
INFECTION PAR LE VIRUS D'IMMUNODEFICIENCE BOVINE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Thierry LOUGE

Né, le 23 avril 1972 à VERSAILLES (Yvelines)

Directeur de thèse : M. le Professeur François SCHELCHER

JURY

PRESIDENT :

M. Jacques IZOPET

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

Partie 1/2

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

Directeur	: M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	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*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

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. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

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*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRE 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. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
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**, *Zootecnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
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*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
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

- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
Mme **CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- M. **DESMAIZIERES Louis-Marie**, *Clinique équine*

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIE

- M. **REYNOLDS Brice**, *Pathologie chirurgicale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

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

A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Virologie

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jacques IZOPET de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

A Monsieur le Professeur François SCHELCHER
Professeur de L'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie Médicale du Bétail et des animaux de Basse-Cour

Je remercie Monsieur le professeur François SCHELCHER pour la confiance qu'il m'a accordé en acceptant de diriger cette thèse.

A Monsieur le Docteur Gilles MEYER
Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des Ruminants

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Docteur Gilles MEYER qui me fait l'honneur d'être membre du jury.

A Béatrice
pour m'avoir soutenu tout au long de ce travail

A ma fille, Marion

A Aurore, pour son aide

A ma famille

A mes amis

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
I VIROLOGIE.....	11
1. LA FAMILLE DES <i>RETROVIRIDAE</i>	11
A. <i>Virion</i>	11
B. <i>Protéines</i>	11
C. <i>Le génome</i>	12
D. <i>La Réplication</i>	13
2. CLASSIFICATION DES <i>RETROVIRIDAE</i>	13
3. CARACTERISTIQUES DISTINCTIVES DES LENTIVIRUS	17
A. <i>Virion</i>	17
B. <i>Génome</i>	17
C. <i>Distribution</i>	17
4. CARACTERISTIQUES DU VIB.....	18
A. <i>La particule virale</i>	18
i) L'enveloppe	18
ii) La capsid e	19
iii) Le cœur de la particule.....	19
♦ L'ARN viral et les protéines associées	19
♦ Les enzymes.....	20
♦ Les ARN _t	20
B. <i>De la particule virale au provirus</i>	22
C. <i>Le provirus</i>	25
i) Les protéines de structure Gag et Gag-Pol	26
ii) La protéine de structure Env	27
iii) Les gènes accessoires.....	29
♦ La protéine Tat.....	30
♦ La protéine Rev.....	33
♦ La protéine Tmx.....	34
♦ Les protéines Vif, Vpw et Vpx	34

♦ Le LTR.....	35
II LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE.....	38
1. LA SEROLOGIE	38
A. <i>Immunofluorescence indirecte</i>	38
B. <i>La technique de l'immunotransfert ou Western Blot</i>	39
i) Technique.....	39
♦ Généralités	39
♦ Techniques spécifiques au VIB	40
C. <i>La technique ELISA</i>	42
D. <i>Comparaison des techniques sérologiques</i>	45
i) Comparaison IFI et WB.....	45
ii) Comparaison IFI et ELISA	46
iii) Comparaison WB et ELISA	47
iv) IFI, Western Blot et radio-immuno-précipitation	47
2. LA VIROLOGIE.....	48
A. <i>L'activité de la transcriptase inverse</i>	48
B. <i>L'isolement</i>	48
C. <i>Les techniques de PCR</i>	49
i) Les PCR appliquées au VIB	50
ii) Comparaison de 5 PCR différentes.....	54
iii) PCR hybridation <i>in situ</i>	55
D. <i>Comparaison des différents tests</i>	58
i) Comparaison de l'isolement et de l'activité de la transcriptase inverse	58
ii) Comparaison du WB, de l'isolement et de la PCR.....	58
iii) Comparaison IFI, isolement et PCR	59
iv) Western Blot et PCR.....	61
III PREVALENCE DE L'INFECTION PAR LE VIB.....	63
1. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES MENEES EN AMERIQUE	63
A. <i>Etats-Unis</i>	64
B. <i>Canada</i>	64
C. <i>Brésil</i>	65
D. <i>Costa-Rica</i>	65

2.	ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES MENEES EN ASIE ET EN OCEANIE	67
A.	<i>Nouvelle-Zélande</i>	67
B.	<i>Australie</i>	68
C.	<i>Japon</i>	69
D.	<i>en Corée du Sud</i>	70
E.	<i>Pakistan</i>	70
F.	<i>Cambodge</i>	71
G.	<i>Iles de Bali et de Nusa Penida</i>	71
3.	ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES MENEES EN EUROPE	72
A.	<i>Pays- Bas</i>	72
B.	<i>Allemagne</i>	72
C.	<i>Grande-Bretagne</i>	73
D.	<i>Italie</i>	73
E.	<i>France</i>	73
IV	LES MODES DE TRANSMISSION	77
1.	TRANSMISSION EXPERIMENTALE	77
2.	TRANSMISSION HORIZONTALE	77
A.	<i>Matières potentiellement virulentes</i>	77
i)	Le sperme	77
◆	Les autres lentivirus	77
◆	Le VIB	78
ii)	Les embryons	79
iii)	Le lait	81
◆	Le VIH et les autres rétrovirus	81
◆	Le VIB	82
iv)	Le sang	83
v)	La salive	83
vi)	Facteurs de risque de transmission	83
3.	TRANSMISSION VERTICALE	86
4.	TRANSMISSION EXTRA-SPECIFIQUE	87
V	LE TROPISME	89
1.	LE TROPISME D'HOTE	89

A.	<i>Le VIB et les ovins et caprins.....</i>	89
B.	<i>Le VIB et les lapins</i>	89
C.	<i>Le VIB et les autres rongeurs</i>	90
D.	<i>Le VIB et l'Homme</i>	90
2.	LE TROPISME D'ORGANE	90
3.	LE TROPISME CELLULAIRE	91
VI	MALADIES DUES AU VIB	94
1.	REPERCUSSIONS SUR LA NUMERATION FORMULE	94
2.	REPERCUSSIONS SUR LA REPOSE IMMUNITAIRE	95
A.	<i>Action sur les lymphocytes.....</i>	95
i)	Evaluation du rapport CD4/CD8	95
ii)	Action sur les lymphocytes B	98
iii)	Action sur la réponse immunitaire.....	99
B.	<i>Action sur les lignées monocytes/macrophages.....</i>	103
C.	<i>Action sur les polynucléaires neutrophiles.....</i>	104
3.	REPERCUSSIONS CLINIQUES	105
i)	Changements précoces.....	107
ii)	VIB et performances zootechniques	108
iii)	VIB et troubles nerveux.....	108
♦	les méningo-encéphalites.....	108
♦	Le syndrome paraplégique bovin.....	110
iv)	VIB et lymphosarcome multicentrique.....	111
	CONCLUSION	115
	BIBLIOGRAPHIE.....	117

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Les Figures

<i>Fig. 1 : Représentation schématique de la particule virale du VIB et localisation des protéines.</i>	<i>21</i>
<i>Fig. 2 : Schéma simplifié de la rétrotranscription</i>	<i>22</i>
<i>Fig. 3 : Le cycle infectieux du VIB (d'après GONDA et coll, 1992).....</i>	<i>24</i>
<i>Fig. 4 : Organisation génomique du VIB et du VIH-1.</i>	<i>37</i>
<i>Fig. 5 : Schéma simplifié de la technique ELISA sandwich : étape 1</i>	<i>42</i>
<i>Fig. 6 : Schéma simplifié de la technique ELISA sandwich : étape 2a</i>	<i>43</i>
<i>Fig. 7 : Schéma simplifié de la technique ELISA sandwich : étape 2b</i>	<i>44</i>
<i>Fig. 8 : Schéma simplifié de la technique ELISA sandwich : étape 3.</i>	<i>44</i>
<i>Fig. 9 : Position des nucléotides de l'extrémité 5' des amorces du gène pol et du gène env sur le génome proviral du VIB127 R29 (GARVEY et coll., 1990).</i>	<i>52</i>
<i>Fig. 10 : Séquences des amorces des PCR dirigées contre les séquences des gènes gag et pol (d'après NADIN-DAVIS et coll., 1993)</i>	<i>54</i>

Les Tableaux

<i>Tabl. 1 : Classification de la famille des Rétrovirus d'après HUNTER et coll., 2002 ...</i>	<i>14</i>
<i>Tabl. 2 : Classification de la famille des Rétrovirus d'après HUNTER et coll., 2002 (suite)</i>	<i>15</i>
<i>Tabl. 3 : Classification de la famille des Rétrovirus d'après HUNTER et coll., 2002 (fin)</i>	<i>16</i>
<i>Tabl. 4 : Résumé de différentes techniques PCR.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabl. 5 : Comparaison IFI, isolement et PCR d'après GRADIL et coll., 1999.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabl. 6 : Bilan des tests effectués d'après GRADIL et coll., 1999.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabl. 7 : Récapitulatif des différentes études épidémiologiques sur le VIB en Amérique.</i>	<i>63</i>
<i>Tabl. 8 : Récapitulatif des différentes études épidémiologiques sur le VIB en Asie et Océanie.</i>	<i>67</i>
<i>Tabl. 9 : Résultats de l'étude épidémiologique menée en Nouvelle-Zélande (d'après HORNER, 1991)</i>	<i>68</i>
<i>Tabl. 10 : Récapitulatif des différentes études épidémiologiques sur le VIB en Europe ..</i>	<i>72</i>
<i>Tabl. 11 : Résultats du dépistage du VIB dans les Landes et en Vendée (France) (d'après POLACK et coll., 1996).....</i>	<i>74</i>
<i>Tabl. 12 : Prévalence du VIB dans 4 troupeaux infectés de Vendée (d'après POLACK et coll., 1996)</i>	<i>74</i>
<i>Tabl. 13 : Isolement du VIB sur des animaux infectés (d'après ROVID et coll., 1995)..</i>	<i>103</i>

INTRODUCTION

Les rétrovirus, qui sont des virions à ARN, ont retenu l'attention des chercheurs, à partir de 1983 car ils sont à l'origine d'un certain nombre de cancers. Certains d'entre eux, en particulier, sont associés à des leucémies, comme par exemple le virus de la leucémie lymphoïde T humaine. Plus récemment, un autre type de rétrovirus, le virus VIH (virus de l'immunodéficience humaine), a été identifié comme étant responsable du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). Outre leur intérêt en biologie moléculaire, les rétrovirus ont permis la découverte d'un mode exceptionnel de réplication de l'ARN en ADN, ce qui a ouvert une voie de recherche dans le domaine de la régulation et de la différenciation cellulaire.

Le Virus de l'Immunodéficience Bovine, noté VIB (ou BIV pour Bovine Immunodeficiency Virus, en anglais) a été découvert en 1969, lors de travaux effectués par MALMQUIST et son équipe sur une autre maladie rétrovirale, la Leucose Bovine Enzootique (LBE). Ce virus a été isolé chez une vache Holstein de 8 ans gravide, identifiée par le numéro R29, atteinte de symptômes évocateurs de la LBE (lymphocytose persistante, hypertrophie des ganglions lymphatiques, dégradation marquée de l'état général). Toutefois, à l'autopsie, aucune lésion tumorale viscérale n'a pu être observée (MALMQUIST et coll., 1969 ; VAN DER MAATEN et coll., 1972). Le virus fut désigné en 1972, par le terme de « *Bovine Visna-like Virus* », car il rappelait par sa structure le virus Maedi-Visna des ovins.

Ce n'est qu'avec l'apparition du VIH (responsable du SIDA chez l'Homme), que l'intérêt pour le VIB a été relancé. Le VIB est alors, dans un premier temps, appelé « *Bovine Immunodeficiency-like Virus* » avant d'obtenir son appellation actuelle (Virus de l'Immunodéficience Bovine). Le virus est alors plus clairement inclus dans la même famille et dans le même genre que le virus du SIDA. Deux clones du provirus ont été séquencés (GONDA et coll., 1987 ; GARVEY et coll., 1990).

Le VIB est le troisième lentivirus animal, découvert après celui des Equidés (Anémie Infectieuse Equine) (VALLEE et CARRE, 1904) et celui des Ovins (Virus Maedi-Visna Ovin) (SIGURDSSON et coll., 1957 ; SIGURDSSON et coll., 1958 ; KENEDY et coll., 1968).

Nous nous attacherons, dans ce travail, à faire la synthèse bibliographique des données actuelles connues pour le VIB. Après avoir rappelé les caractéristiques biologiques de ce virus, nous essaierons d'évaluer sa répartition géographique, ainsi que ses répercussions sur la santé animale.

I VIROLOGIE

1. La famille des *Retroviridae*

A. Virion

Les virions sont sphériques, enveloppés, de 80 à 100 nm de diamètre, avec en surface des projections de glycoprotéines, d'environ 8 nm. La structure interne se décompose en une capsidie sphérique ou en forme de bâtonnet contenant une ribonucléoprotéine peut-être hélicoïdale. En coupes fines, il est possible de distinguer une enveloppe externe, une membrane interne (encore appelée coque) et un nucléoïde central. Ce dernier est disposé de façon excentrique dans les virions de types B, et de façon concentrique dans les virions de type C ; il a la forme d'un bâtonnet ou d'un cône tronqué chez les lentivirus.

La densité des rétrovirus est comprise entre 1,16 et 1,18 g/cm³ en gradient de saccharose. Les rétrovirus sont dégradés par les solvants des lipides et les détergents. Les glycoprotéines de surface sont partiellement détachables par les enzymes protéolytiques. Ils sont relativement résistants aux rayonnements ultra-violets.

B. Protéines

Les protéines représentent environ 60 % du poids du virion. Il s'agit de :

Trois protéines internes de structure non glycosylées (toutes codées par le même gène *gag*): MA (matrice) ; CA (capsidie) ; et NC (nucléo-capsidie). La protéine MA est souvent acylée (par exemple par un myristate) à son extrémité -NH₂.

Une protéase (PR) codée par le gène *pro*.

Une transcriptase inverse (RT) et une intégrase (IN) codées par le gène *pol*.

Deux protéines d'enveloppe sont codées par le gène *env* : SU (surface) et TM (transmembranaire).

C. Le génome

L'acide nucléique est composé d'un dimère d'ARN_{mc} linéaire, brin positif, de 7 à 10 x 10³ bases de long (environ 2 % du poids de la particule). Les monomères sont maintenus entre eux par des liaisons hydrogène. L'ARN_m polyadénylé à l'extrémité 3', avec une structure de coiffe (M7 G5ppp 5'GmpNp) à l'extrémité 5' du génome

Bien que les virions possèdent deux exemplaires du génome, on ne sait pas si les deux sont fonctionnels. L'information génétique de base consiste en 4 gènes :

-*gag*, qui code pour les protéines de structure interne du virion ;

-*pro*, qui code pour la protéase du virion ;

-*pol*, qui code pour la transcriptase inverse ;

-et *env*, qui code pour les glycoprotéines d'enveloppe du virion.

L'ordre de ces gènes est invariablement 5' *gag, pro, pol, env* 3'. Quelques rétrovirus, comme les lentivirus, contiennent aussi des gènes codant pour des protéines n'entrant pas dans la composition du virion, mais qui sont importantes pour la régulation de l'expression. D'autres transportent une information génétique dérivée de la cellule, pour la synthèse de protéines non structurales qui sont importantes en matière de pathogenèse. Ces séquences d'origine cellulaire sont incorporées dans un génome rétroviral complet (certaines souches de virus du sarcome de ROUS), ou se substituent à des séquences répliquatives éliminées du virus (la plupart des autres rétrovirus rapidement oncogènes). De telles délétions rendent la répllication virale déficiente et dépendante, pour la production d'une descendance infectieuse, d'un virus auxiliaire non transformant. Dans bien des cas les séquences d'origine cellulaire forment un gène par fusion avec une information structurale virale, gène qui est alors traduit en une protéine (p. ex. la protéine « gag-onc »)

D. La Réplication

La rétrotranscriptase, produite à partir de l'ARN viral, transcrit le génome viral en ADN bicaténaire ; celui-ci migre dans le noyau avec une intégrase virale qui l'insère dans le génome de la cellule infectée.

Cet ADN bicaténaire viral est appelé un provirus : il est désormais assimilé à un gène cellulaire et pourra, dans certaines conditions, être transcrit par la cellule, ce qui donnera soit des ARN-messagers (ARN_m) soit des génomes viraux .

2. Classification des *Retroviridae*

A la lumière des connaissances actuelles sur les rétrovirus, la classification antérieure en trois sous-familles (*Oncovirinae*, *Lentivirinae*, *Spumavirinae*), ne semble plus appropriée. On classe actuellement les rétrovirus en 7 genres (voir Tableaux 1, 2 et 3), qui sont les suivants (HUNTER et coll., 2001):

Alpharetrovirus

Betaretrovirus

Gammaretrovirus

Deltaretrovirus

Epsilonretrovirus

Lentivirus

Spumavirus

A ce jour quatre rétrovirus bovins ont été décrits :

1. Le **virus de la leucose bovine enzootique** (*oncovirus du genre Deltaretrovirus*) (GHYSDAEL et coll., 1984 ; SCHWARTZ et coll., 1994) ;
2. Le **virus syncytial bovin** (*spumavirus*) sans pouvoir pathogène évident chez l'animal (MALMQUIST et coll., 1969 ; MILLER et coll., 1969) ;

3. Le **Virus de l'Immudéficience Bovine** (*lentivirus*) qui nous intéressera dans ce travail (VAN DER MAATEN et coll., 1972 ; GONDA et coll., 1987) ;
4. Le **virus de la Jembrana Disease** (*lentivirus*) dont on soulignera plus particulièrement ici les caractéristiques communes avec le VIB (KERTAYADNYA et coll., 1993 ; CHADWICK et coll., 1995a ; CHADWICK et coll., 1995b).

GENRE	ESPECES (espèce type)
<i>Alpharetrovirus</i>	Virus de la leucose aviaire (VLA) Virus du carcinome aviaire Mill Hill 2 Virus du sarcome de Rous Virus de la myéloblastose aviaire Virus de la myélocytomatose 29 Virus du sarcome aviaire CT10 Virus du sarcome de Fujinami Virus du sarcome UR2 Virus du sarcome de Y73
<i>Betaretrovirus</i>	Virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) Virus Langur Virus du singe de Mason-Pfizer Virus de l'adénocarcinome pulmonaire ovin Rétrovirus du singe-écureuil

Tabl. 1 : Classification de la famille des Rétrovirus d'après HUNTER et coll., 2002

GENRE	ESPECES (espèce type)
<i>Gammaretrovirus</i>	<p>Virus de la leucémie murine</p> <p>Virus leucémogène félin (FeLV)</p> <p>Virus de la leucémie du gibbon</p> <p>Oncovirus type C du Cobaye</p> <p>Oncovirus type C du porc</p> <p>Virus du sarcome félin de Gardner-Arnstein</p> <p>Virus du sarcome félin Hardy-Zuckerman</p> <p>Virus du sarcome murin de Harvey</p> <p>Virus du sarcome murin de Kirsten</p> <p>Virus du sarcome murin de Moloney</p> <p>Virus du sarcome murin de Finkel-Biskis-Jenkins</p> <p>Virus du sarcome félin de Snyder-Theilen</p> <p>Virus du sarcome du singe laineux</p> <p>Rétrovirus de vipère</p> <p>Virus syncitial du poussin</p> <p>Virus de la reticulo-endothéliose (souche T,A)</p> <p>Virus de la nécrose de la rate du canard Trager</p>
<i>Deltaretrovirus</i>	<p>Virus de la leucose bovine enzootique (VLBE)</p> <p>Virus de la leucémie lymphoïde T des primates de type 1</p> <p>Virus de la leucémie lymphoïde T des primates de type 2</p> <p>Virus de la leucémie lymphoïde T des primates de type 3</p>
<i>Epsilonretrovirus</i>	<p>Virus du sarcome dermique de Walleye</p> <p>Virus de l'hyperplasie épidermique de Walleye type 1</p> <p>Virus de l'hyperplasie épidermique de Walleye type 2</p> <p>Virus de l'hyperplasie de Perch</p> <p>Rétrovirus du poisson à tête de serpent (<i>Channa spp.</i>)</p>

Tabl. 2 : Classification de la famille des Rétrovirus d'après HUNTER et coll., 2002 (suite)

GENRE	ESPECES (espèce type)
<i>Lentivirus</i>	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) Virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (VIH-2) Virus de l'immunodéficience simienne (VIS) Virus de l'immunodéficience bovine (VIB) Virus de la Jembrana disease (VJD) Virus de l'anémie infectieuse équine (VAIE) Virus de l'immunodéficience féline (VIF) Virus de l'immunodéficience féline de Oma Lentivirus du puma Virus de l'arthrite-encéphalite caprine (VAEC) Virus Maedi Visna ovin (VMVO)
<i>Spumavirus</i>	Virus spumeux simien de type 1 Virus spumeux simien de type 3 Virus syncytial bovin (VSB) Virus spumeux du chimpanze Virus syncytial félin

Tabl. 3 : Classification de la famille des Rétrovirus d'après HUNTER et coll., 2002 (fin)

3. Caractéristiques distinctives des lentivirus

A. Virion.

Morphologie distinctive, mais sans dénomination, avec nucléoïde en forme de barre ou de cône tronqué. Assemblage à la membrane cellulaire. Protéines : MA environ 17 kDa ; CA environ 24 kDa ; NC = 7-11 kDa ; PR = 14 kDa ; SU = 120 kDa ; TM = 41 kDa.

B. Génome.

Environ 9200 bases. Plusieurs gènes additionnels, variants quelque peu selon les groupes (p. ex. : dans le VIH- 1 : *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*), dont les produits sont impliqués dans la régulation de la synthèse et dans la maturation de l'ARN viral, et peut-être aussi dans d'autres fonctions ; ils sont localisés du côté 3' de *gag-pro-pol* et du côté 5' de *env*, avec l'un d'eux (*nef* du VIH) situé du côté 3' de *env*. Amorceur: ARN_t_{1,2}^{Lys}. LTR = 600 pb (U3: 450 ; R : 100 ; U5: 70).

C. Distribution.

Virus exogènes à transmission horizontale et verticale, chez l'homme et beaucoup d'autres groupes d'animaux. On ne connaît pas de virus endogènes apparentés. Associés à diverses maladies, dont des immunodéficiences, des troubles neurologiques, des arthrites. On n'a pas isolé de membres de ce groupe possédant des oncogènes.

C'est donc ce virus, le VIB (virus de l'immunodéficiences bovine) que nous allons étudier maintenant, alors que nous avons rappelé les caractéristiques majeures de cette famille, les ***Retroviridæ***, et que nous l'avons situé dans la classification des virus, parmi les autres virus du genre **Lentivirus**,

4. Caractéristiques du VIB

A. La particule virale

La particule virale ou virion, encore dénommée lentivirion, correspond au virus pendant la phase extracellulaire de son cycle de vie. C'est elle qui va s'adsorber à la surface de la cellule-hôte (lymphocytes circulants, neurones, cellules microgliales par exemple - ZHANG et coll., 1997-).

Cette particule virale a une structure caractéristique des rétrovirus (cf. supra) (VAN DER MAATEN et coll., 1972). De forme sphérique, le virion est composé d'une enveloppe qui entoure une capsid. Au centre de la capsid se trouve l'ARN viral, accompagné de quelques protéines indispensables pour sa protection et pour le déroulement des premières étapes de l'infection cellulaire.

i) L'enveloppe

L'enveloppe de la particule virale correspond à une membrane cellulaire lipidique (une partie des constituants de l'enveloppe provient de la cellule hôte) où seraient enfoncés de multiples « clous » ou spicules.

Chaque spicule est constitué :

- d'une protéine gp100 (*gp* pour indiquer qu'il s'agit d'une protéine glycosylée, et 100 pour donner sa masse moléculaire théorique exprimée en kilodalton), qui dépasse à l'extérieur et qui forme la « tête du clou ». Celle-ci est également appelée SU (pour protéine de SURface). Elle se lie de façon non covalente avec la région centrale de la gp45 (GARVEY et coll., 1990).
- d'une protéine gp45, qui « ancre le clou » dans la bicouche lipidique. Celle-ci, transmembranaire, elle est également notée TM (GARVEY et coll., 1990).

A l'instar des glycoprotéines d'enveloppe de tous les lentivirus, celles du VIB s'assemblent en oligomères pour constituer les spicules visibles à la surface des particules virales matures (RASMUSSEN et coll.,1992).

Enfin, on retrouve des molécules de la protéine p16 (*p* pour indiquer qu'il s'agit bien d'une protéine, mais non glycosylée cette fois), encore appelée MA, puisque cette couche est souvent appelée matrice, qui tapisse l'intérieur de la membrane lipidique.

ii) La capside

En microscopie électronique, le VIB a la morphologie caractéristique des lentivirus, une capside éicosaédrique visualisée sous la forme d'un cône.

La protéine p26, phosphorylée, encore notée CA (pour protéine de CApside), représente la protéine majeure de la capside.

iii) Le cœur de la particule

La capside renferme l'ARN viral ainsi que d'autres molécules associées. Cet ensemble, capside, ARN viral et les molécules qui lui sont associées, constitue le « *core* » de la particule virale.

◆ L'ARN viral et les protéines associées

L'ARN du VIB est composé de deux brins d'ARN simple brin, identiques, encore appelés ARN monocaténaire et notés ARN_{mc}, qui sont disposés tête-bêche, et qui portent l'information génétique virale.

Chacune des deux molécules de l'ARN génomique du lentivirion a une longueur d'environ 8,5 kilobases.

◆ Les enzymes

A côté de ces deux molécules d'ARN viral se trouvent des enzymes comme la rétrotranscriptase (encore notée RT) ou transcriptase inverse, l'intégrase (IN ou endonucléase), une protéase (PR) et une ribonucléase H (ARNase H). On dénombre environ cinquante exemplaires de chacune de ces molécules.

Elles accompagnent le virus et lui permettent, le moment venu de se répliquer, de s'intégrer, d'achever sa maturation, etc...

De plus, on retrouve une protéine p7, ou protéine NC (pour protéine de nucléocapside), avec deux alignements de cystéine susceptibles de générer un motif en doigt de zinc. Cette structure secondaire interagit probablement avec l'ARN génomique pour permettre son incorporation dans la particule virale en formation, et le protégerait contre la dégradation par des nucléases cellulaires.

◆ Les ARN_t

La rétrotranscriptase, comme toute ADN polymérase, a besoin d'une amorce. C'est un ARN_{transfert} (ARN_t) qui jouera cette fonction. Dans le cas du VIB, cet ARN_t est l'ARN_{t1,2}^{Lys}. Il provient de l'hôte. Un ARN_t est ainsi lié à chacun des deux ARN viraux.

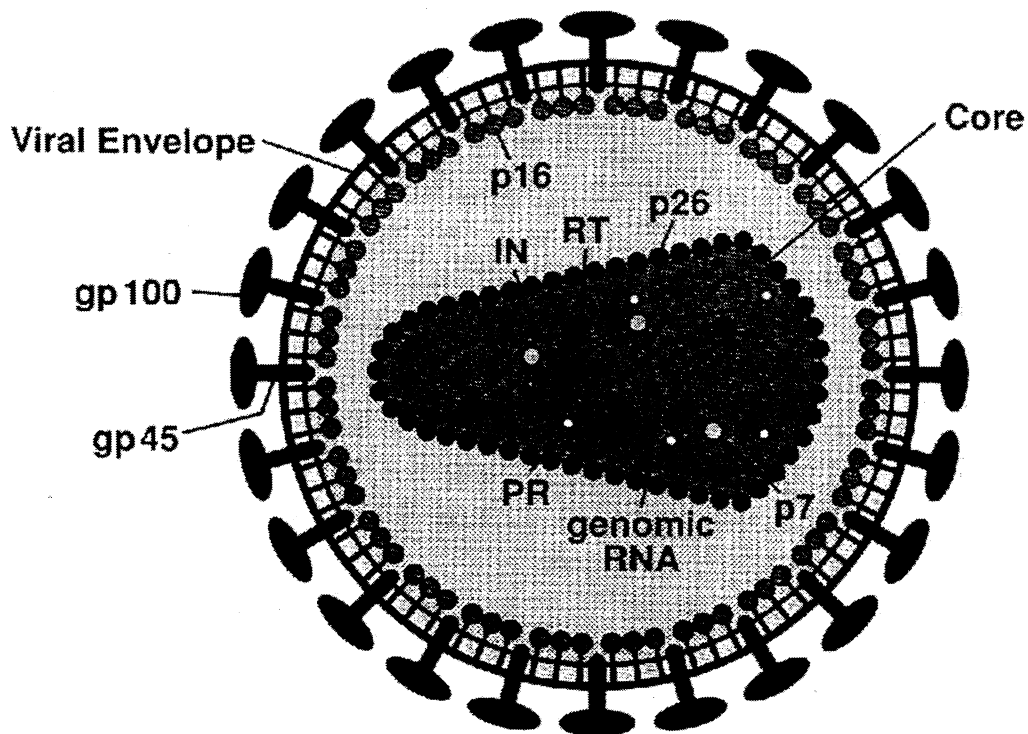


Fig. 1 : Représentation schématique de la particule virale du VIB et localisation des protéines.

Les protéines constitutives de l'enveloppe sont les protéines gp100 (SU), gp45TM et p16 (MA). Les protéines du « core » sont p26 (CA), p7 (NC), PR, RT et IN. Le génome viral est par ailleurs enfermé dans le « core » (d'après GONDA et coll., 1994).

B. De la particule virale au provirus

Par analogie avec l'ensemble des *Retroviridæ* et en l'absence de données propres au VIB, le cycle de réplication est déduit de celui du VIH (GONDA et OBERSTE, 1992).

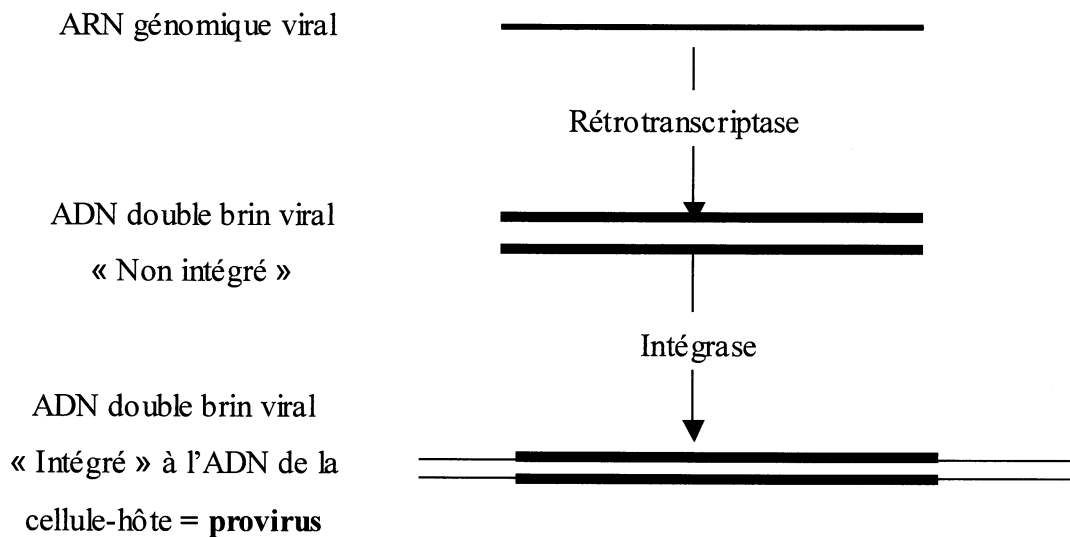


Fig. 2 : Schéma simplifié de la rétrotranscription

Le cycle infectieux débute lorsque des particules virales libres s'attachent, grâce aux glycoprotéines de surface, aux récepteurs cellulaires spécifiques dont la nature n'a pas encore été précisée dans le cas du VIB.

Elles pénètrent ensuite dans la cellule par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de l'hôte. L'ARN génomique et les protéines issues du gène *pol* enfermés dans la capsid diffusent dans le cytoplasme de la cellule infectée. Sous l'action de la

transcriptase inverse ou reverse transcriptase (RT) et de la ribonucléase, l'ARN monocaténaire (ARN_{mc}) est transformé en ADN bicaténaire (ADN_{bc}).

La RT possède plusieurs activités enzymatiques. Tout d'abord, une activité ADN polymérase qui permet la copie de l'ARN viral en ADN simple brin. Il se forme alors un hybride ARN-ADN. Puis l'activité ARNase de la RT détruit le brin d'ARN (ainsi que l' $ARN_{transfert}$ qui a servi d'amorce). Enfin, un 2^{ème} brin d'ADN est formé, par copie complémentaire de l'ADN simple brin, pour donner un ADN double brin contenant donc toutes les informations génétiques initialement portées par l'ARN viral.

A ce propos, il faut noter que la RT est une ADN polymérase dénuée de toute fonction d'édition. Les mutations sont donc relativement nombreuses. Cela explique en partie la grande variabilité des séquences nucléotidiques des rétrovirus.

Cette synthèse par la RT s'effectue dans la capsid.

Cette molécule d' ADN_{bc} double-sens, nommée provirus, est insérée dans l'ADN nucléaire de la cellule hôte, par clivage de son ADN sous l'effet d'une nouvelle enzyme : l'intégrase (IN). Le provirus, ainsi inclus dans le génome de l'hôte peut rester inactif pendant des années, jusqu'à ce que des signaux cellulaires spécifiques viennent déclencher l'expression génique du LTR. Celle-ci est amplifiée par l'expression de la protéine Tat virale.

Ensuite, l'épissage de l' ARN_m génomique primaire et le transport vers le cytoplasme font appel aux mécanismes d'épissage de la cellule hôte ainsi qu'à une autre protéine d'origine virale, la protéine Rev. La traduction se fait donc dans le cytoplasme des cellules infectées et grâce aux ribosomes de l'hôte.

Les précurseurs viraux Gag et Gag-Pol sont assemblés sous la membrane plasmique et se lient à l'ARN viral au cours de la phase de bourgeonnement. L'enveloppe virale est alors ornée des protéines transmembranaires (TM) et de surface (SU). C'est le précurseur Gag, Pr53 qui est responsable de l'initiation de la phase de bourgeonnement et de l'incorporation de l'ARN génomique aux particules virales en formation (BATTLES et coll., 1992 ; GONDA et coll., 1994).

Après la libération des particules virales, le précurseur Gag est clivé en plusieurs sous-unités fonctionnelles. Ce n'est qu'alors que la particule virale adopte sa morphologie de particule virale mature, potentiellement infectieuse : le cycle peut alors recommencer (voir figure 3).

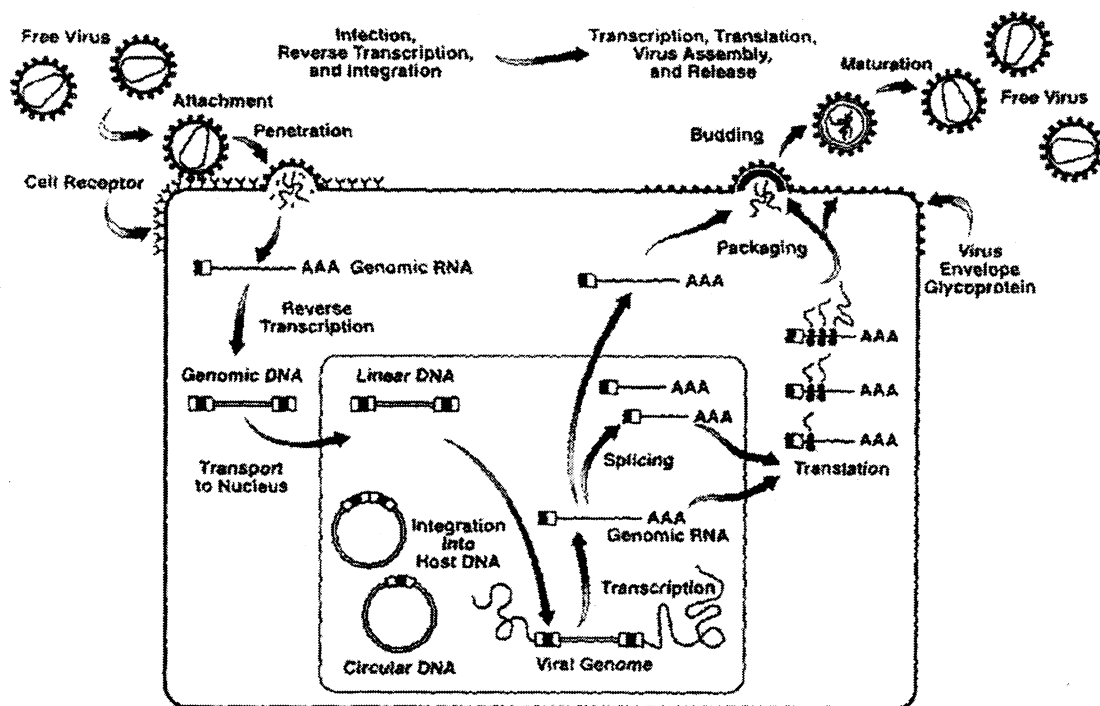


Fig. 3 : Le cycle infectieux du VIB (d'après GONDA et coll., 1992)

C. Le provirus

La carte génétique complète du VIB a pu être déterminée grâce aux nombreux travaux de clonage et de séquençage du provirus retrouvé dans les cellules infectées (BRAUN et coll., 1988, GARVEY et coll., 1990). Des études complémentaires faisant appel aux techniques de Northern Blot et de clonage de l'ADN complémentaire ont contribué à déterminer la complexité génétique de ce virus (OBERSTE et coll., 1991, LIU et coll., 1992 ; OBERSTE et coll., 1993 ; PALLANSH et coll., 1992).

Chacune des deux molécules de l'ADN génomique du provirus du VIB est composé d'environ 8960 paires de bases.

Le génome du VIB est semblable à celui des autres rétrovirus, à savoir dans le sens 5'-3', la présence des trois gènes de structure caractéristiques de la région codante (*gag*, *pol* et *env*).

Ils sont encadrés de part et d'autre par les deux séquences LTR, et sont associés à une « région centrale », invariablement encadrée par les gènes *pol* et *env* et caractéristique des lentivirus (BRAUN et coll., 1988). Cela permet de schématiser l'organisation virale de la façon suivante (BRAUN et coll., 1988 ; GARVEY et coll., 1990) :

5'-LTR-*gag-pol*-« région centrale »-*env*-LTR-3'

La séquence nucléotidique et aminée complète du VIB a été déterminée à partir de 2 clones proviraux biologiquement actifs, les clones BIV106 et BIV127, tous deux issus de la souche R29 initiale (GARVEY et coll., 1990).

Le génome viral du BIV127 est composé de 8482 nucléotides, contre 8391 pour le BIV106. Cette variabilité s'exprime notamment par des délétions, une majeure (87 nucléotides entre les nucléotides 5819 et 5905) et deux mineures (2 fois 2 nucléotides entre 99 et 100, et entre 8470 et 8471). De nombreuses substitutions nucléotidiques sont également constatées.

Le fait que le BIV127 soit composé d'un matériel génétique plus important, a conduit l'auteur à prendre empiriquement ce clone comme référence duquel le clone BIV106 serait dérivé.

Malgré les différences entre les clones BIV127 et BIV106, tous les cadres ouverts de lecture sont identiques (GARVEY et coll., 1990).

i) Les protéines de structure Gag et Gag-Pol

- ➔ Le gène *gag* code pour les protéines de structure de la matrice (MA ou p17) de la capsid (CA ou p26) et de la nucléocapsid (NC ou p7).
- ➔ Le gène *pol* code notamment pour la rétrotranscriptase, la protéase, l'intégrase et la ribonucléase H.

Les précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol sont issus de la traduction du transcrit primaire.

Le précurseur Gag, encore noté Pr53 (pour précurseur protéique de 53kDa), est responsable de l'initiation de la phase de bourgeonnement viral et de l'incorporation de l'ARN génomique aux particules virales en formation. Les protéines issues de Gag ont été décrites immunologiquement (BATTLES et coll., 1992) ou par analyse de la séquence d'acides aminés (TOBIN et coll., 1994).

Dans le cas du VIB, le précurseur Pr53 est responsable de la formation de 3 protéines majeures, p16, p26 et p7, c'est à dire respectivement les protéines de la matrice (notée MA), de la capsid (notée CA) et de la nucléocapsid (notée NC). Les protéines CA et NC sont immunologiquement très proches de leurs analogues chez le VIH-1 (GONDA et coll., 1987 ; RASMUSSEN et coll., 1990 ; BATTLES et coll., 1992 ; JACOBS et coll., 1992 ; WHETSTONE et coll., 1992).

D'autres protéines de petite taille ont également été identifiées entre les sites de clivage MA-CA et CA-NC ainsi qu'à l'extrémité –COOH mais leur rôle reste inconnu.

Par ailleurs, le précurseur Gag n'est pas myristilé comme chez la plupart des rétrovirus (BATTLES et coll., 1992 ; TOBIN et coll., 1994).

Le précurseur Gag-Pol est transcrit par décalage du cadre de lecture de -1 (JACKS et coll., 1988 ; VARMUS, 1988) ce qui donne une protéine de 170 kDa dans le cas du VIB (RASMUSSEN et coll., 1990 ; BATTLES et coll., 1992)

Les produits du gène *pol* n'ont pas été identifiés par des sérums monospécifiques (GONDA et coll., 1994) mais il s'agit des protéines suivantes : la protéase (notée PR), la transcriptase inverse (notée RT) et l'intégrase (notée IN). Il existerait également un résidu de 75 acides aminés entre RT et IN dans la région attribuée à la dUTPase des virus VIH, VAIE, VAEC, et VMVO (ELDER et coll., 1992 ; THREADGILL et coll., 1993). Toutefois, dans le cas du VIB, la séquence de cette région ne semble pas avoir d'activité dUTPasiq : sa fonction reste donc inconnue (GONDA et coll., 1994).

D'autre part, la séquence de l'ADN du gène *pol* semble conservée d'une souche virale à l'autre. A partir de 19 animaux provenant de l'île de Hokkaido, tous séropositifs par analyse Western Blot, le VIB a été isolé des cellules mononucléées sanguines circulantes (dans 17 des 19 échantillons) ou des leucocytes du lait (dans le seul prélèvement étudié). Ces isolats avaient une faible capacité de réplication et de formation de syncytia. La séquence peptidique du gène *pol* était de 99.0 à 99.7% homologue à celle de la souche américaine R29. La réaction positive de ces mêmes animaux au test WB faisant appel à un épitope majeur de la protéine p26 du VIB, indique que les souches identifiées au Japon, et le virus VIB R29 isolé en 1969 aux Etats-Unis (VAN DER MAATEN et coll., 1972), sont antigéniquement proches (MEAS et coll., 1998).

A partir d'une séquence de 298 paires de bases du gène *pol*, l'homologie de séquence peptidique est de 98.0 à 100% pour les isolats viraux des 28 bovins allaitants élevés au Brésil et la souche de référence R29, et de 97.0 à 99.0% entre ces mêmes isolats brésiliens et les isolats japonais (MEAS et coll., 2002b).

ii) La protéine de structure Env

Le gène *env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe : protéine de surface (SU ou gp100) et protéine transmembranaire (TM ou gp45) (RASMUSSEN et coll., 1990).

Par analogie avec les autres lentivirus, on peut considérer que la glycoprotéine gp100 ou SU n'est autre que le récepteur viral, situé entièrement à l'extérieur de la particule virale, tandis que la glycoprotéine gp45 ou TM constitue le moyen d'ancrage dans l'enveloppe virale, de façon à fixer SU (GONDA et coll., 1994).

TM est également responsable de l'effet cytopathogène du virus puisqu'elle induit la formation des syncytia en culture cellulaire. (GONDA et coll., 1994).

Des régions hypervariables et des régions constantes ont été décrites sur le gène codant pour la protéine SU, comme cela a déjà été décrit pour le VIH-1 et le VIF (RIGBY et coll., 1993 ; STARCICH et coll., 1986). En comparant différents clones de VIB, des différences de taille sont couramment observées. Les plus grandes sont notamment concentrées sur trois zones hypervariables du gène *env*. La seconde zone hypervariable (V2) est la plus variable, avec une différence de taille de 72 acides aminés entre les isolats chez un même individu (SUAREZ et coll., 1995). De telles variations de taille de SU sont courantes chez les lentivirus. Toutefois, celles du VIB semblent les plus marquées (BALL et coll., 1994 ; RIGBY et coll., 1993 ; SIMMONDS et coll., 1990 ; SUAREZ et coll., 1995).

Cette capacité d'évolution du génome du VIB joue un rôle important dans la persistance du virus dans l'organisme hôte et dans la pathogenèse, grâce à l'aptitude à changer rapidement d'antigène de surface. (SUAREZ et coll., 1997)

Des mutations ponctuelles sont couramment observées chez un même hôte. Cependant, des facteurs de sélection semblent jouer un rôle prépondérant dans l'élimination de certains génotypes, plus particulièrement ceux entraînant des erreurs comme des décalages de cadre de lecture (SUAREZ et coll., 1997).

Le VIB, *in vivo* chez des lapins, constitue une quasi-espèce avec des différences génétiques dans la région du gène *env*, non seulement entre les différents animaux infectés, mais également chez un même sujet (KALVATCHEV et coll., 2000). Ces variations peuvent par ailleurs être mises en relation avec les cellules cibles infectées et/ou l'évolution de la maladie. Certains variants, mieux adaptés pour un type de cellules cibles, pourraient être sélectionnés à partir de la multitude de génomes présents chez un même individu.

L'hétérogénéité génomique spécifique peut être en relation avec plusieurs facteurs de pression sélective, même si le rôle fonctionnel de telles modifications reste inconnu : on ne sait pas si la variabilité génétique des lentivirus est une cause ou une conséquence de l'immunodéficience (KALVATCHEV et coll., 2000).

iii) Les gènes accessoires

Le VIB est également caractérisé par la présence d'une « *région centrale* », enchâssée entre les gènes *pol* et *env*, et chevauchant les extrémités de ces 2 gènes et celles d'autres cadres ouverts de lecture (notés ORF pour « Open Reading Frames »).

Ces gènes accessoires (telle est leur dénomination courante) ont longtemps été considérés comme des gènes non indispensables voire inutiles car des expériences de délétion ou d'inactivation n'entraînaient que peu d'effets *in vitro*. Pourtant, il n'en est pas de même *in vivo* (KESTLER et coll., 1991).

Ces gènes accessoires sont mieux connus dans le cas du VIH. Ce sont les gènes *vif* (facteur du pouvoir infectant viral), *tat* (trans-activateur de la transcription), *rev* (régulateur de l'expression virale), *vpr* (un autre trans-activateur potentiel), *vpu* (facteur de libération virale) et le gène *nef* (facteur négatif) qui est situé à l'extrémité 3' (GONDA et coll., 1990).

La « région centrale » du VIB se compose de plusieurs exons codant pour ces gènes accessoires (*vif*, *tat*, *rev*, *vpw* et *vpy*). Le gène *nef* des lentivirus des Primates n'a pas été retrouvé. Cependant, l'analyse des transcrits de l'ADN a permis d'identifier un nouveau gène, nommé *tmx*, composé d'un seul exon à cheval sur l'extrémité 3' du gène *env* et la région U₃ du LTR, qui pourrait être l'analogue de ce gène *nef* (GONDA, 1992).

Bien que les séquences des gènes *tat*, *rev*, *vif*, *vpy*, *vpw* et *tmx* du VIB et des gènes *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpw*, *vpx* et *nef* des lentivirus des Primates soient différentes, leurs localisations, leurs fonctions suggèrent une grande analogie (GARVEY et coll., 1990 ; OBERSTE et coll., 1991 ; LIU et coll., 1992 ; OBERSTE et coll., 1992 ; CARPENTER et coll., 1993 ; OBERTE et coll., 1993).

Le VIB est constitué de 9 gènes différents, ce qui fait de lui le lentivirus non primate le plus complexe du point de vue structural.

◆ La protéine Tat

La protéine Tat du VIB, d'un poids moléculaire de 14 kilodaltons est encore notée p14. Celle-ci est codée à partir de l'épissage de 3 exons et est traduite tôt dans le cycle infectieux. Il s'agit d'une phosphoprotéine que l'on retrouve dans le noyau et le nucléole des cellules infectées.

Deux formes de protéine Tat ont été détectées : la première est entièrement synthétisée à partir du premier exon codant (exon 2) et mesure 103 acides aminés de long. La seconde utilise les 98 premiers acides aminés du premier exon codant (exon 2) et 10 acides aminés du second exon codant (exon 3) formant ainsi, après épissage, une protéine de 108 acides aminés. La fonction de trans-activation de la protéine Tat étant la même sous ses deux formes, il paraît vraisemblable que cette fonction est codée par la partie commune de l'exon 2 (LIU et coll., 1992 ; PALLANSH et coll., 1992).

La protéine Tat est donc un trans-activateur potentiel qui va amplifier l'expression virale d'un facteur 50 à 100 par rapport à la seule activation par des activateurs cellulaires endogènes. Son mode d'action exact n'a pas encore été élucidé mais il semble qu'elle agisse sur la séquence d'ARN TAR (trans-activation région - appartenant au LTR) présente à l'extrémité 5' de tous les transcrits viraux.

Cette séquence d'ARN TAR se situe entre les nucléotides +1 et +20 du LTR viral, et tout remplacement de cette séquence empêche le fonctionnement de la protéine Tat (GARVEY et coll., 1990 ; CARPENTER et coll., 1993).

Il convient de noter que les protéines Tat du VIB ou du VIH sont capables de trans-activer le LTR d'un virus ou de l'autre, indifféremment, même si le système homologue semble plus performant (LIU et coll., 1992 ; PALLANSH et coll., 1992). Cela est sans doute la conséquence des homologies séquentielles et de la position de la séquence TAR qui est la même pour le VIH-1 et le VIB au sein de leur LTR respectif. Toutefois, on ne sait toujours

pas si la protéine Tat est capable de trans-activer le LTR hétérologue de manière directe, ou si elle active indirectement l'expression génomique par activation de facteurs de la transcription cellulaires endogènes spécifiques, dont les sites de transport sont présents sur le LTR (GARVEY et coll., 1990 ; PALLANSH et coll., 1992 ; CARPENTER et coll., 1993).

Récemment, (BARBORIC et coll., 2000), la cible cellulaire de la protéine Tat du VIH-1 a été identifiée. Celle ci est le facteur P-TEFb (Positive transcription elongation factor b), association d'une kinase 9 cycline-dépendante (CDK9) et d'une cycline T1 (CycT1). L'interaction de la protéine Tat du VIH-1 avec la CycT1 humaine augmente fortement l'affinité et la spécificité de l'interaction de Tat avec TAR. Ainsi, la protéine Tat peut positionner le facteur P-TEFb très proche du domaine CTD (C-terminal domain) de l'ARNpolyméraseII. Il se produit alors une phosphorylation du domaine CTD grâce à la kinase CDK9 (TAUBE et coll., 1999).

La présence de la cycline T1 semble indispensable pour le transport de Tat comme cela a été décrit pour les virus VIH-1 et VAIE (GARBER et coll., 1998 ; KWAK et coll., 1999 ; BIENIASZ et coll., 1999).

En résumé, la triade Tat-CycT1-TAR semble donc indispensable pour provoquer la trans-activation de ces virus (BARBORIC et coll., 2000). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la protéine Tat du VIB était beaucoup moins spécifique vis à vis des souches cellulaires infectées que ne le sont les protéines Tat du VIH-1 ou du VAIE, ce qui est en faveur d'une trans-activation ne faisant pas appel à la cycline T1 de la cellule hôte. Il en résulte donc un mode de transport de la protéine Tat du VIB vers son récepteur TAR différent de celui des autres lentivirus cités : Tat et TAR étant alors capables de former un complexe stable même en l'absence de CycT1. Ceci est rendu possible par une affinité et une spécificité de Tat pour TAR suffisante, sans l'aide de CycT1, pour amener le facteur P-TEFb vers son complexe transcriptionnel.

Toutefois, les mécanismes d'action de la protéine Tat sont différents à l'intérieur même de la sous famille des lentivirus. Pour le VIH, le VIS et le VAIE la trans-activation nécessite la présence de TAR situé en aval du site d'initiation de la transcription (ARYA et coll., 1988 ;

CARVALHO et coll., 1991). Dans la plupart des cas, l'activité basale du LTR de ces virus est faible mais celle-ci est fortement activée en présence de la protéine Tat homologue (DERSE et coll., 1987 ; CULLEN et coll., 1992).

Par opposition, la séquence du LTR nécessaire à la trans-activation du virus Maedi Visna ovin et du VIF est localisée dans la région U3 du LTR et inclut les séquences « promoteur » AP-1 et AP-4 (HESS et coll., 1989). Elle est donc située en amont du site d'initiation de la transcription. A la fois, le VMVO et le VIF ont une forte activité basale d'expression du LTR dans la plupart des souches cellulaires infectées, mais subissent une trans-activation de faible ampleur (DAVIS et coll., 1989 ; HESS et coll., 1985 ; SPARGER et coll., 1992).

Si l'on s'en tient à la structure de la protéine Tat elle-même, elle est composée de domaines fonctionnels hautement conservés dans le cas du VIH et du VIS, qui comprennent un domaine riche en cystéine, un domaine de base et une région centrale constante (GARCIA et coll., 1988 ; CULLEN et coll., 1992). En revanche, la protéine Tat du VAIE est également composée de la région centrale et du domaine de base, mais elle ne présente pas de région riche en cystéine (DORN et coll., 1988). Ces domaines sont cependant absents dans le cas du virus Maedi Visna ovin et du VIF (PARKIN et coll., 1988 ; SPARGER et coll., 1992).

In vitro, le LTR du VIB est un promoteur actif dans certaines lignées cellulaires sensibles et subissant une faible trans-activation dans de tels milieux de culture (LIU et coll., 1992 ; PALLANSH et coll., 1992). Ceci est plutôt en faveur d'un mode d'action proche de celui du virus Maedi Visna ovin ou du VIF. Cependant, la protéine Tat a une structure très proche des protéines Tat des virus des Primates (GARVEY et coll., 1990). Par ailleurs, la trans-activation du VIB fait appel à une structure en boucle proche de celle du TAR des primates et située en aval du site d'initiation de la transcription équipe (CARPENTER et coll., 1993). Le mécanisme de trans-activation serait donc très proche de celui des virus VIH, VIS ou VAIE (CARPENTER et coll., 1993).

Il est toutefois intéressant de noter qu'il ne semble pas y avoir de corrélation entre les signes cliniques observés et le mécanisme de trans-activation virale. Les lentivirus des primates et des félins se répliquent dans les cellules des lignées CD₄⁺ et sont associées à de

sévères immunodépressions, alors que les virus Maedi Visna ovin et VAIE se répliquent uniquement dans les cellules des lignées monocytes/macrophages et ne sont pas associés à ces syndromes immunodépressifs. Pourtant, la trans-activation du VIF se rapproche plutôt des mécanismes rencontrés pour le virus Maedi Visna ovin, alors que la trans-activation du VAIE est à mettre en relation avec celle des virus des Primates.

◆ La protéine Rev

La protéine Rev du VIB est une phosphoprotéine qui se situe également dans le noyau et le nucléole des cellules infectées, comme la protéine Tat (OBERSTE et coll., 1993). Les techniques d'immunofluorescence ont d'ailleurs montré qu'elle est surtout présente en périphérie des nucléoles des cellules ayant formé des syncytia, alors qu'elle est quasiment absente du cytoplasme. La signification de cette localisation n'est pas connue pour le VIB, mais il a été montré que la protéine Rev du VIH-1 était liée à une protéine nucléolaire B23. Celle-ci jouerait un rôle dans le transport de Rev vers le nucléole et le noyau (FANKHAUSER et coll., 1991), alors que la protéine Rev ne subit aucune activation de la part de B23 (McDONALD et coll., 1992).

La protéine Rev est composée de 186 acides aminés, d'un poids moléculaire de 20,7 kilodaltons. Elle est codée par l'épissage de 3 exons. Les deuxième et troisième exons codants produisent la protéine Rev elle-même. L'exon 2 dérive de la séquence de l'extrémité 5' du gène *env*. Les VIH-1 et VMVO ont un gène *rev* dont les transcrits contiennent une courte séquence non-codante issue du gène *pol*, particularité que l'on ne retrouve pas dans le cas du VIB (OBERSTE et coll., 1993).

Des études faisant appel à des virus dépourvus ou non de la protéine Rev ont démontré son rôle dans la régulation de l'expression des transcrits viraux épissés ou non épissés, sans doute par action sur son récepteur spécifique, noté RRE (Rev-Responsive Element). Celui-ci est formé à partir de transcrits situés à l'extrémité 3' du gène *env* qui code pour les domaines extracellulaires de la protéine TM. Le complexe ainsi formé va faciliter le transport des transcrits non- ou mono-épissés du noyau vers le cytoplasme, comme cela a été décrit pour d'autres lentivirus. Il semble toutefois que la protéine Rev ne joue aucun

rôle dans l'expression d'un message ayant subi un double épissage (comme le gène *tat* par exemple) (OBERSTE et coll., 1993).

Par ailleurs, la présence de Rev semble indispensable pour l'expression du précurseur Gag et la production de virion. Il est probable que la protéine Rev intervienne dans l'expression des gènes *gag* et *env* en agissant sur un élément *cis* présent dans les ARN_m *gag-pol* non-épissés ou *env* mono-épissés, mais que cet élément soit absent de l'ARN_m multi-épissé de la protéine Tat. Cet élément interagissant avec la protéine Rev pourrait donc se trouver entre les nucléotides 5541 et 7636 puisque cette région est constante dans tous les transcrits non-ou mono-épissés du VIB, mais qu'elle n'appartient à aucun messenger multi-épissé connu (OBERSTE et coll., 1991 ; OBERSTE et coll., 1993).

◆ La protéine Tmx

La protéine Tmx ou p19, codée à partir d'un seul exon, a été retrouvée dans le cytoplasme des cellules infectées et à l'intérieur du virion. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un cadre de lecture indépendant comme pour le gène *nef* du VIH-1, la localisation sur le génome est la même. Le clonage de l'ADN complémentaire du gène *tmx* du VIB débute par la traduction de 14 nucléotides de la jonction d'épissage du promoteur commun et du second exon, au niveau du codon AUG qui appartient à la séquence codante pour TM du gène *env*. Il pourrait exister des similitudes entre les gènes *tmx* du VIB et *nef* du VIH-1, mais des études complémentaires restent nécessaires (GONDA et coll., 1994).

◆ Les protéines Vif, Vpw et Vpx

Actuellement, ces gènes sont peu connus.

Le gène *vif* est situé dans la région centrale du génome, mais situé en dehors de la séquence codante du gène *pol*. Il code pour une protéine Vif de 23 kilodaltons. Cette protéine Vif est très différente des protéines Vif des autres lentivirus, mais la présence de plusieurs motifs communs suggère que son rôle est proche de celui des autres protéines Vif (OBERSTE et GONDA, 1992).

Le rôle de cette protéine Vif dans la régulation du pouvoir infectieux du VIH-1 a récemment été illustré (SHEEHY et coll., 2002). L'enzyme dont la synthèse est dirigée par le gène CEM15 agit comme un frein sur le développement de la réplication du VIH-1, tandis que la protéine Vif empêche l'expression de ce gène et favorise ainsi la réplication.

La région codante du gène *vpr* est maintenant connue, ainsi que la protéine Vpr de 7 kilodaltons qu'il code. L'ADN complémentaire codant pour la protéine Vpx de 10 kilodaltons, quant à lui, n'a pas été identifié. Il s'agirait également de facteurs intervenant dans la régulation de l'expression génomique virale (GARVEY et coll., 1990).

◆ Le LTR

Les limites du LTR et de ses composants caractéristiques U₃, R et U₅ ont pu être déterminées (GARVEY et coll., 1990).

Ces limites, qui différencient chaque LTR à chaque extrémité du génome viral sont marquées par la répétition de courtes séquences inversées :

5'-ACTG-3' située après un motif poly-purine à l'extrémité 3' ;

5'-ACGT-3' localisée après une séquence complémentaire à l'extrémité 3' du site de transport de l'ARN_t qui initie la synthèse de la reverse-transcriptase.

Cet ARN_t est en fait le même ARN_{t1,2}^{Lys} que celui utilisé par le virus Maedi Visna ovin (BRAUN et coll., 1988).

La régulation de la réplication du VIB dépend à la fois de facteurs trans-activateurs viraux (comme la protéine Tat) et cellulaires qui interagissent avec le LTR viral (LIU et coll., 1992 ; PALLANSH et coll., 1993 ; CARPENTER et coll., 1993).

Ce LTR viral est de plus semblable aux promoteurs eucaryotes car il est capable de réguler l'expression génique. Il contient les sites cibles des facteurs de la transcription (NF-κB, Sp1, AP-1 et AP-4) (GONDA et coll., 1994).

La région U₃ du LTR contient les signaux de l'initiation de l'amplification et de terminaison de la transcription. L'initiation de la transcription débute à +1, ce qui représente la jonction U₃-R (GARVEY et coll., 1990). La région U₃ contient également une copie unique de plusieurs facteurs de la transcription et au moins un « *core enhancer* ». Certains auteurs considèrent que la présence de 2 ou plus de ces sites va de pair avec une virulence accrue du virus, comme cela a pu être constaté pour le VIH-1 ou le virus Maedi Visna ovin (HESS et coll., 1989 ; ROSS et coll., 1991 ; ANDRESSON et coll., 1993 ; CHANG et coll., 1993). Par exemple, le VIB possède un site unique pour SP1 et un site unique pour NF-κB, relativement éloignés de la boîte TATA, alors que le VIH-1 possède 3 sites Sp1 et 2 sites NF-κB. Ces observations seraient (GONDA et coll., 1994) en partie responsables des différences de pathogénicité observées entre les virus. L'étude de ces sites a pu être réalisée par délétion d'une partie de la séquence du LTR du VIB et a démontré l'importance de ces sites dans la régulation de la transcription virale. La transcription est quant à elle promue par le « *core enhancer* », un autre élément appartenant au LTR. Par ailleurs, le rôle joué par ces sites de régulation de la transcription semble varier suivant l'espèce et le type cellulaire infecté. Ainsi, le LTR pourrait expliquer également la spécificité du virus pour certains tissus (PALLANSH et coll., 1992 ; GONDA et coll., 1994). Des séquences « *promoteur* » comme les boîtes TATA et CAT mieux connues pour les rétrovirus des Primates ont également été retrouvées dans cette région U₃ (GARVEY et coll., 1990).

Les LTR des rétrovirus contiennent généralement une longue séquence de motifs répétés entre U₃ et U₅. Dans le cas du BIV127 cette séquence de 111 nucléotides (109 pour BIV106), constitue la limite U₃-R et R-U₅ (GARVEY et coll., 1990).

La région R, présente dans tous les transcrits viraux, renferme une région de trans-activation, notée TAR (trans-activation region) qui interagit avec la protéine Tat virale pour amplifier l'expression génique, comme cela a déjà été décrit pour le VIH-1 (CARPENTER et coll., 1993 ; PALLANSH et coll., 1992).

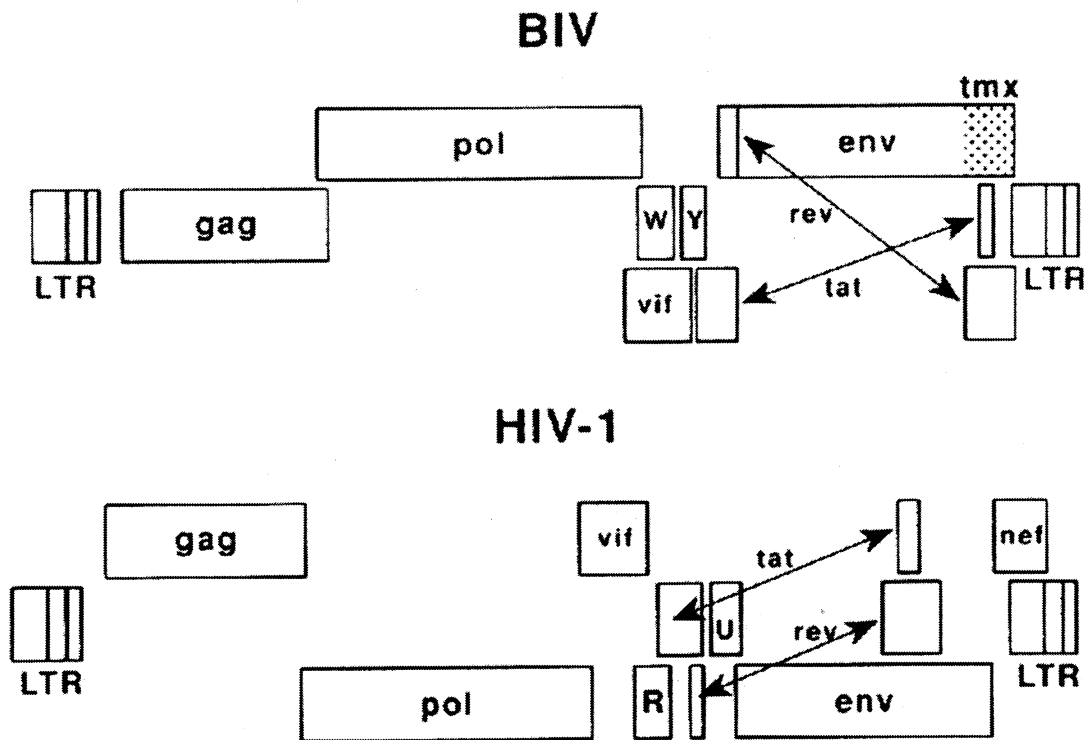


Fig. 4 : Organisation génomique du VIB et du VIH-1.

Les gènes de structure identifiés dans le génome du VIB et du VIH-1 sont les gènes gag, pol et env. Les gènes accessoires sont vif, tat, rev, vpr (Y), vpw (W) et tmx pour le VIB et vif, tat, rev, vpr (R), vpu (U) et nef pour le VIH-1 (d'après GONDA et coll., 1990).

II LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Les anticorps, apparus après une primo-invasion et dirigés contre les différentes protéines immunogènes de la particule virale (codées par les gènes *gag*, *pol* et *env*), peuvent être mis en évidence.

Plus récemment, des techniques de PCR visant à amplifier la quantité d'ADN viral ont été décrites.

1. La sérologie

Les tests sérologiques les plus utilisés sont l'immunofluorescence indirecte (IFI), le Western Blot (WB) et les techniques immunoenzymatiques (ELISA).

A. Immunofluorescence indirecte

L'IFI a été utilisée pour détecter des anticorps.

L'Ag est constitué de cellules de thymus de fœtus de chien (Cf2Th) infectées par le VIB R29, fixées à l'aide d'acétone sur lame de verre.

Les sérums sont dilués dans une solution PBS (phosphate buffered saline) de pH=7,4 avec une dilution croissante commençant à 1/5^{ème}. Chaque échantillon, ainsi qu'un témoin positif et un témoin négatif, est déposé sur une lame. Après une heure d'incubation à 37°C, les lames sont lavées 3 fois avec la solution PBS. Ensuite, elles sont de nouveau mises en incubation pendant 1 heure à 37°C mais en présence d'anticorps de lapin anti-immunoglobuline G de bovins (IgG) marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (Laboratoire SIGMA, ST.-LOUIS, MISSOURI, ETATS-UNIS). L'anticorps spécifique anti-VIB R29 complexé est donc à son tour reconnu par ce second anticorps marqué à la

fluorescéine. Le complexe final formé est alors visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Les sérums sont considérés comme positifs si des foyers de fluorescence sont observés, et lorsque le titre de l'échantillon est $\geq 1/64^{\text{ème}}$. Dans un même temps, toute fluorescence doit être absente sur la lame du témoin négatif (WHETSTONE et coll., 1990 ; WHETSTONE et coll., 1991).

Les anticorps sont ainsi détectés dès la 3^{ème} semaine après l'infection et peuvent persister deux ans après l'inoculation expérimentale du virus (WHETSTONE et coll., 1990).

B. La technique de l'immunotransfert ou Western Blot

i) Technique

◆ Généralités

L'immunotransfert ou Western Blot (WB) est une technique précise et spécifique.

Les protéines virales, qui seront utilisées comme réactifs, sont d'abord séparées par électrophorèse sur gel, selon leur poids moléculaire. Un électrotransfert permet de faire passer ces protéines sur un support de nitrocellulose. Le sérum à tester est alors déposé.

La fixation des anticorps du sérum sur les antigènes est révélée par réaction enzymatique colorée ; l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents.

Pour la recherche d'anticorps anti-VIH-1, des bandelettes sont commercialisées par des laboratoires biomédicaux, elles permettent de tester les anticorps anti-gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p32, p24, et p17. Le sérum est fortement positif si toutes ces bandes apparaissent, mais lorsqu'il n'y a que quelques bandes se pose alors un problème d'interprétation. Pour le CDC (« Centers for Disease Control » d'Atlanta) un sérum est positif s'il contient au moins une bande d'enveloppe (gp160, gp120 ou gp41) associée à une bande spécifique des gènes *gag* ou *pol* ; pour l'OMS, il suffit que 2 bandes d'enveloppe

soient présentes associées ou non à une bande des gènes *gag* ou *pol* (ETIENNE et coll., 2000 ; CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1989).

◆ Techniques spécifiques au VIB

La technique de Western Blot (WB) de référence pour le VIB a été décrite par WHETSTONE (WHETSTONE et coll., 1991) puis fut utilisée par la suite dans la plupart des études sur le VIB.

Le VIB est cultivé sur des cellules de poumon de fœtus de bovin (FBL). Du 3^{ème} au 6^{ème} passage il est mis en culture dans le milieu de EAGLE modifié par EARL additionné de 10% de sérum de fœtus de veau, 50mg/l de gentamicine, 0,02% de α -glutamine et 2 μ g/ml de polybrene.

Le milieu favorise la formation de syncytia de grande taille qui vont libérer le virus.

Le virus est recueilli par ultracentrifugation à 100.000g à partir du surnageant mis en solution dans du PBS (phosphate buffered saline) de DULBECCO avec 40% de glycérol.

L'ultracentrifugat est d'abord lavé par une solution de 50mM de Tris (pH=8) et 5mM d'EDTA puis remis en suspension en solution de tampon de lyse avec 500mM de NaCl, 50mM de Tris (pH=8), 5mM d'EDTA, 1% de Triton X-100 et 50 μ M de phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF). Le virus est ainsi concentré environ 1000 fois dans le surnageant.

Après traitement par une solution de SDS (dodécylsulfate de sodium), les antigènes subissent une électrophorèse sur de gel de polyacrylamide-SDS 10-20% (Laboratoire ENPROTECH, HYDE PARK, MARYLAND, ETATS-UNIS)

Les protéines séparées par ce gradient sont enfin transférées par électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose à pore de 0,45 μ m (Laboratoire BIO-RAD, RICHMOND, CALIFORNIE, ETATS-UNIS), ce papier est conservé une nuit à température ambiante dans une solution TS-T (10mM de Tris, 150mM de NaCl et 0,05% de Tween 20 -pH=8,6-)

Les sérums bovins sont dilués au 10^{ème} dans une solution TS (10mM de Tris et 150mM de NaCl -pH=8,6-) et incubés avec la membrane de nitrocellulose pendant 2 heures à température ambiante dans un appareil miniblott (Laboratoire IMMUNETICS, CAMBRIDGE, MASSASCHUSETTS, ETATS-UNIS).

La membrane de nitrocellulose est rincée trois fois 10 minutes, dans une solution TBS (20mM Tris, 500mM de NaCl -pH=7,5-). Ensuite, les membranes de nitrocellulose sont retirées de l'appareil miniblott puis incubées une heure à température ambiante en présence de Gammabind G-HRP (GENEX CORP., GAITHERSBURG, MARYLAND, ETATS-UNIS). La bandelette est à nouveau rincée comme décrit précédemment puis les réactions sont révélées par un kit de substrat de peroxydase 4-chloronaphtol (Laboratoire KIRKEGAARD and PERRY Inc., GAITHERSBURG, MARYLAND, ETATS-UNIS). Les sérums seront considérés positifs lorsque des anticorps anti-p26 sont ainsi détectés.

Ce test a été amélioré (JACOBS et coll., 1992) en ajoutant au protocole une technique de chimioluminescence afin de mieux visualiser le résultat. La sensibilité est augmentée d'environ 100 fois par rapport aux techniques enzymatiques traditionnelles.

Les animaux considérés comme positifs étaient ceux dont les sérums contenaient des anticorps dirigés contre les protéines spécifiques du VIB, à savoir au moins une bande de migration à approximativement : 13, 15, 24, 26, 28, 40 ou 60 kDa (JACOBS et coll., 1992).

Ces protéines sont celles précédemment décrites (WHETSTONE et coll., 1991) excepté pour les bandes 40 et 60 kDa qui correspondent en fait aux gp42 et p50 ou 55. Toutefois les réactions font préférentiellement ressortir la présence de migration à 15, 24 et 26 (protéines d'enveloppe ou de la capsid) et à 28kDa. Toutefois, la protéine immunogène majeure reste p26 : c'est la première à être mise en évidence après l'infection (3 semaines post-infection) et celle qui correspond à la plus large bande dans les prélèvements tardifs (WHETSTONE et coll., 1990 ; JACOBS et coll., 1992).

Des réactions non constantes sont parfois enregistrées à 45, 53 et 62 kDa, ce qui correspond respectivement à des glycoprotéines d'enveloppe, au précurseur protéique Gag et à la rétrotranscriptase.

Dans une autre étude (ZHANG et coll., 1997) l'Ag utilisé est une protéine recombinante et purifiée, p26, issue du gène *gag* du VIB, préparée à partir de *E.coli*.

Les sérums d'un veau infecté par une souche sauvage et d'un veau expérimentalement contaminé par la souche R29 sont testés. L'auteur a également testé des veaux infectés par le BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus), le BHV-1 (Bovin Herpes Virus de type1), le VLBE et le PIV-3 (Para influenza virus type 3)

Les anticorps contre le VIB sont détectés dès la 2^{ème} semaine après l'infection par le VIB et ce jusqu'à 2 ans post infection. De plus, il n'existe aucune réaction croisée contre les autres virus bovins souvent retrouvés (VLBE, BHV-1, PI 3, BVDV).

La reproductibilité du test WB a été étudiée à partir de 100 sérums provenant de 25 animaux différents. Les tests en aveugle des sérums ont permis de retrouver la présence de 19 animaux séronégatifs et de 5 séropositifs. Le dernier animal a été jugé séropositif sur seulement 3 des 4 échantillons (McNAB et coll., 1994).

C. La technique ELISA

Une technique ELISA sandwich a été développée avec pour Ag le précurseur protéique Gag de 53kDa du virus R29 obtenu par recombinaison sur baculovirus (RASMUSSEN et coll., 1990).

Etape 1: Fixation du précurseur protéique Gag du virus R29 sur la plaque EIA

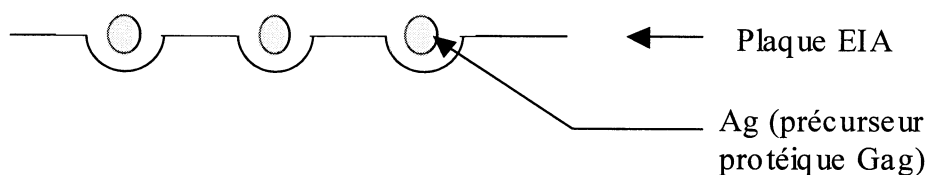


Fig. 5 : Schéma simplifié de la technique ELISA sandwich : étape 1

Ces Ag étaient dilués dans une solution tampon de couplage (100 mM de bicarbonate de sodium, pH=9,6) ; les dilutions (100 µl/puits) étaient réalisées dans une plaque EIA de 96 puits (Laboratoire TITERTEK, HUNTSVILLE, ALABAMA, ETATS-UNIS) incubée à 4°C pendant une nuit. Les puits contenant l'Ag étaient rincés avec une solution de PBS avec 0,02 % de Tween 20 (= tampon de rinçage) puis fixés avec de l'albumine sérique humaine dans une solution de PBS (350 µl/puits) pendant une heure à 23°C.

Etape 2a: Mise en présence du sérum à tester

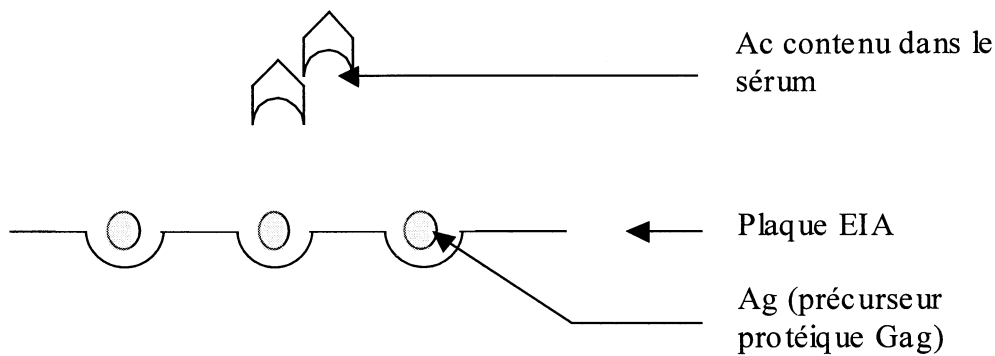


Fig. 6 : Schéma simplifié de la technique ELISA sandwich : étape 2a

Les puits étaient rincés une fois avec le tampon de rinçage puis le sérum à tester dilué au 10^{ème} dans une solution de PBS additionné de 0,05% de Tween 20 (100µl/puits) était rajouté et incubé pendant deux heures à 37°C.

Etape 2a: Réaction des AC avec les AG fixés

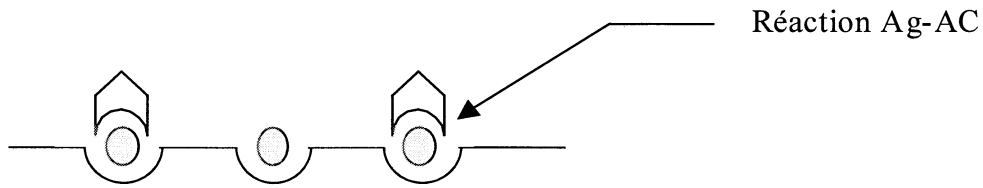


Fig. 7 : Schéma simplifié de la technique ELISA sandwich : étape 2b

L'excédent de sérum n'ayant pas réagi était éliminé par le tampon de rinçage (5 rinçages). Ensuite, des IgG anti-IgG de bovin conjuguées à la peroxydase de raifort (100 µl/puits) (Laboratoire KIRKEGAARD and PERRY Inc., GAITHERSBURG, MARYLAND, ETATS-UNIS) étaient ajoutées. L'ensemble était incubé 2 heures à 37°C.

Etape 3: Couplage des Ac du sérum avec une IgG marquée

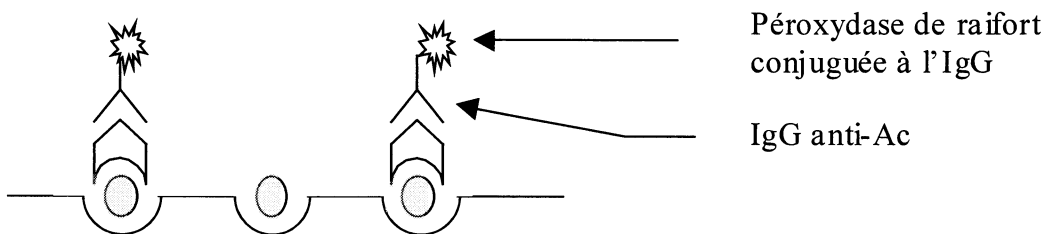


Fig. 8 : Schéma simplifié de la technique ELISA sandwich : étape 3.

Les plaques sont enfin rincées 5 fois avec le tampon de rinçage. Les plaques sont ensuite révélées : on ajoute son substrat chromogène à la peroxydase de raifort (une solution d'ABTS - diammonium 2,2' Azino-bis [3-Ethyl Benzthiazoline-6-Sulfonic acid]-).

La densité optique était déterminée par un lecteur de plaque VMAX (Laboratoire MOLECULAR DEVICES Corp., SUNNYVALE, CALIFORNIE, ETATS-UNIS) à la longueur d'onde de 405 nm. Le zéro optique du lecteur de microplaque est réglé sur la première rangée de la plaque (chaque microplaque comporte une rangée "témoin de manipulation" dans laquelle l'antigène n'a pas été déposé) (RASMUSSEN et coll., 1990).

Les Ag fixés sur microplaques étaient soit purifiés comme le précurseur Pr53 recombinant (RASMUSSEN et coll., 1990) ou les protéines de capsid des VIB et VJD (BURKALA coll., 1998), soit issus d'une culture de cellules infectées par la souche R29 comme les cellules de thymus de fœtus de chien (Cf2Th) (MULHUNEH et coll., 1994).

Les échantillons étaient considérés comme étant positifs lorsque la densité optique de celui-ci est supérieure ou égale aux valeurs de la densité optique obtenue à l'aide du témoin positif à la dilution de 1/2000^{ème} (BURKALA et coll., 1999).

Les anticorps étaient détectés avant la quatrième semaine suivant l'inoculation expérimentale et semblaient persister chez la plupart des individus au delà de 50 semaines (SCOBIE et coll., 1999).

Une technique de radio-immuno-précipitation a été utilisée par HORZINEK. Ici l'antigène purifié était couplé à un radio-isotope, ¹²⁵I, au lieu d'être couplé à une enzyme comme vu précédemment (HORZINEK et coll., 1991).

D. Comparaison des techniques sérologiques

i) Comparaison IFI et WB

La cinétique des Ac après l'infection expérimentale des veaux par la souche R29 a été étudiée par IFI réalisée sur des cellules de rate d'embryon de bovin (BESP) et par WB (WHETSTONE et coll., 1990).

Les résultats des WB et IFI montrent que les Ac anti-p26 sont les premiers à apparaître et qu'ils sont toujours responsables de la réponse la plus forte. Dans cette expérience, l'IFI a permis de détecter un titre de $1/64^{\text{ème}}$ (valeur seuil de positivité) dès le $22^{\text{ème}}$ jour et jusqu'au $9^{\text{ème}}$ mois post-infection, puis une augmentation du titre ($1/512^{\text{ème}}$) jusqu'à la fin de l'expérimentation au $13^{\text{ème}}$ mois. Les autres Ac dirigés contre p110, p55, p26, p24, p18, p15 et p13 ont été détectés après le $31^{\text{ème}}$ jour post-infection par WB.

Un troupeau laitier de 78 bovins avec plusieurs cas de lymphadénomégalie, des problèmes de santé importants récurrents et un fort taux de mortalité inexplicée a été soumis à des investigations sérologiques VIB par IFI et WB (WHETSTONE et coll., 1990).

Sur les 78 bovins testés, 54 étaient positifs par test d'IFI dont 34 avec un titre élevé (>64) et 20 avec un titre faible (<64).

Puis, 27 des 34 animaux présentant un titre élevé en IFI et 14 des 20 animaux aux titres faibles en IFI ont été testés en WB. Les réactions positives étaient respectivement de 21 sur 27 et de 13 sur 14. Par ailleurs, aucun prélèvement négatif en IFI n'a été testé par WB.

Il est difficile de conclure sur les performances relatives de l'IFI et du WB.

Une autre étude, menée en Italie sur 3304 bovins, a permis d'identifier par immunofluorescence 85 animaux séropositifs. Ces 85 sérums ont été ensuite analysés par WB. Les anticorps anti-p26 n'étaient détectés que sur 81 échantillons, les 4 autres ayant tout de même réagi avec d'autres protéines (CAVIRANI et coll., 1998).

ii) Comparaison IFI et ELISA

Une étude réalisée sur 380 vaches laitières provenant de différents troupeaux (dont le nombre n'est pas communiqué) dans l'est de l'Allemagne a permis d'évaluer la séroprévalence du VIB à 6,6% (25 animaux) et à 4,2% par IFI (16 animaux). Les sérums ont été dilués au $1/4$ avant d'être testés. L'IFI était réalisée sur des cellules de thymus de fœtus de chien (Cf2Th) infectées par la souche R29. La technique ELISA sandwich était réalisée sur les mêmes cultures de cellules Cf2Th infectées fixées sur microplaque. (MULUNEH, 1994).

iii) Comparaison WB et ELISA

A l'aide d'un test ELISA de type sandwich réalisée sur des microplaques en polystyrène auxquelles des Ag recombinants de CA du VJD ou de CA du VIB avaient été rajoutés, 26 des 690 animaux testés étaient positifs (3,8% des animaux) repartis dans 17 des 23 troupeaux étudiés (74%).

Sur ces 690 animaux, 207 ont été testés par WB avec le même Ag recombinant de CA de VJD. Les Ac ont alors été détectés dans 15,9% des sérums testés (33 animaux) répartis dans 13 des 23 troupeaux étudiés (56,5%).

Tous les animaux positifs en ELISA l'étaient en WB (BURKALA et coll., 1999).

L'existence de réactions croisées entre le VIB et le VJD a été documentée (KERTAYADNYA et coll., 1993 ; BURKALA et coll., 1998).

Ainsi tous les sujets positifs en WB-CA du VJD, ont également été testés positifs en WB-CA du VIB. L'antigène de la protéine recombinante de capsid du VJD a été préférée par l'auteur car celle-ci, contrairement à celle du VIB, est une protéine soluble, ce qui rend plus aisées les manipulations. De plus, les réactions anti-CA de VJD chez des sujets infectés par le VIB semblent plus marquées que les réactions anti-CA de VIB, rendant la lecture du test plus facile. Cela pourrait être imputé à la variabilité antigénique des lentivirus (BURKALA et coll., 1999).

iv) IFI, Western Blot et radio-immuno-précipitation

Les sérums de 957 bovins ont été collectés de façon aléatoire dans plusieurs provinces de Hollande. Le dépistage par IFI sur des cultures cellulaires de reins de bovins (MDBK : cellules de reins de bovin de MADIN DARBY ; et BBK : cellules de reins de bovin de BLACK) révèle dans cette population 6,7% d'animaux positifs. Les animaux séropositifs ont ensuite été testés en WB : 1,4% des animaux étaient positifs simultanément par IFI et WB, et 0,7% d'animaux positifs à ces deux techniques et à la radio-immuno-précipitation.

Parmi les animaux négatifs en IFI, 70 ont été testés en WB, de façon aléatoire. Un seul sérum s'est révélé positif en Ac anti- p26 (HORZINEK et coll., 1991).

2. La virologie

A. L'activité de la transcriptase inverse

Ce test exploite la particularité de la transcriptase inverse lentivirale qui synthétise de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN polyadénylé. Des oligonucléotides marqués à la digoxigénine et d'autres marqués à la biotine sont présents dans la réaction qui génère donc de l'ADN doublement marqué. Le produit de la réaction de transcription inverse est déposé sur une microplaque recouverte de streptavidine ; l'ADN marqué à la biotine est donc retenu dans les puits. Un anticorps anti-digoxigénine couplé à la peroxydase puis un substrat de la peroxydase sont successivement ajoutés. La peroxydase détruit son substrat et génère un produit de réaction coloré. L'absorbance des échantillons est lue à 400 nm dans un lecteur de plaque ELISA. La densité optique obtenue est corrélée à la quantité de transcriptase inverse présente dans l'échantillon.

L'activité de la transcriptase inverse est dosée dans les surnageants des cultures de cellules à tester.

B. L'isolement

Le VIB est capable de se répliquer dans des cellules de rate d'embryons de bovins (BESP). Il induit la formation de syncytia (VAN DER MAATEN et coll., 1972). Cette propriété a été utilisée afin de permettre l'isolement du virus (ONUMA et coll., 1990).

D'autres lignées cellulaires ont été utilisées par ailleurs comme indicateur de la formation de syncytia : les cellules de thymus de chien (Cf2Th), les cellules de chats infectées par le virus du sarcome murin (F81), les cellules rénales de MADIN DARBY (MDBK). Des cultures cellulaires (non décrites par l'auteur) ont été utilisées entre le 3^{ème} et le 10^{ème} passage : des cellules de thymus, de muscle, de rate, de rein ou de poumon d'embryons de

bovins. Toutes ces cellules sont mises en culture dans le milieu essentiel minimum de EAGLE (MEM), avec 10% de sérum de fœtus de veau (ONUMA et coll., 1990).

Les syncytia sont mis en évidence par coloration de Giemsa. Une augmentation du nombre de syncytium après le 2^{ème} jour, et un pic au 3-4^{ème} jours ont été constatés. L'utilisation de polybrene à la concentration de 2 à 5 µg/mL stimule l'effet cytopathogène, comme décrit pour le VLBE (VAN DER MAATEN et coll., 1977). Ces syncytia se forment majoritairement dans les lignées cellulaires BESP et F81, suivies par celles de cellules MDBK et de poumon d'embryon de bovin (lignée inconnue) (ONUMA et coll., 1990).

L'adjonction d'antisérum anti-VIB (dont la provenance n'est pas détaillée par l'auteur) inhibe la formation de ces syncytia (- 85%), contrairement aux antisérum VLBE ou VSB.

Le sang de veaux expérimentalement infectés par le VIB souche R29 est collecté sur anticoagulant EDTA. Après centrifugation à 800g pendant 20 minutes à 4°C, le buffy coat est prélevé, puis mis en culture sur des cellules fœtales de poumon de bovins (FBL). La formation de syncytia et la lyse cellulaire surviennent habituellement entre le 1^{er} (lorsque le prélèvement est effectué sur les veaux 14 jours après l'infection) et le 3^{ème} passage (291 jours après l'infection). L'isolement du virus chez les bovins naturellement infectés reste difficile par cette technique, mais cela a déjà été réalisé (VAN DER MAATEN et coll., 1972 ; SUAREZ et coll., 1993 ; HIDALGO et coll. 1995)

L'effet cytopathogène est considéré comme étant absent (test négatif) lorsqu'il ne se forme aucun syncytium au terme de 9 passages successifs en culture (SUAREZ et coll., 1995).

C. Les techniques de PCR

La PCR est une technique d'amplification d'un segment d'ADN compris entre deux régions de séquence connue par un procédé d'extension d'amorce.

Elle consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une de ces amorces est une copie du brin codant et l'autre, une copie du brin non codant.

Sous l'action d'une enzyme (l'ADN polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'-3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié.

La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible considérée.

i) Les PCR appliquées au VIB

Aucune technique PCR de référence n'a été validée dans le dépistage du VIB. La plus utilisée reste la PCR emboîtée visant à amplifier des séquences peu variables des gènes de structure *pol* et *env* (SUAREZ et coll., 1995b).

Les amorces du gène *env* ont été choisies dans une région peu antigénique, interne à la protéine de surface, supposée moins variable que les régions externes (SUAREZ et coll., 1995a).

Les amorces de la région codante pour la transcriptase inverse, issue de *pol* ont été choisies car cette région est connue pour être stable sur différentes souches de VIB (GELMAN et coll., 1992)

Pour 50 µl de solution tampon pour PCR et d'échantillon à analyser (0,5 µg d'ADN), 3 mmol de MgCl₂, 20 pmol de chaque amorce et 1.25 U de la polymérase Taq sont utilisés dans chacune des deux étapes de la PCR emboîtée.

La première étape de la PCR dirigée contre le gène *pol* fait appel aux amorces P01 et 36. La seconde étape aux amorces P02 et 37. La première étape de la PCR dirigée contre le gène *env* fait appel aux amorces 04 et 06. La seconde étape aux amorces 01 et 45 (voir figure 9).

Dans la première étape, 0,5 µg d'acides nucléiques de l'échantillon sont nécessaires. Lors de la seconde étape, 2 µl de la première réaction sont utilisés comme source d'ADN. La seule différence dans la PCR dirigée contre le gène *env*, par rapport à celle visant à détecter le gène *pol*, est l'utilisation de seulement 4 pmol d'amorces au lieu de 20 pmol.

La PCR, qu'il s'agisse de dépister la présence du gène *env* ou du gène *pol*, s'effectue dans des conditions bien particulières, à savoir :

- Le premier cycle de la première étape s'effectue à 94°C pendant 2 minutes, 51°C pendant 15 secondes, et 72°C pendant 2 minutes ;
- Les 30 cycles suivants sont réalisés à 94°C pendant 45 secondes, 51°C pendant 15 secondes, et 72°C pendant 1 minute ;
- Enfin une dernière phase d'extension de la première étape à 72°C pendant 10 minutes.
- La seconde étape débute par un premier cycle qui s'effectue à 94°C pendant 2 minutes, 61°C pendant 15 secondes, et 72°C pendant 1 minute ;
- Les 30 cycles suivants sont réalisés à 94°C pendant 45 secondes, 61°C pendant 15 secondes, et 72°C pendant 1 minutes ;
- Enfin une dernière phase d'extension de la seconde étape à 72°C pendant 10 minutes.

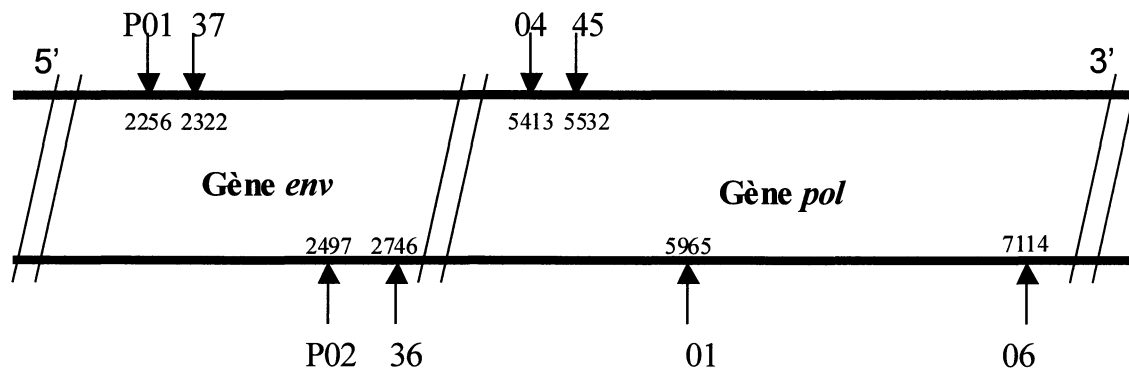


Fig. 9 : Position des nucléotides de l'extrémité 5' des amorces du gène pol et du gène env sur le génome proviral du VIB127 R29 (GARVEY et coll., 1990).

Amorce 37	5'-CCTTACCCTCCAGGAATTAA-3'
Amorce 36	5'-CATTTCTTGGGTGTGAGCTC-3'
Amorce P01	5'-ATGCTAATGGATTTTAGGGA-3'
Amorce P02	5'-CATCCTTGTGGTAGAACATT-3'
Amorce 01	5'-TCTATGGTATCTCTGGCTGC-3'
Amorce 04	5'-CTATGGATCAGGACCTAGAC-3'
Amorce 06	5'-GCCAGCACAAAGCAGGAATAT-3'
Amorce 45	5'-ATCAATAACGGTGAGATCCA-3'

Les amorces de la PCR emboîtée utilisées pour mettre en évidence le gène pol sont respectivement P01 et 36, et P02 et 37 pour les premières et secondes étapes. Les amorces de la PCR emboîtée utilisées pour mettre en évidence le gène env sont respectivement 04 et 06, et 45 et 01 pour les premières et secondes étapes (d'après SUAREZ et coll., 1995).

D'autres PCR, appelées PCR standard, par opposition à la PCR emboîtée (SUAREZ et coll., 1995b) ont permis d'amplifier des séquences des gènes *gag* et *pol* (NADIN-DAVIS et coll., 1993 ; NASH et coll., 1995a).

Un amplicon de 235 pb a été obtenu par PCR standard réalisée à partir d'amorces localisées sur la séquence du gène *pol* codante pour la transcriptase inverse.

Amorces	Séquences 5'-3'	Localisation (nucléotides) (d'après GARVEY et coll., 1990)
	GATTTTAGGGAATTAAATAA	2265-2285
	ACCCATCCTTGTGGTAGAAC	2480-2500

Deux microlitres d'ADN à tester (5000 cellules) sont ajoutées à 100 µl de tampon de PCR contenant 0,2 µmol d'amorces, 2,5 mmol de MgCl₂ et 5 U de polymérase Taq. La première étape de dénaturation a lieu à 95°C pendant 5 minutes, suivie de l'anneau des amorces à 45°C pendant 1 seconde, et de l'élongation à 72°C pendant 1 minute. L'amplification a été obtenue après 20 cycles de 30 secondes à 92°C, 1 seconde à 45°C et 1 minute à 72°C, suivis par 15 cycles de 30 secondes à 92°C, 1 seconde à 45°C et 2 minutes à 72°C (NASH et coll., 1995a).

D'autre part, l'amplification de 1 µg d'ADN a été réalisée à partir de 2 paires d'amorces du gène *gag* (VIB17 et VIB18b) dans 50µl de tampon PCR contenant 1,5 mmol de MgCl₂, 20 pmol de chaque amorce et 1,25 U de polymérase Taq, par dénaturation, anneau à 52°C et 30 cycles d'élongation (NADIN-DAVIS et coll., 1993).

Une autre PCR standard faisant appel à des amorces amplifiant le gène *pol* (VIB15 et VIB16) a été réalisée dans les mêmes conditions (NADIN-DAVIS et coll., 1993).

	Amorces	Séquences 5'-3'	Localisation ^(a) (nucléotides)
<i>gag</i>	VIB	TGGCGGGGTACAAACCAGAGAGTAC	581-605
	VIB18b	AAGCTGCTTCATGAGGTCAGGATC	819-796
<i>pol</i>	VIB15	GATGGAGGATGCTAATGG	2248-2265
	VIB16	CCATCCTTGTGGTAGAAC	2498-2481

Fig. 10 : Séquences des amorces des PCR dirigées contre les séquences des gènes *gag* et *pol* (d'après NADIN-DAVIS et coll., 1993)

(a) la localisation a été déterminée à partir du clone VIB127 (BRAUN et coll., 1988)

Avec les techniques de PCR simples, il existe toujours un risque d'amplifier des ADN contaminants, alors que la PCR emboîtée permet de limiter le nombre de faux négatifs par l'utilisation de 2 tests distincts, utilisant 2 paires d'amorces différentes orientées vers 2 régions différentes du génome : *pol* et *env*.

ii) Comparaison de 5 PCR différentes

Une étude basée sur 39 prélèvements a évalué les performances de détection de 5 PCR différentes. Aucune technique n'a pu se prévaloir d'une sensibilité de 100% (SUAREZ et coll., 1997).

Les meilleurs résultats ont été obtenus grâce à l'utilisation de 2 PCR emboîtées distinctes, ce qui tendait à réduire les faux négatifs (SUAREZ et coll., 1995b).

	SUAREZ et coll., 1995b	NADIN-DAVIS et coll., 1993	NASH et coll., 1995
Gènes cibles	<i>env, pol</i>	<i>pol, gag</i>	<i>pol</i>
Volume de la réaction	50 µl	50 µl	100 µl
ADN	0,5 µg	2,0 µg	5000 cellules
Amorces	20 pmol	25 pmol	10 pmol
Taq polymérase	1,25 U	2,5 U	5 U
Cycles	Emboîtée, 62 cycles	42 cycles	35 cycles

Tabl. 4 : Résumé de différentes techniques PCR

Par ailleurs, même si la séquence issue du gène *pol* semble la mieux conservée dans le génome du VIB, la plus grande sensibilité a été obtenue pour la PCR basée sur le gène *env*.

Il semble toutefois indispensable d'isoler d'autres souches virales afin d'optimiser la définition de nouvelles amorces.

iii) PCR hybridation *in situ*

On appelle PCR hybridation *in situ* (HIS) l'utilisation de sondes d'acides nucléiques pour mettre en évidence et localiser, dans des cellules ou des tissus, des séquences d'acides nucléiques, complémentaires de la sonde par leurs bases. Elle est très proche, dans son principe, des Southern Blot et des Northern Blot et repose, comme eux, sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser. Mais les Southern Blot et Northern Blot se font sur des broyats de tissus, alors que la PCR-hybridation *in situ* s'effectue sur une coupe de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés.

La technique de PCR-hybridation *in situ* a été développée afin de déterminer le nombre précis de cellules mononucléées du sang périphérique infectées par le VIH-1, qu'il soit à

l'état latent ou productif, chez des patients séropositifs à des stades différents de la maladie (BAGASRA et coll.,1992 ; BAGASRA et coll.,1997).

Une cellule intacte peut être considérée comme une « enceinte » d'amplification. Pour cela, il suffit, après fixation des cellules sur lame, de les rendre perméables par le formaldéhyde. Les réactifs de la PCR incluant la Taq polymérase et les amorces (gag SK38-39) peuvent ensuite diffuser dans la cellule. Après l'étape d'amplification, les produits obtenus sont détectés avec un oligonucléotide biotinylé (sonde SK19) selon une méthode classique d'hybridation *in situ*. Un total de 10 000 cellules est compté au microscope afin de calculer précisément le pourcentage de cellules infectées (coloration rouge brun). Après amplification, la majorité du produit amplifié se situe à l'intérieur du noyau.

La PCR-hybridation *in situ* a également été réalisée dans le cas du VIB (ZHANG et coll., 1997). Les tissus à analyser ont été sectionnés (épaisseur 6µm) et fixés sur lame à l'aide du réactif VECTABOND (Laboratoire VECTOR, BURLINGANE, CALIFORNIE, ETATS-UNIS). Les sections ont été déparaffinées au xylène puis réhydratées à l'éthanol. Elles ont ensuite été traitées par la protéinase K (6 µg/ml, SIGMA CHEMICAL Co., SAINT-LOUIS, MISSOURI, ETATS-UNIS) pendant 6 à 20 minutes à température ambiante avant d'être chauffées à 95°C pendant 2 minutes afin d'inactiver l'enzyme (une digestion plus longue dégrade trop les structures cellulaires pour l'examen ultérieur). Après rinçage avec une solution PBS puis avec de l'eau distillée, les tissus à analyser ont été mis en contact avec 30 µl de solution pour PCR, contenant 35 mmol de Mg²⁺, les amorces externes du gène *pol* (2,5 µmol) et la polymérase Tag (4 U/30 µl). Ces lames ont enfin été recouvertes, en veillant à éliminer toute bulle d'air de leur surface. L'amplification a été réalisée dans un four de type BioOven II Thermal Cycles (BIOTHERM CORP., ARLINGTON, VIRGINIE, ETATS-UNIS) en 2 étapes : tout d'abord la dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, puis l'amplification pendant 30 cycles de 1 minute à 95°C, de 1 minute à 55°C et de 2 minutes à 72°C.

Après amplification, les opercules ont été retirés des lames, puis les sections de tissu ont été chauffées à 96°C pendant 1 minute pour fixer les amplicons sur la lame. Cinquante microlitres de solution d'hybridation (2x solution SSC, 10x solution de DENHARDT, 0,1 % DSD, 1 µl d'ADN de sperme de saumon et 50 pg d'amorce d'ADN marqué à la

biotine) ont été ajoutés sur chaque lame. Une amorce interne du gène *pol* amplifié (VIB-127, nucléotides 2339-2369) a été marquée à la biotine (Laboratoire SYNTHETIC GENETICS, SAN DIEGO, CALIFORNIE, ETATS-UNIS). Les sections de tissu ont été de nouveau dénaturées pendant 5 minutes à 95°C et incubées toute la nuit à 42°C.

Après cette phase d'hybridation *in situ*, les opercules ont été retirés, les lames rincées, avant d'être incubées avec de la streptavidine-or (1,4 nm ultrosmall, ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES, WASHINGTON, ETATS-UNIS) pendant 2 heures. Les sections de tissu ont ensuite été rincées 5 fois par une solution de PBS-or et 3 fois par une solution de PBS. Les particules d'or déposées ont été amplifiées par incubation pendant 12 minutes à température ambiante avec des réactifs argentés (Laboratoire AMERSHAM LIFE SCIENCE, AIRHINGTON HEIGHTS, ILLINOIS, ETATS-UNIS). L'excès de réactif a été rincé pendant 5 minutes à l'aide d'eau distillée.

Finalement, les lames ont été colorées à l'éosine-hématoxyline et examinées en microscopie de contraste de phases. Des colorations plus spécifiques de certains types cellulaires, comme les neurones (coloration au violet rapide de Crésyl), ou les cellules microgliales (coloration de PENFIELD) ont également été utilisées.

Les réactions positives apparaissaient sous la forme de grains sombres à l'intérieur des cellules infectées par le virus (ZHANG et coll., 1997).

Le Southern Blot allie la technique classique d'hybridation sur des broyats cellulaires à une technique électrophorétique (migration de l'ADN chargé électriquement dans un champ électrique). Dans ce cas, les fragments d'ADN formés par l'action d'enzymes spécifiques (endonucléases de restriction spécifiques de courte séquence d'ADN) sont séparés selon leurs tailles (ZHANG et coll., 1997).

D. Comparaison des différents tests

i) Comparaison de l'isolement et de l'activité de la transcriptase inverse

L'activité de la transcriptase inverse a pu être observée en l'absence d'isolement du VIB : la multiplication du virus était confirmée dès la 3^{ème} semaine post-infection par une augmentation de l'activité de la transcriptase inverse et seulement à partir de la 4^{ème} semaine par isolement (HEATON et coll., 1998).

ii) Comparaison du WB, de l'isolement et de la PCR

Le virus a été recherché sur 2 animaux infectés expérimentalement par 2 souches différentes de VIB R29 et FL491 (SUAREZ et coll., 1995b).

Les tests de mise en culture ont permis d'isoler le virus, chez le premier (souche R 29) dès le 7^{ème} jour et chez le second (souche FL 491) dès le 10^{ème} jour. Les tests restent positifs jusqu'à la fin de l'expérimentation sauf au 197^{ème} jour pour le second.

Dans un même temps, le nombre de passages en culture pour obtenir la formation de syncytia est de 1 au 14^{ème} jour post-infection (p.i.) et de 3 au 291^{ème} jour p.i. pour le premier alors qu'il est de 3 au 21^{ème} jour p.i. et de 9 au 365^{ème} et 470^{ème} jour p.i. pour le second.

Par WB, les Ac anti p26 sont apparus au 21^{ème} jour pour le premier et au 14^{ème} jour pour le second, avec un pic au 56^{ème} jour puis une diminution du taux d'Ac, jusqu'à devenir indétectable au 180^{ème} jour chez le premier veau (R 29).

La PCR emboîtée a, quant à elle, été positive dès le 3^{ème} jour pour les 2 veaux, avec des différences selon les gènes utilisés. Avec la souche FL 491, le test est positif avec le gène *pol* et négatif avec le gène *env* ; avec la souche R 29 on obtient l'inverse : positif au gène *env* et négatif au gène *pol*. La PCR est positive avec les 2 gènes dès le 5^{ème} jour.

L'isolement du virus peut nécessiter 2 mois de passages en culture successifs avant de se révéler positive dans l'étude alors que la primo-infection est relativement récente par rapport aux conditions rencontrées lors d'infection naturelle (SUAREZ et coll., 1995b).

Les Ac n'apparaissent qu'après le 14^{ème} jour et peuvent redescendre sous le seuil de détection 6 mois après la primo-infection.

Les Ac contre les protéines issues du gène *env* ne semblent pas détectés aussi facilement que ceux dirigés contre la protéine p26 (SUAREZ et coll., 1995b).

iii) Comparaison IFI, isolement et PCR

Sur 5 taureaux de 18 à 24 mois, dont 3 infectés expérimentalement par le VIB (souche FL112) et 2 séronégatifs servant de témoins, différents tests de dépistage ont été mis en oeuvre (GRADIL et coll., 1999).

Tout d'abord, l'isolement du virus est recherché en mettant en culture des cellules mononucléées sanguines dans le milieu essentiel minimum de EAGLE en présence de cellules de poumons de fœtus bovins. Par ailleurs, 2 PCR emboîtées dirigées contre *env* et *pol* (SUAREZ et coll., 1995b) ont été effectuées à la fois sur le sang (cellules mononucléées sanguines) et sur le sperme de taureaux (cellules non spermatiques). Enfin, les sérums de ces bovins ont été testés par IFI sur plaques sur lesquelles avaient été fixées des cellules de testicules de bovins infectés par le VIB souche FL112.

Nombre de jours post infection	Numéro du taureau testé								
	00			67			98		
	IV*	PCR	IFI	IV*	PCR	IFI	IV*	PCR	IFI
-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	nd*	-	-	nd	-	-	-	-
3	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd
9	+	+	-	-	+	-	+	+	-
17	nd	nd	-	nd	nd	+	nd	nd	+
23	+	nd	+	+	nd	+	+	nd	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	nd	+	+	nd	++	+	nd	+
44	-	+	+	+	+	+	+	+	+
51	-	nd	+	+	nd	+	+	nd	+
58	-	+	+	+	+	+	+	+	+
65	-	nd	+	+	nd	+	-	nd	+
72	-	+	+	-	+	+	-	-	+
80	-	+	+	-	+	+	-	+	+
87	-	nd	-	-	nd	+	-	nd	+
90	-	+	-	-	+	+	-	+	+
98	-	+	-	-	+	+	-	+	-

*IV=isolement du virus, nd= non déterminé

Tabl. 5 : Comparaison IFI, isolement et PCR d'après GRADIL et coll., 1999.

	Nombre de tests réalisés	Nombre de tests positifs	% de tests positifs
Isolement du virus	45	18	40%
IFI	48	34	70,8%
PCR	30	23	76,7%

Tabl. 6 : Bilan des tests effectués d'après GRADIL et coll., 1999

La PCR des cellules mononucléées sanguines se montre ici plus sensible que la technique sérologique (IFI) et que l'isolement du virus. La PCR effectuées sur les cellules non spermatiques n'a pas permis d'amplifier les fragments du gène *pol* (*env* n'a pas été testé).

PCR et isolement du virus détectent le virus dès le 9^{ème} jour post infection, mais pas chez le taureau 67 où la PCR est le test le plus précoce. L'isolement du virus n'est possible que pendant une courte période, alors que la PCR détecte le VIB tout au long des 14 semaines d'étude.

Les anticorps sont détectés plus tardivement par la technique IFI et disparaissent précocement, par rapport à la détection virale par la PCR.

iv) Western Blot et PCR

La prévalence de l'infection chez les taureaux en Ontario a été déterminée à partir de 105 taureaux sélectionnés de façon aléatoire parmi les 500 taureaux âgés de plus de 3 ans dans cet état.

Le taux d'infection par WB était de 9,4 % (10 sur 106) alors que les réactions de PCR emboîtée pour *env* et *pol*, et standard pour *gag* révèlent un taux plus élevé : 12,6 % (13 sur 106).

Une plus forte sensibilité des PCR est suggérée par rapport à l'analyse par Western Blot (JACOBS et coll., 1998).

Les différents taux d'infection sont systématiquement interprétés par l'existence de faux négatifs lors des tests sérologiques, mais aucun auteur n'envisage la possibilité de faux positifs lors des techniques de PCR. Toutefois, lors de l'utilisation des techniques de PCR dans le diagnostic du VIH-1 chez l'Homme, certains auteurs rapportent des cas de faux-positifs (HAVLICHEV et coll., 1999 ; RICH et coll., 1999).

III PREVALENCE DE L'INFECTION PAR LE VIB

De nombreuses enquêtes épidémiologiques ont été réalisées dans de nombreux pays du globe, et semblent toutes donner des résultats concordants : le VIB est présent partout où il a été recherché.

1. Etudes épidémiologiques menées en Amérique

Zone géographique et référence	Biais de sélection	Troupeaux		Animaux dépistés		Méthode de dépistage	Prévalence	
		Type d'élevage	Nbr	Nbr	Age		animaux	élevages
Sud et Sud-Ouest des Etats-Unis (WHETSTONE, 1990)	aléatoire	laitier	235	1997	adultes	IFI	4 %	82 %
		allaitant						53 %
Lousiane et Colorado (Etats-Unis) (AMBORSKI, 1984)	Fermes d'état	Laitier	4	97		IFI	11 %	100 %
		allaitant	4	138			4,3 %	50 %
Colorado (COCKERELL, 1992)	Troupeau de 400 Bv, avec 48% de VLBE+	laitier	1	95	adultes	ELISA	21 %	100 %
Mississippi (StCYR COATS, 1994)		laitier	2	170 272	2 à 11 ans	ELISA	38 % 58 %	100 %
Canada (McNAB, 1994)		laitier	265	928	>2 ans	WB	5,5 %	18,1 %
Brésil (MEAS, 2002)		allaitant	6	238		WB	11,7 %	
Costa-Rica (HIDALGO, 1995)	Indemne de virus du BVD et de l'IBR Avec 38 BLV+ et 12 BLV-	laitier	nd ^(a)	50	4 à 6 ans	WB	74 %	nd

Tabl. 7 : Récapitulatif des différentes études épidémiologiques sur le VIB en Amérique.

(a) nd : non décrit par l'auteur

A. Etats-Unis

La prévalence a été estimée à 4 % des bovins dans le sud et le sud-ouest des Etats-Unis avec, en moyenne, 82 % des troupeaux laitiers et 53 % des troupeaux de races allaitantes. Ces résultats ont été obtenus par immunofluorescence indirecte (IFI) réalisée sur près de 1997 sérums (WHETSTONE et coll., 1990).

La séroprévalence du VIB en Louisiane et au Colorado a été estimée par IFI à 11 % des bovins laitiers (97 bovins issus de 4 troupeaux différents ont été dépistés) et à 4,3 % des bovins allaitants (138 vaches provenant de 4 troupeaux) (AMBROSKI et coll., 1989).

Dans un élevage laitier du Colorado, la prévalence du VIB et du VLBE était respectivement de 21 % (20 vaches sur les 95 dépistées par ELISA) et de 52 % (49 sur 95). Il faut également noter qu'un tiers des animaux infectés par le VIB (6 sur 20) l'étaient également par le VLBE, alors que 57 % des animaux séronégatifs pour le VIB (43 sur 75) étaient porteurs d'anticorps contre le VLBE (COCKERELL et coll., 1992).

Au sein de 2 troupeaux laitiers dans des fermes d'état du Mississippi, les taux d'infection déterminés par ELISA faisant appel au précurseur Gag recombinant de 53 kDa était respectivement de 38% et 58% des animaux (StCYR COATS et coll., 1994).

B. Canada

Les sérums de 928 prélèvements sanguins effectués en 1986 et 1987 sur des vaches laitières de plus de 2 ans provenant de 265 troupeaux différents de l'Ontario sont analysés par la technique du Western Blot (WB). Les échantillons étaient constitués de 1 à 13 animaux par troupeau, sélectionnés de façon aléatoire avec une moyenne de 3 sérums par troupeau.

L'épreuve de WB pour la détection d'anticorps contre le VIB a établi la prévalence à 5,5 % de vaches séropositives (soit 51 animaux positifs) avec un intervalle de confiance 95 % limité par 4,2 % et 7,2 %. Dans 18,1 % des troupeaux, au moins un individu était positif, avec une prévalence du VIB au sein d'un troupeau infecté se situant entre 13,8 et 23,4 %.

Sur 239 animaux, les anticorps anti-VLBE ont été détectés par immunodiffusion sur 25,7 % des animaux, dont 17 co-infectés par le VLBE et le VIB (McNAB et coll., 1994).

Par ailleurs, 1,3% des animaux étaient co-infectés par le VIB et le VSB, et 0,9% des animaux co-infectés par les 3 rétrovirus bovins : VIB, VLBE et VSB.

Une seconde étude a été réalisée en 2001 avec des PCR basées sur les gènes *gag*, *pol* ou *env* dans 317 échantillons de buffy coat et 50 échantillons de sperme. Ces prélèvements ont été récoltés dans l'ouest du Canada entre 1980 et 1999 à partir de 27 races bovines.

Bien que les PCR aient été capables de détecter le virus à partir de 10 copies du gène recherché dans l'échantillon, aucune analyse n'a permis de détecter le VIB (GONZALEZ et coll., 2001).

Même si la PCR est une technique très sensible, la taille de l'échantillon paraît toutefois insuffisante pour conclure à l'absence du VIB dans l'ouest du Canada.

C. Brésil

Au Brésil sur 238 sérums provenant de 6 troupeaux de vaches allaitantes, le taux d'infection était de 11,7 % pour le VIB (soit 28 animaux) et 2,1% pour le VLBE (soit 5 animaux). Les techniques utilisées étaient, respectivement pour le VIB et le VLBE, le Western Blot dirigé contre les anticorps anti-p26 du VIB et le test d'immunodiffusion visant à détecter les Ac anti-p51 du VLBE.

L'ADN du provirus a par ailleurs pu être identifié par PCR emboîtée sur le gène *pol* dans les cellules mononucléées circulantes de tous les animaux précédemment trouvés positifs par WB (MEAS et coll., 2002b).

D. Costa-Rica

La détection du VIB par WB a été réalisée sur 50 bovins laitiers de 4 à 6 ans du Costa Rica. Tous ces animaux étaient préalablement négatifs vis à vis du virus du BVD et du virus de l'IBR. Trente-huit animaux infectés par le VLBE et 12 indemnes ont été sélectionnés pour

cette étude. La prévalence des infections rétrovirales est donc ici très importante puisque 74 % (soit 37 sur 50) de ces bovins étaient séropositifs pour le VIB. De plus, 35 sur ces 37 vaches étaient aussi infectées par le VLBE (HIDALGO et coll., 1995).

Toutefois, la petite taille de l'échantillon et le biais lié à la sélection des animaux selon leur statut indemne ou infecté par le VLBE limitent l'intérêt de ces résultats.

Le virus a par ailleurs pu être isolé par culture des cellules mononucléées sanguines sur cellules embryonnaires épithéliales de lapin (EREp). Ce nouvel isolat a été baptisé VIB CR1 (HIDALGO et coll., 1995).

2. Etudes épidémiologiques menées en Asie et en Océanie

Zone géographique et référence	Biais de sélection	Troupeaux		Animaux dépistés		Méthode de dépistage	Prévalence	
		Type d'élevage	Nbr	Nbr	Age		animaux	élevages
Nouvelle-Zélande (HORNER, 1991)	Troupeau infecté par le VLBE	Nd ^(a)	2	96	nd	WB	25%	100 %
Australie –province de Victoria et du Queensland- (FORMAN, 1992)	Forte prévalence de VLBE	Laitier	6	120	nd	WB et ELISA	7% à 17% selon les troupeaux	100 %
Ouest de l'Australie (BURKALA, 1999)	aléatoire	Laitier	23	690	nd	ELISA	3.8%	73.9%
				207	nd	WB	15.9%	56,5%
Japon –île d'Hokkaido- (MEAS, 1998)	Forte prévalence de VLBE	Laitier	12	611	nd	WB	15.9%	100 %
Corée du Sud (CHO, 1999)	aléatoire	Laitier	20	266	1 à 8 ans	WB	35%	60%
		Allaitant	26				33%	65%
Pakistan (MEAS, 200a)	aléatoire	Buffles d'Asie	nd	370	nd	WB	10,3%	nd
		Races locales	nd	76	nd		15.8%	nd
Cambodge (MEAS, 200b)	aléatoire	Buffles d'Asie	nd	42	nd	WB	16.7%	nd
		Bovins de trait et races locales	nd	544	nd		26.3%	nd
Iles de Bali et de Nusa Penida (BARBONI, 2001)				77		ELISA	11.7%	

Tabl. 8 : Récapitulatif des différentes études épidémiologiques sur le VIB en Asie et Océanie.

(a) nd : non décrit par l'auteur

A. Nouvelle-Zélande

Des analyses par WB pour rechercher des anticorps anti-VIB et des analyses d'immunodiffusion sur gel pour rechercher les anticorps anti-VLBE et anti-VSB ont été réalisées sur ces 96 animaux provenant de 2 troupeaux néo-zélandais.

Vingt-cinq pour cent des animaux étaient séropositifs vis à vis du VIB dont un animal co-infecté par le VIB et le VLBE, 3 co-infectés par le VIB et le VSB et un animal séropositif pour les 3 virus.

L'intérêt de ces résultats est limité par le biais de sélection (les troupeaux testés ont été choisis à cause de leur fort taux d'infection par le VLBE) et la taille de l'échantillon (HORNER, 1991).

Virus	Nombre de séropositifs	% de positif
VIB seul	13	13,5
VLBE seul	6	6,2
VSB seul	27	28,1
VIB et VLBE	1	1
VIB et VSB	9	9,4
VLBE et VSB	3	3,1
VIB, VSB et VLBE	1	1

Tabl. 9 : Résultats de l'étude épidémiologique menée en Nouvelle-Zélande (d'après HORNER, 1991)

B. Australie

La première étude épidémiologique réalisée dans ce pays a été effectuée sur 60 bovins laitiers issus de 2 troupeaux de la province de Victoria, et 60 autres provenant de 4 élevages de la province du Queensland. Ces troupeaux ont été sélectionnés car ils sont fortement infectés par le VLBE. La séroprévalence par WB et ELISA était de 7 à 17 % des animaux dans chaque troupeau. Dix-neuf des cent-vingt animaux testés (soit 15,8 %) étaient également porteurs d'anticorps dirigés contre le VSB (FORMAN et coll., 1992).

Une seconde étude épidémiologique dans 23 élevages laitiers, avec 30 animaux par élevage sélectionnés, a été réalisée dans l'ouest de l'Australie afin d'évaluer la prévalence des infections par deux lentivirus bovins, le VIB et le virus de la Jembrana Disease (VJD) (BURKALA et coll., 1999).

Un test ELISA avec des antigènes de capsid (CA) du VJD a été réalisé sur l'ensemble des prélèvements et révèle la présence d'anticorps dans 3,8 % des cas. Par ailleurs, un test WB avec ces mêmes antigènes CA de VJD permet de détecter la présence d'anticorps spécifiques chez 15,9 % des animaux, alors que seulement 9 bovins par troupeau étaient testés.

Les 26 animaux positifs au test ELISA l'étaient également au test Western Blot, et les 33 sujets positifs au test WB CA du VJD, étaient également positifs en WB CA du VIB.

Si le taux d'infection dans chaque élevage reste faible, ce sont 73,9 % des troupeaux qui comportent au moins un sujet porteur d'anticorps (BURKALA et coll., 1999).

C. Japon

Une étude épidémiologique a été menée dans l'île d'Hokkaido sur 611 bovins laitiers provenant de 12 troupeaux différents, sélectionnés à cause de leur fort taux d'infection en VLBE.

Les anticorps anti p26 ont été détectés par WB. Les Ac dirigés contre le VLBE ont été recherchés par immunodiffusion. Certains troupeaux étaient indemnes de VLBE, mais la prévalence élevée pour le VLBE s'accompagnait également d'une prévalence élevée pour le VIB. Au total, sur les 611 animaux testés, 175 (soit 28,6 %) étaient positifs vis à vis du VLBE, et 72 (11,7 %) vis à vis du VIB, alors que 26 (soit 4,2 %) étaient co-infectés par les 2 virus.

Cependant, le biais de sélection des troupeaux retenus pour cette étude rend difficile l'interprétation de taux d'infection aussi élevés (MEAS et coll., 1998).

D. en Corée du Sud

En 1999, sur 20 troupeaux laitiers et 26 troupeaux allaitants du sud-ouest du pays, 266 sérums récoltés entre 1994 et 1998 ont été analysés par Western Blot protéine p26.

La séroprévalence individuelle était de 35 % [15 % à 56 % selon les provinces étudiées] chez les bovins laitiers et de 33 % [19 %-67 %] chez les bovins allaitants, alors que 60 % [50-83 %] des troupeaux laitiers et 65 % [56 %-100 %] des troupeaux allaitants abritaient au moins un sujet réactif.

Dans cette étude tous les animaux testés avaient entre 1 et 8 ans, excepté 5 veaux qui avaient moins de 4 mois. Un de ces 5 veaux était porteur d'anticorps anti-p26.

Une PCR emboîtée visant à amplifier une séquence de 298 paires de bases du gène *pol* a été réalisée sur 11 échantillons de sang testés positifs tirés au hasard, et tous ont permis de détecter le provirus.

Le VLBE a également été recherché par immunodiffusion : la séroprévalence individuelle était de 40 % [15 %-67 %] et 48 % [0 %-66 %] et la co-infection VIB+VLBE était de 9 % [5 %-13 %] et 10 % [0 %-15 %], pour respectivement les bovins laitiers et allaitants. Les résultats n'ont pas permis de conclure à une quelconque corrélation entre les infections par le VIB ou le VLBE (CHO et coll., 1999).

Ces taux sont relativement élevés par rapport aux autres études épidémiologiques réalisées. Cependant, la prévalence élevée du VLBE rend une fois de plus difficile l'interprétation de ces résultats.

E. Pakistan

Trois cent soixante-dix buffles d'Asie ainsi que 76 vaches ont été testés par WB p26 de VIB, et par immunodiffusion pour rechercher les anticorps anti-VLBE.

Au total, 10,3 % des buffles d'Asie et 15,8 % des vaches étaient séropositifs pour le VIB et seulement 0,8 % des buffles et aucune vache pour le VLBE. Un seul animal était co-infecté par ces deux virus.

Une PCR emboîtée basée sur le gène *pol*, ainsi qu'une autre basée sur la région V2 du gène *env*, se sont révélées positives sur les 25 animaux séropositifs en WB. (MEAS coll., 2000a).

F. Cambodge

Des échantillons sur 544 bovins de trait et 42 buffles d'Asie, ont été prélevés et analysés par WB p26 de VIB et par immunodiffusion pour rechercher des anticorps anti-VLBE. Le taux de séropositif était de 26,3% des bovins et de 16,7 % des buffles pour le VIB, alors que seulement 5,3 % des bovins étaient séropositifs pour le VLBE, mais aucun buffle. Aucune co-infection n'a été détectée. Les techniques de PCR, d'hybridation *in situ* et de Southern Blot ont par ailleurs confirmé la présence d'ADN proviral (MEAS et coll. 2000b).

Le VIB a été identifié dans le genre *Bos*, mais aussi dans le genre *Bubalus*. D'autres études sont nécessaires pour savoir si d'autres sous-familles des Bovidés sont infectées par le VIB.

G. Iles de Bali et de Nusa Penida

Deux tests ELISA spécifiques du VIB ou du VJD (ZHENG et coll., 2000), faisant intervenir les protéines CA et TM ont été mis en oeuvre, afin de pouvoir comparer les séroprévalences de ces deux lentivirus présents sur les îles de Bali et de Nusa Penida. Des anticorps anti-VJD ont été retrouvés chez 28 des 77 animaux testés. Sur les 49 animaux séronégatifs pour le VJD, 9 ce sont avérés porteurs d'Ac anti-VIB. Ces 2 tests, très sensibles, ont donc permis d'évaluer les taux d'infection à 36,4 % et 11,7 %, respectivement pour le VJD et le VIB (ZHENG et coll., 2001). Il s'agit là de la première étude permettant de différencier les sujets infectés par le VIB et par le VJD dans l'île de Bali, où la Jembrana Disease est considérée comme une maladie endémique, et dans l'île de Nusa Penida, très proche, mais considérée comme indemne de Jembrana Disease (BARBONI et coll., 2001).

3. Etudes épidémiologiques menées en Europe

Zone géographique et référence	Biais de sélection	Troupeaux		Animaux dépistés		Méthode de dépistage	Prévalence	
		Type d'élevage	Nbr	Nbr	Age		animaux	élevages
Pays-Bas (HORZINEK, 1991)	aléatoire	nd ^(a)	nd	957	3 à 5 ans	IFI	6,7%	nd
Allemagne (MULUNEH, 1994)	Indemnes de LBE et de BVD	Laitier	nd	380	>3 ans	ELISA	6,6%	nd
Grande-Bretagne (SCOBIE, 2001)	aléatoire	Allaitant	29	514	adultes	ELISA	5 %	58,6 %
		Laitier	20	457			5,9 %	60 %
Italie (CAVIRANI, 1998)	aléatoire	Laitier	272	3166	6 à 10 ans	IFI	2,5 %	5,8 %
		Centre insémination	8	138			5,1 %	25 %
France –Landes- (POLACK, 1996)	Troupeau infecté VLBE	Laitier	12	57	Les plus âgés	WB	9 %	25 %
		Allaitant	7	34			6 %	14,3 %
France –Vendée- (POLACK, 1996)	Troupeau infecté VLBE	Laitier	7	16			6 %	28,6%
		Allaitant	6				1 %	16,7 %
		Mixte	5				1 %	20 %

Tabl. 10 : Récapitulatif des différentes études épidémiologiques sur le VIB en Europe

(a) nd : non décrit par l'auteur

A. Pays- Bas

Les sérums de 957 bovins de 3 à 5 ans ont été collectés de façon aléatoire dans plusieurs provinces de Hollande. Le dépistage par immunofluorescence indirecte (IFI) a révélé 6,7% d'animaux positifs (HORZINEK et coll., 1991).

B. Allemagne

La recherche du VIB est effectuée par ELISA ou immunofluorescence sur 380 sérums de vaches laitières indemnes de BVD et de VLBE collectés entre 1989 et 1991 dans l'est de l'Allemagne, la séroprévalence du VIB était de 6,6% des bovins testés (MULUNEH, 1994).

C. Grande-Bretagne

La séroprévalence du VIB déterminée par ELISA à partir de 514 vaches allaitantes issues de 29 troupeaux différents et de 457 bovins laitiers provenant de 20 élevages était respectivement de 5,0 % et de 5,9 % des bovins. Douze troupeaux laitiers sur les 20 et 17 élevages allaitants sur les 29 comportaient au moins un sujet infecté dans leur effectif. Aucune différence significative n'a été démontrée entre les taux d'infections des bovins laitiers et allaitants (SCOBIE et coll., 2001).

Par ailleurs, le VIB avait déjà été dépisté au Royaume-Uni (BROWNLIE et coll., 1994).

D. Italie

Sur 3166 vaches laitières de la vallée du Pô, provenant de 272 troupeaux différents, et 138 taureaux issus de 8 centres d'insémination artificielle, l'IFI a permis d'identifier 78 vaches (2,5 %) issues de 16 troupeaux (5,8 %) et 7 taureaux (5,1 %) de 2 centres d'insémination artificielle (25 %) porteurs d'anticorps contre le VIB R29.

Par ailleurs, les résultats positifs ont été évalués par WB (protéine p26 du VIB R29) : 81 des 85 sérums analysés étaient positifs, les 4 autres ayant des Ac dirigés contre d'autres protéines que p26 (CAVIRANI et coll., 1998).

E. France

Les sérums collectés sont prélevés sur les 3 à 6 animaux les plus âgés de chacun des 37 troupeaux différents infectés par le VLBE, sélectionnés dans les départements des Landes et de Vendée. Les tests de dépistage étaient basés sur une technique de WB permettant de détecter les Ac contre le précurseur Gag de 53 kDa (suivant la technique décrite par RASMUSSEN et coll., 1990).

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux 11 et 12:

	Troupeaux			Animaux	
	Type	Testés	Positifs	Testés	Séropositifs
Landes	Laitier	12	3 (25%)	57	5 (9%)
	Allaitant	7	1 (14%)	34	2 (6%)
Total		19	4 (21%)	91	7 (8%)
Vendée	Laitier	7	2 (29%)	113	6 (5%)
	Allaitant	6	1 (17%)	108	1 (1%)
	Mixte	5	1 (20%)	86	1 (1%)
Total		18	4 (22%)	307	8 (3%)
2 Enquêtes	Laitier	19	5 (26%)	170	11 (6%)
	Allaitant	13	2 (15%)	142	3 (2%)
	Mixte	5	1 (20%)	86	1 (1%)
Total		37	8 (22%)	398	15 (4%)

Tabl. 11 : Résultats du dépistage du VIB dans les Landes et en Vendée (France) (d'après POLACK et coll., 1996).

Type de troupeau	Animaux		
	Testés	Séropositifs	Races
Laitier	68	16 (24%)	Holstein
Laitier	64	3 (5%)	Holstein
Allaitant	62	2 (3%)	Charolaise et Blonde d'Aquitaine
Mixte	50	2 (4%)	Croisées

Tabl. 12 : Prévalence du VIB dans 4 troupeaux infectés de Vendée (d'après POLACK et coll., 1996)

La compilation de toutes ces données permet d'obtenir un taux d'infection moyen de 4 % des animaux testés (soit 15 sur 398), avec une séropositivité de 6% des bovins les plus âgés en élevage laitier et de 2 % des bovins les plus âgés pour les troupeaux allaitants. Au total, 22 % des troupeaux testés comportent au moins un sujet positif à la sérologie VIB dans leur effectif, répartis en 26% des troupeaux laitiers, 20% des troupeaux mixtes et 15% des troupeaux allaitants (POLACK et coll., 1996).

Cette étude est la seule effectuée en France. La présence du VIB sur notre territoire n'est pas rare et les taux sont proches de ceux de la plupart des études épidémiologiques précédemment décrites, quel que soit le continent (POLACK et coll., 1996).

Ces données ne peuvent être extrapolées à l'ensemble du territoire national. En effet, l'effectif dépisté reste trop faible et trop localisé. Par ailleurs, ils ne reflètent certainement pas non plus la séroprévalence du VIB réelle dans ces régions.

En effet, les prélèvements n'ont pas été réalisés au hasard.

Les troupeaux ont été choisis dans ces deux départements sur la base de leur statut sérologique vis à vis de la leucose bovine enzootique : dans ces troupeaux au moins un sujet séropositif vis à vis du VLBE a été détecté lors des dernières campagnes de prophylaxie obligatoire. L'infection par le VIB est présumée être liée à celle par le VLBE par plusieurs auteurs (AMBORSKI et coll., 1989 ; GONDA et coll., 1992) même si cette hypothèse est controversée dans d'autres études (WHETSTONE et coll., 1990 ; COCKERELL et coll., 1992 ; McNAB et coll., 1994).

Seuls les sujets les plus âgés de chaque troupeau ont été prélevés. Il semble que le taux d'infection par les rétrovirus augmente avec l'âge (POLACK et coll., 1987 ; StCYR COATS et coll., 1994). Toutefois, dans une étude séro-épidémiologique menée en Grande-Bretagne (SCOBIE et coll., 2001) sur 971 bovins adultes, il n'existait pas de différence significative entre les taux d'infection des animaux selon leur âge (moins de 3 ans, entre 3 et 4 ans, et plus de 4 ans).

Les analyses sérologiques ont été réalisées à partir de la souche américaine R29, alors que les souches sauvages présentes dans notre pays pourraient être antigéniquement suffisamment éloignées du VIB R29 pour provoquer des faux négatifs. D'ailleurs, les réactions positives observées en WB sont d'intensité beaucoup plus faible lors d'infection naturelle que lors d'infection expérimentale avec la souche américaine R29 (HORZINEK et coll., 1991 ; GONDA et coll., 1992 ; GONDA et coll., 1994 ; POLACK et coll., 1996). De telles variations de réactivité contre les antigènes du précurseur Gag sont connues dans le cas du VIH (De LEYS et coll., 1990).