

INFECTION EXPERIMENTALE DE VEAUX PAR LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN EVALUATION DE LA PERSISTANCE VIRALE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Benoît, Christophe, Stéphane CALLENDRET
Né, le 3 mai 1975 à CAEN (Calvados)

Directeur de thèse : M. le Professeur François SCHELCHER

JURY

PRESIDENT :
Mme Jacqueline PUEL

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. François SCHELCHER
M. Gilles MEYER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur par intérim	: M.	G. BONNES
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	M.	R. LAUTIE
	M.	J. FERNEY
	M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	: M.	A. BRIZARD
	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	D. GRIESS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
Mlle **HAY Magali**, *Zootéchnie*
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **GRANDJEAN Christophe**, *Gestion de la santé en élevage des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

A notre président de thèse,

A Madame le Professeur Jacqueline PUEL
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Service Bactériologie-Virologie

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Hommage très respectueux.

A notre jury de thèse,

A Monsieur le Professeur François SCHELCHER
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour

En remerciement de ses précieux conseils.
Qu'il veuille bien accepter ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A monsieur le Docteur Gilles MEYER
Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des ruminants

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury de thèse.
Qu'il trouve ici la marque de notre sincère reconnaissance.

A mes parents,

Pour m'avoir supporté plus longtemps que les autres.

A Shnouf et Val,

Pour leur soutien logistique, leur aide, leur amitié, et tous les bons moments passés, présents et à venir.

A François,

Je ne t'oublie pas

A toutes les filles que j'ai aimé avant,

Qui sont devenues femmes maintenant

TABLE DES MATIERES

Tables des illustrations	12
Introduction.....	13
1) Synthèse bibliographique	16
1.1) Symptomatologie	16
1.2) Epidémiologie	17
1.2.1) Espèces infectées	17
1.2.2) Prévalence sérologique dans l'espèce bovine.....	17
1.2.3) Fréquence et rôle du VRSB dans les maladies respiratoires des bovins	17
1.2.4) Saisonnalité des infections.....	18
1.2.5) Transmission et circulation du VRSB.....	18
1.3) La persistance des virus à ARN sans transcriptase réverse.....	19
1.3.1) Etablir la persistance virale	20
1.3.1.1) Eviter la cytolyse	20
1.3.1.1.1) Les virus défectifs et interférents.....	20
1.3.1.1.2) Les virus thermosensibles.....	21
1.3.1.1.3) Mutations particulières.....	22
1.3.1.2) Infecter des cellules tolérant la persistance.....	22
1.3.1.3) Etat de persistance in vitro : infection smoldering	23
1.3.2) Maintenir la persistance : déjouer le système immunitaire.....	24
1.3.2.1) Entraîner une immunosuppression.....	24
1.3.2.1.1) Détruire les cellules de l'immunité	24
1.3.2.1.2) Infecter les cellules présentatrices d'antigènes.....	25
1.3.2.1.3) Inhiber la prolifération des lymphocyte ou entraîner leur suppression.....	26

1.3.2.1.4) La tolérance immunitaire	27
1.3.2.1.5) Interaction avec les cytokines immunorégulatrices	28
1.3.2.2) Eviter la reconnaissance des épitopes viraux.....	29
1.3.2.2.1) Echapper aux anticorps	29
1.3.2.2.2) Echapper à la réponse immunitaire spécifique cellulaire	31
1.3.2.3) Contrer la présentation antigénique	31
1.3.2.3.1) Diminuer l'expression des gènes viraux	32
1.3.2.3.2) Interagir avec la voie de présentation des antigènes via les CMH	34
1.3.2.4) Empêcher la destruction du virus ou de la cellule	35
2) Etude expérimentale	37
2.1) Matériel et méthode	37
2.1.1) Cellules et virus	37
2.1.2) Les animaux.....	37
2.1.2.1) Animaux d'expérimentation	37
2.1.2.2) Animaux de terrain	38
2.1.3) Les prélèvements.....	38
2.1.3.1) Prélèvements de tissus	38
2.1.3.2) Lavages bronchoalvéolaires.....	39
2.1.3.3) Sang.....	39
2.1.4) Séroneutralisation	41
2.1.5) Technique PCR	41
2.1.5.1) Extraction de l'ARN.....	41
2.1.5.2) Transcription réverse et réaction de polymérisation en chaîne	41
2.1.5.2.1) ARNg du gène N.....	42
2.1.5.2.2) ARNm des gènes N, F et G	43
2.1.6) Isolement.....	45

2.1.6.1) Culture conventionnelle	45
2.1.6.2) Cocultures.....	45
2.1.7) Immunodétection du VRSB dans les tissus fixés au formol.....	46
2.1.8) Immunohistochimie	46
2.2) Résultats	47
2.2.1) Contrôle de l'infection des veaux	47
2.2.2) Détection du VRSB dans les cellules des LBA	47
2.2.3) Détection du VRSB dans les cellules mononucléées du sang périphérique.....	48
2.2.4) Détection du VRSB dans les tissus par nRT-PCR.....	48
2.2.5) Détection du VRSB par culture cellulaire	51
2.2.6) Immunodétection du VRSB dans les nœuds lymphatiques pulmonaires	52
2.3) Discussion.....	53
2.3.1) Faible durée de présence dans le LBA	53
2.3.2) Absence de virémie	54
2.3.3) Persistance virale uniquement dans les nœuds lymphatiques loco-régionaux	54
2.3.4) Absence de détection de l'infectiosité.....	57
2.3.5) Le virus semble persister dans les lymphocytes B et les macrophages.....	58
Conclusions	60
Références	62

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Carte du génome du VRSB	13
Tableau 1 : Gènes et protéines de la souche du VRSB A51908	14
Tableau 2 : Protocole de l'infection expérimentale de 21 veaux par le VRSB.....	40
Tableau 3 : Amorces utilisées pour la transcription reverse et la réaction de polymérisation en chaîne nichée	41
Tableau 4 : Détection des ARN messagers et génomique du VRSB dans les CMSP et dans les NLP de veaux infectés expérimentalement	50
Tableau 5 : Détection des ARN messagers et génomiques du gène de la nucléoprotéine du VRSB par une RT-PCR nichée, sur des échantillons de poumon et de nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux prélevés sur 8 veaux naturellement infectés par le VRSB.....	51
Tableau 6 : Détection de L'ARN du VRSB par une RT-PCR nichée ciblant le gène N pendant la coculture.....	52

Introduction

Les affections respiratoires représentent une importante cause de morbidité en élevage bovin, aussi bien en production laitière qu'en viande, et entraînent ainsi de lourdes pertes économiques. Parmi les causes de ces maladies respiratoires, l'infection par le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) semble être l'une des plus fréquentes.^{5, 54} Le VRSB est un virus de la famille des *Paramyxoviridae*, du genre *Pneumovirus*. C'est un virus à ARN monocaténaire non segmenté sans reverse transcriptase, de sens négatif. Les virus respiratoires syncytiaux humains (VRSH), ovins et caprins appartiennent également au même genre. Le génome du VRSB, long d'environ 15000 nucléotides, comprend 10 gènes (figure 1) (tableau 1), dont l'ordre de transcription est le suivant :

3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-22K-L-5'

Sur les dix protéines produites par le génome du VRSB, deux sont non structurales (NS1 et NS2). Les 8 autres sont des protéines structurales, séparables en trois groupes :

- les protéines d'enveloppe : protéine de fusion F, la glycoprotéine G et la protéine SH (small hydrophobic)
- les protéines de la matrice : les protéine M et M2 (=22K)
- les protéines de la nucléocapside : la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P et la polymérase L.

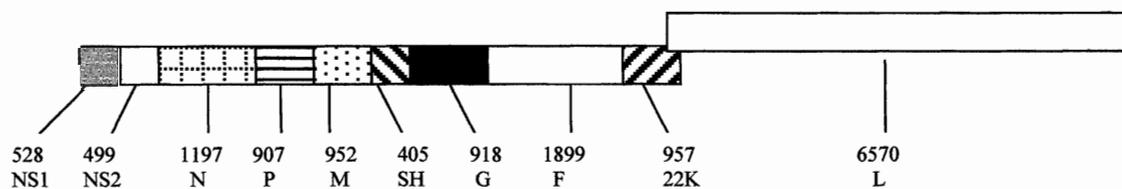


Figure 1 : Carte du génome du VRSB (noter le chevauchement des gènes 22K et L)

Tableau 1 : Gènes et protéines de la souche du VRSB A51908

GENE	PROTEINES	nombre		Fonctions de la protéine
		nucl.	a. a.	
	NON STRUCTURALES			
NS1	NS1	524	136	Spécifiques des <i>Pneumovirus</i> , rôles mal connus
NS2	NS2	489	124	
	NUCLEOCAPSIDE			
N	nucléoprotéine	1203	391	structure de la nucléocapside complexe avec L
P	phosphoprotéine	914	241	facteur de transcription et de réplication, assemblage du virion
L	polymérase	6573	2162	avec N et P, responsable de la transcription et de la réplication
	ENVELOPPE INTERNE			
M	protéine de matrice M	902	256	Morphogenèse et arrêt de la transcription
22K	protéine de matrice M2	958	186	
	PROTEINES STRUCTURALES			
F	protéine de fusion F	1716	572	fusion et pénétration du virus avec la cellule, fusion des cellules entre elles
G	glycoprotéine G	835	263	pourrait contribuer à la pénétration du virus
1A	petite protéine hydrophobe SH	566	73	fonctions mal connues

a.a. : acides aminés

nucl. : nucléotides

Le VRSB, qui semble être spécifique des bovins, est associé à de nombreux troubles respiratoires, notamment chez les jeunes. Des études réalisées dans différents systèmes d'élevage soulignent la fréquence et l'importance des infections par le VRSB.^{171, 11, 54, 94} Le VRSB possède de plus de grandes similitudes structurales, génotypiques et phénotypiques, avec le virus respiratoire syncytial humain (VRSH). Les infections qu'ils provoquent sont également très proches sur les plans clinique et épidémiologique. Outre son impact en production bovine, l'infection par le VRSB s'avère donc d'un grand intérêt en pathologie comparée, et étudier le VRSB sur son hôte spécifique pourrait éclairer la pathogénie du VRSH.

Sur un plan épidémiologique, les infections par le VRSB et par le VRSH sont caractérisées par une récurrence et une grande saisonnalité. L'incidence des maladies respiratoires associées au VRSB culmine en automne et en hiver,¹⁰ et il semblerait que le virus ne circule pendant le printemps et l'été qu'à un très faible niveau.¹⁷³ Le devenir du VRSH comme celui du VRSB entre les épidémies n'est pas connu. Si la circulation continue reste possible, elle a

été considérée comme peu probable.¹⁷³ Au contraire, l'hypothèse de la persistance du virus chez certains individus semble apparaître comme plus plausible.

Cette étude a pour objectif d'évaluer la persistance du VRSB chez son hôte naturel suite à une infection expérimentale. Dans une première partie de synthèse bibliographique nous rappellerons les aspects cliniques et épidémiologiques des infections par le VRSB, ainsi que les différents mécanismes de persistance des virus à ARN dépourvus de reverse transcriptase. Ces différents éléments permettent de mieux comprendre pourquoi la persistance du VRS est envisageable. La deuxième partie sera concernée à l'étude expérimentale avec tout d'abord la méthode et les moyens utilisés, puis les résultats obtenus, et enfin la discussion en comparaison avec des expériences similaires faites sur le VRS et d'autres virus.

1) Synthèse bibliographique

1.1) Symptomatologie

La durée d'incubation de la maladie, courte, est estimée entre 2 et 5 jours. L'animal développe ensuite des troubles respiratoires et généraux d'intensité variable. Ainsi, le passage de VRSB dans un élevage n'entraîne parfois aucun symptôme majeur (simplement une toux minime), alors qu'il peut parfois entraîner une morbidité élevée, voire des morts subites.¹⁷⁸

Les symptômes généraux, présents en tout début d'évolution, sont transitoires, et disparaissent en 1 à 3 jours dans la majorité des cas. On constate une diminution de l'appétit, une hyperthermie marquée (jusqu'à 41,5°C) et un abattement en général minime, sauf en cas de syndrome de détresse respiratoire aiguë. Les symptômes respiratoires sont variés, et toutes les combinaisons possibles de signes cliniques peuvent être retrouvées. En cas d'atteinte de l'appareil respiratoire supérieur (rhino trachéite), l'animal peut présenter un jetage, muqueux et souvent de faible quantité, et/ou de la toux, sèche et non productive, et/ou une conjonctivite. Le jetage et la toux persistent chez plus de 50% des bovins durant 20 jours.¹⁷⁷ L'atteinte de l'appareil respiratoire profond (bronchiolite et bronchopneumonie) est plus caractéristique. Une respiration abdominale, une polypnée et des anomalies des bruits respiratoires à l'auscultation, associées ou non, dominent le tableau clinique. Ces symptômes disparaissent habituellement en 1 à 2 semaines.¹⁶ Une exacerbation de la bronchiolite peut se produire dans certains cas, et se traduit alors par un syndrome de détresse respiratoire avec orthopnée, œdème et emphysème pulmonaire qui peut évoluer en emphysème sous cutané. Une évolution clinique en deux phases séparées de quelques jours à quelques semaines a été rapportée dans quelques cas. Elle n'est ni constante ni retrouvée lors d'infections expérimentales.¹⁶

Comme pour les autres infections virales, on constate parfois une surinfection bactérienne et/ou une association avec d'autres virus à tropisme respiratoire tels que le PI3 ou le BVD, sans que cela modifie forcément le tableau clinique.

Ces symptômes ne sont pas pathognomoniques de l'infection par le VRSB et sont retrouvés dans beaucoup d'autres maladies virales, bactériennes et parasitaires de l'appareil respiratoire. Le diagnostic différentiel basé uniquement sur la symptomatologie est rendu très délicat. Cependant, l'acuité des symptômes et leur rémission rapide semblent plaider en faveur d'une infection par le VRSB.^{179, 178}

1.2) Épidémiologie du VRSB

1.2.1) Espèces infectées

Le VRSB est un virus spécifique des bovins. L'existence d'un réservoir autre que bovin ne semble pas avoir été démontrée.⁵ Cependant, la transmission interspécifique naturelle avec les autres VRS, humain, ovin ou caprin, ne peut être totalement exclue. En effet, des ovins ont été infectés expérimentalement par le VRSB^{156, 169} et le VRSH a expérimentalement provoqué des troubles respiratoires chez des veaux.⁸⁵

1.2.2) Prévalence sérologique dans l'espèce bovine

La contamination des bovins par le VRSB semble fréquente, comme le montre les études de prévalence sérologique. En France, la séroprévalence du VRSB est élevée (50 à 65% des bovins^{5, 136}). En Suède, sur une étude portant sur les troupeaux laitiers, 41 à 89% des élevages seraient positifs, selon les régions.⁵⁴ Aux USA, la prévalence du VRSB varierait de 65 à 81% des bovins suivant les états.¹⁰ La fréquence des cheptels séropositifs est fortement liée à la densité des animaux.^{54, 136} Ainsi en Suède, plus de 71% des cheptels séropositifs sur mélange de lait se situent dans les zones qui regroupent 69% des bovins, alors que la prévalence s'échelonne de 41 à 67% dans les zones regroupant seulement 31% des bovins.⁵⁴ Rares sont les cheptels où tous les adultes sont dépourvus d'anticorps (Ac) anti VRSB.

1.2.3) Fréquence et rôle du VRSB dans les maladies respiratoires des bovins

D'après les différentes études épidémiologiques menées sur les maladies respiratoires des bovins, le VRSB ressort comme un agent pathogène majeur. Le VRSB serait responsable, selon les études, de 15 à 71% des infections respiratoires des bovins.⁵ De plus, l'apparition des troubles cliniques est bien corrélée à la séroconversion des animaux vis-à-vis du VRSB.^{22, 23, 161} Des enquêtes épidémiologiques dans différents systèmes d'élevage soulignent la fréquence et l'importance des infections par le VRSB. Au Danemark, en élevage laitier, les troubles respiratoires sont associés au VRSB dans 60% des élevages (n=10).¹⁷¹ Aux Etats-Unis, lors de maladie respiratoire d'allure grippale, l'infection par le VRSB est diagnostiquée dans 71 % des élevages (n=14).¹¹ En Suède, une étude sur 12 troupeaux a montré que 66 % (n=102) des vaches laitières ont eu une montée significative d'anticorps anti VRSB associée aux troubles respiratoires.⁵⁴ En élevage allaitant ou en production de viande, le VRSB semble responsable de 16 à 71% des troubles respiratoires.^{22, 23, 95, 151, 161}

Selon les différentes études, la sensibilité maximale envers le VRSB concerne les veaux âgés de 1,5 mois à 1 an, avec une moyenne entre 3 à 6 mois. Mais, si le VRSB touche principalement les veaux âgés de moins d'un an, la catégorie de population atteinte semble différente entre la primo-infection d'un élevage ou les réinfections. Ainsi, en cas d'introduction du virus dans un cheptel sain, toutes les classes d'âge sont atteintes (parfois très sévèrement), alors que seuls les veaux sont malades dans les troupeaux où circule régulièrement le VRSB.^{5, 53, 54}

1.2.4) Saisonnalité des infections

Bien que des épisodes infectieux imputés au VRSB aient été relevés tout au long de l'année, la maladie culmine toutefois en automne et en hiver. La chute des températures favoriserait en effet la maladie.^{5, 22, 54, 151, 161} Cependant, pour le VRSH, le regroupement des populations associé à des conditions climatiques extrêmes serait plus en cause que les conditions climatiques elles-mêmes.⁶⁴

1.2.5) Transmission et circulation du VRSB

Le VRSB est transmis d'un animal à l'autre par voie aérienne proche. Il n'existe aucune preuve de transmission verticale. Les anticorps colostraux persistent dans le sang des veaux pendant en moyenne 99 jours (de 30 à 208 jours). Ils interfèrent avec le dépistage en masquant la séroconversion. Suite à une infection par le VRSB, l'immunité acquise ne semble pas empêcher la multiplication virale, mais évite le développement des signes cliniques.⁹⁵

La réapparition de troubles respiratoires liés au VRSB dans les mêmes exploitations plusieurs années consécutives est fréquente. Les réinfections surviennent surtout pendant la période hivernale et à un moindre degré l'été.¹⁷³ Deux hypothèses sont alors envisageables : soit une réintroduction du virus dans l'élevage, soit le maintien du virus au sein d'un réservoir animal. Aux Pays-Bas, un suivi sérologique longitudinal de six troupeaux laitiers, sur douze mois, démontre une circulation de virus tout au long de l'année, bien qu'il n'y ait pas d'introduction extérieure d'animaux. Sur 884 bovins inclus dans l'étude, une primo-infection est observée sur 14,4% des animaux (n=884), une réinfection sur 21,7% (n=884) des animaux. Soixante sept bovins, soit 7,6% subissent au moins deux passages viraux dans l'année.¹⁷³ Des observations similaires ont été rapportées aux USA⁹ et en Suède.⁵⁴ Il reste à définir comment le virus persiste dans l'élevage. Soit il se maintient dans l'élevage par une réinfection asymptomatique permanente des bovins adultes (circulation subclinique du virus). Soit le

virus persiste chez un hôte en attendant d'être réexcrété. L'analyse par modélisation mathématique d'épisodes infectieux a permis de conclure que la transmission continue entre bovins séropositifs n'était pas un scénario plausible. Au contraire l'infection prolongée de vaches séropositives, c'est-à-dire la persistance du virus chez des individus, était considérée comme probable.⁴³ Cette persistance du VRSB chez les bovins a été suggérée par plusieurs auteurs sans qu'aucune preuve n'ait été apportée.^{137, 165, 174} Quelques expériences *in vitro* attestent de la capacité du VRSB d'établir une persistance.^{111, 133, 162, 175}

1.3) La persistance des virus à ADN sans transcriptase réverse

Un virus est, par définition, un agent infectieux qui nécessite pour se répliquer de parasiter une cellule. Afin d'infecter continuellement un hôte, les virus ont développé au cours du temps plusieurs stratégies : certains virus se maintiennent au sein de la population cible en passant d'un hôte à l'autre par la production rapide et massive de virions très infectieux. D'autres virus doués de propriétés de résistance dans le milieu extérieur exceptionnelles attendent ainsi un nouveau contact avec un hôte sensible. D'autres encore sont capables de rester dans des espèces réservoirs et d'attendre ainsi un contact pour infecter leur hôte principal. Enfin, des virus ont mis au point une autre technique pour infecter en permanence leur espèce cible principale: la persistance au long terme au sein même de cet hôte.¹²² Cette persistance peut être définie comme le maintien du matériel génétique viral à l'intérieur d'une cellule hôte sans qu'il y ait nécessairement répllication du virus, avec une éventuelle excrétion virale ultérieure.

Ainsi, un virus peut ne pas être éliminé par le système immunitaire, mais au contraire maintenir son génome dans des cellules de son hôte. Cette persistance virale a été mise en évidence depuis longtemps *in vitro*, et a été démontrée *in vivo*. Depuis la mise en cause du virus de la rougeole dans des affections chroniques du système nerveux humains, des étiologies virales dans des maladies humaines chroniques sont de plus en plus souvent suspectées et recherchées.^{128, 143} Dans de nombreuses familles virales (virus à ADN comme à ARN), des virus capables d'établir une persistance existent.³ Le maintien du matériel génétique des virus à ADN et des rétrovirus (qui transforment leur ARN en ADN dans la cellule infectée) se conçoit aisément. L'ADN viral peut être soit intégré au génome de la cellule hôte, soit persister dans le cytoplasme en tant qu'épisome, ADN circulaire très stable. Il peut alors rester ainsi sans être transcrit jusqu'à réactivation. En revanche, il est plus difficile d'envisager le même scénario avec les virus à ARN. L'ARN viral semble difficilement pouvoir persister dans le cytoplasme de la cellule hôte à l'état quiescent, sans

être transcrit ou détruit par les ribonucléases endogènes. Nous limiterons notre étude aux virus à ARN, en excluant les rétrovirus.

Les principes généraux requis pour la persistance virale sont maintenant bien définis.^{3, 110, 127, 128, 129} Dans un premier temps, le virus doit établir cette persistance virale. Pour cela, il doit respecter l'intégrité de la cellule hôte, c'est à dire ne pas la détruire. Dans un deuxième temps, le virus doit faire en sorte que la cellule infectée ne soit pas détruite par le système immunitaire de l'hôte. C'est le maintien de la persistance virale.

1.3.1) Etablir la persistance virale

1.3.1.1) Eviter la cytolysse

Certains virus sont capables lors de contact avec leur hôte d'établir d'emblée une infection cellulaire non lytique. Ces virus dits non cytopathogènes seront évidemment de très bons candidats pour une persistance virale. Deux virus très étudiés pour leur capacité à persister chez leur hôte respectif appartiennent à cette catégorie : le virus de l'hépatite C (VHC) chez l'homme, et celui de la chorioméningite lymphocytaire de la souris (LCMV). Mais beaucoup de virus, lorsqu'ils infectent une cellule, entraînent sa destruction soit par inhibition/interaction avec la synthèse protéique cellulaire, soit par déstabilisation de la membrane cytoplasmique. Ces virus doivent, pour pouvoir persister, diminuer leur virulence. Les études sur culture cellulaire ont permis de mettre en évidence plusieurs modifications des souches virales sauvages associées à une persistance virale.

1.3.1.1.1) Les virus défectifs et interférents

Certains virus dits défectifs et interférents (virus DI) peuvent jouer un rôle important dans la diminution de la cytotoxicité de la souche virale. Leur définition a été donnée en 1970 par Huang.⁸⁴ Ces virus DI contiennent toutes les protéines de structure normales du virus souche, mais, en revanche, ne contiennent qu'une partie du génome viral (défectivité). En outre, la présence du virus « sauvage » dont ils sont issus leur est nécessaire pour se répliquer. La relation entre les virus DI et le virus sauvage est très spécifique. La présence d'un autre virus ne leur permet pas de se répliquer. Enfin, ils interfèrent avec la réplication de leur virus homologue non défectif. Pour pouvoir réaliser l'interférence, la fonctionnalité du génome du virus DI doit être respectée (inhibition de l'interférence lors de dénaturation du génome du virus DI par les UV).⁸² La facilité et l'aptitude à générer ces virus DI varient en fonction des différents virus, mais aussi des différents couples culture cellulaire/virus utilisés. Ces virus

DI, en diminuant la charge en virions, abaissent la cytotoxicité du virus et permettent l'établissement de la persistance. Ainsi, un état d'équilibre entre le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) et les particules DI dans une lignée de cellules BHK21 a permis l'établissement d'une infection à long terme sur plus de 8 ans, au lieu d'une classique lyse cellulaire. Beaucoup de virus sont capables de générer des virus DI *in vitro*.⁸³ Il est intéressant de noter que Treuhft et Beem ont ainsi mis en évidence l'existence de tels mécanismes pour le VRSH sur des cultures de cellules Hep-2 en 1982.¹⁶⁸ Dans certains modèles (VSV, réovirus...) il a été montré que les virus DI étaient produits *in vivo*¹⁶⁸ et qu'ils modifiaient l'issue de la maladie en atténuant fortement la virulence de l'infection.

1.3.1.1.2) Les virus thermosensibles

Un virus thermosensible a acquis la capacité de se développer de façon optimale à une certaine température (la température permissive). Sa croissance est réduite voire arrêtée à une température restrictive, généralement plus élevée. Ces variants viraux ont très souvent été isolés suite à des persistances virales *in vitro* (Virus Sendai, virus de la rougeole) comme *in vivo* (virus de la maladie de Newcastle, VSV, virus Influenza).¹³⁹ A une température supérieure à leur température optimale de croissance, leur virulence est diminuée, ce qui peut permettre l'établissement de la persistance. La cause de cette thermosensibilité n'est pas toujours connue, mais peut dans certains cas être associée à des mutations ponctuelles. Ainsi, la thermosensibilité de la souche tsW16B du VSV est liée à la mutation d'un nucléotide sur le gène codant pour la protéine N.¹²⁵ De même la mutation d'un nucléotide sur le gène codant pour l'ARN polymérase du poliovirus de type 1 contribue à la thermosensibilité de ce mutant, ainsi qu'à l'atténuation de sa virulence.¹⁶⁴

De tels mutants ont déjà été mis en évidence pour le VRSH et ont permis l'instauration d'une persistance *in vitro*. Sur 7 variants thermosensibles différents inoculés à des cellules BS-C-1 et cultivés à température restrictive (39°C), seuls 2 ont permis d'établir une infection persistante stable, les autres ayant donné lieu soit à des infections abortives soit à des infections lytiques par réversion de la thermosensibilité. Il a bien été constaté que la thermosensibilité n'était associée qu'à la diminution de la virulence de la souche de VRSH, et que d'autres modifications (altérations de l'expression des gènes viraux entre autre) devaient être nécessaires pour le maintien de l'état de persistance. En effet, il a été possible de maintenir la persistance après le vingtième passage sans difficulté à 37°C, température non restrictive.¹⁴¹

1.3.1.1.3) Mutations particulières

Les mutations des virus à ARN sont extrêmement fréquentes. Si le taux d'erreur lors de réplication d'ADN n'est en moyenne que de 10^{-8} à 10^{-11} par nucléotide incorporé, il est de 10^{-3} à 10^{-4} lors de réplication d'ARN. Le taux de mutation de trois virus à ARN (influenza, virus de la stomatite vésiculeuse et Sendai) suite à une sélection par des anticorps monoclonaux (Acm) a été de 10^{-4} mutations par cycle répliatif.⁷⁹ Certaines de ces mutations permettent la diminution de la virulence et contribuent à l'établissement de la persistance. Deux mutations ponctuelles sur les gènes codant pour les protéines VP1 ou VP2 de la capsid du poliovirus Sabin 1, un picornavirus, sont suffisantes à elles seules pour permettre à ce virus normalement très cytopathique d'établir une persistance dans la lignée cellulaire Hep-2c.¹³⁴ L'établissement de la persistance suite à ces mutations pourrait être due à une modification des premières étapes du cycle de la multiplication virale (adsorption, pénétration et décapsidation).¹³⁵ Ces mutations modifient de plus les relations du poliovirus avec son récepteur cellulaire, le PVr. Or, cette interaction pourrait être responsable de la cytotoxicité du poliovirus.¹³⁴

D'autres mutations, en altérant l'expression normale des gènes viraux limitent la cytotoxicité virale et permettent ainsi l'établissement d'une persistance. En diminuant l'expression des protéines virales (donc des Ag) à la surface des cellules infectées, ces mécanismes offrent également au virus un moyen d'échapper au système immunitaire. Ces mutations seront donc étudiées en même temps que les mécanismes de maintien de cette persistance.

1.3.1.2) Infecter des cellules tolérant la persistance

Lors de culture de virus *in vitro*, il a été constaté que, si une adaptation du virus était nécessaire pour l'établissement de la persistance, une adaptation de la cellule à son envahisseur pouvait survenir.² Ainsi les cellules ayant hébergé un variant viral responsable de la persistance résistent mieux au virus sauvage que des cellules vierges. Cette évolution de la lignée cellulaire s'accompagne également d'une sélection d'un virus dont la croissance est optimisée dans cette lignée. On parle alors de coévolution de cellules et de virus. La coévolution est définie comme un système biologique nécessitant une interdépendance du mode d'évolution de deux entités.^{44, 135} Cela a été supposé lors d'une étude sur le VRSH *in vitro*. Suite à une infection de cellules BS-C-1 par le VRSH, la sélection d'un virus thermosensible a permis d'établir la persistance. Suite à cette persistance, une différence entre le caryotype des cellules souches et des cellules associées à la persistance a été observée.¹⁴¹

Un autre registre d'adaptation de la cellule et du virus concerne la tolérance que montrent naturellement certaines souches cellulaires vis-à-vis d'un virus donné.³⁸ En effet, certains virus sont capables d'établir une persistance dans un type de cellule, alors qu'ils créent une infection lytique ou abortive sur une culture cellulaire d'un autre type.⁶⁰ Il s'agit souvent de cellules du système immunitaire. C'est notamment le cas pour le VRSH et les macrophages alvéolaires (cf. § 2.3.5) ou pour le virus de la rougeole et les cellules de lignée macrophagique.⁷¹

1.3.1.3) Etat de persistance *in vitro* : infection smoldering

Dans ce système de persistance virale, le virus n'infecte pas toutes les cellules de la culture en même temps, mais seulement une petite quantité de cellules à la fois. Il y a lyse cellulaire et à nouveau colonisation d'un tout petit nombre de cellules. Ici, l'état de persistance n'est réel qu'au niveau de la culture cellulaire et non de la cellule. Ce mécanisme de persistance est rencontré lorsque le virus a besoin que la cellule hôte soit à un certain stade de différenciation ou de division pour pouvoir l'infecter. Il pourrait également être influencé par la présence de substances inhibitrices (cytokines).^{3, 110} Le virus est libéré dans le milieu de culture et ne peut réinfecter que les cellules réceptrices à ce moment précis. Toutefois, la pertinence *in vivo* de ce mécanisme est inconnue. En effet, le virus doit échapper au système immunitaire lors de sa libération des cellules, ce qui ne pourrait s'envisager que par la sélection de mutants échappant à la réponse humorale (variabilité antigénique) entre chaque libération. Il semblerait que cette technique de persistance soit utilisée *in vivo* chez les souris par le virus élevant la lactate déshydrogénase (virus LDH). Ce virus se réplique presque exclusivement dans une sous population macrophagique, et persiste dans les cellules permissives nouvellement synthétisées. La réponse immunitaire spécifique, bien que présente, est incapable de contrôler l'infection. Le mécanisme exact permettant au virus LDH d'échapper au système immunitaire est mal connu.⁶

Pour survivre dans les cellules de l'hôte, le virus doit, outre diminuer sa virulence, éviter la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire. En effet, la seule atténuation de la virulence n'est pas suffisante pour permettre la persistance *in vivo*.¹⁰⁹

1.3.2) Maintenir la persistance : déjouer le système immunitaire

1.3.2.1) Entraîner une immunosuppression

La diminution des défenses immunitaires permet au virus de pouvoir survivre dans l'organisme de son hôte. Mais cela peut également lui permettre d'initier la persistance virale en lui donnant un léger avantage sur le système immunitaire. Les cinétiques différentielles de la réponse immunitaire antivirale et de la réplication virale sont en effet très importantes pour le devenir de l'infection.^{47, 51, 103, 130} Un grand nombre de virus à ARN sont capables d'infecter les cellules des lignées lymphocytaires,^{40, 114, 145} et/ou monocytaires.^{57, 63, 71, 145, 160} Ces infections ont été observées à la fois *in vitro* et *in vivo*, et dans certains cas, une préactivation des cellules immunitaires permet une meilleure réceptivité des cellules au virus.⁶⁶ Les VRSB et VRSH sont également capables de ce type d'infections, et nous développerons ce phénomène lors de la discussion. Dans de nombreux cas, les virus qui se répliquent dans des cellules immunitaires entraînent une immunosuppression (transitoire ou permanente).^{92, 114, 145} Les mécanismes qui aboutissent à cette perturbation de la réponse immunitaire sont nombreux. Le virus peut détruire les cellules immunitaires, perturber les fonctions des cellules spécialisées dans la présentation antigénique, empêcher la prolifération et/ou l'activation des lymphocytes T, et interagir avec les cytokines, afin de modifier à son avantage la réponse immunitaire. Très souvent, l'immunosuppression induite par un virus découle de plusieurs de ces facteurs, puisque tous sont plus ou moins liés. Les virus trouveraient également un autre avantage à infecter les cellules immunitaires. En tirant profit de la mobilité de ces cellules, ils pourraient ainsi être disséminés dans l'organisme.^{57, 91} De plus, les virus pourraient profiter des étroits contacts entre les différentes cellules immunitaires pour transmettre l'infection de l'une à l'autre.^{72, 160}

1.3.2.1.1) Détruire les cellules de l'immunité

Cette destruction peut s'opérer de deux manières. Tout d'abord, le virus peut infecter la cellule, et la détruire directement. L'immunosuppression ne peut s'établir que si la réplication du virus dépasse les capacités de multiplication et de destruction des cellules immunitaires.¹¹⁷ Dans ce cas, le virus est très virulent et donc peu à même de persister. Plus fréquemment, lors de l'infection virale, les cellules expriment les épitopes viraux via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) I. Elles sont alors reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de ce virus, et détruites. C'est notamment le cas du LCMV qui infectent les

cellules dendritiques et dendritiques interdigitées, les macrophages et les lymphocytes T (LT) CD4⁺. Ce mécanisme permet notamment au LCMV de se prémunir contre les anticorps neutralisants spécifiquement dirigés contre lui. Le LCMV détruit spécifiquement les lymphocytes B. Le virus pénètre dans ces lymphocytes en se servant des Ig ancrées dans leur membrane comme récepteurs, les infecte et ainsi entraîne leur destruction par l'intermédiaire des LTc.¹⁸³

1.3.2.1.2) Infecter les cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules dendritiques sont des cellules spécialisées dans la présentation antigénique, et responsables, au moins chez l'homme et la souris, d'une forte activation des lymphocytes T et de leur prolifération.^{66, 90, 155} Infecter ces cellules et les détruire ou dérégler leurs fonctions peut donc permettre à un virus de déstabiliser la réponse immunitaire. L'infection des cellules dendritiques a été prouvée notamment pour le LCMV. L'intensité de la réplication de ce virus dans les cellules dendritiques dépend alors des souches virales. Il apparaît que les variants capables d'une infection vigoureuse sont plus à même d'établir une persistance.¹⁵⁵

L'infection des cellules présentatrices d'antigènes peut avoir de lourds retentissement sur la qualité de la réponse immunitaire, pouvant aller jusqu'à une immunosuppression. Récemment, de tels mécanismes ont été mis en évidence pour le virus de la rougeole.^{17, 72} Les cellules dendritiques supportent la réplication virale, et le taux de libération de virions est augmenté lors de contact et d'interactions entre les cellules dendritiques et les cellules T. Il s'ensuit alors l'apoptose de certaines cellules dendritiques et de lymphocytes T. La mort de ces cellules est soit directement induite par le virus, soit indirectement, sans infection virale détectable.⁶⁶ Mais la mort des cellules T n'est pas seule responsable de l'immunosuppression induite par le virus de la rougeole. En effet, il apparaît également que les cellules dendritiques ne sont plus capables de jouer leur rôle de cellules stimulatrices.⁷² Peu de cellules dendritiques infectées sont nécessaires pour bloquer la prolifération des lymphocytes T, et cette inhibition a lieu même si la production de virus infectieux est inactivée par les UV. Le contact d'une cellule présentatrice d'antigènes exprimant à sa surface les glycoprotéines virales de fusion (F) et d'hémagglutination (H) avec les lymphocytes T entraînerait la transmission d'un signal transmembranaire qui inhiberait la prolifération des lymphocytes T.^{66, 72, 126} Les lymphocytes ne sont donc pas tous détruits, mais certains restent anergiques suite à un arrêt de leur cycle de différenciation.⁹⁰ La découverte dernièrement d'un nouveau récepteur pour le virus de la rougeole laisse apparaître une autre possibilité. La glycoprotéine H se lie en effet au récepteur CDw150, présent sur les lymphocytes B et T et les cellules dendritiques, suite à leur

activation. Le CDw150 costimulerait la prolifération lymphocytaire, la synthèse d'immunoglobulines (Ig) et la production d'interféron γ (INF γ). La liaison de la glycoprotéine H à ce récepteur inhiberait ces effets⁸¹.

1.3.2.1.3) Inhiber la prolifération des lymphocytes T ou entraîner leur suppression

La persistance du LCMV chez des adultes immunocompétents est directement liée à la vitesse de propagation du virus (dépendant de la souche virale, de la dose et de la voie de l'inoculation) et à la capacité de l'hôte d'y opposer une réponse en LT cytotoxiques (LTc) spécifiques efficace (rapidité et quantité).^{119, 130} L'infection par le LCMV entraîne l'activation de la réponse spécifique en LT CD8⁺. Si l'infection est réalisée avec une souche peu invasive, se répliquant lentement, la réponse immunitaire en LT CD8⁺ contrôle et élimine le virus. Mais, lorsque les souris sont inoculées avec une souche de LCMV se répliquant rapidement et produisant une grande quantité de virus (souche Docile ou Cl-13 par exemple), on observe un développement très intense des LT CD8⁺, suivi ensuite soit de leur inactivation par anergie, soit de leur suppression. Ce phénomène est appelé épuisement clonal.¹³⁰ Les LT CD8⁺ anergiques sont incapables de remplir leurs fonctions (élimination des cellules infectées et production de cytokines), mais portent les marqueurs d'activation attestant de leur contact récent avec un épitope (marqueur de l'engagement du TCR, CD69).¹⁸² La cause de l'inactivation par anergie ou élimination des LT CD8⁺ n'est pas totalement connue. Plusieurs hypothèses sont envisageables. La destruction des cellules présentatrices d'antigènes « professionnelles » suite à l'infection virale imposerait la présentation des Ag par des cellules « non professionnelles » dépourvues de facteurs de costimulation. Or, en l'absence de certains facteurs de costimulation, les LT subissent une activation incomplète qui aboutit à leur anergie.¹⁸³ L'infection chronique des cellules présentatrices d'antigènes pourrait dérégler leur production de cytokines, certaines étant nécessaires à l'activation des LT et d'autres au maintien de la survie des LT activés.¹³⁰ L'anergie et/ou l'élimination des LT CD8⁺ est fonction de la spécificité des épitopes reconnus par ces cellules. Ainsi, les LTc reconnaissant l'épitope NP₃₉₆₋₄₀₆ sont plus sensibles à l'élimination que ceux reconnaissant l'épitope GP₂₇₆₋₂₈₆. L'interaction entre le TCR et le complexe peptide/CMH peut aboutir à différents mécanismes d'activation (activation, anergie ou élimination), en fonction de l'affinité et du taux de dissociation de cette interaction. Le devenir des LT CD8⁺ spécifiques serait donc en partie dépendant du programme d'activation induit par l'engagement de leur TCR. Un

scénario d'atteinte spécifique de l'efficacité des LT CD4⁺ a été démontré, identique mais plus tardif.¹³¹

Lors de stimulation prolongée avec un antigène (lorsque celui-ci n'a pas été éliminé) les LT enclenchent un mécanisme actif de mort par activation (AICD : activated induced cell death) faisant intervenir les molécules de la famille du TNF, et aboutissant à leur apoptose. *In vivo*, il a été prouvé que la stimulation continue des cellules immunitaires avec un antigène (Ag) entraînait la génération de cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ anergiques, qui sont incapables de proliférer et de développer leurs fonctions. En revanche, ces cellules sont capables de produire de l'interleukine 10²¹, cytokine aux nombreuses fonctions immunoinhibitrices.¹⁴⁴

Le VHC crée très fréquemment des infections persistantes, et a la capacité d'induire chez son hôte une immunosuppression. Ce virus produit une protéine, la protéine de core. L'expression de cette protéine par un virus de la vaccine recombinant a diminué considérablement la génération de LTc spécifiques du virus de la vaccine chez la souris.¹⁰² Le mécanisme exact qui permet cette immunosuppression n'est pas connu. Cette protéine de core peut se lier à la queue cytoplasmique des molécules Fas, augmentant la sensibilité des LT à l'apoptose.¹¹⁷ Récemment, il a été montré que cette protéine peut se lier à un récepteur de la molécule gC1q du complément. Ce récepteur est fortement exprimé à la surface des cellules mononucléées et lymphoïdes. La molécule gC1q exerçant une activité immunomodulatrice, l'interaction de la protéine de core avec le récepteur de gC1q pourrait ainsi être responsable de la suppression de la réponse en LTc.⁹⁶

1.3.2.1.4) La tolérance immunitaire

Le moyen le plus efficace pour persister et inhiber la réponse immunitaire spécifique antivirale est certainement la tolérance immunitaire. Pour parvenir à cet état de tolérance, le virus doit infecter son hôte durant la phase de sélection des lymphocytes dans le thymus. Les antigènes viraux passent alors pour des protéines du soi. Le moment d'infection varie selon les espèces. Ainsi, des souris infectées par le virus du LCMV à la naissance ou *in utero* deviennent porteuses tout au long de leur vie, et le virus envahit tout l'animal. Chez ces animaux est observée une absence de LTc spécifiques du LCMV. Cependant, des souris porteuses de LCMV ont été « purgées » du virus par transfert de LTc spécifiques issus de souris immunisées contre le LCMV. Suite à l'éradication du virus, elles ont alors pu mettre en place leur propre réponse immunitaire cellulaire. La persistance des antigènes est donc nécessaire au maintien de l'état de tolérance.⁸⁶

1.3.2.1.5) Interaction avec les cytokines immunorégulatrices

Les cytokines jouent un rôle fondamental dans l'orchestration de la lutte antivirale. Certaines cytokines permettent de stimuler la réponse immunitaire à médiation cellulaire (INF γ , interleukine (IL)-12, IL-2), d'autres l'inhibent (IL-4, IL-10).^{21, 59, 103, 181} Afin de contrôler la réponse immunitaire pour qu'elle leur soit favorable, les virus ont mis au point différentes stratégies pour interagir avec les cytokines. D'une part, les virus peuvent produire des molécules analogues qui vont mimer les cytokines immunosuppressives (ou ils peuvent produire des inhibiteurs de cytokines immunostimulatrices). D'autre part, les virus peuvent dérégler la production de cytokines à sa source, c'est à dire en interagissant avec les cellules immunitaires qui les produisent. Les virus à ARN agissent principalement sur la production des cytokines. En infectant les cellules de l'immunité, les virus les empêchent de produire les cytokines normalement responsables du recrutement et de l'activation d'autres cellules immunitaires. Le cercle vertueux est brisé, et un cercle vicieux peut s'installer. Ainsi la diminution de la production d'IL-2 et d'INF γ lors de l'infection par le VHC serait due à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes par la protéine de core.⁹⁶

Le virus de la rougeole rend les lymphocytes réfractaires à l'IL-2, sans que ces lymphocytes soient directement infectés. L'expression du récepteur à cette interleukine ainsi que la production même d'IL-2 ne sont que très peu affectées durant l'infection. C'est donc la transmission du signal d'activation suite à la fixation de l'IL-2 sur son récepteur qui est inhibée. Le contact d'une cellule, exprimant à sa surface les glycoprotéines F et H sans virus apte à se répliquer, avec un lymphocyte, empêche l'activation de signaux de prolifération et d'activation des lymphocytes T en bloquant l'activation d'une protéine kinase.⁷ En outre, les lymphocytes B et T infectés par le virus de la rougeole produiraient une cytokine antiproliférative qui limiterait l'expansion de ces lymphocytes.⁶⁷

Un autre exemple des interactions virus - cytokines concerne le VHC. La protéine non structurale NS5a du VHC induit la production d'IL-8, chimiotactique pour les LT notamment, et capable d'inhiber l'action de l'INF α *in vitro*.¹³⁸

Le VRS est capable de se répliquer dans les cellules immunitaires (se référer à la discussion). L'infection par le VRSH ou le VRSB diminue la prolifération lymphocytaire normalement induite par la phytohéماغglutinine.⁹² En outre, l'exposition de leucocytes mononucléés au VRSH n'a pas entraîné l'expression de marqueurs de l'activation ou de la prolifération à leur surface (ces marqueurs ont été induits par l'exposition au virus influenza), et les leucocytes sont restés confinés dans les phases G₀/G₁ du cycle cellulaire.¹⁴⁹ Le VRS serait capable

d'inhiber la réponse en LTc spécifiques anti VRS, mais aussi diminuerait la réponse cellulaire non spécifique, vis à vis d'autres pathogènes. Cette inhibition ne serait pas due à l'infection directe des LT, mais à celle des monocytes et/ou macrophages, et serait permise grâce à un facteur soluble.¹¹³ Salkind et al. ont défini cette substance comme ayant une activité inhibitrice de l'IL-1.¹⁴⁹ Le VRSH est en outre capable de stimuler la synthèse du facteur d'activation des plaquettes (PAF) par les macrophages infectés. Or le PAF module la réponse immunitaire et notamment diminue la production d'IL-1. Cependant, les études au sujet de la dérégulation de la réponse en cytokines des macrophages sont assez contradictoires. En effet, le profil de cytokines produites par les macrophages infectés par le VRSH ne semble pas altéré (maintien de la production d'IL-6 et d'IL-1 notamment). Toutefois, la stimulation de la prolifération lymphocytaire par les macrophages infectés est restée modérée.¹⁷⁰ Keles et al. dans une étude menée sur le VRSB ont bien confirmé la suppression de la prolifération lymphocytaire suite à la stimulation par la phytohémagglutinine, mais la cause de cette inhibition n'a pas pu être déterminée. Elle ne semble être due ni à la production de prostaglandines E2 ni à l'inhibition ou au manque d'IL-1 ou d'IL-2.⁹² Une autre alternative pourrait faire intervenir l'IL-10, puisque l'infection des macrophages par le VRSH a induit la production d'IL-10 par ces derniers. Cette cytokine possède de fortes propriétés immunomodulatrices, avec la diminution de production d'autres cytokines (IL-1 α et β , IL-8, IL-12 et TNF α).¹⁴⁴

1.3.2.2) Eviter la reconnaissance des épitopes viraux

Suite à une infection virale, l'organisme élabore une réponse immunitaire spécifique dirigée contre les antigènes viraux. En modifiant ces cibles, le virus peut échapper à la réponse immunitaire. Le taux élevé de mutations des virus à ARN favorise l'évolution des épitopes reconnus par les anticorps neutralisant ou cibles de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les mutations sur les épitopes modifient la reconnaissance des peptides de deux façons : soit en affectant directement un acide aminé au contact de l'Ig ou du TCR/CMH, soit indirectement en modifiant la conformation spatiale du peptide (voire du CMH).¹⁶⁶

1.3.2.2.1) Echapper aux anticorps

L'échappement aux Ac a été observé pour permettre au virus de réinfecter un hôte précédemment immunisé lors d'une primo-infection⁷⁴ (notamment avec les virus Influenza). Dans le cadre de la persistance virale des virus à ARN sans reverse transcriptase, de tels

mécanismes ont été décrits dans des modèles expérimentaux. Lors d'infection par le LCMV, les souris transgéniques dénuées de réponse immunitaire cellulaire et exprimant uniquement un Ac neutralisant dirigé contre l'épitope de la glycoprotéine de surface GPI ont réussi à juguler la virémie. Cependant, la mutation d'un seul acide aminé de l'épitope visé a entraîné la réémergence massive du virus.¹⁵⁴ De même, sur des souris déficientes en LT CD8⁺ et infectées par le LCMV, les anticorps neutralisants polyclonaux naturellement produits par la souris ont conduit à l'arrêt de la virémie. Mais des mutants ont été sélectionnés et ont envahi de nouveau massivement les souris. Les mutations ne portaient que sur quelques acides aminés (1 à 3).³⁴ Dans ce cas, le virus a échappé à une réponse humorale apparemment normale. Ceci a été rendu possible par l'anergie des LT helper (LTh) CD4⁺ spécifiques. L'absence d'une réponse en LTh adéquate au moment de l'échappement viral empêche l'induction d'une nouvelle réponse en anticorps neutralisants contre les variants et leur permet de persister.^{33, 35}

Pour certains virus à ARN (virus de la fièvre aphteuse, VSV), suite à une capacité de variabilité génomique importante, le notion même de souche sauvage est remise en cause, et ce que l'on considérait auparavant comme telle ne serait en fait qu'un mélange de plusieurs mutants dont l'un est majoritaire car plus adapté au milieu proposé.⁴⁹ Ainsi, lors d'infection par le VHC, de multiples variants comprenant des séquences nucléotidiques différentes persistent ensemble chez le même hôte. Les Ac neutralisants sont spécifiques d'un variant et ainsi sélectionnent les variants résistants. De nouveaux anticorps sont produits, mais d'autres variants sont sélectionnés et ainsi de suite, ce qui permet au virus de persister.^{55, 56}

Une telle aptitude à éviter la réponse immunitaire humorale a été également constatée pour le VRSH. Rueda et al. ont sélectionné *in vitro* des variants de VRSH résistants à des anticorps. Cinq Acm différents, tous dirigés contre la protéine G, ont été utilisés. La sélection d'un mutant s'est faite à l'aide d'un seul Acm. Plusieurs sélections ont été réalisées, et 7 mutants différents ont été étudiés. Seul un mutant pouvait encore être neutralisé par les Acm n'ayant pas servi à le sélectionner. Tous les autres ont hérité d'une protection croisée, évitant la neutralisation non seulement par l'Acm ayant servi à le sélectionner, mais également par tous les autres Acm, suite à un changement antigénique drastique. Cette variabilité antigénique a découlé d'une mutation du gène G, qui a eu pour conséquence l'incorporation d'un codon stop. La traduction de l'ARNm de G a donc abouti à une protéine G tronquée de 11 à 42 acides aminés. De plus, il y a eu perte de nombreux sites permettant une glycosylation. Ces modifications n'ont pas altéré l'infectiosité du VRSH.¹⁴⁸

1.3.2.2.2) Echapper à la réponse immunitaire spécifique cellulaire

Les variations antigéniques ont également été décrites pour les épitopes T. Cette sélection nécessite systématiquement une forte pression immunitaire. Ainsi, sur des souris transgéniques dont les LTc n'expriment qu'un seul TCR dirigé contre l'épitope de la nucléoprotéine du virus Influenza A (NP₃₆₆₋₃₇₄), le virus a d'abord été ramené sous le seuil de détectabilité, avant de réémerger et de persister. Des mutations observées sur l'épitope NP₃₆₆₋₃₇₄ ont été responsables de cette persistance. Les mutations ont été très diverses, selon les variants persistants.¹⁴⁰ De telles modifications antigéniques ont également été prouvées pour le CMH II et les LT CD4⁺.³⁶

Lors de reconnaissance du peptide par le TCR, les modifications des épitopes ont une autre conséquence. Elles n'aboutissent pas forcément à une non reconnaissance absolue de ce peptide par le TCR, mais souvent modifient simplement l'affinité de la liaison CMH/peptide/TCR. Ces peptides dont l'affinité pour le TCR est modifiée sont appelés des peptides ligands altérés (APL). Or l'intensité du message d'activation des lymphocytes T serait directement liée à la cinétique de la liaison CMH/peptide/TCR, qui dépend directement de l'affinité et de la demi-vie du complexe. Lorsque l'affinité du peptide pour le TCR est forte, les lymphocytes sont activés. A l'opposé, lorsque l'affinité du peptide pour le TCR est faible, les lymphocytes peuvent être inhibés (avec tous les stades intermédiaires que cela suppose).¹⁶⁶ Ainsi, certains variants générés dans les études précédemment citées sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T.

1.3.2.3) Contre la présentation antigénique

Une autre stratégie pour persister et éviter d'être reconnu consiste à ne pas montrer les antigènes viraux à la surface des cellules infectées. Les lymphocytes ne reconnaissent les cellules infectées qu'au delà d'un certain seuil d'expression des complexes peptides/CMH à leur surface. Il faut à peu près une centaine de ces complexes pour entraîner la destruction cellulaire et/ou l'activation des lymphocytes. Donc, pour éviter la reconnaissance par les cellules immunitaires, les virus peuvent mettre en place deux tactiques : moins exprimer leur gènes, et ainsi produire moins d'antigène, et/ou éviter le transport de ces antigènes jusqu'à la surface cellulaire.

1.3.2.3.1) Diminuer l'expression des gènes viraux

En diminuant l'expression des gènes viraux, les virus évitent la présentation des épitopes. La meilleure méthode pour ce faire consiste à intégrer le génome viral à celui de l'hôte dans l'attente d'une transcription/réplication ultérieure (certains virus à ADN et rétrovirus).³ Il semblerait que la présence de reverse transcriptase endogène permette au génome du LCMV de persister sous forme d'ADN. Cette découverte très spécifique du couple virus/facteurs cellulaires, laisse apparaître de nouvelles possibilités de persistance pour les virus à ARN.⁹⁷ Dans la plupart des cas, les virus à ARN répriment l'expression de leurs gènes, selon trois possibilités : diminuer la réplication virale, la transcription du génome, ou enfin réduire la traduction des ARNm.

Les virus DI interfèrent avec la réplication virale. Cette interférence pourrait être liée à un simple phénomène de compétition au niveau de la machinerie de réplication/transcription du virus. Cependant, certaines modifications du génome peuvent permettre la production de nouvelles protéines virales. Certaines de ces protéines pourraient inhiber la réplication virale. Ainsi suite à la persistance *in vitro* du virus Sendai, il est apparu des virus DI produisant une protéine P tronquée. Cette protéine se lie à la nucléocapside et empêche ainsi l'action de l'ARN polymérase.⁶⁹

Les virus à ARN peuvent également coder naturellement pour des protéines capables de réguler la réplication virale. C'est le cas notamment du virus Sendai, dont le gène P peut sous certaines conditions coder pour 8 protéines différentes. Deux d'entre elles inhibent la réplication virale, et pourraient limiter la transcription.⁴⁰

La diminution de la traduction des ARNm sans altération de la transcription a également été décrite pour le virus de la maladie de Carré, sans que le mécanisme moléculaire en soit élucidé.¹²³

Certains anticorps produits par l'organisme sembleraient également favoriser la persistance virale : en se fixant aux antigènes présents à la surface des cellules infectées, ils exerceraient par un mécanisme inconnu un rétrocontrôle négatif sur la transcription et/ou la traduction de tous les autres gènes viraux.^{107, 142}

Un autre mécanisme concernant les protéines virales a été mis en évidence. Suite à des mutations, les protéines produites sont instables et dégradées rapidement, avant leur présentation à la surface cellulaire. Ce phénomène a été constaté notamment pour le virus de la rougeole lors d'infection persistante. Les principales mutations concernent la protéine M^{25, 28}, la protéine de fusion F et l'hémagglutinine.^{8, 29} Les mutations rencontrées seraient dues au

remplacement de l'adénosine par de l'inosine (aboutissant à terme à l'incorporation de cytosine) lors de la séparation de deux brins d'ARN complémentaires accidentellement liés.^{14, 15, 27, 101} Ces mutations semblent accroître l'instabilité des protéines. Une autre conséquence des mutations peut être l'incapacité des protéines modifiées de se lier à la nucléocapside, évitant ainsi la formation et l'excrétion de virions.^{78, 147, 153} L'intérêt éventuel de ce mécanisme n'est pas clairement élucidé, et on s'interroge encore sur son rôle dans l'établissement ou le maintien de la persistance. Cette technique pourrait favoriser la transmission du virus de cellule en cellule suite à des fusions, voyageant ainsi à l'abri du système immunitaire.

Certains virus à ARN seraient susceptibles de persister en restant quiescents à l'intérieur des cellules hôtes. Dans une étude sur le virus Sindbis, le génome persiste sous une forme non productive, caractérisée par une quantité de protéines virales sous le seuil de détectabilité.¹⁰⁷ Plus curieusement, Fearn et al. ont décrit la persistance du paramyxovirus simien 5 sous la forme d'inclusions cytoplasmiques. Les glycoprotéines de l'enveloppe ne sont plus détectables dans ces inclusions. Le virus semblerait persister sous une forme inactive, mais capable de se répliquer sous certaines conditions.⁶⁰ Le paramyxovirus sendai-6/94 est également capable de persister de façon chronique *in vitro* comme *in vivo* sous une forme latente : l'ARN viral persiste longuement (près d'1 an) sans que les protéines virales puissent être détectées.⁹⁸

Lors de persistance *in vitro* du VRSH sur une lignée cellulaire BCH4 de fibroblastes de souris, l'expression des glycoprotéines virales de surface F et G est diminuée par rapport aux protéines internes. La quantité d'ARNm des différentes protéines virales étant identique, il semblerait que la régulation de la synthèse de F et G soit post-transcriptionnelle. Dans cette même étude, la transcription du génome est apparue 5 fois moins importante dans la lignée cellulaire associée à la persistance que lors d'infection lytique. Le virus persistant reste toujours capable de provoquer une infection lytique sur des cellules Hep-2, la diminution des protéines virales serait donc liée aux interactions entre le VRSH et les cellules BCH4.¹¹¹ Il serait intéressant d'évaluer la production des protéines lors de la persistance d'autres cellules permissives comme les macrophages alvéolaires.

Le VRS possède en outre un autre moyen de limiter la réplication et/ou la transcription de son ARN génomique. En effet, les deux derniers gènes du VRS se chevauchent : la séquence d'initiation du gène L est comprise dans le gène 22K, et la séquence stop du gène 22K est incluse dans le gène L. Ce chevauchement pourrait permettre la régulation de la transcription de L en fonction de différents facteurs cellulaires. Or la protéine L est l'unité principale de

l'ARN polymérase/répliqueuse. Ainsi, toute diminution de la production de L pourrait affecter le niveau de transcription et/ ou de répliqueuse du génome.³⁷

1.3.2.3.2) Interagir avec la voie de présentation des antigènes via les CMH

Les virus ont établi de nombreux moyens pour éviter ou au moins réduire la présentation antigénique par les CMH, et ainsi éviter la reconnaissance des cellules infectées par les LTh ou inhiber la réponse des LTh. Les interactions peuvent avoir lieu aux différentes étapes de présentation des épitopes par le CMH.^{19, 52, 77} Les virus sont ainsi capables :

- d'affecter l'assemblage des sous unités des CMH et induire ainsi leur dégradation
- d'empêcher le clivage des antigènes par le protéasome
- d'empêcher le transport des épitopes par le TAP, transporteur associé à la présentation antigénique
- d'empêcher la migration du CMH I dans le réticulum endoplasmique et/ou l'appareil de Golgi
- de coder pour un analogue du CMH I pour éviter la reconnaissance des cellules par les natural killer
- d'empêcher l'acidification des endosomes nécessaire à la maturation du CMH II

La plupart de ces mécanismes nécessitent que les virus codent pour des molécules spécialisées, acquises certainement suite à leur évolution dans le génome de leur hôte.³⁰ Ces mécanismes sont donc observés principalement chez les virus à ADN ou les rétrovirus, dont la transcription est la plupart du temps intranucléaire. Certains virus à ARN ont toutefois développé des moyens permettant de ralentir l'expression des CMH. Ainsi, le poliovirus code pour une protéine non structurale, la protéine 3A, capable d'inhiber en partie l'appareil sécrétoire cellulaire en interférant avec la membrane du réticulum endoplasmique. Le transport des protéines entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi est considérablement ralenti (d'un facteur 5). Le CMH I empruntant cette voie pour migrer à la surface cellulaire, la présentation antigénique est altérée lors d'infection par le poliovirus.⁴⁵

Le système nerveux central, et les neurones tout particulièrement, sont un lieu de prédilection pour la persistance des virus à ARN.¹⁰⁰ Joly et al. ont montré que, suite à une infection par le LCMV, les neurones expriment peu les molécules du CMH I, qui restent en dessous du seuil

de détection par les LTc. Ce mécanisme permettrait de protéger les neurones, cellules indispensables mais également irremplaçables et incapables de se multiplier. Cependant, l'expression du CMH I dans ces cellules peut être augmentée, notamment par l'INF γ .⁸⁸ Il semblerait en outre que l'expression du CMH I soit directement liée à la viabilité des neurones. L'activité électrique des neurones viables exercerait une inhibition de l'induction du CMH I par l'INF γ .¹²⁴ Par ailleurs, l'expression du CMH I suite à l'infection d'astrocytes *in vitro* par la souche JHM du virus de l'hépatite de la souris, un coronavirus, est sévèrement diminuée, mais le mécanisme reste inconnu.³⁹ Dans une étude portant sur les SSPE, il est apparu que seule une petite fraction des neurones coexprimaient le CMH I et les protéines du virus de la rougeole.⁷⁰ Ni la cause ni la conséquence de cet état ne sont connues, mais cela pourrait permettre aux neurones infectés d'échapper aux LTc.

L'infection de neurones par le virus de la rougeole empêche l'activation du facteur nucléaire NF- κ B, en évitant la dégradation de l'inhibiteur de ce facteur, l'I κ B α . Le NF- κ B est impliqué dans l'augmentation de l'expression du gène de l'INF β . En augmentant la production d'INF β , le NF- κ B accroît indirectement l'expression des molécules du CMH I. Cette inhibition du NF- κ B est spécifique des neurones, et permettrait aux cellules infectées d'échapper à la reconnaissance par les LTc, en diminuant l'expression des molécules du CMH I, favorisant ainsi la persistance du virus de la rougeole dans les neurones.⁴⁸

D'autres virus à ARN (Influenza A, LCMV notamment) exploitent leur haut potentiel de mutation pour éviter que leurs épitopes ne soient pris en charge par les CMH. Certaines mutations des épitopes peuvent modifier ces derniers de telle sorte qu'ils ne se fixent plus au CMH I.^{36, 140}

1.3.2.4) Empêcher la destruction du virus ou de la cellule

Un des moyens envisageables pour contrer la réponse immunitaire antivirale serait de bloquer la destruction du virus ou de la cellule infectée. Plusieurs cytokines possèdent des propriétés antivirales, notamment les interférons et les TNF. Certains virus ont développé des résistances à ces cytokines, en particuliers aux interférons. Ainsi, certains variants du VHC sont résistants à l'action de l'INF α .^{55, 56} Une lignée cellulaire transgénique contenant le génome du VHC a été utilisée pour évaluer l'effet de l'expression des protéines du VHC sur la transmission du signal d'activation induit par l'INF α . Une des cascades de réactions induites par l'INF α est appelée la voie Jak-STAT, mettant en jeu différentes protéines tyrosines kinases et aboutissant à l'interaction de molécules (dont le ISGF-3) avec l'ADN cellulaire afin de stimuler

l'expression de certains gènes. L'expression des protéines du VHC a inhibé la fixation de l'ISGF-3 à l'ADN et l'augmentation de l'expression des gènes normalement induite par l'INF α .⁷⁶ De plus, l'INF α induit la synthèse d'une protéine kinase, la PKR. Cette protéine est en partie responsable de l'activité antivirale de l'INF α en inhibant la traduction des ARNm suite à la phosphorylation du facteur eIF-2 α . Dans des cellules HeLa transgéniques, l'expression de la protéine non structurale NS5A du VHC a empêché le blocage imposé par la PKR sur la traduction des ARNm durant une infection virale.⁶⁸

Plusieurs variants du virus de la rougeole sont également résistants aux interférons. Le mécanisme moléculaire de cette résistance n'est pas connu. Ces variants ne sont cependant pas tous capables de se répliquer parfaitement en présence d'interféron. Certains développent des états de croissance limitée, sans effet cytopathique. Carrigan et Knox ont alors proposé la théorie suivante : l'interféron servirait dans la sélection d'un variant viral capable de produire une infection limitée du système nerveux. Ce variant, sous l'effet de l'interféron, exprimerait peu ses antigènes. Le maintien d'une certaine concentration d'interféron assurerait la persistance virale. L'interféron résistance servirait ici à la fois dans l'établissement et le maintien de la persistance virale.²⁴ La résistance à l'INF β et sa production cellulaire ont été proposées lors de la persistance du virus coxsackie B dans des cellules endothéliales vasculaires humaines. La production d'interféron protégerait les cellules et permettrait la persistance du virus.

Lorsque la cellule virale infectée a été repéré par les cellules immunitaires, sa destruction a lieu. Cette destruction fait intervenir deux mécanismes principaux : la libération dans le cytoplasme de la cellule infectée d'enzymes (perforine et granzymes), et d'autre part une voie nécessitant la liaison du récepteur Fas de la cellule à détruire et le Fas ligand de la cellule tueuse.¹²⁰ Ces deux voies importantes pourraient être dérégées par les virus. En effet, la résistance à la perforine de certaines cellules infectées a déjà été relatée.⁸⁹

Lorsqu'une cellule est infectée par un virus, le dérèglement de ses fonctions et la présence de molécules étrangères (ARN double brin notamment) peut déclencher son apoptose. Or le maintien de la viabilité cellulaire est une condition importante de la persistance virale. Des virus sont capables de ralentir ou inhiber cette mort cellulaire. Cette capacité a été démontrée pour le VHC. La protéine NS5a peut en effet dérégler le programme de mort cellulaire en inhibant la PKR.⁶⁸

2) Etude expérimentale

2.1) Matériel et méthode

2.1.1) Cellules et virus

La souche virale utilisée pour l'expérience (A2 Gelfi) est une souche sauvage qui a été isolée en France en 1994 lors d'une épidémie sévère de VRSB touchant à la fois les veaux et les adultes. Cette souche a été cultivée sur une lignée de cellules de cornets nasaux de bovins (Bovine Turbinate) (cellules BT) (ATCC nb CRL 1390) dans le milieu de culture suivant (MC):

- milieu essentiel minimum avec des sels de EARLE et de la L-glutamine (MEM) (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France)
- acides aminés non essentiels 1% (Gibco BRL)
- pénicilline 100 UI/ml (Gibco BRL)
- dihydrostreptomycine 100 µg/ml (Gibco BRL)

Ce milieu de culture a été supplémenté avec 3% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco BRL). Le sixième passage a été stocké à – 80°C. Le virus a été titré après cinq jours d'incubation dans des cellules BT. Le titre était de $1,25 \times 10^6$ unités formant des syncytia. (UFS)/ml. Cette souche ainsi stockée a été utilisée pour l'inoculation des veaux, ainsi qu'en tant que témoin positif pour la PCR et l'isolement sur culture cellulaire. L'absence de virus de la diarrhée virale bovine dans les échantillons a été déterminée par RT-PCR.⁷³

2.1.2) Les animaux

2.1.2.1) Animaux d'expérimentation

Vingt-cinq veaux Prim Holstein âgés de 6 à 12 semaines ont été élevés en milieu protégé. Ces veaux ont été parqués dans des stabulations spécifiques, en fonction de leur groupe expérimental. Le personnel d'expérimentation et d'entretien était tenu de se laver les mains, de porter des surbottes et une blouse dont l'usage était strictement réservé à la zone d'expérimentation.

La prise de colostrum et le statut en anticorps anti-VRSB sont répertoriés dans le tableau 2. Aucun des veaux n'était infecté permanent immunotolérant vis à vis du BVDV, comme le

montre les résultats négatifs de la détection de l'Ag p80-125 (Serelisa BVDV-BD, Synbiotics, Lyon, France) pratiquée juste après la naissance et avant la prise de colostrum.

Vingt-et-un veaux ont été séparés en quatre groupes et inoculés avec du VRSB. Les quatre autres veaux ont servi de témoins négatifs et ont été inoculés avec des cellules BT indemnes de VRSB. Tous les veaux ont été inoculés sous anesthésie générale (kétamine 3mg/kg, Imalgène®, Rhône Mérieux, Lyon, France). Dix millilitres du virus stocké ou de cellules BT indemnes de VRSB (pour les témoins négatifs) ont été inoculés aux veaux trois jours de suite par instillation intra nasale et injection endotrachéale grâce à un endoscope.

Un examen clinique standard (température rectale, fréquence cardiaque et respiratoire, auscultation cardio-pulmonaire) a été effectué chaque jour, depuis 2 jours avant l'inoculation jusqu'à l'euthanasie des animaux. A l'aide de ces données, un score clinique a été calculé.⁵⁸

2.1.2.2) Animaux de terrain

Huit animaux d'élevage âgés de quatre à six mois atteints de signes respiratoires sévères compatibles avec une atteinte par le VRSB ont été également utilisés pour le dépistage d'une éventuelle persistance. Les nœuds lymphatiques (NL) trachéobronchiques et médiastinaux, ainsi que des échantillons de poumons ont été prélevés sur ces veaux dans les six à trente heures suivant leur mort naturelle. Tous ces échantillons ont été répertoriés et étudiés de la même manière que pour les veaux d'expérience.

2.1.3) Les prélèvements

2.1.3.1) Prélèvements de tissus

Suite à une anesthésie générale (Pentobarbital sodique, Sanofi, Libourne, France, 20 mg/kg IV) et à une exsanguination, des échantillons de tissus d'approximativement 100 mm³ ont été prélevés moins de trente minutes après la mort avec des instruments de dissection dépourvus d'ARNase. Les échantillons ont alors été congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C dans 1 ml de réactif Trizol™ (phénol et isothiocyanate de guanidine, Gibco BRL) pour la pratique d'une RT-PCR, ou dans 5 ml de MC pour les cultures cellulaires. Un échantillon de chaque organe a été fixé dans du formol à 10% tamponné pour les études d'histopathologie et d'immunocytologie. Les organes utilisés pour la coculture ont été conservés dans la glace jusqu'à dissociation.

2.1.3.2) Lavages bronchoalvéolaires

Les lavages bronchoalvéolaires (LBA) ont été effectués sous anesthésie générale (Kétamine, 3mg/kg, Imalgène®, Merial), à l'aide d'endoscopes (GIF-Q, Olympus, Paris, France) décontaminés après chaque lavage. Les voies respiratoires ont été lavées trois fois avec 50 ml du mélange suivant:

- MEM
- acides aminés non essentiels 1% (Gibco BRL)
- gentamicine 200 mg/ml(Gibco BRL)
- enrofloxacin 0,2µg/ml(Baytril 5% injectable ND, Bayer, Puteaux, France)
- fungizone 2,5 µg/ml (Gibco BRL)

Les cellules issues des LBA pratiqués sur des animaux de terrain ont été stockées dans 95% de SVF et 5% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et placées à -80°C jusqu'à la RT-PCR ou la culture cellulaire, qui ont été pratiquées dans le mois suivant le prélèvement. Les cellules issues des LBA pratiqués sur les animaux d'expérimentation ont été préservées dans du Trizol™ (Gibco BRL) à -80°C jusqu'à l'analyse par la RT-PCR. Pour l'isolement viral par culture cellulaire, les cellules ont été conservées à +4°C et ensemencées sur des cellules BT moins de 2 heures après le prélèvement.

2.1.3.3) Sang

Des échantillons de sang de 5 ml ont été prélevés sur des tubes EDTA pour la RT-PCR et sur des tubes héparinés (Venoject ND, Masson, Cestas, France) pour l'isolement du virus sur culture cellulaire. Les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) issues de 3 ml de ces échantillons ont été purifiées avec le système Accuspin Histopaque (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Les CMSP utilisées pour l'isolement du virus sur culture cellulaire ont été remises en suspension dans 1 ml de MC, et, après un cycle de congélation (-80°C) décongélation, ont été réensemencées sur des cellules BT. Les CMSP utilisées pour la PCR ont été conservées dans 1 ml de réactif Trizol™ (Gibco BRL) à - 80°C.

Le calendrier des prélèvements est rapporté dans le tableau 2.

Tableau 2 : Protocole de l'infection expérimentale de 21 veaux par le VRSB

Groupes	Veaux					Echantillons		
	n° ⁽¹⁾	colostrum ⁽²⁾	Statut en Ac anti-VRSB ⁽³⁾		jour de l'euthanasie	LBA ⁽⁴⁾	sang ⁽⁵⁾	tissu ⁽⁶⁾
			J0	J18				
1	2	+	-	+	19	Δ	P	nlp,r,th,to,n,c
	6	+	-	+	19	Δ	P	nlp,r,th,to,n,c
	3	+	-	+	30	Δ	P	nlp,r,th,to,n,c
	5	+	-	+	30	Δ	P	nlp,r,th,to,n,c
	1	+	-	+	36	Δ	P	nlp,r,th,to,n,c
	4	+	-	+	36	Δ	P	nlp,r,th,to,n,c
2	9	+	-	+	19	σ	P	nlp,r,th,to,n,c
	8	+	-	+	30	σ	P	nlp,r,th,to,n,c
	7	+	-	+	36	σ	P	nlp,r,th,to,n,c
3	26	-	-	+	18	Ψ	NP	nlp, nle
	27	-	-	+	18	Ψ	NP	nlp, nle
	28	-	-	+	18	Ψ	NP	nlp, nle
	29	-	-	+	18	Ψ	NP	nlp, nle
	30	-	-	+	18	Ψ	NP	nlp, nle
4	15	+	+	+	50	υ	NP	nlp, l
	17	+	-	+	50	υ	NP	nlp, l
	11	+	-	+	50	υ	NP	nlp, l
	18	+	-	+	71	υ	NP	nlp, l
	10	+	-	+	71	υ	NP	nlp, l
	12	+	+	+	71	υ	NP	nlp, l
5 ⁽⁷⁾	13	+	-	+	71	υ	NP	nlp, l
	A	+	-	-	19	Δ	P	nlp,r,th,to,n,c
	B	+	-	-	30	Δ	P	nlp,r,th,to,n,c
	C	+	-	-	36	Δ	P	nlp,r,th,to,n,c
	D	+	-	-	60	Δ	P	nlp

⁽¹⁾n°= numéro d'identification

⁽²⁾colostrum : + ou - : indique si il y a eu ingestion de colostrum ou non

⁽³⁾statut en Ac (anticorps) anti-VRSB : réalisé par séroneutralisation : J0 : avant l'inoculation
J18 : jour 18 p.i.

⁽⁴⁾LBA: lavage bronchoalvéolaire : LBA : a été réalisé tous les 2 jours entre :

Δ J5 et J19 et le jour de l'euthanasie

Ψ J4 et J18 et le jour de l'euthanasie

σ le jour de l'euthanasie

Pas de LBA réalisé: υ

⁽⁵⁾sang: le sang a été prélevé tous les jours entre J4 et J19 et le jour de l'euthanasie

⁽⁶⁾tissus: nlp: nœuds lymphatiques pulmonaires : nœuds lymphatiques médiastinal et trachéobronchique

r: rate

th: thymus

to: tonsilles pharyngiennes

n: tissus nerveux: cortex cérébral, medulla oblongata, bulbe olfactif, hypophyse et plaque cribiforme

c: coeur: septum interventriculaire et oreillette

nle: nœuds lymphatiques externes: nœuds lymphatiques préscapulaire et pharyngien

p: poumon

⁽⁷⁾5 : veaux témoins

NP = non prélevé

P = prélevé

2.1.4) Séroneutralisation

Des échantillons de sérum prélevés avant l'inoculation des veaux et à J 18 ont été analysés afin de mettre en évidence la présence d'anticorps neutralisants. Cette séroneutralisation a été réalisée sur des cellules BT avec une quantité constante de virus issus de la souche A2 Gelfi, et des dilutions de deux en deux de l'échantillon de sérum.¹³² L'effet cytopathogène a été mis en évidence après 8 jours par un marquage au cristal violet à 0,1%.

2.1.5) Technique PCR

2.1.5.1) Extraction de l'ARN

L'ARN a été extrait des différents échantillons de tissus et de cellules selon une méthode précédemment décrite.¹⁷² En ce qui concerne les tissus, les échantillons ont d'abord été homogénéisés directement dans leur tube de stockage à l'aide d'un homogénéisateur DiAx 600 (Heidolph, Bioblock, Illkirch, France). La fraise de l'homogénéisateur a été remplacée entre chaque échantillon et stérilisée (NaOH 10 min et 30 min à 120°C) avant d'être réutilisée.

Tableau 3 : amorces utilisées pour la transcription réverse et la réaction de polymérisation en chaîne nichée

Gène	Nom de l'amorce	Position*	Séquence 5' → 3'	Taille du produit amplifié
N	N2.1	1-19	ATG GCT CTCA GCA AGG TCA	1034
	N2.2	1034-1013	TCT TGG TTT CTT GGT GTA CCT C	
	N2.3	127-146	CAT CTC AAT AAG TTG TGT GG	731
	N2.4	857-838	TCT ACA ACC TGT TCC ATTT C	
G	VG.1	131-155	CCA CCC TAG CAA TGA TAA CCT TGA C	603
	VG.2	733-712	AGG AGA GGA TGC (T/C)TT GCT GTG G	
	VG.3	302-326	CAT CAA TCC AAA GCA CCA CAC TGT C	371
	VG.4	648-672	GCT AGT TCT GTG GTG GAT TGT TGT C	
F	F2.1	136-157	AGT GCA TTA AGA ACT GGA TGG T	1335
	F2.2	1470-1450	TGC ATC AAA CTC ATC AGA AGG	
	F2.3	433-452	GGA TCT GCT ATT GCA AGT GG	833
	F2.4	1265-1244	CAT TTT GTC TTC CCA TAG CAT G	

*les positions données se rapportent aux régions définies pour les gènes N, F, et G respectivement par 150, 105 et 104

2.1.5.2) Transcription réverse et réaction de polymérisation en chaîne

Plusieurs nRT-PCR ont été utilisées pour détecter l'ARN génomique (ARNg) de la région du gène de la nucléoprotéine et les ARN messagers (ARNm) des gènes de la protéine de fusion

(F), de la glycoprotéine (G) et de la nucléoprotéine (N). Les séquences des amorces et la taille des produits amplifiés sont recensées dans le tableau 2. Les étapes des amplifications ont été réalisées dans le GeneAmp PCR System 480 (Perkin Elmer, Cetus, Roissy-Charles de Gaulle, France).

2.1.5.2.1) ARNg du gène N

Les amorces utilisées pour la RT-PCR-N ont été tirées du programme de ClustalW 1.60 en utilisant un alignement multiple de séquences disponibles de gènes de la nucléoprotéine de plusieurs VRS :

- 3 souches de VRSB (numéro d'accès respectif à la Genbank: L27840, M35076, S40504) :
 - RB-94 isolée en Belgique en 1970
 - A51908 isolée dans le Maryland aux USA en 1975
 - 391.2 isolée en Caroline du Nord, aux USA en 1985
- 1 souche de VRS ovin (numéro d'accès Genbank : U07233)
- 2 souches de VRSH (numéro d'accès Genbank : M11486 et D00390)

Le programme informatique PRIMER version 0,5¹⁰⁸ a été utilisé pour sélectionner les amorces, leur assurant :

- une longueur optimale de 20 nucléotides
- d'être compatibles avec la température d'expérience
- de n'avoir pas plus de 8 bases d'auto complémentarité ou pas plus de 4 bases d'auto complémentarité dans leur portion terminale 3'.

Pour la transcription réverse, 1µl (2pmoles) de l'amorce N2.1 a été mélangé avec 9µl d'eau traitée avec du diéthylpyrocarbonate (eau DEPC) contenant de l'ARN et a été mis à incuber à 68°C pendant 10 minutes, puis à 58°C pendant 10 minutes et enfin refroidi dans de la glace.

Puis y ont été ajoutés :

- 4 µl d'une solution contenant 10mMol de chaque nucléotide
- 1 µl d'ARNsin (40 U) (Proméga, Charbonnières, France)
- 2 µl DTT (0,1 M) (Gibco BRL)
- 4 µl de tampon Superscript TM II (250 mM Tris HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Gibco BRL)
- 1 µl de SuperScript TM II (200 U)(Gibco BRL)

Le tout a été mis à incuber à 42°C pendant 50 minutes. La transcriptase réverse a été ensuite inactivée en portant le tout à 70°C pendant 15 minutes. L'ADNc a été ensuite dilué au

dixième dans de l'eau DEPC. Dix microlitres de cet ADNc dilué ont été mélangés avec 5 µl d'amorce N2.1 (50pmol) et 5 µl d'amorce N2.2, 200 µM de chaque nucléotide triphosphate, 10 mM de Tris HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂ et 2.5 UI de polymérase AmpliTaq Gold polymérase (Perkin Elmer cetus, Roissy-Charles de Gaulle, France), et complétés avec de l'eau DEPC afin d'obtenir un volume final de 100µl. Le premier passage de la PCR a été réalisé dans un GèneAmp PCR System 480 (Perkin Elmer cetus), utilisant le programme suivant :

- 94°C pendant 12 minutes
- 35 cycles (dénaturation à 94°C pendant 60 secondes ; refroidissement 58°C pendant 60 secondes ; élongation :72°C pendant 90 secondes)
- et une élongation finale pendant 10 minutes

Dix microlitres des produits de la PCR ont été dilués 10 fois et utilisés pour faire le deuxième passage de la PCR, avec les mêmes mélanges, mais cette fois en utilisant les amorces N2.3 et N2.4. Cette deuxième PCR a suivi le protocole suivant :

- 94°C pendant 12 minutes
- 35 cycles (dénaturation à 94°C pendant 45 secondes ; refroidissement 49°C pendant 60 secondes ; élongation :72°C pendant 60 secondes)
- une élongation finale pendant 10 minutes

Les produits de la PCR ont été ensuite détectés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% contenant 0,1µg/ml de bromure d'éthidium.

2.1.5.2.2) ARMm des gènes N, F et G

Pour la transcription réverse, 1µl d'OligodT 12-18 (Gibco BRL) a été mélangé avec 9µl d'eau DEPC contenant de l'ARN et a été mis à incuber à 68°C pendant 10 minutes, puis à 58°C pendant 10 minutes et enfin refroidi dans de la glace. Puis y ont été ajoutés :

- 4 µl d'une solution contenant 10mMol de chaque nucléotide triphosphate
- 1 µl d'ARNsin (40 U) (Proméga, Charbonnières, France)
- 2 µl DTT (0,1 M) (Gibco BRL)
- 4 µl de tampon Superscript TM II (250 mM Tris HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Gibco BRL)

- 1 µl de SuperScript TM II (200 U)(Gibco BRL)

Le tout a été mis à incuber à 42°C pendant 60 minutes. La transcriptase réverse a été ensuite inactivée en portant le tout à 70°C pendant 15 minutes.

L'ADNc a été ensuite dilué au dixième dans de l'eau DEPC. Dix microlitres de cet ADNc dilué ont été mélangés avec 5 µl (50pmol) de chaque premier jeu d'amorce (série 1 et 2), 200 µM de chaque nucléotide triphosphate, 10 mM de Tris HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂ et 2.5 UI de polymérase AmpliTaq Gold polymérase (Perkin Elmer cetus, Roissy-Charles de Gaulle, France), et complétés avec de l'eau DEPC afin d'obtenir un volume final de 100µl. Puis, 10 µl des produits de la PCR ont été dilués 10 fois et utilisés pour faire le deuxième passage de la PCR, avec les mêmes mélanges, mais cette fois en utilisant le second jeu d'amorces (série 3 et 4).

Pour détecter l'ARNm de N, le même protocole et les mêmes amorces que ceux utilisés pour détecter l'ARNg de N ont été utilisés.

Pour l'ARNm de G, les jeux d'amorces et les températures d'hybridation utilisés ont été ceux définis dans des expériences précédentes.¹⁸⁰

Les amorces utilisées pour la nRT-PCR du gène F ont été basées sur des séquences connues de F-VRSB (numéro d'accès Genbank D00953, M58350, M82816) et en utilisant le programme informatique PRIMER version 0.5. Le premier passage de la PCR a été réalisé avec le premier jeu d'amorce (F2.1 et F2.2) dans un GèneAmp PCR System 480 (Perkin Elmer cetus), utilisant le programme suivant :

94°C pendant 12 minutes

- 35 cycles (dénaturation à 94°C pendant 60 secondes ; refroidissement 58°C pendant 60 secondes ; élongation :72°C pendant 90 secondes)
- une élongation finale pendant 10 minutes

Dix microlitres des produits de la PCR ont été dilués 10 fois et utilisés pour faire le deuxième passage de la PCR, avec les mêmes mélanges, mais cette fois en utilisant les amorces F2.3 et F2.4. Cette deuxième PCR a suivi le protocole suivant :

- 94°C pendant 12 minutes
- 35 cycles (dénaturation à 94°C pendant 45 secondes ; refroidissement 62°C pendant 60 secondes ; élongation :72°C pendant 60 secondes)
- une élongation finale pendant 10 minutes

Les produits de la PCR ont ensuite été détectés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% contenant 0,1 µg/ml de bromure d'éthidium.

2.1.6) Isolement

2.1.6.1) Culture conventionnelle

Des cellules BT monocouches (cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ dans du MC enrichi en fungizone (2,5 µg/ml)(Gibco BRL)) ont été inoculées avec les différents échantillons (CMSP, cellules des LBA, nœuds lymphatiques pulmonaires après homogénéisation) après un cycle de congélation – décongélation. Ces cultures cellulaires ont été observées tous les jours afin de détecter un éventuel effet cytopathogène (ECP). Lorsque aucun ECP n'a été détecté après 7 jours d'incubation, la culture cellulaire a été congelée puis décongelée, et 1 ml du surnageant a été réensemencé dans les mêmes conditions. Après 3 passages, une réaction d'IFI a été réalisée sur des Labtek (Poly Labo, Strasbourg, France), afin d'identifier d'éventuels antigènes du VRSB. Le premier anticorps a été l'Acm 18 B2 dirigé contre la protéine F du VRSH (Argen Biosoft, Varilhes, France), et qui réagit parfaitement avec le VRSB.¹¹² Le second anticorps était un anticorps polyclonal de lapin anti souris conjugué au FITC (Diagnostics Pasteur Sanofi, Marnes la Coquette, France).

2.1.6.2) Cocultures

Des fragments de NLP ont été précautionneusement dissociés à l'aide de ciseaux et d'une grille métallique stériles. Les cellules des NLP ont été séparées en 3 échantillons maintenus dans des flacons pour culture tissulaire de 25 cm² (Falcon, Subra, Toulouse, France) dans un milieu de culture pour lymphocyte (MCL) composé de RPMI (Gibco BRL), Hepes 10 mM (Gibco BRL), bétamercaptoéthanol (Gibco BRL), supplémenté avec du SVF à 10% (Falcon, Subra, Toulouse, France). Après 3 jours de stimulation avec le lipopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia coli* à 10 µg/ml (Sigma) ou avec la phytohémaglutinine (PHA) à 1 µg/ml (Sigma), ou après 3 jours sans stimulation, les cellules de NLP ont étéensemencées sur des cellules BT. Le milieu de coculture a été composé de 50% de MCL et de 50% de MC, et a été supplémenté avec 7,5% de SVF. Le milieu de coculture contenant des cellules non adhérentes a été enlevé à la fin de chaque passage. Les cellules adhérentes restantes ont été rincées une fois avec 10 ml de MC. Cinq millilitres de MC frais ont été ensuite ajoutés à chaque flacon de culture tissulaire (Falcon). Deux passages de plus, chacun de 7 jours, ont été ensuite réalisés. Avant chaque passage, les cellules ont été lavées comme décrit précédemment avant de subir

soit une trypsination (spécimens collectés à J50) soit un raclage (échantillons de J71) (cell scraper, TPP, ATGC Biotechnologie, Noisy-le-Grand, France). A la fin de chaque passage, la moitié des cellules a été directementensemencée sur 2,5 10⁵ cellules BT fraîches. L'autre moitié a été congelée puis décongelée, deux jours plus tard, et ajoutée à des cellules BT fraîches comme décrit précédemment pour la culture conventionnelle. A chaque passage, 250 µl de cellules et de milieu de culture précédemment congelés ont été utilisés pour détecter le VRSB par RT-PCR visant le gène de la nucléoprotéine (N).

2.1.7) Immunodétection du VRSB dans les tissus fixés au formol

La protéine F a été détectée par une IgG1 anti-F (Argène-Biosoft, Varilhes, France)¹¹² et par un anticorps biotinylé de chèvre anti-IgG1 de souris (Tebu, Le Perray en Yvelines, France). Le complexe immunitaire a été visualisé par une amplification au tyramide et un marquage à l' amino éthyl carbamoyl (TSA indirect, NEN bioproducts, Paris, France) et un contre marquage à l'hématoxyline. La protéine G du VRSB a été détectée par une IgG2b anti G (Acm 54) au 1/200 aimablement fournie par J.Furze et G.Taylor (IAH Compton, UK) et a été révélée en utilisant le système de révélation Dako Envision+™-AEC (Dako, Trappes, France).

2.1.8) Immunohistochimie

Trois essais ont été réalisés successivement afin d'identifier les cellules susceptibles d'héberger le VRSB.

Premièrement, l'Ag F du VRSB a été mis en évidence comme décrit pour l'immunodétection sur tissus fixés par du formol, mais sans contre marquage. La détection des lymphocytes a été réalisée ensuite en utilisant comme premier anticorps un Acm (IgG3) dérivé du clone TH18 (Argène-Biosoft)^{42, 121}, laissé incubé 1 heure au 1/50. Le second anticorps (Ac de chèvre anti IgG3 de souris (Tebu)) a été utilisé au 1/40 et visualisé avec du bleu rapide (Sigma).

Deuxièmement, la protéine F du VRSB a été détectée à l'aide du même Ac que le premier décrit ci-dessus. Le second anticorps a été un Ac de lapin anti IgG1 de souris (1/100)(Rockland, Tebu), associé au système de révélation Dako Envision+™-AEC (Dako, Trappes, France). La détection des lymphocytes B bovins a été pratiquée en se servant de l'Acm IgG3 au 1/50 dirigé contre l'Ag 36KD (CD20-CDw75 like) des lymphocytes bovins issu du clone A27.42 (BLA36, Novocastra, Tebu).⁹³ Le second Ac était un Ac de chèvre conjugué avec de la biotine, anti IgG3 de souris, au 1/40 (Tebu, Le Perray en Yvelines,

France), qui a été révélé avec un complexe de streptavidine - alcaline - phosphatase (Dako) au 1/75 et visualisé avec du bleu rapide (Sigma).

Troisièmement, la détection de l'Ag F du VRSB a été réalisée en utilisant le système de révélation Dako Envision+™-AEC (Dako, Trappes, France). La mise en évidence des lymphocytes T de bovins a été permise par l'utilisation comme premier Ac d'un Ac polyclonal de lapin anti CD3 au 1/100 (A.0452, Dako). Le deuxième Ac (un Ac de chèvre anti-lapin biotine conjuguée (Dako)) a été utilisé au 1/100. Les lames ont été mises à incuber dans un complexe de streptavidine – alcaline - phosphatase (Dako) au 1/75 et visualisées avec du bleu rapide (Sigma).

2.2) Résultats

2.2.1) Contrôle de l'infection des veaux

Des signes cliniques compatibles avec une infection par le VRSB (polypnée, dyspnée, toux ; d'intensité variable) (cf. § 1.1)^{177, 32} ont été observés chez tous les veaux inoculés, de J5 à J12. Le score clinique moyen a été maximal vers J7 – J8. L'étude des scores cliniques a montré une différence significative entre les veaux inoculés, soumis ou non au LBA, et les témoins. De plus, l'étude sérologique a montré que, à J18, tous les veaux inoculés avaient développé des anticorps anti-VRSB.

2.2.2) Détection du VRSB dans les cellules des LBA

Les résultats ont été identiques pour la détection du VRSB dans les cellules du LBA pour les deux groupes qui y ont été soumis (groupe 1 et 3).

L'isolement du VRSB par culture cellulaire sur les LBA pratiqués de J4 à J7 a été positif dans 100% des cas (n=11) chez les veaux inoculés. Sur les LBA de J8-J9, seul 36,4% des veaux ont permis un isolement positif. L'isolement a toujours été infructueux au-delà de J9.

Par nRT-PCR, 100% des LBA pratiqués de J4 à J11 sur les veaux inoculés ont permis de détecter le VRSB, puis, au-delà de J11, les résultats ont décliné de la manière suivante :

- 63,6% à J12 et J13
- 18,2% de J14 à J17
- 0% à partir de J18 et le jour de l'euthanasie

Aucune détection du VRSB, que ce soit par isolement ou par RT-PCR, n'a pu être faite sur les 4 veaux témoins (groupe 5).

2.2.3) Détection du VRSB dans les cellules mononucléées du sang périphérique

Les échantillons de sang pour la recherche du VRSB dans les CMSP (appréciation de la virémie) ont été prélevés sur les veaux du groupe 1 (soumis au LBA), du groupe 2 (non soumis au LBA) et du groupe 5 (veaux témoins). La recherche du VRSB a été faite ici aussi par isolement sur culture cellulaire et par nRT-PCR. Le virus n'a jamais pu être mis en évidence par isolement.

Seule la nRT-PCR basée sur l'ARN génomique du gène N a donné des résultats positifs sur 3 veaux :

- Veau 1 (groupe 1, soumis au LBA) : J5 et J7
- Veau 6 (groupe 1, soumis au LBA): à J10
- Veau 9 (groupe 2, non soumis au LBA): à J14

Les ARNm n'ont jamais été détectés, et les résultats des veaux témoins sont restés invariablement négatifs.

2.2.4) Détection du VRSB dans les tissus par nRT-PCR

Les échantillons suivants ont été prélevés sur les veaux après euthanasie à J19, J30 et J36 sur 9 veaux inoculés (groupe 1 et 2) et sur 3 témoins (un à J19, un à J30 et un à J36) :

■ Tissus cérébraux :

- bulbe olfactif
- cortex cérébral
- medulla oblongata
- hypophyse

■ Organes lymphoïdes :

- thymus
- rate
- tonsilles pharyngiennes

■ Plaque cribriforme

■ Cœur :

- oreillette
- septum interventriculaire

La recherche de l'ARNg par RT-PCR dans ces échantillons est restée infructueuse.

Les échantillons de nœud lymphatique (NL) préscapulaires et pharyngiens prélevés sur 5 veaux (n° 26 à 30) euthanasiés à J18 ont donné des résultats négatifs pour les ARNg et m de N, sauf le NL pharyngien du veau 30 (groupe 3, soumis au LBA).

Les échantillons de poumons prélevés à J50 et J71 sur les veaux du groupe 4 ont présenté des résultats négatifs pour l'ARNg.

Aucun prélèvement fait sur les veaux témoins n'a permis d'obtenir des résultats positifs.

Les échantillons de *NL pulmonaires (NLP)*, *trachéobronchique (NLT)* et *médiastinal (NLM)*, ont été prélevés sur tous les veaux et ont permis de détecter l'ARNm et g de N, F et G dans au moins 1 des 2 NLP dans 90,5% des veaux inoculés (n=21). Nous avons retrouvé le même pourcentage de veaux positifs quelle que soit la date d'euthanasie, de J18 à J71. Les veaux 3 et 4 qui sont restés constamment négatifs ont été euthanasiés à J30 et J36 respectivement.

Les variations de détection des ARNg et m de N, F et G ont été les suivantes :

L'ARNg a été détecté dans 53,6% des essais (n=56) pratiqués sur les NLP. L'ARNm de N a été détecté dans 59,5% des essais (n=42), l'ARNm de G dans 53,1% (n=32) et l'ARNm de F dans 34,4% (n=32).

Le pourcentage de veaux dont la détection de l'ARN g et/ou m a été positive est identique pour le NLT et pour le NLM (76,2% des veaux dans les deux cas). Le test du χ^2 n'a pas montré de différence significative entre les 55,6% de tests positifs (n=81, ARN m et g étant comptabilisés ensemble) trouvés sur le NLM et les 46,9% (n=81) trouvés sur le NLT. Cela laisse supposer qu'il n'y a pas de localisation préférentielle de l'ARN viral entre les deux NLP. De plus, en comparant les résultats de veaux du groupe 2 qui n'ont pas subi de LBA et ceux du groupe 1 qui y ont été soumis toutes les 48 heures, nous constatons que les LBA ne semblent pas avoir influencé la présence du VRSB dans les NLP : 4 veaux sur les 6 du groupe 1 ont présenté au moins un résultat positif, tandis que tous les veaux du groupe 2 (3/3) ont donné au moins un résultat positif.

Pour les veaux du groupe 4 euthanasiés à J50 et J71, et qui n'ont pas été soumis aux LBA, l'ARNg a été détecté par nRT-PCR dans au moins un des deux NLP dans 100% des cas (n=7). A J50, l'ARNg a été détecté dans 66,7% des tentatives (n=12), et à J71 dans 31,3% des tentatives (n=16). A J50, la transcription des gènes N, F et G a été observée sur les 3 veaux analysés, et à J71 dans 3 des 4 veaux analysés (tous sauf le veau 18). En outre, la RT-PCR ciblée sur le gène N et pratiquée sur des échantillons du NLT sans adjonction de transcriptase inverse (veau n°6) a donné des résultats négatifs. Ceci prouve l'absence de transcription inverse endogène et l'absence de contamination par de l'ADNc.

Tableau 4 : Détection des ARN messagers et génomique du VRSB dans les CMSP et dans les NLP de veaux infectés expérimentalement

Jour euθ*	Veau n°	CMSP		NL Médiastinal				NL Trachéobronchique				Total ARN g+m
		ARNg	ARNm	ARNg	ARNm			ARNg	ARNm			
					N	G	F		N	G	F	
J18	26	ND	ND	1/1	+	ND	ND	1/1	+	ND	ND	+
	27	ND	ND	0/1	0	ND	ND	0/1	+	ND	ND	+
	28	ND	ND	1/1	+	ND	ND	1/1	+	ND	ND	+
	29	ND	ND	1/1	+	ND	ND	1/1	+	ND	ND	+
	30	ND	ND	1/1	+	ND	ND	1/1	+	ND	ND	+
J19	2	0	0	1/1	+	0	0	0/1	0	0	0	+
	6	+	0	1/1	0	+	+	1/1	+	+	0	+
	9	+	0	0/1	0	+	+	0/1	+	+	+	+
J30	3	0	0	0/1	0	0	0	0/1	0	0	0	0
	5	0	0	1/1	+	+	+	0/1	0	0	0	+
	8	0	0	1/1	+	+	+	1/1	+	0	0	+
J36	1	+	0	1/1	0	0	0	0/1	0	0	0	+
	4	0	0	0/1	0	0	0	0/1	0	0	0	0
	7	0	0	1/1	+	+	+	1/1	+	+	+	+
J50	15	ND	ND	1/2	+	+	+	0/2	0	+	0	+
	17	ND	ND	2/2	+	+	+	2/2	+	+	+	+
	11	ND	ND	1/2	0	+	0	2/2	+	+	+	+
J71	18	ND	ND	0/2	0	0	0	1/2	0	0	0	+
	10	ND	ND	1/2	+	+	0	0/2	+	+	0	+
	12	ND	ND	0/2	0	0	0	1/2	0	+	0	+
	13	ND	ND	2/2	+	0	0	0/2	+	0	0	+
Total		39	09	17/28	12/21	9/16	7/16	13/28	13/21	8/16	4/16	19/21
%		33.3	0	60.7	57.1	56.3	43.8	46.4	61.9	50	25	90.5

ARNg ARN génomique + : résultat positif par n RT-PCR sur N, G ou F

ARNm : ARN messager 0 : résultat négatif par n RT-PCR sur N, G ou F

N : gène de la nucléoprotéine ND : non déterminée

G : gène de la glycoprotéine

F : gène de la protéine de fusion

* : jour de l'euthanasie des veaux

Pour vérifier et corroborer les résultats obtenus sur les veaux d'expérimentation, des prélèvements de poumons et de NLP ont été effectués sur des veaux de terrain atteints avant leur mort de signes respiratoires compatibles avec le VRSB (tableau 5) : les ARN g et m du gène N ont été détectés dans tous les échantillons de poumons et dans au moins un, mais souvent les deux, NLP. Les résultats négatifs peuvent être dus à la dégradation de l'ARN avant la RT-PCR, les échantillons ayant été parfois prélevés tardivement après la mort.

Tableau 5 : Détection des ARN messagers et génomiques du gène de la nucléoprotéine du VRSB par une RT-PCR nichée, sur des échantillons de poumon et de nœuds lymphatiques trachéobronchiques et médiastinaux prélevés sur 8 veaux naturellement infectés par le VRSB:

veau n°	poumon	Nœud lymphatique médiastinal		Nœud lymphatique trachéobronchique	
		ARNg ⁽¹⁾	ARNm ⁽²⁾	ARNg ⁽¹⁾	ARNm ⁽²⁾
72	+	+	+	+	+
69	+	+	+	+	+
97799	+	0	+	+	+
97800	+	+	+	0	+
97803	+	0	0	+	+
98258	+	+	+	+	+
98275	+	+	+	+	+
98288	+	+	+	+	+

⁽¹⁾ ARNg : ARN génomique

⁽²⁾ ARNm : ARN messager

+: résultat positif par RT-PCR nichée

0 : résultat négatif par RT-PCR nichée

2.2.5) Détection du VRSB par culture cellulaire

Un isolement conventionnel du virus a été tenté sur culture cellulaire à partir de cellules issues des NLP et des LBA prélevés sur les veaux des groupes 1, 2 et 3 le jour de leur euthanasie. Il a été impossible d'isoler le VRSB, ni aucun autre virus cytopathogène. De plus, les RT-PCR nichées pour détecter le gène N n'ont donné que des résultats négatifs lors de leur réalisation après le troisième passage en culture.

Pour les veaux du groupe 4, euthanasiés à J50 et J71, les cellules issues des NLP ont été également cocultivées dans des cellules BT, et ce, soit sans stimulation mitogène, soit après 3 jours de stimulation par du LPS ou du PHA afin d'optimiser les conditions d'isolement. Ainsi, à J50, pour les veaux 15 et 17, la RT-PCR nichée sur le gène N a donné des résultats positifs

sur les deuxième et troisième passages de cultures réalisées à partir des cellules des NLM après stimulation par le LPS. A J71, seul le veau 10 a donné un résultat positif pour la détection du gène N par RT-PCR à la fin des deuxième et troisième passages de culture à partir de cellules du NLM non stimulées. Des résultats positifs ont été également obtenus :

- à la fin du second passage (cellules non stimulées du NLT) pour 2 veaux (n°17 à J50 et n°10 à J71)
- à la fin du troisième passage (cellules du NLT stimulées par le LPS) pour le veau n°11 à J50

Dans aucun des cas nous n'avons pu observer des effets cytopathogènes. Le troisième passage a été congelé car les cellules BT ont été progressivement envahies par des cellules ayant la morphologie de cellules épithéliales. Après décongélation, 1 ml de suspension de ces cellules a été ajouté à des cellules BT fraîches. Un marquage par immunofluorescence indirecte de la protéine de fusion F du VRSB après 7 jours de culture a donné des résultats négatifs.

Tableau 6 : Détection de l'ARN du VRSB par une RT-PCR nichée ciblant le gène N pendant la coculture

Jour pi.	Veau n°	Nœud lymphatique médiastinal			Nœud lymphatique trachéobronchique		
		NS ⁽¹⁾	LPS ⁽²⁾	PHA ⁽³⁾	NS ⁽¹⁾	LPS ⁽²⁾	PHA ⁽³⁾
50	15	Neg	p2-p3	neg	Neg	neg	neg
	17	Neg	p2-p3	neg	p2	neg	neg
	11	Neg	neg	neg	Neg	p3	neg
71	18	Neg	neg	neg	Neg	neg	neg
	10	p2-p3	neg	neg	p2	neg	neg
	12	Neg	neg	neg	Neg	neg	neg
	13	Neg	neg	neg	Neg	neg	neg

px : détection positive de l'ARN du VRSB par une n RT-PCR visant N après le x^e passage

⁽¹⁾NS : pas de stimulation des cellules des noeuds lymphatiques pendant 3 jours avant la coculture avec des cellules BT

⁽²⁾LPS : stimulation des cellules des noeuds lymphatiques par des lipopolysaccharides (10 mg/ml) pendant 3 jours avant la coculture avec des cellules BT

⁽³⁾PHA : stimulation des cellules des noeuds lymphatiques par des phytohaemagglutinines (1µg/ml) pendant 3 jours avant la coculture avec des cellules BT

2.2.6) Immunodétection du VRSB dans les noeuds lymphatiques pulmonaires

La protéine F a pu être détectée par immunomarquage dans les noeuds lymphatiques trachéobronchiques de tous les veaux analysés, quelle que soit la date de l'euthanasie. Le marquage a été essentiellement granulaire et cytoplasmique, et dans quelques cas

membranaire. La quantité de cellules marquées a été plus grande à J 19 et J 30, et la fréquence de marquage a fortement diminué ensuite.

Par ailleurs, la localisation des cellules marquées varie avec le temps : à J 19, les cellules infectées ont été retrouvées principalement dans le cortex sinusal, et beaucoup moins fréquemment dans le paracortex ou les aires folliculaires. Plus tard, de J 30 à J 71, les cellules marquées ont été majoritairement observées dans le manteau folliculaire lymphoïde. Elles ont été plus rarement observées dans le paracortex, et occasionnellement dans le sinus médullaire. L'activation des follicules lymphoïdes a atteint un maximum à J30 et J36, et a ensuite décliné lentement jusqu'à J50 et J71. A J71, la protéine F a continué d'être détectée surtout dans le manteau lymphoïde folliculaire. En se basant sur la morphologie des cellules atteintes et sur leur localisation, les cellules cibles du VRSB seraient les macrophages et les lymphocytes.

L'immunohistochimie (IHC) a été réalisée sur les NLT des veaux 6 et 17 afin de déterminer la nature des cellules infectées. Elle a été positive avec les Acm contre la protéine F du VRSB et les Acm dérivés du clone TH18, qui reconnaissent toutes les différentes populations lymphocytaires. Des cellules doublement positives ont également été détectées lors de l'utilisation des Acm anti-F et des Acm dirigés contre l'Ag 36KD, destiné à détecter les lymphocytes B bovins. L'IHC a par contre été négative lors de l'utilisation d'Ac polyclonaux A.0452 reconnaissant les lymphocytes CD3⁺.

2.3) Discussion

2.3.1) Faible durée de présence virale dans le LBA

La recherche du VRSB dans les cellules des LBA pratiqués nous a montré que le virus n'était détectable que de J4 à J9 post infection (pi) par culture cellulaire. La RT-PCR permet de retrouver de l'ARNg jusqu'à J17. Ceci corrobore des études menées précédemment. Ainsi, le VRSB n'a été retrouvé que jusqu'à J5 par culture et J10 par immunofluorescence après inoculation sur des poumons de veaux autopsiés²⁶, jusqu'à J8 sur des agneaux et des veaux autopsiés.²⁰ Van der Poel et al.¹⁷⁶ confirment également l'étude en détectant le VRS par culture et par immunofluorescence seulement jusqu'à J8 dans des LBA. La différence de résultat obtenue entre les cultures cellulaire (positivité jusqu'à J9) et le RT-PCR (positivité jusqu'à J17) s'explique par la très bonne sensibilité de cette dernière technique, qui est apparue supérieure à toutes les autres techniques testées (immunofluorescence, EIA-TP, culture cellulaire et sérologie).¹⁷²

2.3.2) Absence de virémie

La détection du VRSB dans les CMSP a pu être réalisée exclusivement grâce à la RT-PCR, par mise en évidence de l'ARNg du virus, et ce seulement dans 3 cas. La mise en évidence du virus par culture cellulaire et les RT-PCR sur les ARNm ont constamment donné des résultats négatifs. Nous en déduisons donc que l'infection productive des CMSP *in vivo* semble peu probable. Sur des prises de sang réalisées sur des enfants atteints de VRSH lors de leur admission à l'hôpital, le virus infectieux n'a jamais pu être retrouvé dans le plasma ou les CMSP.⁵⁰ En revanche, l'infection par le VRSH de rats des cotonniers traités par un immunosuppresseur (le cyclophosphamide) permet la détection des Ag du VRS dans de nombreux organes, attestant d'une virémie.⁸⁷ De même l'infection d'humains immunodéprimés se caractérise souvent par un portage long du virus et une atteinte chronique de nombreux organes.^{62, 116} Cela suggère que, dans des conditions normales (i.e. sur des sujets immunocompétents), le système immunitaire restreint l'infection par le VRS au territoire pulmonaire et empêche la virémie. Cela contraste avec l'étude de Van der Poel et al.¹⁷⁵ dans laquelle l'ARNg de F a pu être retrouvé 6 jours après inoculation d'un veau par le VRSB dans différents territoires respiratoires ainsi que dans la rate et dans une moindre mesure le rein. Cependant, aucune tentative pour retrouver du virus infectieux n'a été faite, et la compétence immunitaire de l'animal d'expérience n'a pas été évaluée. Rohwedder et al. ont montré l'éventualité d'une virémie pour le VRSH. L'ARNg et l'ARNm du VRSH ont été détectés dans les CMSP de 63% de nouveaux-nés (parfois prématurés, n=41) et de 20% d'enfants âgés en moyenne de 5 mois, n=20) atteints de troubles respiratoires compatibles avec le VRSH. La durée de cette virémie n'a pas pu être déterminée, et la mise en évidence de virus infectieux par culture cellulaire n'a pas été réalisée.¹⁴⁶

Les CMSP expriment très fréquemment les protéines du VRS⁵⁰, et ce dans des durées parfois importantes (jusqu'à 21 j p.i. dans des lymphocytes sanguins d'agneaux infectés par le VRSB). Comme nous n'avons pu retrouver que de l'ARNg et pas d'ARNm, il semblerait plutôt que ces protéines correspondent à un lent processus de dégradation virale, comme cela a été proposé par Schrijver et al.¹⁵²

2.3.3) Persistance virale uniquement dans les nœuds lymphatiques loco-régionaux

Les *Paramyxovirus* sont connus pour persister dans les structures lymphoïdes et nerveuses.^{118, 157, 80} Dans notre étude, le VRSB n'a pas pu être détecté dans les tissus nerveux, le cœur, et la

rate par quelque méthode que ce soit. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de VRSB dans les poumons. Or, des études effectuées sur des cobayes^{18, 41, 75, 163} infectés par le VRSH ont permis de retrouver de l'infectiosité, des protéines virales ou de l'ARNg entre 42 et 100 jours post infection dans l'ensemble des poumons. Cette différence pourrait être liée au fait que les cobayes ne sont pas les hôtes naturels du VRSH. Il peut donc y avoir des différences en fonction des espèces cibles.

En revanche, les ARNg et/ou ARNm du VRSB ont été retrouvés sur plusieurs veaux dans les nœuds lymphatiques pulmonaires et dans un nœud lymphatique pharyngien. Etant donnée l'absence de virémie constatée dans notre étude, la contamination de ce nœud lymphatique pharyngien pourrait provenir d'une multiplication virale dans les voies respiratoires supérieures⁶¹ plutôt que d'une dissémination par voie sanguine.

La localisation du virus dans les NLP, évaluée par immunomarquage, (virus présent à J19 majoritairement dans la zone corticale et ensuite essentiellement dans la zone folliculaire) suggère que la contamination des NLP se ferait par voie lymphatique depuis le poumon. De plus, la persistance des ARN beaucoup plus longue dans les NLP (jusqu'à J71) que dans le LBA (négatif à partir de J18) suggère d'exclure l'hypothèse selon laquelle la détection du VRSB dans les NLP ne serait due qu'à un simple drainage lymphatique pulmonaire.

Sur les 8 animaux de terrain morts en détresse respiratoire associée à une infection par le VRSB, la présence du virus dans les NLP a pu être détectée. Dans une étude d'infection expérimentale, de l'ARN du VRSB a pu être mis en évidence par RT-PCR 6 jours après inoculation (soit durant la phase clinique de la maladie) dans les nœuds lymphatiques.¹⁷⁵ En revanche, dans cette même étude, 2 veaux de 5 mois environ et 2 vaches de 36 mois environ, naturellement infectés par le VRSB, ont subi un traitement immunosuppresseur (dexaméthasone 0,5 mg/kg/j pendant 5 jours, deux fois à trois semaines d'intervalle) respectivement 41 et 106 semaines après l'infection. Les veaux furent euthanasiés 4 semaines après, et les vaches 18 semaines après la dernière injection de corticoïdes. La recherche de l'ARNg de F par RT-PCR dans les nœuds lymphatiques pulmonaires notamment s'est soldée par un échec. Ces différences de résultats pourraient s'expliquer soit par la moins bonne sensibilité de la RT-PCR utilisée, soit par le temps écoulé entre l'infection et la recherche du virus, beaucoup plus long que dans notre étude. Par ailleurs, la mise en évidence de la persistance de l'ARN viral du VSV chez son hôte naturel n'a pu être démontrée que sur des animaux infectés expérimentalement et non sur des animaux naturellement infectés.¹⁰⁵ Il paraît donc nécessaire de vérifier ces observations sur des animaux naturellement infectés après un délai post infection plus long.

La détection d'ARNg et surtout d'ARNm du VRSB dans les NLP suggère qu'il y a non seulement maintien du génome viral, mais aussi transcription de ce génome. Le VRSB semble donc persister de manière active dans les NLP. Ce maintien de la transcription virale est retrouvé dans d'autres état de persistance *in vitro* comme *in vivo*. Ainsi la persistance établie par le virus de la maladie de Carré, un *Paramyxovirus*, sur culture de cellules de cerveau de chien se traduit par la réplication virale et la production de toutes les protéines virales.¹⁸⁴ De même, la persistance du virus de la rougeole *in vivo* se traduit par une réplication et une transcription active du virus, bien que moins prononcées que durant les affections aiguës.⁸ Dans certaines études, seul le génome viral a pu être mis en évidence, et ce grâce à des techniques très sensibles comme la PCR.^{13, 46, 118} La persistance du VSV sur des hamsters et sur des vaches suite à leur inoculation expérimentale n'a pu être démontrée que par la mise en évidence de l'ARN génomique, et ni l'antigénome ni les ARNm n'ont pu être détectés.^{13, 105} De même seul l'ARNg du virus Sindbis a pu être retrouvé dans le cerveau de souris.¹⁰⁷ Sur des souris inoculées avec le virus Sendai, l'ARNg a pu être détecté jusqu'à 168 jours p.i., alors que l'ARNm n'a pu l'être que durant 28 jours.¹¹⁸ Ainsi, l'éventualité d'une persistance chronique du génome de virus à ARN sans reverse transcriptase sans réplication ni transcription du génome a été émise. Koch et al. ont mis en évidence la persistance du génome du virus Sendai-6/94 sur des souris C129 jusqu'à 423 jours p.i.. Aucune trace de transcription ni de traduction n'a pu être mise en évidence. Fearn's et al. ont démontré la persistance de la nucléoprotéine du virus Simian 5 (mais pas des protéines de l'enveloppe) jusqu'à 12 semaines, dans des inclusions cytoplasmiques. Le virus a pu être réactivé. Lors du clonage de cellules contenant la nucléoprotéine virale, seule une infime partie des cellules souches contenait des particules virales. Le génome viral résiderait dans les inclusions cytoplasmiques sous une forme inactive, pouvant être occasionnellement réactivée.⁶⁰ Il faut cependant noter qu'aucune recherche d'antigénome ou d'ARNm n'a été réalisée. Pour beaucoup, il semble peu probable que les virus à ARN sans reverse transcriptase puisse persister dans le milieu intracellulaire pendant une longue durée sans association avec la réplication.^{3, 107, 25} La difficulté de détection des ARNm ou des antigénomes pourrait alors s'expliquer par leur faible durée de vie ou leur faible quantité, respectivement.

Les virus normalement cytopathiques, comme le VRS, persistent la plupart du temps en réprimant l'expression de leurs gènes, afin d'échapper au système immunitaire. Cette régulation peut se faire au niveau de la réplication, de la transcription, ou de la traduction. Les mécanismes incriminés dans la diminution de l'expression des gènes viraux comprennent la génération de virus DI, les mutations, la présence d'anticorps (cf. synthèse bibliographique, §

1.3.2.3.1) et la présence d'interféron (cf § . 1.3.2.3.3). Nous n'avons pas étudié l'une ou l'autre des hypothèses.

2.3.4) Absence de détection de l'infectiosité

Sur culture cellulaire, aucune infection productive de VRSB n'a pu être détectée à partir de broyat de NLP. Les cocultures ont permis de stimuler la réplication virale.^{80, 145} Nos résultats obtenus par cette méthode sont en demi-teinte. Nous n'avons pas obtenu l'effet cytopathogène pathognomonique des infections par le VRS en culture. En revanche, il a été possible de détecter par RT-PCR l'ARNg du VRSB après le deuxième passage en coculture. Le fait de ne pas retrouver de virus infectieux a été observé dans d'autres modèles. En effet, différentes études ont permis de retrouver *in vivo* des traces de génomes viraux sans pour autant réussir à cultiver ce virus sur culture cellulaire.^{114, 118} Ainsi, le génome du poliovirus a été détecté par nRT-PCR jusqu'à 12 mois après le début des symptômes dans la moëlle épinière de souris paralysées suite à leur infection expérimentale. Dès le vingtième jour après le début des symptômes, toutes les tentatives pour isoler le virus sur des cultures de cellules Hep-2c sont restées infructueuses.^{46, 105} De même, malgré la persistance du génome du VSV chez des hamsters et des vaches, le virus n'a pas pu être isolé après la rémission des symptômes.¹³ L'échec de la mise en évidence du virus par culture cellulaire peut avoir plusieurs causes. Tout d'abord, les traitements physiques infligés au virus durant les manipulations (cycles de congélation/décongélation) peuvent être responsables de l'inactivation virale. Le virus peut également avoir perdu, au cours de la persistance, ses capacités de réplication, suite à des mutations ou à l'apparition de virus défectifs. Plus probablement, la quantité de particules infectieuses présente dans les NLP était insuffisante pour permettre une infection efficace des cultures cellulaires. Cette hypothèse est corroborée par l'extrême sensibilité des méthodes diagnostiques (le seuil de détection moyen de la nRT-PCR sur N est de 0,17 UFS) et l'hétérogénéité des résultats obtenus dans notre étude (présence d'ARNm de N sans détection d'ARNg dans les NL trachéobronchiques des veaux n° 9, 10, 13 et 27). Ces résultats surprenants pourraient s'expliquer par le fait que la charge virale dans les NLP est proche des seuils de détection des RT-PCR. La détection de l'ARNg du VRSB après le deuxième passage en coculture alors qu'il n'était pas détectable lors du premier passage suggère que les cocultures ont permis d'accroître la quantité d'ARN viral. Malheureusement, l'envahissement des cocultures par des cellules épithéliales a rendu la poursuite des cocultures impossible au delà du troisième passage.

Les infections persistantes du virus de la Rougeole et de la maladie de Carré se caractérisent par l'incapacité de mettre en évidence du virus infectieux sur culture cellulaire suite à un défaut d'assemblage du virion. Cela est dû vraisemblablement à des défections ou à des mutations entraînant soit une instabilité soit la non synthèse de la protéine M. Mais, dans le cas des virus de la rougeole et de la maladie de Carré, la réplication du génome continue. (cf § 1.3.2.3.1) Il est donc peu probable que ce mécanisme concerne notre étude car du matériel génomique devrait être retrouvé en quantité.

2.3.5) Le virus semble persister dans les lymphocytes B et les macrophages

Les résultats d'immunomarquage et la morphologie des cellules supportant la persistance du VRSB dans les NLP suggèrent que les lymphocytes B et les macrophages hébergent le virus. L'infection expérimentale de lymphocytes et de macrophages a été réalisée avec succès pour le VRSH.⁵⁰ Bangham et McMichael ont établi une infection persistante du VRSH sur des lignées de cellules B transformées par le virus Epstein-Barr. Cette persistance a été caractérisée par la faible production de virus infectieux et l'expression des antigènes viraux jusqu'à 120 jours après inoculation.¹²

Les macrophages alvéolaires issus d'enfants contaminés par le VRSH sont infectés et peuvent produire du virus infectieux.¹¹⁵ *In vitro*, les macrophages supportent tous les stades de la réplication virale aboutissant à la production de nouveaux virions. De plus, il n'y a pas altération de la viabilité des macrophages.¹³³ Il semblerait que seule une sous population des macrophages alvéolaires serait permissive au VRSH.^{31, 170} La différence de susceptibilité des macrophages pourrait être due à leur état d'activation ou de différenciation.¹⁷⁰ Panuska et al. confirme les études précédentes en montrant que les cultures de macrophages alvéolaires contiennent des sous population de cellules permissives, capables de supporter la réplication du virus jusqu'à 25 jours post-infection.¹³³ Les Ac spécifiques des glycoprotéines de surface du VRSH permettent d'accroître l'infection de macrophages et monocytes *in vitro*.⁹⁹ Cependant, cette caractéristique n'a pas été retrouvée pour le VRSB.¹⁵²

L'inoculation de VRSB sur des macrophages alvéolaires bovins (MAB) ne permet qu'un très faible niveau de réplication virale.^{167, 1} L'infection de MAB n'a permis de retrouver du virus infectieux que dans 0,1% des cellules inoculées après 7 jours, même si 30% des MAB contenaient des Ag du VRSB.¹⁵² Toth et Hesse ont également confirmé la très faible réplication et la présence d'une infime quantité d'Ag du VRSB sur des MAB 9 jours après inoculation.¹⁶⁷ Adair et McNulty ont constaté la disparition des Ag du VRSB des MAB en 7

jours, et n'ont pas pu retrouver de virus infectieux.¹ Dans tous ces cas, la préactivation des macrophages ne modifie pas le taux d'infection.

L'infection des macrophages par les VRS semble affecter leur production de cytokines et leurs fonctions. Les capacités de phagocytose et les propriétés microbicides sont diminuées dans les populations macrophagiques infectées par le VRSH.¹⁷⁰ Les mêmes dysfonctionnements ont été retrouvés pour le VRSB, qui en plus limite l'expression des récepteurs à la molécule C3b du complément, et au fragment Fc des Ig, molécules favorisant la phagocytose des macrophages.¹ Cependant, les études sont contradictoires sur la nature des cytokines induites ou inhibées (cf § 1.3.2.1.5). Il est intéressant de noter qu'une infection même abortive de macrophages alvéolaires de souris par le VRSH a entraîné des modifications des propriétés des macrophages (diminution de la capacité de tuer les leishmanies, de la production de radicaux libres oxygénés et augmentation de la production d'IL-6).^{65, 159}

La contamination par le VRSB des macrophages et/ou des lymphocytes B pourrait permettre au virus de profiter de leur mobilité pour gagner les nœuds lymphatiques et de leur longue durée de vie pour le maintien de la persistance. De plus, les macrophages et les lymphocytes B exercent le rôle de CPA pour les LTh CD4⁺. Outre la perturbation des fonctions propres à ces deux types cellulaires, le VRS pourrait perturber les fonctions des LTh. Il a déjà été prouvé que la stimulation continue des LTh CD4⁺ par les antigènes du VRSH pouvait entraîner la production de cytokines inflammatoires impliquées dans la pathogénie du VRS.^{4,}

158

D'autres études seraient nécessaires afin de déterminer si les lymphocytes B infectés par le virus sont spécifiques au VRS et quel est leur état d'activation (cellules naives ou mémoires).

Conclusions

La persistance du VRSB et du VRSH a pu être démontrée *in vitro* sur différentes lignées cellulaires (monocytes/macrophages, fibroblastes...) et *in vivo* sur des cobayes ou sur des sujets immunodéprimés. En revanche, la persistance du VRS *in vivo* chez son hôte naturel immunocompétent n'a jamais pu être mise en évidence. Elle a pourtant depuis longtemps été fortement suspectée à partir des données épidémiologiques. En outre, le VRS possède plusieurs caractéristiques communes avec des virus susceptibles de persister, à savoir :

- existence de variants peu cytotoxiques (virus DI ou thermosensitifs)
- capacité d'induire une immunosuppression
- aptitude à se répliquer dans les cellules immunitaires
- capacités de diminuer l'expression de ses gènes
- variabilité antigénique

Dans notre expérience, conduite sur 25 veaux immunocompétents, grâce à l'excellente sensibilité de la technique PCR, la transcription et l'expression des protéines du VRSB ont pu être détectées dans les nœuds lymphatiques pulmonaires jusqu'à 71 jours après inoculation. La persistance du VRSB semble localisée dans les lymphocytes B. C'est la première fois que la persistance d'un VRS est prouvée chez son hôte spécifique.

De nombreuses questions persistent :

Quel rôle joue cette persistance dans l'épidémiologie et la transmission de la maladie ? Il nous a en effet été impossible de retrouver du virus infectieux. Il serait intéressant, sur des animaux infectés expérimentalement, de rechercher une réexcrétion virale suite à un stress ou une immunosuppression, ou une infection virale concomitante.

Quelle est l'importance de la persistance sur les aspects cliniques de la maladie ?

Quels sont les mécanismes de la persistance sur le plan moléculaire (interactions avec le système immunitaire, variabilité antigénique, état d'activation du génome, et ce durant la persistance) ?

La persistance existe-t-elle également chez l'homme infecté par le VRSH ?

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
M. CALLENDRET Benoît
a été admis(e) sur concours en : 1993
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 26 septembre 1997
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, F. Schelcher, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
déclare que j'ai lu la thèse de :

M. CALLENDRET Benoît

intitulée :

"Infection expérimentale de veaux par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin. Evaluation de la persistance"
et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



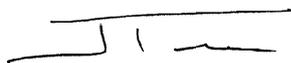
Professeur François SCHELCHER

**Vu :
Le Directeur par intérim
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Professeur Gilbert BONNES

**Vu :
Le Président de la thèse :**

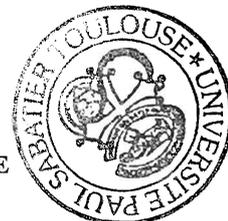


Professeur Jacqueline PUEL

**Vu le : 1er février 2002
Le Président
de l'Université Paul Sabatier**



Professeur Raymond BASTIDE



Références :

1. ADAIR, B.M., MCNULTTY, M.S.
Effect of *in vitro* exposure of bovine alveolar macrophages to different strains of bovine respiratory syncytial virus.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1992, **30**, 193-206
2. AHMED, R., CANNING, W.M., KAUFFMAN, R.S., et al.
Role of the host cell in persistent viral infection: coevolution of L cells and reovirus during persistent infection.
Cell, 1981, **25**, 325-332
3. AHMED, R., MORRISON, L.A., KNIPE, D.M.
Persistence of viruses.
In: Fields, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., et al. (eds)
Fields Virology. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 1996, 219-249
4. ALWAN, W.H., RECORD, F.M., OPENSHAW, P.J.M.
Phenotypic and functional characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins.
J. Immunol., 1993, **150**, 5211-5218
5. AMES, T.R.
The epidemiology of BRSV infection.
Vet. Med., 1993, 881-884
6. ANDERSON, G.W., ROWLAND, R.R., PALMER, G.A., et al.
Lactate dehydrogenase-elevating virus replication persists in liver, spleen, lymph node, and testis tissues and results in accumulation of viral RNA in germinal centers, concomitant with polyclonal activation of B cells.
J. Virol., 1995, **69**, 5177-5185
7. AVOTA, E., AVOTS, A., NIEWIESK, S., et al.
Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus.
Nat. Med., 2001, **7**, 725-731
8. BACZKO, K., LIEBERT, U.G., BILLETER, M., et al.
Expression of defective measles virus genes in brain tissues patients with subacute sclerosing panencephalitis.
J. Virol., 1986, **59**, 472-478
9. BAKER, J.C., AMES, T.R., MARKHAM, R.J.F.
Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd.
Am. J. Vet. Res., 1986, **47**, 240-245
10. BAKER, J.C., AMES, T.R., MARKHAM, R.J.F.
Serologic studies of bovine respiratory syncytial virus in Minnesota cattle.
Am. J. Vet. Res., 1985, **46**, 891-892

11. BAKER, J.C., WERDIN, R.E., AMES, T.R., et al.
Study on etiologic role of bovine respiratory syncytial virus in pneumonia of dairy calves.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1986, **189**, 66-70
12. BANGHAM, C.R.M., et McMICHAEL, A.J.
Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, **83**, 9183-9187
13. BARRERA, J.D.C., LETCHWORTH, G.J.
Persistence of vesicular stomatitis virus New Jersey RNA in convalescent hamsters
Virology, 1996, **219**, 453-464
14. BASS, B.L., WEINTRAUB, H.
An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate.
Cell, 1988, **55**, 1089-1098
15. BASS, B.L., WEINTRAUB, H., CATTANEO, R., et al.
Biased hypermutation of viral RNA genomes could be due to unwinding/modification of double-strand RNA
Cell, 1989, **56**, p331
16. BELKNAP, E.B.
Recognizing the clinical signs of BRSV infection.
Vet. Med., 1993, 886-887
17. BHARDWAJ, N.
Interactions of viruses with dendritic cells: a double-edged sword.
J. Exp. Med., 1997, **186**, 795-799
18. BRAMLEY, A.M., VITALIS, T.Z., WIGGS, B.R., et al.
Effects of respiratory syncytial virus persistence on airway responsiveness and inflammation in guinea-pigs.
Eur. Respir. J., 1999, **14**, 1061-1067
19. BRODSKY, F.M., LEM, L., SOLACHE, A., et al
Human pathogen subversion of antigen presentation.
Immunol. Rev., 1999, **168**, 199-215
20. BRYSON, D.G., EVERMANN, J.F., LIGGITT, H.D., et al.
Studies on the pathogenesis and interspecies transmission of respiratory syncytial virus isolated from sheep.
Am. J. Vet. Res., 1988, **49**, 1424-1430
21. BUER, J., LANOUE, A., FRANZKE, A., et al.
Interleukin 10 secretion and impaired function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized *in vivo*.
J. Exp. Med., 1998, **187**, 177-183
22. CALDOW, G.L., EDWARDS, S., NIXON, P., et al.
Associations between viral infection and respiratory disease in young beef bulls.

- Vet. Rec., 1988, **122**, 529-531
23. CALDOW, G.L., EDWARDS, S., PETERS, A.R., et al.
Associations between viral infections and respiratory disease in artificially reared calves.
Vet. Rec., 1993, **133**, 85-89
 24. CARRIGAN, D.R., KEHL KNOX, K.
Identification of interferon-resistant subpopulations in several strains of measles virus: positive selection by growth of the virus in the brain tissue.
J. Virol., 1990, **64**, 1606-1615
 25. CARTER, M.J., WILLCOCKS, M.M., TER MEULEN, V.
Defective translation of measles virus matrix protein in a subacute sclerosing panencephalitis cell line.
Nature, 1983, **305**, 153-155
 26. CASTELMAN, W.L., LAY, J.C., DUBOVI, E.J., et al.
Experimental bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves: light microscopic lesions, microbiology, and studies on lavaged lung cells.
Am. J. Vet. Res., **46**, 547-553
 27. CATTANEO, R., BILLETER, A.
Mutations and A/I hypermutations in measles virus persistent infections.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1992, **176**, 63-73
 28. CATTANEO, R., SCHMID, A., BILLETER, M.A., et al.
Multiple viral mutations rather than host factors cause defective measles virus gene expression in a subacute sclerosing panencephalitis cell line.
J. Virol., 1988, **62**, 1388-1397
 29. CATTANEO, R., SCHMID, A., ESCHIE, D., et al.
Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections.
Cell, 1988, **55**, 255-265
 30. CHASTON, T.B., LIDBURY, B.A.
Genetic 'budget' of viruses and the cost to the infected host: a theory on the relationship between the genetic capacity of viruses, immune evasion, persistence and disease.
Immunol. Cell. Biol., 2001, **79**, 62-66
 31. CIRINO, N. M., PANUSKA, J.R., VILLANI, A., et al.
Restricted replication of respiratory syncytial virus in human alveolar macrophages.
J. Gen. Virol., 1993, **74**, 1527-1537
 32. CISZEWSKI, D.K., BAKER, J.C., SLOCOMBE, R.F., et al.
Experimental reproduction of respiratory tract disease with bovine respiratory syncytial virus.
Vet. Microb., 1991, **28**, 39-60
 33. CIUREA, A., HUNZIKER, L., HENGARTNER, H., et al.

Viral escape from the neutralizing antibody response: the lymphocytic choriomeningitis virus model.

Immunogenetics., 2001, **53**, 185-189

34. CIUREA, A., KLENERMAN, P., HUNZIKER, L., et al.
Viral persistence *in vivo* through selection of neutralizing antibody-escape variants.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, **97**, 2749-2754
35. CIUREA, A., KLENERMAN, P., HUNZIKER, L., et al.
Impairment of CD4+ T cell responses during chronic virus infection prevents neutralizing antibody responses against virus escape mutants.
J. Exp. Med., 2001, **193**, 297-305
36. CIUREA, A., HUNZIKER, L., MARTINNIC, M.M.A., et al.
CD4+ T-cell epitope escape mutant virus selected *in vivo*
Nat. Med., 2001, **7**, 795-800
37. COLLINS, P.L., OLMSTED, R.A., SPRIGGS, M.K., et al.
Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, **84**, 5134-5138
38. CONALDI, P.G., SERRA, C., MOSSA, A.
Persistent infection of human vascular endothelial cells by group B coxsackieviruses.
J. Inf. Dis., 1997, **175**, 693-696
39. CORREALE, J., LI, S., WEINER, L.P., et al.
Effect of persistent mouse hepatitis virus infection on MHC class I expression in murine astrocytes.
J. Neuros. Res., 1995, **40**, 10-21
40. CURRAN, J., BOECK, R., KOLAKOFSKY, D.
The Sendai virus P gene expresses both an essential protein and an inhibitor of RNA synthesis by shuffling modules via mRNA editing.
EMBO J., 1991, **10**, 3079-3085
41. DAKHAMA, A., VITALIS, T.Z., HEGELE, R.G.
Persistence of respiratory syncytial virus (RSV) infection and development of RSV-specific IgG1 response in a guinea-pig model of acute bronchiolitis.
Eur. Respir. J., 1997, **10**, 20-26
42. DAVIS, W. C., MARUSIC, S., LEWIN, H. A., et al.
The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1987, **15**, 337-376
43. DE JONG, M.C.M., VAN DER POEL, W.H.M., KRAMP, J.A., et al.
Quantitative investigation of population persistence and recurrent outbreaks of bovine respiratory syncytial virus on dairy farms.
Am. J. Vet. Res., 1996, **57**, 628-633

44. DE LA TORRE, J.C., MARTINEZ-SALAS, E., DIEZ, J., et al.
Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture.
J. Virol., 1988, **62**, 2050-2058
45. DEITZ, S.B., DODD, D.A., COOPER, S., et al.
MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, **97**, 13790-13795
46. DESTOMBES, J., COUDERC, T., THIESSON, D., et al.
Persistent poliovirus infection in mouse motoneurons.
J. Virol., 1997, **71**, 1621-1628
47. DETHLEFS, S., BRAHIC, M., LARSSON-SCIARD, E-L.
An early, abundant cytotoxic T-lymphocyte response against Theiler's virus is critical for preventing viral persistence.
J. Virol., 1997, **71**, 8875-8878
48. DHIB-JALBUT, S., XIA, J., RANGAVIGGULA, H., et al.
Failure of measles virus to activate nuclear factor- κ B in neuronal cells: implications on the immune response to viral infections in the central nervous system.
J. Immunol., 1999, **162**, 4024-4029
49. DOMINGO, E.
Quasispecies and the implications for virus persistence and escape.
Clin. Diag. Virol., 1998, **10**, 97-101
50. DOMURAT, F., ROBERTS, Jr, N.J., WALSH, E.E., et al.
Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear leukocytes *in vitro* and *in vivo*.
J. Inf. Dis., 1985, **152**, 895-902
51. EHL, S., KLENERMAN, P., ZINKERNAGEL, R.M., et al.
The impact of variation in the number of CD8⁺ T-cell precursors on the outcome of virus infection.
Cell. Immunol., 1998, **189**, 67-73
52. EHRLICH, R.
Modulation of antigen processing and presentation by persistent virus infections and in tumors.
Hum. Immunol., 1997, **54**, 104-116
53. ELLIS, J.A., PHILIBERT, H., WEST, K., et al.
Fatal pneumonia in adult dairy cattle associated with active infection with bovine respiratory syncytial virus.
Can. Vet. J. Vol., 1996, **37**, 103-105
54. ELVANDER, M.
Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus.
Vet. Rec., 1996, **138**, 101-105

55. ENOMOTO, N., SATO, C.
Clinical relevance of viral hepatitis C virus quasispecies.
J. Viral. Hepat., 1995, **2**, 267-272
56. ENOMOTO, N., SATO, C.
Hepatitis C virus quasispecies populations during chronic hepatitis C infection.
Trends Microb., 1995, **3**, 445-447
57. ESOLEN, L.M., WARD, B.J., MOENCH, T.R., et al.
Infection of monocytes during measles.
J. Inf. Dis., 1993, **168**, 47-52.
58. ESPINASSE, J., RAYNAUD, J.P., VISO, M.
L'examen clinique dans les bronchopneumonies infectieuses enzootiques des jeunes bovins. Etude critique : proposition pour une méthodologie nouvelle.
In : ANTOINE, H. (eds)
Affections respiratoires des jeunes bovins.
Cureghem : société belge de buiatrie, 1981, 15-23
59. ESTCOURT, M.J., RAMSHAW, I.A., RAMSAY, A.J.
Cytokine responses in virus infections: effect on pathogenesis, recovery and persistence.
Curr. Opin. Microb., 1, 1998, 411-418
60. FEARNES, R., YOUNG, D.F., RANDALL, R.E.
Evidence that the paramyxovirus simian virus 5 can establish quiescent infections by remaining inactive in cytoplasmic inclusion bodies.
J. Gen. Virol., 1994, **75**, 3525-3539
61. FISHAUT, M., SCHWARTZMAN, J.D., McINTOSH, K., et al.
Behavior of respiratory syncytial virus in piglet tracheal organ culture.
J. Inf. Dis., 1978, **138**, 644-649
62. FISHAUT, M., TUBERGEN, D., McINTOSH, K.
Cellular response to respiratory syncytial viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity.
J. Pediat., 1980, **96**, 179-186
63. FLEISCHER, B., KRETH, H.W.
Mumps virus replication in human lymphoid cell lines and in peripheral blood monocytes: preference for T cells.
Inf. Immun., 1982, **35**, 25-31
64. FLORMAN, A.L., et McLAREN, L.C.
The effect of altitude and weather on the occurrence of outbreaks of respiratory syncytial virus infections.
J. Inf. Dis., 1988, **158**, 1401-1402
65. FRANKE, G., FREIHORST, J., STEINMULLER, C., et al.
Interaction of alveolar macrophages and respiratory syncytial virus.
J. Immunol. Methods, 1994, **174**, 173-184
66. FUGIER-VIVIER, I., SERVET-DELPRAT, C., RIVAILLER, O., et al.

- Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells.
J. Exp. Med., 1997, **186**, 813-823
67. FUJINAMI, R.S., SUN, X., HOWELL, J.M., et al.
 Modulation of immune system function by measles virus infection: role of soluble factor and direct infection.
J. Virol., 1998, **72**, 9421-9427
 68. GALE, Jr, M., KWIECISZEWSKI, B., DOSSETT, M., et al.
 Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase.
J. Virol., 1999, **73**, 6506-6516
 69. GARCIN, D., DE MELO, M., ROUX, L., et al.
 Presence of a truncated form of the Sendai virus P protein in a long-term persistent infection : implications for the maintenance of the persistent state.
Virology, 1994, **201**, 19-25
 70. GOGATE N., SWOVELAND P., YAMABE T. et al.
 Major histocompatibility complex class I expression on neurons in subacute sclerosing panencephalitis and experimental subacute measles encephalitis.
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1996, **55**, 435-443
 71. GOLDMAN, M.B., BUCKTHAL, D.J., PICCIOTTO, S., et al.
 Measles virus persistence in an immortalized murine macrophage cell line.
Virology, 1995, **207**, 12-22
 72. GROSJEAN, I., CAUX, C., BELLA, C., et al.
 Measles virus infects dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4⁺ T cells.
J. Exp. Med., 1997, **186**, 801-812
 73. HAMEL, A.L., WASYLYSHEN, M.D., NAYAR, G.P.S.
 Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay.
J. Clin. Microb., 1995, **33**, 287-291
 74. HAYDON, D.T., WOOLHOUSE, M.E.J.
 Immune avoidance strategies in RNA viruses: fitness continuums arising from trade-offs between immunogenicity and antigenic variability.
J. Theor. Biol., 1998, **193**, 601-312
 75. HEGELE, R.G., HAYASHI, S., BRAMLEY, A.M., et al.
 Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs.
Chest, 1994, **105**, 1848-1854
 76. HEIM, M.H., MORADPOUR, D., BLUM, H.E.
 Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway.
J. Virol., 1999, **73**, 8469-8475

77. HENGEL, H., KOSZINOWSKI, U.H.
Interference with antigen processing by viruses.
Curr. Opin. Immunol., 1997, **9**, 470-476
78. HIRANO, A., AYATA, M., WANG, A.H., et al.
Functional analysis of matrix proteins expressed from cloned genes of measles virus variants that cause subacute sclerosing panencephalitis reveals a common defect in nucleocapsid binding.
J. Virol., 1993, **67**, 1848-1853
79. HOLLAND, J., SPINDLER, K., HORODYSKI, F., et al.
Rapid evolution of RNA genomes.
Science, 1982, **215**, 1577-1585
80. HORTA-BARBOSA, L., HAMILTON, R., WITTIG, B., et al.
Subacute sclerosing panencephalitis: isolation of suppressed measles virus from lymph node biopsies.
Science, 1971, **173**, 840-841
81. HSU, E.C., IORIO, C., SARANGI, F., et al.
CDw150 (SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus.
Virology, 2001, **279**, 9-21
82. HUANG, A.S.
Defective interfering viruses.
Annu. Rev. Microbiol., 1973, **27**, 101-117
83. HUANG, A.S., BALTIMORE, D.
Defective interfering animal viruses.
In FRANKAEL-CONRAT, H., WAGNER, R.R. (eds)
Comprehensive virology, Regulation and genetics. Viral gene expression and integration.
New York: Plenum Publishing Corp., 1977, p73-116
84. HUANG, A.S., BALTIMORE, D.
Defective viral particles and viral disease processes.
Nature, 1970, **226**, 325-327
85. JACOBS, D., McDONALD, N.E., BANGHAM, C.R.M., et al.
Experimental infection of calves with respiratory syncytial virus.
Res. Vet. Sci., 1975, **18**, 299-306
86. JAMIESON, B.D., AHMED, R.
T-cell tolerance: exposure to virus in utero does not cause a permanent deletion of specific T cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, **85**, 2265-2268
87. JOHNSON, R.A., PRINCE, G.A., SUFFIN, S.C., et al.
Respiratory syncytial virus infection in cyclophosphamide-treated cotton rats.
Infect. Immun., 1982, **37**, 369-373

88. JOLY, E., MUCKE, L., OLDSTONE, M.B.A.
Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression.
Science, 1991, **253**, 1283-1285
89. KAFROUNI, M.I., BROWN, G.R., THIELE, D.L.
Virally infected hepatocytes are resistant to perforin-dependent CTL effector mechanisms.
J. Immunol., 2001, **167**, 1566-1574
90. KAISERLIAN, D., DUBOIS, B.
Dendritic cells and viral immunity: friends or foes?
Sem. Immunol., 2001, **13**, 303-310
91. KANDOLF, R., SAUTER, M., AEPINUS, C., et al.
Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system.
Vir. Res., 1999, **62**, 149-158
92. KELES, I., WOLDEHIVET, Z., MURRAY, R.D.
In-vitro studies on mechanisms of immunosuppression associated with bovine respiratory syncytial virus.
J. Comp. Pathol., 1998, **118**, 337-345
93. KELLEY, L. C., MAHAFFEY, E. A., BOUNOUS, D. I., et al.
Detection of equine and bovine T- and B-lymphocytes in formalin-fixed paraffin embedded tissues.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1997, **57**, 187-200
94. KIMMAN, T.G., SRAVER, P.J., ZIMMER, G.M.
Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: morphologic and serologic findings.
Am. J. Vet. Res., 1989, **50**, 684-693
95. KIMMAN, T.G., ZIMMER, G.M., WESTENBRINK, F., et al.
Epidemiological studie of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease.
Vet. Rec., 1988, **123**, 104-109
96. KITTLESEN, D.J., CHIANESE-BULLOCK, K.A., YAO, Z.Q., et al.
Interactions between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation.
J. Clin. Invest., 2000, **106**, 1239-1249
97. KLENERMAN, P., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R.M.
A non-retroviral RNA virus persists in DNA form.
Nature, 1997, **390**, 298-301
98. KOCH, E.M., NEUBERT, W.J., HOFSCHEIDER, P.H.
Lifelong persistence of paramyxovirus Sendai-6/94 in C129 mice: detection of a latent viral RNA by hybridization with a cloned genomic cDNA probe.
Virology, 1984, **136**, 78-88

99. KRILOV, L.R., ANDERSON, L.J., MARCOUX, L., et al.
Antibody-mediated enhancement of respiratory syncytial virus infection in two monocyte/macrophage cell lines.
J. Inf. Dis., 1989, **160**, 777-782
100. KRISTENSSON, K., NORRBY, E.
Persistence of RNA viruses in the central nervous system.
Ann. Rev. Microbiol., 1986, **40**, 159-184
101. LAMB, R.A., DREYFUSS, G.
Unwinding with a vengeance.
Nature, 1989, **337**, 19-20
102. LARGE, M.K., KITTLESEN, D.J., HAHN, Y.S.
Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence.
J. Immunol., 1999, **162**, 931-938
103. LARSSON-SCIARD, E-L., DETHLEFS, S., BRAHIC, M.
In vivo administration of interleukin-2 protects susceptible mice from Theiler's virus persistence.
J. Virol., 1997, **71**, 797-799
104. LERCH, R.A., ANDERSON, K., AMANN, V.L., et al.
Nucleotide sequence analysis of the bovine respiratory syncytial virus fusion protein mRNA and expression from a recombinant vaccinia virus.
Virology, 1991, **181**, 118-131
105. LERCH, R.A., ANDERSON, K., WERTZ, G.W.
Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus
J. Virol., 1990, **64**, 5559-5569
106. LETCHWORTH, G.J., BARRERA, J.D.C., FISHEL, A.R., et al.
Vesicular stomatitis New Jersey virus RNA persists in cattle following convalescence.
Virology, 1996, **219**, 480-484
107. LEVINE, B., GRIFFIN, D.E.
Persistence of viral RNA in mouse brains after recovery from acute alphavirus encephalitis;
J. Gen. Virol., 1992, **66**, 6429-6435
108. LINCOLN, S. E., DALY, M. J., LANDER, E. S.
PRIMER: a computer program for automatically selecting PCR primers, Version 0.5.
MIT Center for Genome Research and Whitehead Institute for Biomedical Research, Nine Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts, USA, 1991
109. LIPTON, H.L., PRITCHARD, A.E., CALENOFF, M.A.
Attenuation of neurovirulence of Theiler's murine encephalomyelitis virus strain GDVII is not sufficient to establish persistence in the central nervous system.
J. Gen. Virol., 1998, **79**, 1001-1004

110. MAHY, B.W.J.
Strategies of virus persistence.
Br. Med. Bull., 1985, **41**, 50-55
111. MARTINEZ, I., BUSTOS, J., MELERO, J.A.
Reduced expression of surface glycoproteins in mouse fibroblasts persistently infected with human respiratory syncytial virus (HRSV).
Arch. Virol., 2001, **146**, 669-683
112. MASSON, C., DELVERDIER, M., SCHELCHER, F., et al.
Mise en évidence immunoperoxydasique du virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) sur coupe en paraffine de tissu pulmonaire bovin.
Rev. Med. Vet., 1993, **144**, 99-104
113. MAXINE PRESTON, F., BEIER, P.L., POPE, J.H.
Infectious respiratory syncytial virus (RSV) effectively inhibits the proliferative T cell response to inactivated RSV *in vitro*.
J. Inf. Dis., 1992, **165**, 849-825
114. MENA, I., PERRY, M.P., HARKINS, S., et al.
The role of B lymphocytes in cocksackievirus B3 infection.
Am. J. Pathol., 1999, **155**, 1205-1215
115. MIDULLA, F., VILLANI, A., PANUSKA, J.R., et al.
Respiratory syncytial virus in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages.
J. Inf. Dis., 1993, **168**, 1515-1519
116. MILNER, M. E., DE LA MONTE, S.M., HUTCHINS, G. M.
Fatal respiratory syncytial virus infection in severe combined immunodeficiency syndrome.
Am. J. Dis. Child., 1985, **135**, 1111-1114
117. MOORMAN, J.P., JOO, M., HAHN, Y.
Evasion of host immune surveillance by hepatitis C virus: potential roles in viral persistence.
Arch. Immunol. Ther. Exp., 2001, **49**, 189-194
- 118.. MORI, I., KOMATSU, T., TAKEUCHI, K., et al.
Parainfluenza virus type 1 infects olfactory neurons and establishes long-term persistence in the nerve tissue.
J. Gen. Virol., 1995, **76**, 1251-1254
119. MOSKOPHIDIS, D., LECHNER, F., PIRCHER, H., et al.
Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells.
Nature, 1993, **362**, 758-761
120. MÜLLBACHER, A., THA HLA, R., MUSETEANU, C., et al.
Perforin is essential for control of ectromelia virus but not related poxviruses in mice.
J. Virol., 1999, **73**, 1665-1667

121. NAESSENS, J., HOPKINS, J.
Introduction and summary of workshop findings.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1996, **52**, 213-235.
122. NATHANSON, N.
Epidemiology.
In: Fields, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., et al. (eds)
Fields Virology. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 1996, 251-271
123. NESSELER, A., BAUMGARTNER, W., ZURBRIGGEN, A., et al.
Restricted virus protein translation in canine distemper virus inclusion body
polioencephalitis.
Vet. Microb., 1999, **69**, 23-23
124. NEUMANN, H., CAVALIE, A., JENNE, D.E., et al.
Induction of MHC class I genes in neurons.
Science, 1995, **269**, 549-552
125. NICKELS, M.S., HUNT, D.M.
Identification of an amino acid change that affects N protein function in vesicular
stomatitis virus.
J. Gen. Virol., 1994, **75**, 3591-3595
126. OLDSTONE, M.B.A.
Virus-Lymphoid cell interactions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, **93**, 12756-12758
127. OLDSTONE, M.B.A.
Viral persistence: mechanisms and consequences.
Curr. Opin. Microb., 1998, **1**, 436-441
128. OLDSTONE, M.B.A.
Viruses and diseases of the Twenty-First century.
Am. J. Pathol., 1993, **143**, 1241-1249
129. OLDSTONE, M.B.A.
Viral persistence.
Cell, 1989, **56**, 517-520
130. OU, R., ZHOU, S., HUANG, L., et al.
Critical role for alpha/beta and gamma interferons in persistence of lymphocytic
choriomeningitis virus by clonal exhaustion of cytotoxic T cells.
J. Virol., 2001, **75**, 8407-8423
131. OXENIUS, A., ZINKERNAGEL, R.M., HENGARTNER, H.
Comparison of activation versus induction of unresponsiveness of virus-specific CD4+
and CD8+ T cells upon acute versus persistent viral infection.
Immunity, 1998, **9**, 449-457
132. PACCAUD, M.F., JACQUIER C.
A respiratory syncytial virus of bovine origin.
Archiv. Ges. Virusforsch., 1970, **30**, 327-332

133. PANUSKA, J.R., CIRINO, N.M., MIDULLA, F., et al.
Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus.
J. Clin. Invest., 1990, **86**, 113-119
134. PELLETIER, I., DUNCAN, G., COLBERE-GARAPIN, F.
One amino acid change on the capsid surface of poliovirus sabin 1 allows the establishment of persistent infections in Hep-2c cell cultures.
Virology, 1998, **241**, 1-13
135. PELLETIER, I., DUNCAN, G., PAVIO, N., et al.
Molecular mechanisms of poliovirus persistence : key role of capsid determinants during the establishment phase.
Cell. Mol. Life Sci., 1998, **54**, 1385-1402
136. PERRIN, B., DANNACHER, G., SOLSONA, M.
Mise en évidence des anticorps contre le virus respiratoire syncytial chez les bovins français.
Rec. Méd. Vét., 1979, **155**, 465-471
137. PLOEGER, H.W., BOON, J.H., KLAASSEN, C.H.L., al.
A seroepidemiological survey of infections with the bovine respiratory syncytial virus in first-season grazing calves.
J. Vet. Med., 1986, **33**, 311-318
138. POYIAK, S.J., KHABAR, K.S.A., PASCHAL, D.M., et al.
Hepatitis C virus Nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response.
J. Virol., 2001, **75**, 6095-6106
139. PREBLE, O.T., et YOUNGNER, J.Y.
Temperature-sensitive viruses and the etiology of chronic and inapparent infection.
J. Inf. Dis., 1975, **131**, 467-473
140. PRICE, G.E., OU, R., JIANG, H., et al.
Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant variants in Influenza A virus pneumonia.
J. Exp. Med., 2000, **191**, 1853-1867
141. PRINGLE, C.R., SHIRODARIA, P.V., CASH, P., et al.
Initiation and maintenance of persistent infection by respiratory syncytial virus.
J. Virol., 1978, **28**, 199-211
142. RAMMOHAN, K.W., McFARLAND, H.F., McFARLIN, D.E.
Induction of subacute murine measles encephalitis by monoclonal antibody to virus haemagglutinin.
Nature, 1981, **290**, 588-589
143. RANDALL, R.E., et RUSSEL, W.C.
Paramyxovirus persistence. Consequences for host and virus.
In KINGSBURY D.W., *The Paramyxovirus*.
New York, Plenum Press, 1991, 299-331

144. REDPATH, S., GHAZAL, P., GASCOIGNE, N.R.J.
Hijacking and exploitation of Il-10 by intracellular pathogens.
Trends Microbiol., 2001, **9**, 86-92
145. REY NORES, J.A., McCULLOUGH, K.C.
Relative ability of different bovine leukocyte populations to support active replication of Rinderpest virus.
J. Virol., 1996, **70**, 4419-4426
146. ROHWEDDER, A., KEMINER, O., FORSTER, J., et al.
Detection of respiratory syncytial virus RNA in blood of neonates by polymerase chain reaction.
J. Med. Virol., 1998, **54**, 320-327
147. ROUX, L., WALDVOGEL, F.A.
Instability of the viral M protein in BHK-21 cells persistently infected with Sendai virus.
Cell, 1982, **28**, 293-302
148. RUEDA, P., DELGADO, T., PORTELA, A., et al.
Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial virus resistant to neutralization by monoclonal antibodies.
J. Virol., 1991, **65**, 3374-3378
149. SALKIND, A.R., McCARTHY, D.O., NICHOLS, J.E., et al;
Interleukin-1-inhibitor activity induced by respiratory syncytial virus: abrogation of virus-specific and alternate human lymphocyte proliferative responses.
J. Inf. Dis., 1991, **163**, 71-77
150. SAMAL, S.K., ZAMORA, M., McPHILLIPS, T.H., et al.
Molecular cloning and sequence analysis of bovine respiratory syncytial virus mRNA encoding the major nucleocapsid protein.
Virology, 1991, **180**, 453-456
151. SCHELCHER, F., SALAT, O., BEZILLE, P., et al.
Approche séroépidémiologique des troubles respiratoires épizootiques des « veaux d'aveyrons » : rôle du virus respiratoire syncytial.
Rev. Med. Vet., 1990, **141**, 117-123
152. SCHRIJVER, R.S., KRAMPS, J.A., MIDDEL, W.G.J., et al.
Bovine respiratory syncytial virus replicates minimally in bovine alveolar macrophages.
Arch. Virol., 1995, **140**, 1905-1917
153. SCHMID, A., SPIELHOFER, P., CATTANEO, R., et al.
Subacute sclerosing panencephalitis is typically characterized by alterations in the fusion protein cytoplasmic domain of the persisting measles virus.
Virology, 1992, **188**, 910-915
154. SEILER, P., SENN, B.M., BRÜNDLER, M-A., et al.
In vivo selection of neutralization-resistant virus variants but no evidence of B cell tolerance in lymphocytic choriomeningitis virus carrier mice expressing a transgenic virus-neutralizing antibody.

- J. Immunol., 1999, **162**, 4536-4541
155. SEVILLA, N., KUNZ, S., HOLZ, A., et al.
Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells.
J. Exp. Med., 2000, **192**, 1249-1260
156. SHARMA, A.K., WOLDEHIWET, Z.
Antigens of bovine respiratory syncytial virus in peripheral blood lymphocytes of experimentally infected lambs.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1996, **50**, 93-104
157. SHIMOKATA, K., NISHIYAMA, Y., ITO, Y., et al.
Pathogenesis of Sendai virus infection in the central nervous system of mice.
Inf. Immun., 1976, **13**, 1497-1502
158. SRIKIATKHACHORN, A., BRACIALE, T.J.
Virus-specific memory and effector T lymphocytes exhibit different cytokine responses to antigens during experimental murine respiratory syncytial infection.
J. Virol., 1997, **71**, 678-685
159. STADNYK, A.W., GILLAN, T.L., et ANDERSON, R.
Respiratory syncytial virus triggers synthesis of IL-6 in BALB/c mouse alveolar macrophages in the absence of virus replication.
Cell. Immunol., 1997, **176**, 122-126
160. STEINEUR, M.P., GROSJEAN, I., BELLA, C., et al.
Langherans cells are susceptible to measles virus infection and actively suppress T cell proliferation.
Eur. J. Dermatol., 1998, **8**, 413-420
161. STOTT, E.J., THOMAS, L.H., COLLINS, A.P., et al.
A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease.
J. Hyg. Camb., 1980, **85**, 257-270
162. STOTT, E.J., THOMAS, L.H., TAYLOR, G., et al.
A comparison of three vaccines against respiratory syncytial virus in calves.
J. Hyg. Camb., 1984, **93**, 251-261
163. STRECKERT, H.-J., PHILIPPOU, S., RIEDEL, F.
Detection of respiratory syncytial virus (RSV) antigen in the lungs of guinea pigs 6 weeks after experimental infection and despite production of neutralizing antibodies.
Arch. Virol., 1996, **141**, 401-410
164. TARDY-PANIT, M., BLONDEL, B., MARTIN, A., et al.
A mutation in the RNA polymerase of poliovirus type 1 contribute to attenuation in mice.
J. Virol., 1993, **67**, 4630-4638
165. THOMAS, L.H., STOTT, E.J., JONES, P.W., et al.

The possible role of respiratory syncytial virus and *Pasteurella* spp in calf respiratory disease.

Vet. Rec., 1980, **107**, 304-307

166. TISSOT, A.C., CIATTO, C., MITTI, P.R.E., et al.
Viral escape at the molecular level explained by quantitative T-cell receptor/peptide/MHC interactions and the crystal structure of a peptide/MHC complex.
J. Mol. Biol., 2000, **302**, 873-885
167. TOTH, T., HESSE, R.A.
Replication of five bovine respiratory viruses in cultured bovine alveolar macrophages.
Arch. Virol., 1983, **75**, 219-224
168. TREUHAF, M.W., BEEM, M.O.
Defective interfering particles of respiratory syncytial virus.
Infect. Immun., 1982, **37**, 439-444
169. TRIGO, F.J., BREEZE, R.G., EVERMANN, J.F., et al.
Pathogenesis of experimental bovine respiratory syncytial virus infection in sheep.
Am. J. Vet. Res., 1984, **45**, 1663-1670
170. ULLMANN-FRANKE, G., PFÖRTNER, C., WALTER, P., et al.
Alteration of pulmonary macrophage function by respiratory syncytial virus infection *in vitro*.
J. Immunol., 1995, **154**, 268-280
171. UTTENTHAL, A., JENSEN, N.P.B., BLOM, J.Y.
Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology.
Vet. Rec., 1996, **139**, 114-117
172. VALARCHER, J.F., BOURHY, H., GELFI, J., et al.
Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infection.
J. Clin. Microbiol., 1999, **37**, 1858-1862
173. VAN DER POEL, W.H.M., KRAMP, J.A., MIDDEL, W.G.J., et al.
Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds.
Arch. Virol., 1993, **133**, 309-321
174. VAN DER POEL, W.H.M., LANGEDIJK, J.P.M., KRAMP, J.A., et al.
Bovine respiratory syncytial virus antibodies in non-bovine species.
Arch. Virol., 1995, **140**, 1549-1555
175. VAN DER POEL, W.H.M., LANGEDIJK, J.P.M., KRAMP, J.A., et al.
Serological indication for persistence of bovine respiratory syncytial virus in cattle and attempts to detect the virus.
Arch. Virol., 1997, **142**, 1681-1696
176. VAN DER POEL, W.H.M., SCHRIJVER, R.S., MIDDEL, W.G.J., et al.

Experimental reproduction of respiratory disease in calves with non-cell-culture-passaged bovine respiratory syncytial virus.
Vet. Quart., 1996, **18**, 81-86

177. VERHOEFF, J., VAN DER BAN, M., VAN NIEUWSTADT, A.P.K.M.I.
Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: clinical and haematological findings.
Vet. Rec., 1984, **114**, 9-12
178. VERHOEFF, J., VAN NIEUWSTADT, A.P.K.M.I.
BRS virus, PI3 virus and BHV1 infections of young stock on self-contained dairy farms: epidemiological and clinical findings.
Vet. Rec., 1984, **114**, 288-293
179. VERHOEFF, J., WIERDA, A., BOON, J.H.
Clinical signs following experimental lungworm infection and natural bovine respiratory syncytial virus infection in calves.
Vet. Rec., 1988, **123**, 346-350
180. VILCEK, S., ELVANDER, M., BALLAGI-PORDANY, A., et al.
Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples.
J. Clin. Microb., 1994, **32**, 2225-2231
181. WELSH, R.M., BRUBAKER, J.O., VARGAS-CORTES, M., et al.
Natural Killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cell-dependent control of virus occur independently of T and B cell function.
J. Exp. Med., 1991, **173**, 1053-1063
182. ZAJAC, A.J., BLATTMAN, J.N., MURALI-KRISHNA, K., et al.
Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function.
J. Exp. Med., 1998, **188**, 2205-2213
183. ZINKERNAGEL, R.M., PLANZ, O., EHL, S., et al.
General and specific immunosuppression caused by antiviral T-cell responses.
Immunol. Rev., 1999, **168**, 305-315
184. ZURBRIGGEN, A., GRABER, H.U., WAGNER, A., et al.
Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread.
J. Virol., 1995, **69**, 1678-1686

Toulouse, 2002

NOM : CALLENDRET

PRENOM : BENOIT

TITRE : Infection expérimentale de veaux par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin.
Evaluation de la persistance virale.

RESUME :

Le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRSB) est une cause majeure de maladie respiratoire des jeunes bovins. La persistance du VRSB et du VRS humain a pu être démontrée *in vitro* sur différentes lignées cellulaires et *in vivo* sur des cobayes ou sur des sujets immunodéprimés. En revanche, la persistance du VRS *in vivo* chez son hôte naturel immunocompétent n'a jamais pu être mise en évidence. Elle a pourtant depuis longtemps été fortement suspectée à partir des données épidémiologiques. En outre, le VRS possède plusieurs caractéristiques communes avec des virus susceptibles de persister.

Dans notre expérience, conduite sur 25 veaux immunocompétents, les ARN messager et génomique par RT-PCR, ainsi que les protéines F et G par immunohistochimie ont été détectés dans les nœuds lymphatiques pulmonaires jusqu'à 71 jours après inoculation. La persistance du VRSB semble localisée dans les lymphocytes B. Les expériences de cocultures suggèrent que le virus est toujours capable de se répliquer, même si le virus n'a pas pu être isolé ni l'effet cytopathogène retrouvé. C'est la première fois que la persistance d'un VRS est prouvée chez son hôte spécifique.

MOTS-CLES : virus respiratoire syncytial bovin ; persistance virale ; lymphocytes B ; ganglions lymphatiques

ENGLISH TITLE : Experimental infection of calves by Bovine Respiratory Syncytial Virus.
Evaluation of viral persistence.

ABSTRACT:

Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) is a major cause of respiratory disease in young cattle. BRSV and human RSV persistence has already been demonstrated *in vitro* in different cell lines and *in vivo* in guinea pigs and immunodeficient subjects. But RSV persistence has never been proved in their natural and immunocompetent hosts. However, it has been strongly suspected considering epidemiological data. Moreover, some mechanisms required for viral persistence can be found for RSV *in vitro*.

In our study on 25 immunocompetent calves, BRSV genomic and messenger RNA by RT-PCR, as well as F and G proteins by immunohistochemistry, were detected in pulmonary lymph nodes upon 71 days after inoculation. BRSV persistence seems to be localized in B lymphocytes. Coculture experiments suggest that virus is still able to replicate, even though no infectious virus was isolated nor cytopathic effect recorded. This is the first experiment showing RSV persistence in his natural host.

KEY WORDS: bovine respiratory syncytial virus; viral persistence; B-lymphocytes; lymph nodes.