("prerun").
- Les condition de migration sont : Puissance : 60 Watts.
Tension : 1600 Volts.

Le haut et le bas du gel baignent dans du TBE (1X).

- 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 à charger sur le gel (Eppendorf A,C,G et T) durant 2 min à 80°C pour dénaturer l'ADN .
- Déposer 4 μ l d'échantillon de chaque Eppendorf par puits (ordre standard de dépôt:A,C,G,T).
- Rebrancher la source de tension et laisser migrer l'échantillon pendant 1h30 ou plus.
- Après migration, recueillir le gel sans le plier sur une des deux plaques de verres .

- Asperger le gel d'une solution d'acide acétique 10%/méthanol 10% (fixation), laisser 10 min.
- Transférer le gel sur un papier buvard Whatman et le recouvrir d'un film plastique.
- Sécher sous vide pendant 45 min à 80°C.
- Placer le gel adhérent au buvard dans une cassette à autoradiographie avec un film autoradiographique (Fuji X-ray film) et laisser une nuit .
- Retirer le film de la cassette, plonger le dans un bain révélateur (Kodak) pendant 5 min, rincer à l'eau puis passer le film révélé dans un bain de fixateur durant 10 min.
- Rincer abondamment le film avec de l'eau et sécher.

RESULTATS ET DISCUSSION

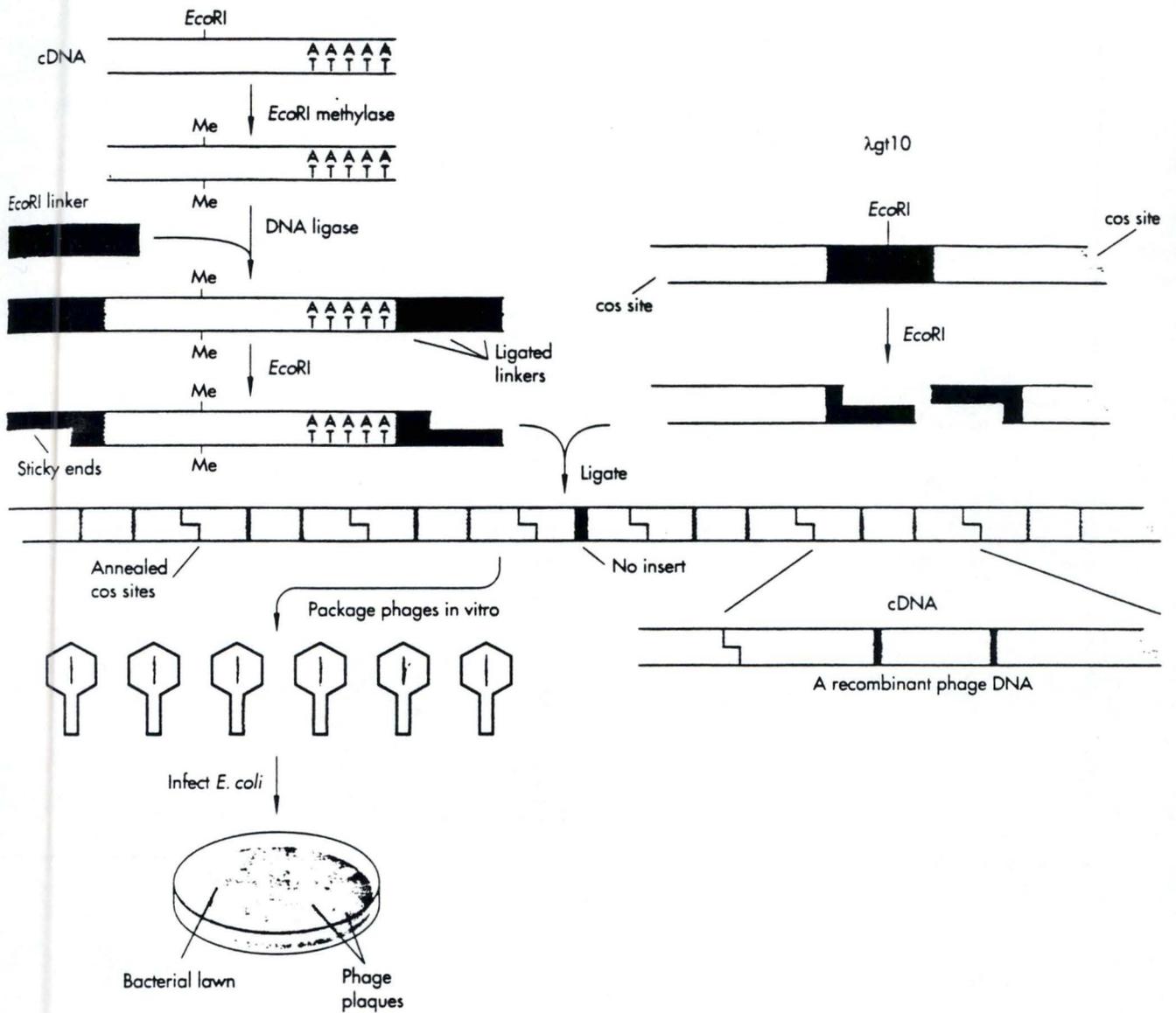


Figure 1: Clonage d'ADNc bicatenaire dans le vecteur phagien λ gt11. (d'après Watson et al., 1992).

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Construction d'une banque de cDNA

Une banque d'ADNc a été réalisée par K.Walravens (1990) de la manière suivante: l'ARN total extrait de cellules VERO infectées par la souche virale RB94 en présence d'actinomycine D (afin d'inhiber la transcription cellulaire), a été purifié sur une colonne d'oligo dT-cellulose. Ces ARN, une fois purifiés, ont été mis en présence d'oligo dT qui fournissent l'amorce nécessaire à l'activité de la *reverse transcriptase*. Cette enzyme a synthétisé le brin complémentaire (cDNA) de l'ARNm. Le brin d'ARN a ensuite été clivé au moyen de la RNAase H et le second brin d'ADN a été quant à lui synthétisé par la DNA polymérase du phage T4. L'ADNc fut inséré au niveau du site *Eco* RI du phage λ gt11. Pour ce faire il était nécessaire de méthyler les sites *Eco* RI présents dans l'ADNc afin d'éviter l'insertion d'un sous-fragment d'ADNc. Des "linkers" *Eco* RI ont été ligués aux extrémités de l'ADNc pour fournir les sites nécessaires à son insertion dans l'unique site *Eco* RI du phage comme illustré par la figure 1.

2) Criblage de la banque de cDNA

La banque de cDNA dont nous venons de décrire la construction a été criblée dans le but de cloner le gène codant pour la protéine SH de la souche RB-94.

2.1 Choix de la sonde

Nous avons choisi une sonde oligonucléotidique afin d'identifier les phages recombinants contenant le gène recherché. Cette sonde fut déduite à partir de la seule séquence de la protéine SH, de BRSV, disponible à l'époque (souche A51908 ; Samal et al., 1991).

La séquence de l'oligonucléotide est la suivante :

5'-ACAATGAACAATACATCTACCATG-3'

La séquence de l'oligonucléotide possède l'ATG du gène, les phages qui s'hybrideront avec la sonde contiendront donc, selon toute probabilité, le gène en entier, car la banque de cDNA a été réalisée à partir de l'extrémité 3' de l'ARNm. En effet, la transcription "reverse" peut faire apparaître des fragments possédant la queue de poly(A) mais dont la séquence ne représente pas l'entièreté de l'ARNm. Pour que la sonde soit spécifique et détecte le gène en entier, il est nécessaire qu'elle s'hybride à l'extrémité 5' du gène.

La température d'hybridation théorique, qui est déterminée par la proportion relative des différents nucléotides ($\{A+T\} \times 2 + \{G+C\} \times 4$), est de 64°C. L'hybridation ne s'effectuera pas à cette température mais à 55°C. Cette température est inférieure à la température théorique afin de permettre à la sonde de s'hybrider au cDNA d'intérêt même si les séquences ne sont pas identiques et elle est suffisamment élevée pour empêcher une hybridation aspécifique de la sonde. La sonde a été marquée au γ - ^{32}P et conservée à -20°C.

2.2 Criblage

2.2.1) *Etalement de la banque*

Avant d'étaler la banque, un titrage fut réalisé. Pour ce faire, nous avons infecté la souche Y1090 de *E.coli* avec différentes dilutions (dilutions de 10^{-2} à 10^{-12}) de la banque. La souche Y1090 de *E.coli* possède le gène codant pour le répresseur de tRNA "ambre" et donc permet la lyse par le phage λ gt11. Les plages de lyse obtenues sur les différentes boîtes nous renseignent sur la concentration des phages. Celle-ci est de $1,4 \times 10^6$ phages/ml.

Les phages de la banque de cDNA furent étalés à raison de 50 000 phages par boîte de Pétri de 22cm². Ce nombre de phages permet d'éviter une confluence entre les plages de lyse tout en leur permettant d'atteindre une taille optimale pour la détection des phages positifs .

L'hybridation réalisée avec notre sonde a permis d'identifier 16 plages de lyse potentiellement positives. Parmi ces 16 plages, cinq furent choisies aléatoirement en vue des étapes de purification ultérieures.

2.2.2) *Purification des phages sélectionnés*

Les cinq plages positives furent récupérées et diluées 100 et 1000 fois. Ces dilutions nous permettront de repérer les boîtes de Pétri contenant un nombre suffisant de plages de lyse pour permettre l'identification des phages positifs. Ce nombre est d'environ mille plages par boîte de 9 cm de diamètre.

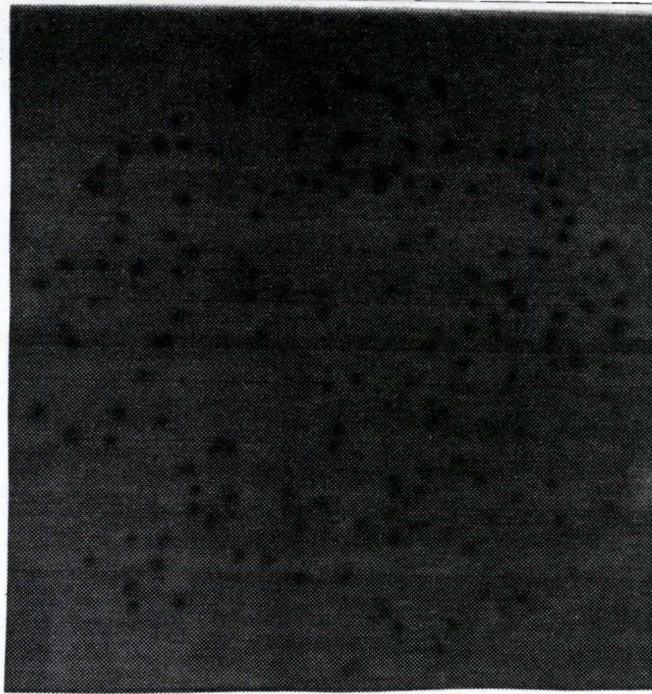


Figure 2: Autoradiographie du clone λ SH3 en fin de purification. Les taches noires indiquent les plages de lyse positives, c'est-à-dire contenant une séquence s'hybridant avec la sonde.

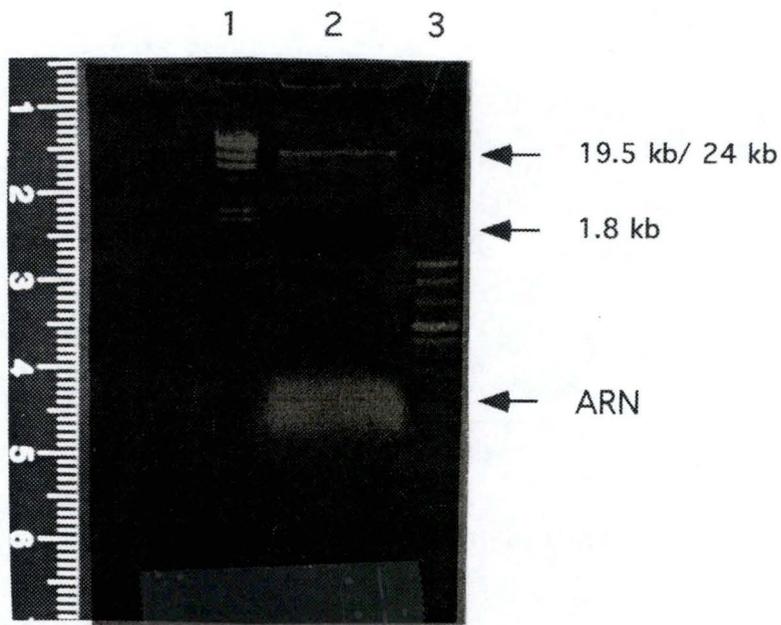


Figure 3: digestion du clone λ SH3 par *Eco* RI et superposition de l'autoradiographie du Southern Blot .

Piste 1: marqueur de poids moléculaire (II) λ restreint par *Hind* III

Piste 2: ADN du phage λ SH3 restreint par *Eco* RI.

Piste 3 : marqueur de poids moléculaire (VIII) pUCBM21 digéré par *Hpa* I, *Dra* I et *Hind* III.

L'infection a été réalisée durant une nuit à 37°C. Cette infection est suivie d'une hybridation qui se réalise durant une nuit à 55°C. Après récupération des plages de lyse positives, une nouvelle infection était réalisée, suivie d'une hybridation.

Ce schéma est suivi jusqu'à obtention de 100% de plages positives par boîte après autoradiographie (Figure 2). Nous avons ainsi obtenu 3 clones purifiés (λ SH1, λ SH2, λ SH3) sur les 5 clones de départ.

2.2.3) Isolement des inserts contenus dans les recombinants positifs

Des quantités plus importantes de phages sont nécessaires pour permettre la récupération de quantités suffisantes d'ADN pour effectuer un clonage. Dès lors, des infections dans de grands volumes de milieu liquide ont été réalisées.

Tout d'abord une première amplification fut réalisée sur boîte de Pétri de 9 cm de diamètre. L'infection a été réalisée de la même manière que pour la purification à la seule différence qu'aucune dilution ne fut réalisée. Les phages ont ensuite été élués par 3 ml de SM que l'on a répandu sur la boîte. Après une incubation de trois heures à 4°C, l'addition de chloroforme a permis de lyser les bactéries restantes. Ensuite un titrage fut réalisé afin de connaître la concentration des phages résultant de cette première amplification.

L'amplification finale se réalise dans 200 ml de milieu liquide avec un indice d'infectivité égal à un phage pour 200 bactéries. La lyse des bactéries se manifestait après 6 heures, elle était caractérisée par l'apparition de filaments et la diminution de la turbidité du milieu de culture. Ces deux phénomènes furent observés pour le troisième clone (λ SH3) mais pas pour les deux autres qui, apparemment, avaient une faible capacité de lyse en milieu liquide.

L'ADN fut isolé des trois clones et restreint par *EcoRI*. La quantité d'ADN récupérée pour les deux premiers clones (λ SH1 et λ SH2) était très faible, ce qui empêchait toute visualisation de l'insert sur gel d'agarose. Pour le clone λ SH3 une bande d'environ 1.8 kb apparaissait, or la taille attendue pour l'insert (cDNA de SH) est d'environ 300 pb (figure 3).

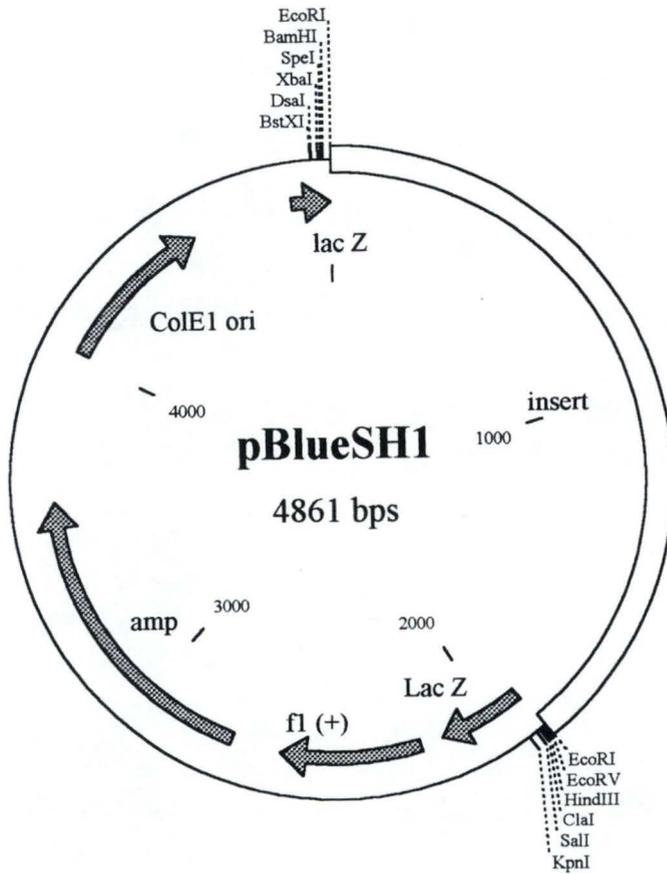


Figure 4: Représentation schématique de l'insert de 1.8 kb dans le vecteur pBluescript appelé désormais pBlueSH1.



Figure 5: Profil de restriction par *Eco* RI de minipreps d'ADN plasmidique pBlue SH1.

Piste 1: Marqueur de taille moléculaire (VIII) pUCBM21 digéré par *Hpa* I, *Dra* I et *Hind* III.

Piste 2 à 6: Constructions issues du mélange de ligation contenant le vecteur pBluescript et l'insert de 1.8 kb.

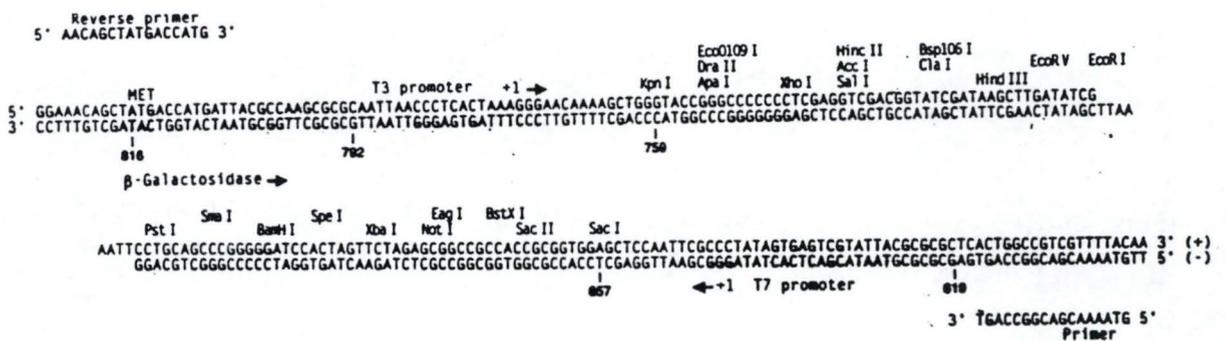


Figure 6: Site de clonage de pBluescript et séquences d'hybridation des amorces "reverse" and "forward".

Dès lors, un "Southern Blot" a été réalisé pour le clone λ SH3, afin de vérifier si la sonde s'hybride effectivement à la bande de 1,8 kb (figure 3). L'autoradiographie nous montre qu'effectivement la sonde s'hybridait bien à l'ADN. On peut donc supposer que ce fragment de 1,8 kb serait issu d'un ARNm polycistronique. Ce phénomène ayant déjà été observé par Samal (Samal et al., 1992), nous nous sommes donc intéressés tout particulièrement à ce clone.

La totalité de l'ADN phagien isolé a été restreint par *Eco*RI. Le fragment a été séparé par électrophorèse en gel d'agarose et récupéré par la méthode de Dretzen.

L'étape suivante consistait à sous-cloner ce fragment dans un vecteur plasmidique afin de pouvoir le séquencer.

3) *Sous-clonage de l'insert dans le plasmide pBluescript.*

L'insert fut donc ligué avec le plasmide pBluescript préalablement digéré par *Eco*RI. La ligation est effectuée dans un volume minimal de réaction et avec deux molécules d'insert pour une de plasmide, afin d'augmenter la probabilité d'insertion. Le plasmide obtenu fut appelé pBlueSH1 (figure 4).

Des bactéries *E.coli* XL1-blue compétentes ont été transformées avec le produit de ligation. Elles ont ensuite été étalées sur milieu sélectif contenant de l'ampicilline, de l'*X-Gal* et de l'*IPTG* qui inhibe le répresseur de l'opéron lactose, afin de sélectionner les bactéries contenant un plasmide recombinant. Le test "Blanc/Bleu" nous permet de différencier les colonies possédant le plasmide recircularisé (bleu) à celles qui contiennent le vecteur recombinant (blanche). Suite au test "Blanc/Bleu", nous avons observé plus d'une vingtaine de colonies blanches. On a donc réalisé des minipreps sur les colonies blanches et vérifié la présence de l'insert par une restriction au moyen de l'enzyme *Eco* RI (figure 5). Des préparations plus importantes d'ADN ont été réalisées par midiprep à partir des 2 colonies contenant l'insert (figure 5, pistes 2 et 5) afin d'obtenir de l'ADN en grande quantité en vue du séquençage.

4) *Séquençage de l'insert.*

L'insert fut séquencé au moyen des oligonucléotides "reverse" et "forward" de pBluescript (figure 6).

Ces réactions de séquençage nous a permis de lire l'entièreté de la séquence du gène SH de la souche RB-94, au moyen du "reverse primer". La séquence nucléotidique est représentée sur la figure 7.

```

1  ATG TAC AAT ACA TCT ACC ATA ATA GAG TTT ACT GGT AAA TTT TGG ACT TAC TTT ACA TTA 60
1  M  Y  N  T  S  T  I  I  E  F  T  G  K  F  W  T  Y  F  T  L  20

61  GTC TTT ATG ATG TTA ATC ATA GG* TTT TTC TTT AIT GTC ACA TCA CTA GTA GCA GCA ATA 12
21  V  F  M  M  L  I  I  X  F  F  F  I  V  T  S  L  V  A  A  I  40

121  CTG AAC AAG TTA TGT GAC CTT AAC GAT CAT CAT ACA AAT AGT CTA AAC ATC AGA ACA AGG 180
41  L  N  K  L  C  D  L  N  D  H  H  T  N  S  L  N  I  R  T  R  60

181  CTT AGG AAT GAT ACA CAA TCA ATA ACA AGA GCA CAT GAA GGA TCC ATC AAC CAA TCA AGC 240
61  L  R  N  D  T  Q  S  I  T  R  A  H  E  G  S  I  N  Q  S  S  80

241  AAT TAA GAAGACAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 271
81  N STOP 82

```

L'astérisque signifie qu'il manque un nucléotide.

Figure 7: Séquence du gène codant pour la protéine SH de la souche RB-94 de BRSV et traduction en aa.

La réaction obtenue avec l'amorce "forward" nous a fourni une séquence. Cette séquence se trouve en amont de SH, elle devrait donc correspondre à un fragment terminal du gène P, si l'hypothèse du polycistronisme se vérifie et si on tient compte des longueurs des séquences des gènes. En effet, l'ordre des gènes dans le génome nous montre que SH est précédé des gènes M et P. Mais il s'avère que cette hypothèse ne se vérifie pas. On constate que cette séquence ne s'aligne pas avec le gène P normalement situé en amont du gène SH. Cette séquence fut également comparée aux séquences se trouvant dans les banques de données GenEMBL et Swiss-Prot au moyen du programme TFASTA, programme qui compare les séquences en aa. Les résultats obtenus nous indiquent que cette séquence ne ressemble à aucune autre séquence.

4.1 Analyse de la partie 3' de l'insert: gène SH

En ce qui concerne la séquence du gène SH de la souche RB-94, elle a été alignée avec les séquences des souches A51908 (Samal et al., 1992) et 391-2 (séquence qui n'était pas disponible au début de ce travail et dont le numéro d'accès dans GenBank est le M86652) à l'aide du programme Gap (GCG).

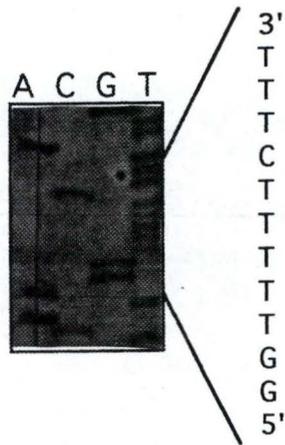
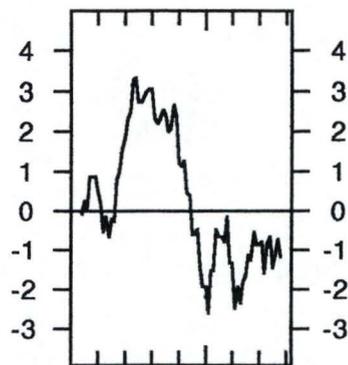
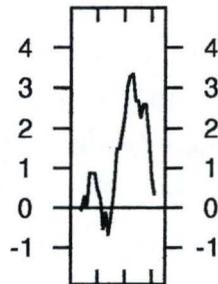


Figure 9: Autoradiographie d'une partie de la séquence de SH de la souche RB-94 représentant la région riche en T.



souche RB-94

BRSV



souche RB-94 BRSV
avec stop prématuré

Figure 10: Profil d'hydrophobicité de la protéine SH. La distribution des domaines hydrophobes et hydrophiles, le long de la séquence en aa, a été déterminée en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle avec une taille de fenêtre de 7 résidus. L'hydrophobicité est indiquée par des valeurs positives.

Cela nous a permis de mettre en évidence un décalage de phase qui apparaît après le nucléotide 85 de la séquence du gène SH de la souche RB94; cela conduit à l'apparition prématurée d'un codon stop et donc à la production d'une protéine d'une taille de 35 aa (figure 8).

```

ATG TAC AAT ACA TCT ACC ATA ATA GAG TTT ACT GGT AAA TTT TGG ACT TAC TTT
M   Y   N   T   S   T   I   I   E   F   T   G   K   F   W   T   Y   F

ACA TTA GTC TTT ATG ATG TTA ATC ATA GGT TTT TCT TTA TTG TCA CAT CAC TAG
T   L   V   F   M   M   L   I   I   G   F   S   L   L   S   H   H   stop

```

Figure 8: Séquence nucléique et séquence protéique déduite du gène SH de la souche RR-94 présentant un codon stop prématuré.

Ce décalage résulte de l'absence d'un nucléotide ("gap") au niveau d'une répétition de T; nucléotide qui est présent dans les séquences des souches A51908 et 391-2 (figure 9). La protéine de 35 aa n'est probablement pas la protéine naturelle de la souche RB-94. En effet, si on regarde le profil d'hydrophobicité (figure 10), on remarque que la séquence est tronquée environ au milieu du domaine hydrophobe. Ceci laisse supposer que la protéine ne se disposerait pas correctement dans la membrane cellulaire et que son activité serait partiellement voire totalement altérée.

Les travaux réalisées par Heminway et al. (1994) ont prouvé l'importance de la protéine SH du HRSV dans la formation de syncytia. En effet, ils ont montré que la coexpression des protéines F et G n'induisait la formation que de petits syncytia. Par contre, l'expression simultanée des protéines F,G et SH provoque la formation des syncytia similaires à ceux observés lors d'une infection *in vitro* de cellules avec le virus. De plus, la coexpression des protéines F et SH est suffisante pour provoquer la formation de syncytia. Or, la souche RB-94 se développe très bien en culture *in vitro*, ce qui laisse supposer que ce "gap" résulterait d'une "erreur" lors de la création de la banque. Elle peut être apparue lors de la transcription inverse ou lors de l'utilisation de la DNA polymérase du phage T4 pour la synthèse du second brin d'ADN. Cette erreur pourrait également résulter d'une erreur de transcription de la polymérase virale, conduisant à la perte d'un nucléotide. Pour cette raison nous avons réalisé toutes les comparaisons de séquences en supprimant le saut de phase par le remplacement du "gap" au moyen d'un nucléotide X.

Les comparaisons effectuées en remplaçant le nucléotide absent par X nous ont permis de mettre en évidence une modification de l'emplacement du codon stop. Pour la souche A51908 le codon stop se situe après le nucléotide 219, ce qui conduit donc à la production d'une protéine de 73 aa. Par contre, pour les souches RB94 et 391-2

le codon stop apparaît après le nucléotide 243, la protéine est donc constituée de 81 aa, c'est-à-dire 8 aa de plus que la souche A51908.

Le pourcentage d'identité en aa entre ces différentes souches n'est pas très indicatif du fait de la divergence de taille des protéines. Ces pourcentages varient de 92 à 95% (tableau 1), si on considère que la protéine a une taille de 73 aa. Il est très difficile de comparer des séquences de taille différente, car on ne sait pas quelle taille utiliser comme référence. Si on prend comme référence 81 aa, le pourcentage d'identité chute automatiquement quand on compare la souche A51908 aux souches 391-2 et RB-94 (tableau 1).

	RB-94	391-2	A51908
RB-94		92.7	<i>89,1</i>
391-2	92.7		<i>87,6</i>
A51908	95.6	94.1	

TABLEAU 1: Comparaisons des séquences en aa de la protéine SH.

En gras: Comparaison effectuée en considérant que la taille de la protéine est de 73 aa.

En italique: Comparaison réalisée en considérant que la taille de la protéine est de 81 aa.

Les études antigéniques réalisées par Furze et al. (1994) et dans notre laboratoire, ont permis de classer plusieurs souches de BRSV en deux sous-groupes (A et B) et un sous-groupe intermédiaire (A/B). En ce qui concerne les souches qui nous intéressent: la souche RB-94 a été classée dans le sous-groupe A/B, la souche 391-2 dans le sous-groupe A et la souche A51908 dans le sous-groupe B.

Si nous regroupons ces souches en nous basant sur la taille des protéines SH, on obtient des résultats similaires à ceux observés lors de l'étude de la protéine G (Prozzi, soumis): les souches RB-94 (A/B) et 391-2 (A) sont plus proches d'un point de vue évolutif que les souches RB-94 et A51908 (B) ou A51908 et 391-2.

En effet, au niveau de G, les alignements en aa ont montré que, parmi les souches du sous-groupe A, le pourcentage d'identité varie de 96 à 92%. Lorsque l'on compare les souches du sous-groupe A avec celles du sous-groupe A/B, on observe une identité variant de 96 à 92%. Cette identité chute à 84% lorsque les souches du sous-groupe A sont comparées avec celles du sous-groupe B. La comparaison entre le sous-groupe A/B et B montre une identité allant de 86 à 87%. A partir de ces

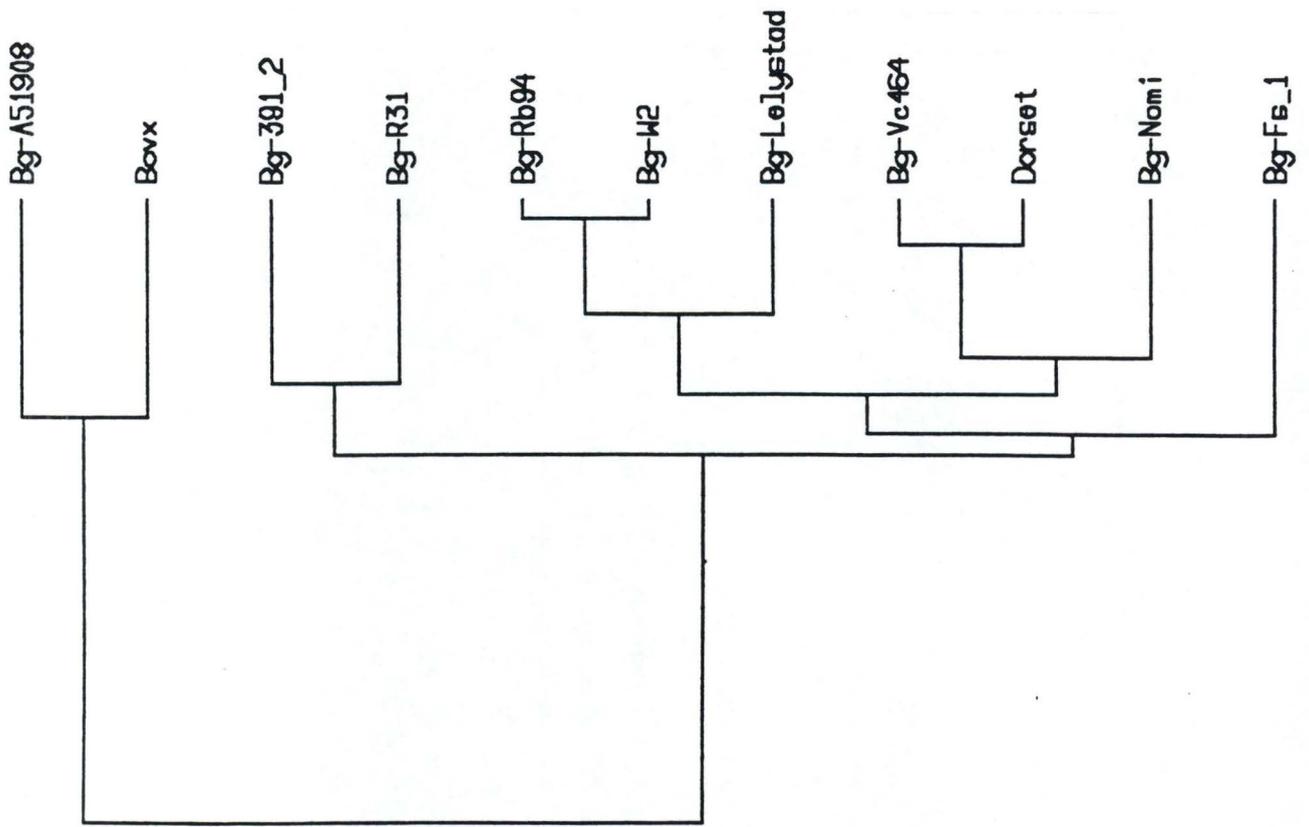


Figure 11: Dendrogramme généré par le programme PileUp, qui montre les liens de parenté entre les séquences nucléotidiques du gène codant pour la protéine G de différentes souches de BRSV (Prozzi, soumis).

RB94
A51908

ACAAAAGAAAATAGCAACATGCATCAAAGATAAGCAAAGGAAAACCACAATGGATCAGACAATCATCACTCATATCTCTTTAGTCTACAA
T A A G C

RB94
A51908

SH Gene-stop G Gene-start
ATGCTGCATTATGTA CTGTTAATTAAGTTATTTAAAAATTAAACTTAAAATGGTTTTATGGTTACATACAGATGTTGGGGCAAATACAAGTATG
C C

Figure 12: Alignements de la région 3' terminale du gène SH et de région intergénique SH-G des souches bovines RB-94 et A51908. L'alignement a été réalisé à l'aide du programme PileUp (GCG) (Prozzi, soumis).

résultats d'alignement il semble que les sous-groupes A et A/B sont plus proches que les sous-groupes A et B ou B et A/B.

Les résultats d'alignement des séquences nucléiques du gène G, ont permis de réaliser un dendogramme (figure 11). Le programme PileUp fut utilisé pour la réalisation de ce dendogramme, cet algorithme se base sur la méthode UPGMA; méthode parcimonieuse qui dessine un arbre phylogénétique en minimisant le nombre d'événements évolutifs.

Les distances entre séquences sont visualisées par la longueur des branches. Le dendogramme obtenu montre la parenté des souches appartenant aux différents sous-groupes. On remarque que les sous-groupes A et A/B sont également plus proches (Prozzi, soumis).

Lors de ces travaux réalisés sur la protéine G de la souche RB-94, divers clones ont été obtenus. L'un d'entre eux contenait le plasmide pDP6. Ce plasmide a été réalisé par la ligation d'un insert, résultant du "screening" de la banque de phage λ gt11 dans le plasmide pBluescript. Ce plasmide pDP6 contient la partie 3' non codante du gène SH avec la région intergénique SH-G et un fragment de G. Cette région non codante, de la souche RB-94, a été alignée à celle de la souche A51908 (figure 12). On observe 5 substitutions de nucléotides entre les deux séquences. Par contre, le signal "gene end" est parfaitement identique. La région intergénique SH-G quant à elle, est caractérisé par une seule substitution nucléotidique et le signal "gene start" est parfaitement identique.

Aucun recouvrement n'est observé entre les séquences (contenues dans le plasmide pDP6) 3' non codante du gène SH de la souche RB-94 et sa région intergénique, avec la séquence obtenue lors de ce travail. Le "gene end" est absent de notre séquence, or l'extrémité 3' du "gene end" devrait servir à la formation de la queue de poly A, comme l'a montré Mink et al., (1991). Ils ont proposé que la formation de la queue de poly A serait le résultat d'un copiage en "va et vient" des résidus uridine se trouvant à la fin du "gene end". Cependant nous observons, dans notre cas, la formation d'une queue de poly A en amont du "gene end", c'est-à-dire 9 nucléotides après le codon "stop".

.....GATACACAATCAATAACAAGAGCACATGAAGGATCCATCAACCAATCAAGCAATTA
ACAAAAAAAAAAAAAAAAA (a) Partie terminale du gène SH de la souche RB94.

ACAAAAGAAAATAGCAACATGCATCAAAGATAAGCAAAGGAAAACCACAATGGATCAGACAATCATCACTCATATCTCTT
TAGTCTACAAaTGCTGCATTATGTACTGTTAATTAGTTATTTAAAATTAAACTTAAAAATGGTTTATGGTTACATACAGA
TGTTGGGGCAAATACAAGTA **TGTCCAACCATACCCATCATCTTAAATCAAGACATTAAAGAGGGCTTGGAAAGCCTCAA**
AATACTTCATAGTAGGATTATCATGTTTATATAAGTTCAATTTAAAATCCCTTGTCCAAGCGGCTTTGACCACCTTAGCA
ATGATAACCTTGACATCACTCGTCATAACAGCCCTTATTTACATTAGTGTGGGAAATGCTAAAGCCAAGCCCACATCCAA
ACCAACCATCCAACAAACACAACGGCCCCAAAACCATACCTCACCTCTTTTCACAGAGCACAACTACAAATCAACTCACA
CATCAATCCAAAGCACCACACTGTCCCAACTACTAAACATAGACACCCTAGAGGAACTACATACAGTCACCCAACCGAT
GAAACCCAAAAC**AAAAAAAAAAAAAAAAA (b)** Insert contenu dans le plasmide pDP6.

Figure 13: Superposition de l'extrémité 3' du gène SH de la souche RB-94 avec l'insert contenu dans le plasmide pDP6. La séquence soulignée, correspond au recouvrement existant entre les deux séquences. En double souligné on retrouve le "gene end" du gène SH et en gras l'ATG de la protéine G. Les queues de poly A prématurées de la protéine SH (a) et de la protéine G (b) sont également représentées en gras.

Cette apparition prématuré de poly A a également été observé pour la protéine G de la souche RB-94. En effet, lors de l'isolement du gène de la protéine G à partir de la banque de cDNA, le phage λ G28 contenait la moitié 5' du gène G et était polyadénylée, le phage λ G24 quant à lui contenait un fragment du gène G qui se terminait au nucléotide 407 par une queue de poly A (figure 13)(de Walque, 1993). Si on observe ces séquences, on ne retrouve aucune séquence semblable au "gene end".

Ces observations ont aussi été décrites dans la littérature pour la protéine G du HRSV, par Melero et al.(1993). Ils réalisèrent des "escape mutants" (c'est-à-dire des mutants échappant aux anticorps) d'une souche de HRSV, en réalisant plusieurs passages du virus, sur une culture cellulaire, en présence d'anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine G de cette souche. Ils ont observé plusieurs types de mutations permettant au virus de se développer en présence de ces anticorps: certaines étaient caractérisées par l'insertion ou la délétion de résidus A ou G, d'autres montraient l'apparition de codons "stop" prématurés par substitution d'un nucléotide.

D'autres substitutions aléatoires étaient également observées, ces dernières provoquant le changement d'un aa. Enfin, certaines protéines étaient caractérisées par l'insertion successive de plusieurs résidus d'adénosine. Les mécanismes d'action proposés par Melero sont de deux types: soit le mécanisme est similaire au "va et vient" décrit pour la polyadénylation de l'ARNm, soit l'addition du poly A résulterait d'un "editing" de l'ARNm, comme on l'observe pour la protéine P du virus Sendai, où l'addition co-transcriptionnel de poly G est un phénomène fréquent (Park et al., 1991). Il est important de souligner que lors de ces expériences *in vitro* la pression des anticorps était très forte. Néanmoins vu le nombre de variants obtenus *in vitro*, il semble possible que certains phénomènes identiques se produisent dans la nature à une moindre échelle.

Une autre hypothèse peut être évoquée pour expliquer l'addition prématurée de la queue de poly A. Lors de la réalisation de la banque de cDNA, certaines amorces oligo-dT utilisées pour la transcription inverse se seraient hybridées de manière aspécifique au niveau d'une région riche en résidu adénosine. Mais cela est peu probable car la température à laquelle s'effectue la réaction de synthèse du cDNA (37°C) est trop élevée pour permettre une hybridation non spécifique.

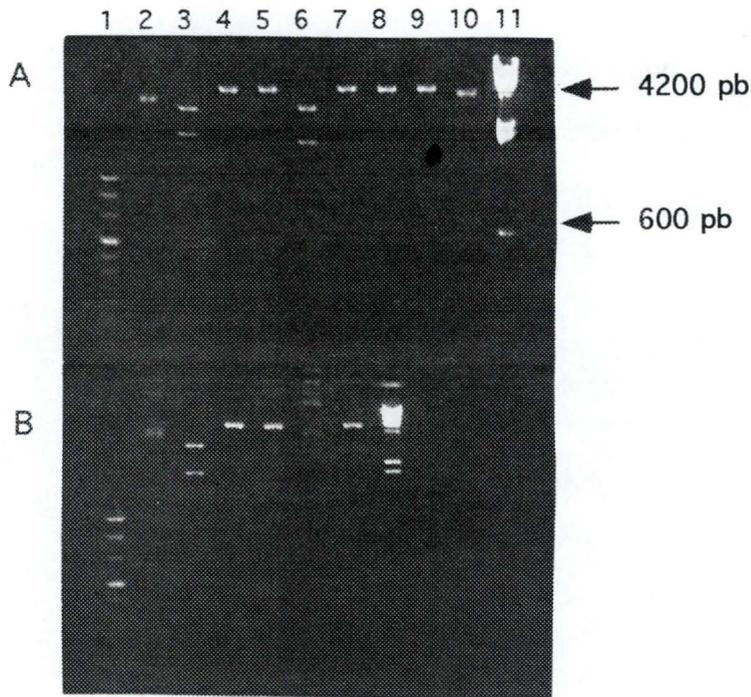


Figure 14: Profil de restriction du plasmide pBlueSH1.

(a)

Piste 1: Marqueur de taille moléculaire (VIII) pUCBM21 digéré par *Hpa* I, *Dra* I et *Hind* III.

Piste 2: Plasmide non restreint.

Piste 3: Plasmide restreint par *Eco* RI.

Piste 4: Plasmide restreint par *Kpn* I.

Piste 5: Plasmide restreint par *Xba* I.

Piste 6: Plasmide restreint par *Spe* I.

Piste 7: Plasmide restreint par *Cla* I.

Piste 8: Plasmide restreint par *Sal* I.

Piste 9: Plasmide restreint par *Nco* I.

Piste 10: Plasmide restreint par *Sac* I.

Piste 11: Marqueur de taille moléculaire (II) λ restreint par *Hind* III

(b)

Piste 1: Marqueur de taille moléculaire (VIII) pUCBM21 digéré par *Hpa* I, *Dra* I et *Hind* III.

Piste 2: Plasmide non restreint

Piste 3: Plasmide restreint par *Bam* HI.

Piste 4: Plasmide restreint par *Eco* RV.

Piste 5: Plasmide restreint par *Hind* III.

Piste 6: Plasmide restreint par *Bgl* II.

Piste 7: Plasmide restreint par *Bst* XI.

Piste 8: marqueur de taille moléculaire (II) λ restreint par *Hind* III

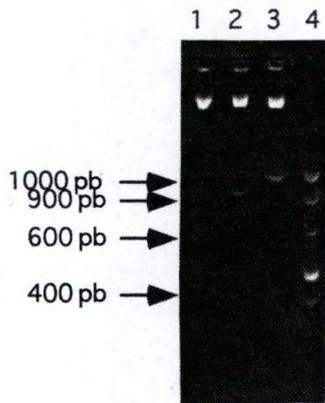


Figure 15:

Profil de restriction du plasmide pBlueSH1.

Piste 1: Plasmide restreint par *Sac* I et *Nco* I.

Piste 2: Plasmide restreint par *Cla* I et *Nco* I.

Piste 3: Plasmide restreint par *Xba* I et *Nco* I.

Piste 4: Marqueur de taille moléculaire (VIII) pUCBM21 digéré par *Hpa* I, *Dra* I et *Hind* III.

4.2 Analyse de la partie 5' de l'insert

4.2.1) Réalisation d'une carte de restriction de l'insert

Ayant obtenu un insert contenant le gène SH et une séquence non identifiée, nous avons donc entrepris de réaliser la carte de restriction de l'insert et ce dans un double but:

a) trouver des sites de restriction qui pourraient nous permettre de confirmer ou d'infirmer la présence des gènes M et P en 5'

b) trouver un site de restriction qui permettrait la réalisation d'un sous-clonage de l'insert en plusieurs fragments, ce qui faciliterait un séquençage directement à l'intérieur de la région inconnue .

Les enzymes utilisées (*KpnI*; *XbaI*; *SpeI* ; *ClaI*; *Sall*; *NcoI*; *SacI*; *BamHI*; *EcoRV*; *HindIII* et *BstXI*) sont caractérisés par le fait qu'elles ne coupent qu'une seule fois le plasmide pBluescript : *Bgl II* est utilisée parce qu'elle ne coupe pas le plasmide.

Les fragments générés par la restriction *Spe I* et *BamHI* confirment l'orientation de l'insert dans le plasmide (figure 14)

Deux enzymes, *NcoI* et *SacI*, quant à elles, nous montrent la présence de ces deux sites au niveau de l'insert. Mais les séquences de M et P ne présentent pas ces sites. Des doubles restrictions ont été réalisées respectivement avec *SacI* et *NcoI*, *ClaI* et *NcoI*, *XbaI* et *NcoI*, afin de situer exactement les sites *SacI* et *NcoI* par rapport au plasmide (les sites *ClaI* et *XbaI* se trouvant de part et d'autre du site multiple de clonage du plasmide pBluescript) (figure 15).

La présence du site *SacI* est intéressante car elle va nous permettre de sous-cloner notre insert en deux parties.

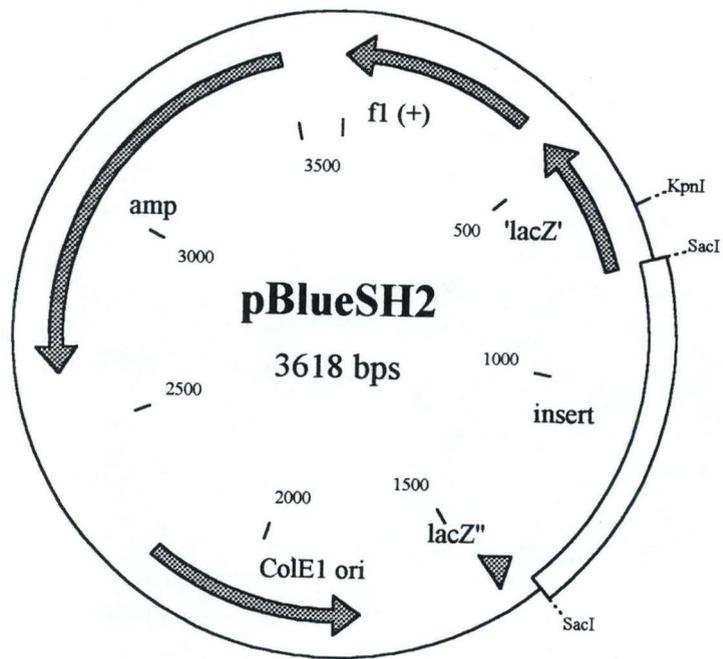


Figure 16: Représentation schématique de l'insert de 600 pb dans le vecteur pBluescript, appelé désormais pBlueSH2

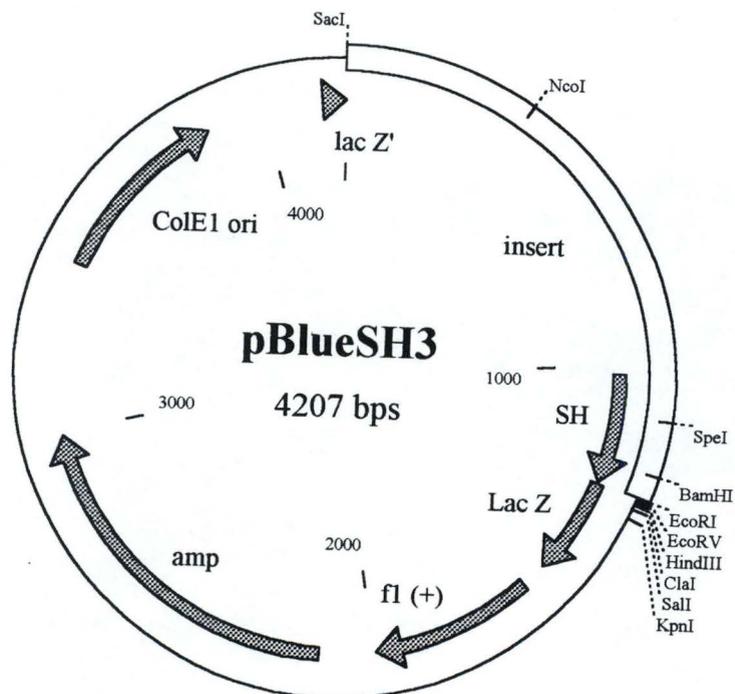


Figure 17: Représentation du fragment de 4.2 kb reliqué sur lui-même (pBlueSH3).

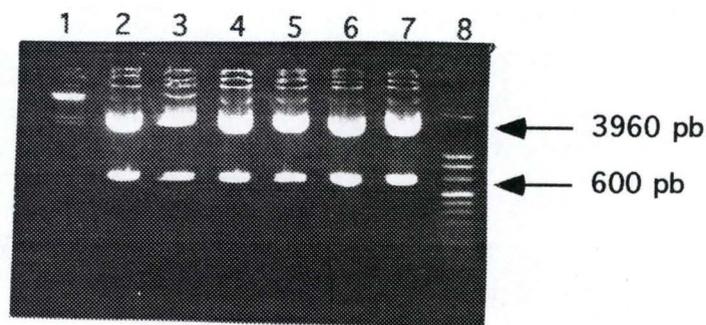


Figure 18: Profil de restriction par *Sac* I de minipreps d'ADN plasmidique pBlue SH2.

Piste 1: Marqueur de taille moléculaire (II) λ restreint par *Hind* III;

Piste 2 à 7: Constructions issues du mélange de ligation contenant le vecteur pBluescript et l'insert de 600 pb.

Piste 8: Marqueur de taille moléculaire (VIII) pUCBM21 digéré par *Hpa* I, *Dra* I et *Hind* III.



Figure 19: Profil de restriction par *Sac* I et *Cla* I de minipreps d'ADN plasmidique pBlueSH3.

Piste 1: Marqueur de taille moléculaire (VIII) pUCBM21 digéré par *Hpa* I, *Dra* I et *Hind* III.

Piste 2 à 7: Constructions obtenues résultant de la recircularisation du plasmide pBlueSH1 après prélèvement du fragment de 600 pb.

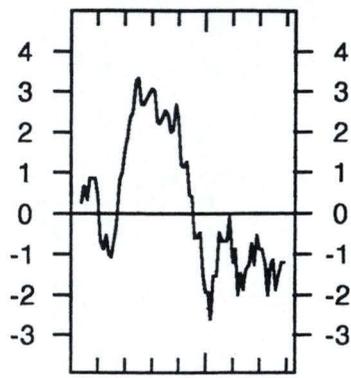
Piste 8: Marqueur de taille moléculaire (II) λ restreint par *Hind* III;

RB-94	M Y N T S T I I E F T G K F W T Y F T L V F M M L I I X F F F I V
391-2	. N S E T . G
A51908	. N M G V .
ORSV	. N . . . I T V . . . S . . . P . . . I H . I . . . V . . . A I
A2	. E . . . I T . . . S S . . . P . . . I H . I T T . I S L L . .
18537	. G . . . I T . . . S . . . P . . . I H . I . T P I S L L . .

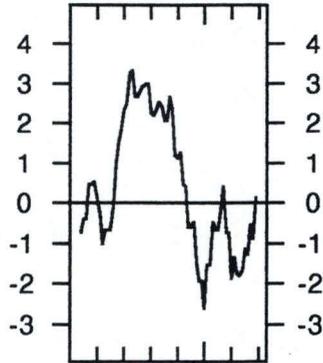
RB-94	T S L V A A I L N K L C D L N D H H T N S L N I R T R L R N D T Q
391-2 D . . . K . . S . . .
A51908 D . . . G
ORSV	. . . M I E M . D A . S E . . . S . .
A2	I . I M I E V . V F . N K T F E L P R A . . V N . -
18537	I T I M I S E H K T F C N K T . E L G Q M Y Q I N . -

RB-94	S I T R A H E G S I N Q S S N	81
391-2	L E	81
A51908 V - - - - -	73
ORSV	L A A D T R G - - - - -	73
A2	- - - - -	65
18537	- - - - -	65

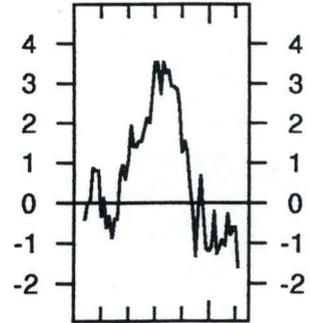
Figure 20: Alignement des séquences de la protéine SH de RB-94 et de 5 autres souches de RSV. Les identités de résidus par rapport à SH de RB-94 sont indiqués par "." et les "gap" par "-".



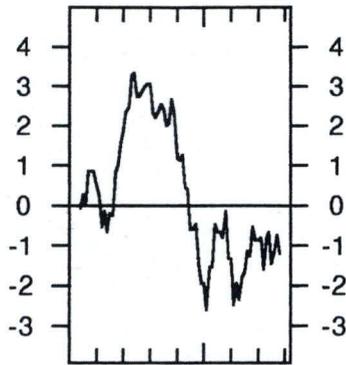
souche 391-2
BRSV



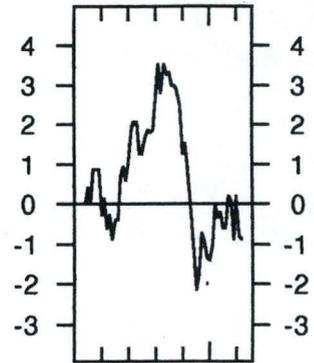
souche A51908
BRSV



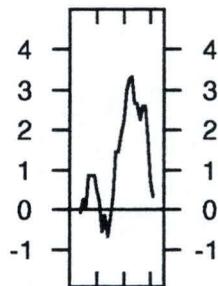
souche A2
HRSV



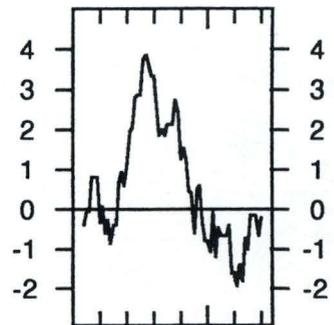
souche RB-94
BRSV



souche 18537
HRSV



souche RB-94 BRSV
avec stop prématuré



ORSV

Figure 21:
Profil d'hydrophobicité de la protéine SH de diverses souches. La distribution des domaines hydrophobes et hydrophiles le long de la séquence en aa, a été déterminée en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle avec une taille de fenêtre de 7 résidus. L'hydrophobicité est indiquée par des valeurs positives.

4.2 2) *Sous-clonage des deux fragments résultant de la restriction par SacI*

La restriction va générer deux fragments différents qui seront récupérés sur gel:

a) Un fragment d'une taille d'environ 600 pb qui sera cloné dans un plasmide pBluescript au niveau du site *SacI*. Le plasmide obtenu fut appelé pBlueSH2 (figure 16). La dénomination utilisée fait référence au cadre du travail sur SH, bien que le fragment ne le contienne pas.

b) Un fragment d'environ 4.2 kb qui sera reliqué sur lui même, il fut nommé pBlueSH3 (figure 17).

Une vingtaine de colonies résultant de la transformation ont été analysées par une restriction *SacI* pour pBlueSH2 et *SacI-ClaI* pour le pBlueSH3. Des midipreps ont été réalisées en vue du séquençage (figure 18 et 19).

4.2.3) *Séquençage des deux inserts*

Les réactions ont été réalisées avec le "primer forward" de pBluescript. Mais seule la réaction effectuée sur le pBlueSH2 nous donne une séquence lisible.

Cette séquence fut également comparée aux séquences existantes dans les banques de données. Mais aucune ressemblance ne fut trouvée avec les séquences connues.

4.3 Analyse de la séquence protéique

La séquence en aa déduite de la protéine SH de la souche RB-94 a été alignée avec les séquences publiées des souches A2 (sous-groupe A de HRSV) (Collins et al., 1990), 18537 (sous-groupe B de HRSV), A51908 (sous-groupe B de BRSV) (Collins et al., 1990), 391-2 (sous-groupe A de BRSV) (numéro d'accèsion dans Gene Bank: M86652) et WSU 83-1578 (souche ovine) (Alansari & Potgieter, 1994) (figure 20). La détermination du profil d'hydrophobicité par l'algorithme de Kyte et Doolittle nous montre que, quelles que soient les souches, on observe un domaine hydrophobe similaire à celui prédit pour la protéine SH des souches humaines A2 et 18537 (Collins et al., 1990) (figure 21). Ce domaine hydrophobe permettrait l'insertion de la protéine dans la membrane cellulaire de cellules infectées.

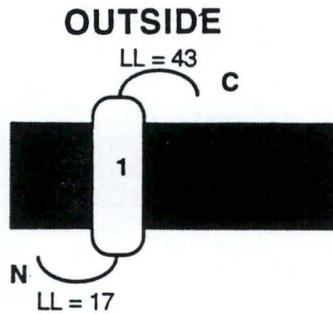


Figure 22: Schéma obtenu après l'analyse de la séquence de la protéine SH de la souche RB-94 par le programme Top Prep II. On observe d'abord un "loop" de 17 aa, ensuite une hélice transmembranaire allant de l'aa 18 à 38, et enfin dans la partie extracellulaire un "loop" de 43 aa.

AA:	M Y N T S T I I E F T G K F W T Y F T L V F M M L I I X F F F I V T S L V
PHD sec:	E E E E E E H
Acc	e e e b b b b b e b

AA:	L N K L C D L N D H H T N S L N I R T R L R N D T Q S I T R A H E G S I N
PHD sec:	H H H H H H H
ACC	b b e b b e b e e e e e e e b e b e e e e b e e e e b e e b b e b e e e e b b e

AA:	Q S S N A A I
PHD sec:	
ACC	e e b e e e b

Figure 23: Résultats de l'analyse de la séquence protéique de SH par le programme P.H.D.

AA: Séquence en aa.

PHD sec: Identification des structures secondaires :

E: aa appartenant à une structure de type β .

H: aa appartenant à une structure de type α .

acc: Exposition au solvant:

e: aa hydrophile.

b: aa hydrophobe.

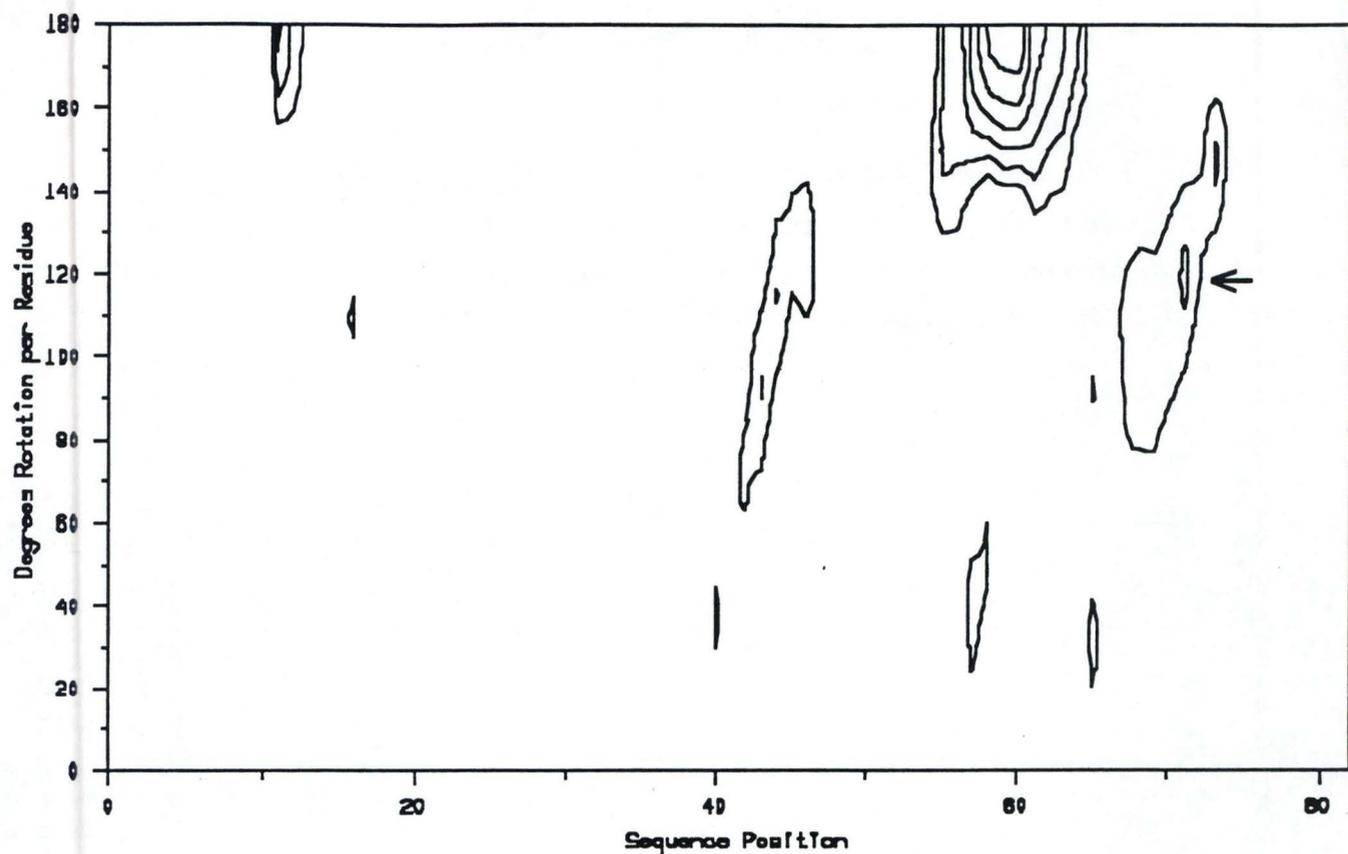


figure 24: Graphique représentant les moments hydrophobes de la séquence de la protéine SH de la souche RB-94.

L'axe des X correspond a la position des aa dans la séquence.

L'axe des Y correspond aux angles de rotation par résidu.

L'axe des Z correspond aux valeurs du moment hydrophobe.

La flèche indique la position de l'hélice α potentiellement amphiphile.

Le programme Top Pred II a été utilisé afin de déterminer avec plus de précision la région transmembranaire éventuellement impliquée dans l'ancrage de la protéine. L'échelle d'hydrophobicité utilisée est également celle de Kyte et Doolittle. La figure 21 nous montre le résultat de l'analyse; on prédit effectivement une hélice α transmembranaire s'étendant de l'aa 18 à 38 .

L'algorithme de prédiction de structures secondaires P.H.D a été utilisé afin d'affiner les résultats obtenus avec Top Pred II. En effet, P.H.D permet de prédire les différents types de structures secondaires; par contre Top Pred II permet de prédire uniquement les hélices α transmembranaires. Les résultats obtenus avec P.H.D sont repris sur la figure 23 ; ils confirment l'existence d'une hélice α transmembranaire, mais ils mettent également en évidence une seconde hélice α localisée dans la partie C-terminale de la protéine. Si on regarde de plus près les résidus impliqués dans la formation de cette hélice, on remarque une certaine alternance entre aa hydrophiles et hydrophobes. Cette observation nous laisse supposer que nous sommes peut-être en présence d'une hélice α amphiphile.

Pour confirmer cette hypothèse nous avons utilisé le programme Moment (GCG). Ce programme permet de mettre en évidence les moments hydrophobes, c'est-à-dire qu'il permet de savoir si un peptide présente une alternance de régions hydrophiles et hydrophobes. La figure 24 nous montrent le résultat de cette analyse. On observe un moment hydrophobe significatif dans la région allant des aa 65 à 75, région qui correspond à l'hélice α qui a été mise en évidence par le programme P.H.D.

La région conformationnelle dans laquelle le moment hydrophobe est significatif, correspond aux angles de rotation par résidu d'une hélice α . En effet, l'angle de rotation par résidu représente l'angle virtuel existant entre les carbones α de chaque résidu. Si la valeur de cet angle est d'environ 100° entre résidus adjacents, cela indique que l'on se trouve en présence d'une hélice α . Si l'angle vaut 160° , cela signifie, par contre, que l'on se trouve en présence d'une structure β .

Ces différentes analyses nous montrent que la protéine SH possède probablement un domaine central hydrophobe, structuré en hélice α . On observe également une petite hélice α dans la partie C-terminale de la protéine, qui serait potentiellement amphiphile et qui interagirait donc avec la bicouche lipidique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons cloné et séquencé le gène codant pour la protéine SH de la souche RB-94. Tout d'abord, le criblage d'une banque de cDNA construite dans le phage λ gt11 réalisé au moyen d'une sonde oligonucléotidique, déduite à partir de la séquence de la souche A51908 (Samal et al., 1990). Une fois les phages positifs identifiés, l'ADN a été extrait, restreint par *Eco* RI et cloné dans le plasmide pBluescript. L'insert obtenu par la restriction avait une taille supérieure à celle attendue: 1.8 kb (au lieu d'environ 300 pb). Cet insert a été séquencé. Au niveau de l'extrémité 3' de l'insert nous avons déterminé l'entièreté de la séquence du gène codant pour la protéine SH. La séquence obtenue pour le côté 5' fut comparée à diverses banques de données afin d'identifier la portion se trouvant en amont du gène SH. Nous n'avons pas obtenu de résultat significatif en alignant cette séquence aux diverses séquences disponibles.

En ce qui concerne la séquence du gène SH de la souche RB-94, elle a été alignée aux séquences de BRSV disponibles dans la littérature (391-2 et A51908). Ces alignements nous ont permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques.

Le gène de la souche RB-94 présente un décalage de phase dû à une seule base, qui conduit à l'apparition d'un codon "stop", entraînant la production d'une protéine de 35 aa. Cette protéine n'est probablement pas la protéine naturellement synthétisée par la souche virale. En effet, les études de Heminway et al., (1994) ont montré l'importance de la protéine SH lors de la fusion entre cellules. Cette protéine de 35 aa est tronquée au niveau de la région hydrophobe qui est impliquée dans son insertion dans la membrane; ceci altérerait voire inhiberait la fonction de la protéine. Or, lors d'infections expérimentales avec la souche RB-94, nous n'observons pas de problème de fusion entre les cellules. Ce décalage de phase est donc probablement dû à une "erreur" lors de la création de la banque ou résulterait d'un glissement de la polymérase virale. Toutes les analyses suivantes ont été réalisées sans tenir compte de ce décalage de phase.

Les analyses antigéniques sur la protéine G réalisées par Furze et al. (1994) et dans notre laboratoire, ont permis de classer diverses souches de BRSV en deux sous-groupes et un sous-groupe intermédiaire. Ce classement place la souche RB-94 dans le sous-groupe intermédiaire (A/B), la souche 391-2 dans le sous-groupe A et la souche A51908 dans le sous-groupe B. Les études réalisées sur la protéine G ont montré que les sous-groupes A et A/B sont plus proches que les sous-groupes A et B ou B et A/B. Ces observations sont confirmées par nos résultats. En effet, si on

compare la taille des protéines SH des trois souches RB-94, A51908 et 391-2, on remarque que les protéines de RB-94 et 391-2 ont la même taille, c'est-à-dire 81 aa. La souche A51908, quant à elle, est caractérisé par une protéine SH plus petite de 8 aa.

Les travaux réalisés dans notre laboratoire sur la protéine G de la souche RB-94 ont permis d'isoler un phage qui contenait la majeure partie de la région 3' non codante du gène SH, la région intergénique SH-G et un fragment 5' du gène G. La séquence 3' non codante devrait recouvrir l'extrémité 3' du gène SH obtenu lors de ce travail. Mais cela n'est pas le cas. En effet, on observe l'apparition prématurée d'une queue de poly A juste après le codon "stop". Ce phénomène a également été observé dans notre laboratoire au niveau de la protéine G, où plusieurs séquences de G de la souche RB-94 étaient tronquées au centre du gène et possédaient une queue de poly A prématurée. Cette apparition de polyadénosine dans des séquences de protéines G a fait l'objet d'études au niveau du HRSV. Melero et ces collaborateurs on en effet pu mettre en évidence l'apparition de plusieurs types de mutations, dont la polyadénylation prématurée, lors de la réalisation d'"escape mutant" (Melero et al., 1993). Dans le cadre qui nous intéresse l'apparition du poly A peut résulter de trois mécanismes différents: soit un phénomène de copiage répété comme lors de la formation de la queue de poly A à partir de la séquence consensus "gene end", soit un mécanisme d'"editing" de l'ARNm, soit une hybridation non spécifique des amorces oligo-dT lors de la réalisation du cDNA. Cette dernière hypothèse semble la moins probable car la température à laquelle s'effectue la réaction de synthèse est trop élevée pour permettre une hybridation non spécifique.

En ce qui concerne la partie 5' de notre insert de 1.8 kb, c'est-à-dire la portion inconnue, une carte de restriction a été réalisée afin d'identifier des sites de restriction qui pourraient nous permettre de confirmer ou d'infirmer la présence des gènes M et P en 5' et afin de permettre la mise en évidence d'un site qui permettrait de réaliser un sous-clonage en vue d'un séquençage. Les différentes enzymes utilisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence un site permettant d'identifier les gènes se trouvant en amont de SH.

La présence du site de restriction *Sac* I est intéressante car elle nous a permis de sous-cloner l'insert de 1 800 pb en deux sous-fragments de 600 et 1 200 pb.

Lors du séquençage du fragment de 600 pb, seule une petite portion a été lue. Aucune séquence ressemblant à ce fragment ne fut trouvée dans les banques de données.

L'analyse de la séquence en aa déduite du gène SH a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques structurales de la protéine. En effet la détermination du profil d'hydrophobicité nous montre que toutes les souches de RSV (ORSV, BRSV et HRSV) présentent un domaine central hydrophobe. Afin de confirmer si ce domaine est impliqué dans l'ancrage de la protéine à la membrane cellulaire, la séquence protéique a été analysée par le programme Top Pred II. Ce programme a permis de déterminer la région impliquée dans l'insertion membranaire, cette région étant structurée en hélice α . En vue d'affiner ces résultats, la séquence a été analysée au moyen du programme de prédiction de structures secondaires P.H.D. Les résultats obtenus ont confirmé l'existence de l'hélice α transmembranaire, mais ils mettent également en évidence une autre hélice α dans la partie C-terminale de la protéine. La région intervenant dans la formation de cette hélice est caractérisée par une certaine alternance d'aa hydrophiles et hydrophobes. L'analyse de cette région au moyen du programme Moment a montré que l'hélice α était potentiellement amphiphile, ce qui permettrait une interaction avec la bicouche lipidique.

Au terme de ce travail, plusieurs pistes peuvent être suivies.

En ce qui concerne les fragments non identifiés, un séquençage complet devra être réalisé afin d'identifier le(s) gène(s) se trouvant en amont de SH; ceci permettrait éventuellement de connaître la séquence du gène M et une partie du gène P de la souche RB-94.

En ce qui concerne le gène SH de la souche RB-94, le criblage de la banque avait permis d'isoler 16 phages positifs, mais seulement 5 d'entre eux ont été purifiés. Il serait intéressant de purifier d'autres phages afin d'identifier le nucléotide qui est absent de la séquence. Si aucun de ces clones ne possède la séquence complète, il faudra réaliser un nouveau criblage de la banque de cDNA.

Quand ce gène SH complet et sans décalage de phase aura été obtenu, nous pourrons envisager son expression. Cette expression devra se réaliser dans le système baculovirus ou celui du virus de la vaccine, afin de permettre une glycosylation de la protéine. De plus ces systèmes ont prouvé leur efficacité pour l'expression des protéines F, G, P et N du HRSV (Alwan et al., 1993) et dans notre laboratoire pour l'expression des protéines F et G du BRSV (Walravens et al., soumis).

L'expression de la protéine SH permettra la production d'anticorps monoclonaux. Ces derniers pourront dès lors être utilisés pour voir si la protéine SH se localise uniquement au niveau des cellules infectées ou si elle est également présente au niveau de l'enveloppe virale. Ils pourront également servir à confirmer le rôle de la protéine SH dans la formation de syncytia chez le BRSV. Enfin, ces

anticorps pourront être utilisés pour étayer les résultats obtenus lors de la classification de souches dans des sous-groupes antigéniques distincts.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

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

ALWAN W. F., RECORD F. M. & OPENSHAW P. J. M. (1993). Phenotypic and functional characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins. *Immunol.* **150**, 5211-5218.

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

ANDERSON, K., SCOTT, 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.

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. F., 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.

BANERJEE, A. K. & BARIK, S. (1992). Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology*, **188**, 417-428.

BLUMBERG, B. M., LEPPERT, M. & KOLOKOFISKY, O. (1981). Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell*, **23**, 837-845.

BONSIR, L. (1994). 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 Zoologiques.

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., 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*, D. W. Kingsbury, ed. New York et Londres, 103-126.

COLLINS, P. L., OLMSTED, R. A., JOHNSON, P. R. (1990). The small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus : comparaison between antigenic subgroups A and B. *J. Gen. Virol.* **71**, 1571-1576.

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**, 849-369.

DE WALQUE, S. (1993). Contribution à l'étude de l'hétérogénéité du virus respiratoire syncytial bovin. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences Zoologiques.

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

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

EVERMANN, J. F., LIGGIT, H. D., PARISH, S. M., WARD, A. C. S. & LEAMASTER, B. R. (1995). Properties of a respiratory syncytial virus isolated from a sheep with rhinitis. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 947-951.

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.

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.

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. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 5625-5629.

GARCIA, J., GARCIA-BARRENO, B., VIVO, A. & MELERO, J. A. (1993). Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: Formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein and the 22k protein. *Virology*, **195**, 243-247.

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

KINGSBURY, D. W. (1990); Paramyxoviridae and their replication. *Virology*, B. N. Fields et al., ed. Raven Press Ltd, New York, 945-962.

KYTE, J., DOOLITTLE, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

LAMBERT, D. M. (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.

LERCH, R. A., STOTT, E. J. & WERTZ, G. W. (1989). Characterization of bovine respiratory syncytial virus proteins and mRNAs 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.

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

MANIATIS, T., FRITSCH E. F., SAMBROOK, J. (1992). Molecular cloning , a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1 ère édition.

McINTOCH, K. & CHANOCK, R. M. (1990). Respiratory syncytial virus. *Virology*, 2ème édition, chap. 28, édité par B. N. Fields, D. M. Knipe et al., Raven Press Ltd., New York, 1045-1072

MELERO, J. A., PALOMA, R. & GARCIA-BARRENO. (1993). Antigenic variation of human respiratory syncytial virus G glycoprotein : genetic mechanisms and evolutionary significance. *Regulation of gene expression in animal viruses*, édité par L. Carrasco et al., Plenum Press, New York, 141-149.

MINK, M. A., STEC D. S. & COLLINS, P. L. (1991). Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology*, **185**, 615-624.

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

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.

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.

PROZZI, D, rapport d'activité du projet FIRST (1993-1994).

PROZZI, D. (soumis). Antigenic and molecular analyses of variability of BRSV G glycoprotein.

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. *Vet. Bulletin*, **61**, 1117-1131.

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.

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.

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., MATHEISE J-P., KNOTT I., COPPE P., COLLARD A., DIDENBOURG C., KETTMANN R. & LETESSON J-J. (soumis). Immunogenic and protective properties of bovine respiratory syncytial virus fusion glycoprotein expressed in recombinant baculovirus infected insect cells.

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.

WELLEMANS G., (1990). Bovine respiratory syncytial virus. *Virus infections in vertebrates*. Edité par Dinter Z. et al., Vol 3, Amsterdam: Elsevier. 363-375.

WOLDEHIWET Z., SHARMA R. (1992). Evidence of immunosuppression by bovine respiratory syncytial virus. *Scand J. immunol.*, **36**, 75-80.

ZAMORA, M. & SAMAL? S. K. (1992). 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.