

FORMATION CONTINUE - ARTICLE DE SYNTHESE

Avancées récentes en biologie moléculaire du virus de la diarrhée virale bovine

DEHAN P.*, HAMERS C*, LETELLIER C.***, COUVREUR B.***,
KERKHOF P.***, PASTORET P-P*

* Laboratoire d'Immunologie Vaccinologie
Faculté de médecine vétérinaire - Université de Liège
Boulevard de Colonster, 20, Bâtiment B43 bis
B-4000 Liège
Belgique

** Centre d'étude et de recherches vétérinaires et agrochimiques (CERVA)
Groeselenberg, 99
B-1180 Bruxelles
Belgique

Correspondance: Dr. Pierre Dehan, Tel 32-4-3664265, FAX 32-4-3664261, Email: Pierre.Dehan@ulg.ac.be

Remerciements: Les auteurs remercient le ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture (IRSIA) pour l'octroi de subsides dans le cadre desquels les recherches sur le virus BVD-MD sont actuellement menées.

RESUME : La recherche sur le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et les autres pestivirus a récemment abouti à des avancées significatives, en particulier concernant l'organisation du génome et la fonction des protéines virales. Cette revue fait le point sur ces progrès récents qui permettent de mieux comprendre la pathogénie de la diarrhée virale bovine et de la maladie des muqueuses. Les implications sur la vaccination et le diagnostic sont également abordées.

Décrite en 1946 (Olafson et al., 1946), la diarrhée virale bovine (BVD) n'a pas été immédiatement associée à la maladie des muqueuses (MD). Ce sont les travaux de Liess et collaborateurs (1974) et la première reproduction expérimentale de la maladie des muqueuses (Brownlie et al., 1984), qui ont formellement identifié le pestivirus BVD comme agent pathogène de la maladie des muqueuses. Cependant, le fait que le virus ne se multiplie en culture in vitro qu'à des titres relativement modestes a constitué un frein aux premières investigations de virologie moléculaire. Les premiers essais de préparation de virus purifiés ont été infructueux et ni les acides nucléiques viraux, ni les protéines virales n'étaient disponibles en quantité suffisante (Moennig et Plagemann, 1992). Il a fallu que les

techniques modernes de biologie moléculaire soient appliquées aux pestivirus pour avoir accès au génome viral. Cette étape déterminante (Renard et al., 1985) a ouvert la voie à une intense activité de recherche centrée sur l'organisation du génome et la fonction des protéines virales. La génétique moléculaire des pestivirus a également permis la comparaison des génomes des pestivirus entre eux et avec d'autres virus (Collett, 1992). Cette revue fait le point sur ces recherches qui ont mené à une meilleure compréhension de la pathologie associée au virus de la diarrhée virale bovine (BVDV).

Le BVDV fait partie du genre des pestivirus qui regroupe également le virus de la peste porcine classique (CSFV) et le virus de la maladie des frontières du mouton. Les pestivirus

font eux-mêmes partie de la famille des flaviviridae, dans laquelle on retrouve également les virus du groupe de l'hépatite C humaine (HCV).

Le BVDV a un impact économique important en élevage bovin dans le monde entier (Houe, 1999). La lutte pour le contrôle de ce pathogène majeur a conduit certains pays d'Europe du Nord à mettre en place des programmes d'élimination et à réduire l'importation de bétail étranger (Lindberg et Alenius, 1999). Dans ces pays, l'infection par le BVDV est déclarée maladie légalement réputée contagieuse alors que, dans le reste de l'Europe, le diagnostic et le contrôle de l'infection à l'échelle des cheptels repose sur les choix individuels des éleveurs et la vaccination est largement utilisée. Le marché, surtout nord-américain, offre un grand nombre de vaccins

tant atténués qu'inactivés. L'efficacité des programmes de vaccination devrait bénéficier des nouvelles avancées technologiques, en particulier de la vaccination par ADN plasmidique. De plus, la recherche sur les pestivirus bénéficie de la proximité avec HCV qui mobilise d'importants budgets. Le BVDV est par ailleurs utilisé comme modèle viral pour pallier aux problèmes de multiplication in vitro de HCV (Zitzmann et al., 1999; Lai et al., 2000).

Si la maladie des muqueuses affecte exclusivement les animaux infectés persistants immunotolérants (IPI), la forme aiguë de l'infection postnatale par BVDV se traduit généralement par des signes cliniques mineurs, voire sub-cliniques. Par contre l'infection d'une vache gestante provoque de nombreux troubles de la reproduction (Chastant et Maillard, 1999). A partir de 1985 cependant, un nouveau type d'infection aiguë par le BVDV a été associé à une forte mortalité. Les animaux présentent de la thrombocytopenie avec pétéchies, accompagnée de diarrhée profuse. Ce tableau clinique ressemble à celui de la peste porcine classique et il est associé à des souches dites hypervirulentes. Ces syndromes hémorragiques ont d'abord été décrits au Canada et aux USA (Corapi et al., 1989; Pellerin et al., 1994) où ils revêtent un caractère épidémiologique alors que des cas isolés ont été observés en Europe (Broes et al., 1992; Lecomte et al., 1996).

1. ORGANISATION MOLÉCULAIRE DU VIRUS DE LA DIARRHÉE VIRALE BOVINE

Le BVDV est un petit virus sphérique (40 à 60 nanomètres) constitué d'une capsidie entourée d'une enveloppe phospho-lipidique. L'information génétique est stockée dans une seule molécule d'ARN positif codant pour 4 protéines structurales localisées dans l'enveloppe (E0 aussi nommée Erns, E1, E2) et la capsidie (C) et 7 protéines non structurales (N pro, p7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). L'analyse de la séquence de l'ADN complémentaire (ADNc) de BVDV a montré que le génome contient environ 12300 nucléotides pour une région codante longue de 3898 codons. Cette région codante est entourée par 2 régions non codantes appelées 5' et 3' UTR (Untranslated Regions) qui sont caractérisées par des structures secondaires complexes

(voir point 4). Le génome du BVDV possède un grand cadre de lecture ouvert codant pour une polyprotéine de 3898 acides aminés, ce qui correspond théoriquement à une protéine de 438 kilodaltons (kD). Cette polyprotéine est successivement clivée en plusieurs polypeptides dont la somme des masses moléculaires atteint 550 kD. La différence entre les deux valeurs doit être recherchée dans la présence de sites de glycosylation sur certains polypeptides. Le tableau I reprend les différents polypeptides issus de la polyprotéine du BVDV, en

ces anticorps ne sont jamais neutralisants. Certaines protéines comme N pro ou p7 ne semblent pas essentielles pour la multiplication virale et des mutants délétés du gène N pro sont viables bien que se multipliant dix fois moins rapidement que le virus sauvage (Lai et al., 2000).

2. VIRUS CYTOPATHOGENE OU NON-CYTOPATHOGENE

La plupart des isolats de BVDV infectent les cellules en culture in vitro sans produire d'effet cytopathogène et ont un biotype dit non-cyto-

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des polypeptides des pestivirus.

	Ancien nom	Glycosylation	Rôle présumé ou Activité enzymatique	Conservation (Acide Amine)	Immuno-génicité	Référence
N pro	p20	-	(Auto)Protéase	-	-	(Tratschin <i>et al.</i> , 1998)
C	p14	-	Structural (Compaction ARN)	+	-	(Stark <i>et al.</i> , 1993)
E0 ou Erns	gp48	+	Structural + RNase Homodimère	+	+	(Schneider <i>et al.</i> , 1993; Rumenapf <i>et al.</i> , 1993)
E1	gp25	+	Structural Hétérodimères avec E2	-	-	(van Rijn <i>et al.</i> , 1994)
E2	gp53	+	Structural + RNase (transmembranaire)	-- (60%)	++	(Weiland <i>et al.</i> , 1990; Thiel <i>et al.</i> , 1991; Hulst <i>et al.</i> , 1994)
p7	p7	-	?	-- (43%)	-	(Elbers <i>et al.</i> , 1996)
NS2/3	p125	-	NS2 et NS3 non clivés (souches NCP), Pas d'induction de l'apoptose	+	+	(Meyers <i>et al.</i> , 1992)
NS2	p54	-	Hydrophobe + domaine « doigt de zinc »	+	-	(De Moerloose <i>et al.</i> , 1990)
NS3	p80	-	Multifonctionnel: hélicase, NTPase, serine protéase, induction de l'apoptose	++ (>90%)	+	(Tamura <i>et al.</i> , 1993; Warrenner et Collett, 1995; Grassmann <i>et al.</i> , 1999)
NS4A	p10	-	Cofacteur de NS3	-	-	(Xu <i>et al.</i> , 1997; Tautz <i>et al.</i> , 2000)
NS4B	p32	-	?	-	-	(van Olphen et Donis, 1997)
NS5A	p58	-	?	-	-	(Reed <i>et al.</i> , 1998)
NS5B	p75	-	RNA-polymerase	+	-	(Zhong <i>et al.</i> , 1998)

suivant l'ordre qu'ils occupent sur le génome. Le tableau I reprend également une estimation du degré de conservation des polypeptides entre les souches de BVDV exprimé en pourcentage de conservation, ainsi qu'une indication de l'immunogénicité, c'est-à-dire la capacité d'induire une réponse immune. Dans le passé, les polypeptides du BVDV étaient désignés par leur masse moléculaire, car leur rôle était inconnu. Actuellement, on utilise une nouvelle nomenclature plus rationnelle qui permet la comparaison avec les autres pestivirus et les autres membres des flaviviridae. Les protéines E0 et E2 sont parmi les plus immunogènes et mais ce sont surtout les anticorps anti-E2 qui suscitent la production d'anticorps qui neutralisent la multiplication virale in vitro. La production d'anticorps dirigés contre NS2/3 ou NS3 est également fréquente mais

pathogène (NCP). Ces souches NCP constituent la grande majorité des souches circulant naturellement. Cependant in vivo chez des animaux infectés persistants immunotolérants (IPI), des variants cytopathogènes (CP) apparaissent spontanément et sont à l'origine de la maladie des muqueuses. La maladie des muqueuses est à l'origine d'une mortalité voisine de 100%. Les bases moléculaires du biotype CP ont fait l'objet de nombreux travaux. Le séquençage du génome a permis de déterminer la présence d'insertion dans le génome des souches CP alors que les souches NCP n'en possédaient pas (Meyers et al., 1991; Qi et al., 1992). L'insertion incriminée a toujours été détectée dans la zone codante pour la protéine NS2/3 et se traduit en pratique par l'expression de la protéine NS3 sous la forme d'un polypeptide de 80 kD qui n'est plus fusionné à NS2 (Mendez et al., 1998). Etant donné le caractère hydrophile

de NS3 et hydrophobe de NS2, il est probable que la localisation intracellulaire de NS3 dans des cellules infectées par des souches CP soit différente de celle de NS2/3 non clivé dans des cellules infectées par des souches NCP (Wiskerchen et Collett, 1991). La protéine NS3 est certainement la plus étudiée chez BVDV et on y associe une activité de protéase, d'hélicase et de NTPase (Tamura et al., 1993; Warrener et Collett, 1995; Grassmann et al., 1999; Tautz et al., 2000).

De nombreuses souches CP de terrain ont fait l'objet de recherches pour déterminer la nature de la mutation à l'origine du biotype CP. Il s'agit soit de l'insertion d'une séquence d'ARN cellulaire, comme par exemple celui codant pour l'ubiquitine, soit de la duplication suivie éventuellement d'un remaniement du génome viral dans la zone incriminée (Figure 1) (Meyers et Thiel, 1996). L'expérience inverse, consistant à enlever expérimentalement l'insertion génétique sur un clone d'ADNc infectieux, a conduit à la perte du biotype CP en culture in vitro (Mendez et al., 1998). Une troisième façon d'obtenir le biotype CP a été récemment découverte. Il s'agit de la production de particules défectives interférentes (DI) qui sont constituées par un mini-génome dépourvu de la plupart des protéines

structurales et donc incapables de former des virions infectieux (Behrens et al., 1998). Ces DI sont bien à l'origine de l'expression de la protéine NS3 et on a démontré qu'elles sont directement responsables de la maladie des muqueuses chez les animaux IPI porteurs de DI.

In vitro, les cellules infectées par des souches CP meurent par apoptose (Hoff et Donis, 1997). Cette apoptose serait la conséquence d'un stress oxydatif intracellulaire (Schweizer et Peterhans, 1999). D'autre part, les monocytes infectés participeraient à l'induction de l'apoptose dans d'autres types cellulaires (Lambot et al., 1998). In vivo, l'analyse des tissus d'animaux atteints de maladie des muqueuses a permis de mettre en évidence les virus de biotype CP dans les tissus qui présentent des lésions caractéristiques de la maladie (tissus lymphoïdes, tube digestif) (Liebler et al., 1991). Des corps apoptotiques y ont été récemment démontrés (Teichmann et al., 2000).

3. LA MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA DIARRHÉE VIRALE BOVINE

In vitro, seules les cultures cellulaires dérivées des artiodactyles (bovins,

ovins, caprins et moins efficacement les cellules porcines) permettent la multiplication du BVDV. Après attachement du virus au niveau de la membrane plasmique et pénétration dans la cellule, il se produit une série d'étapes aboutissant à la production de nouveaux virions (Figure 2). Ces étapes se déroulent exclusivement dans le cytoplasme. Donis (1995) estime que 100 à 1000 virions peuvent provenir d'une seule cellule en culture in vitro. Le BVDV pénètre dans la cellule par un processus d'endocytose médié par un récepteur spécifique (Xue et Minocha, 1993). Après la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, la seconde phase du cycle débute dans le cytosol par la traduction de la molécule d'ARN au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique granulaire. Cette étape est rapide puisque l'existence de polypeptides viraux a pu être démontrée 3 heures après infection (Donis et Dubovi, 1987). Une fois la polyprotéine traduite, celle-ci subit une série de clivages par des protéases virales et cellulaires aboutissant aux protéines virales matures (Donis, 1995). Ces clivages dont le mécanisme intime est encore peu connu ont lieu soit dans le cytosol, soit dans la lumière du réticulum endoplasmique et/ou de l'ap-

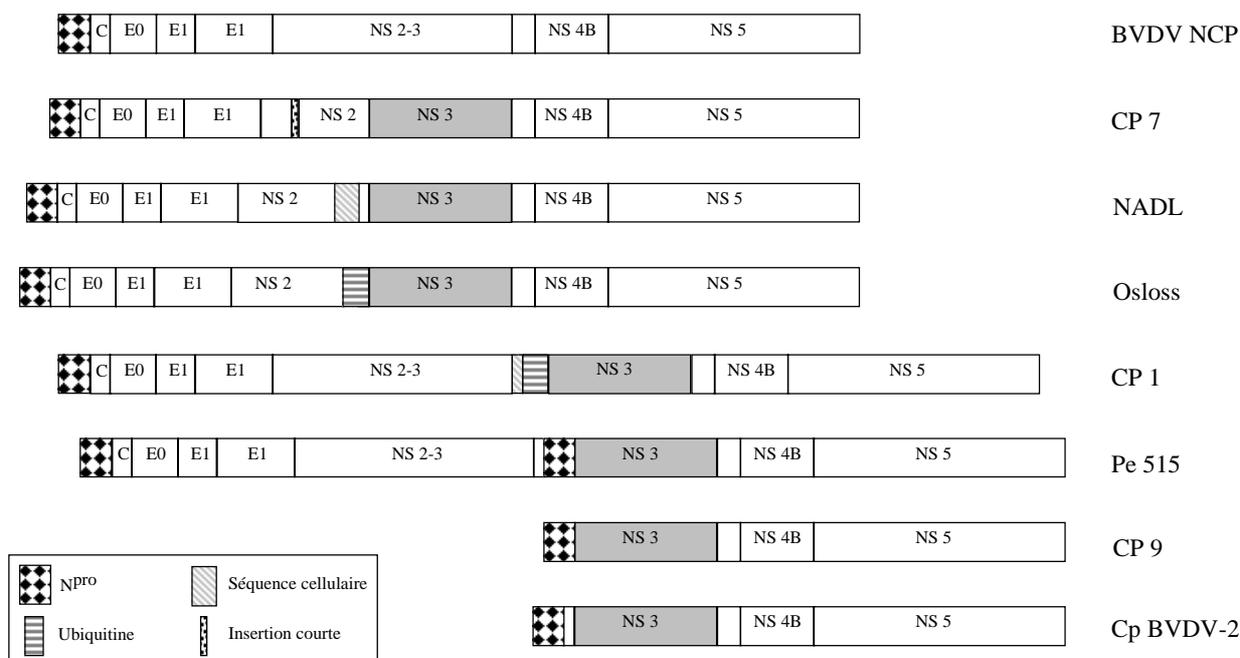


Figure 1 : Comparaison de la structure génomique d'une souche non cytopathogène (BVDV NCP) et de 7 souches cytopathogènes de BVDV, montrant les réarrangements à l'origine de la synthèse de la protéine NS3 (d'après Rice, 1996). Les souches CP7, NADL et Osloss présentent diverses insertions, alors que pour CP 1 et Pe 515, des duplications de séquences virales sont détectées, éventuellement accompagnées d'insertions cellulaires (CP1). Les génomes des souches CP9 et Cp BVDV 2 représentent des particules défectives interférentes dépourvues de protéines structurales.

pareil de Golgi. La phase suivante de réplication du génome requiert deux étapes distinctes : d'abord la synthèse d'un brin d'ARN négatif (cARN) qui va ensuite servir de modèle pour la transcription de multiples copies d'ARN viral positif (vARN). Il est intéressant de mentionner que les insertions de séquences cellulaires à l'origine des souches CP auraient lieu pendant la synthèse du brin d'ARN négatif (cARN) (Jarvis et Kirkegaard, 1992). La protéine clef de cette phase de réplication est certainement NS5B qui possède une activité d'ARN polymérase ARN dépendante (Zhong et al., 1998). Les autres acteurs moléculaires restent mal connus, en particulier l'activité hélicase de NS2/3 (Warrener et Collett, 1995; Grassmann et al., 1999). Les phases finales du cycle viral sont l'encapsulation et l'enveloppement (morphogénèse) à l'issue desquelles les virions s'accumulent dans des vacuoles d'exocytose. Ces vacuoles sont également le siège de la maturation des glycoprotéines associées à l'enveloppe virale (glycosylation). Dix heures après l'infection, des virions ont pu être détectés dans l'espace extracellulaire, ce qui témoigne de la rapidité du cycle viral (Donis, 1995).

4. LES ZONES NON TRADUITES

La zone 5' non traduite (5' UTR) est composée d'environ 385 nucléotides qui adoptent une structure tridimensionnelle complexe. La 5' UTR est très conservée parmi les pestivirus mais également parmi les virus du groupe HCV. Le rôle de cette UTR est de constituer une sorte de clef moléculaire qui rend possible la traduction de la molécule d'ARN viral par les ribosomes de la cellule hôte. En effet pour l'ARN viral, la traduction en protéine n'est pas dépendante d'une coiffe de 7-méthyl guanosine à l'extrémité 5' qui est normalement nécessaire à la machinerie de traduction eucaryotique (Shatkin, 1976). La structure tridimensionnelle de la 5' UTR du BVDV interagit directement avec le ribosome, il s'agit d'un IRES (Internal Ribosomal Entry Site) et la traduction de la polyprotéine débute au niveau du premier codon AUG situé en aval de cette zone 5' UTR (Deng et Brock, 1993; Poole et al.,

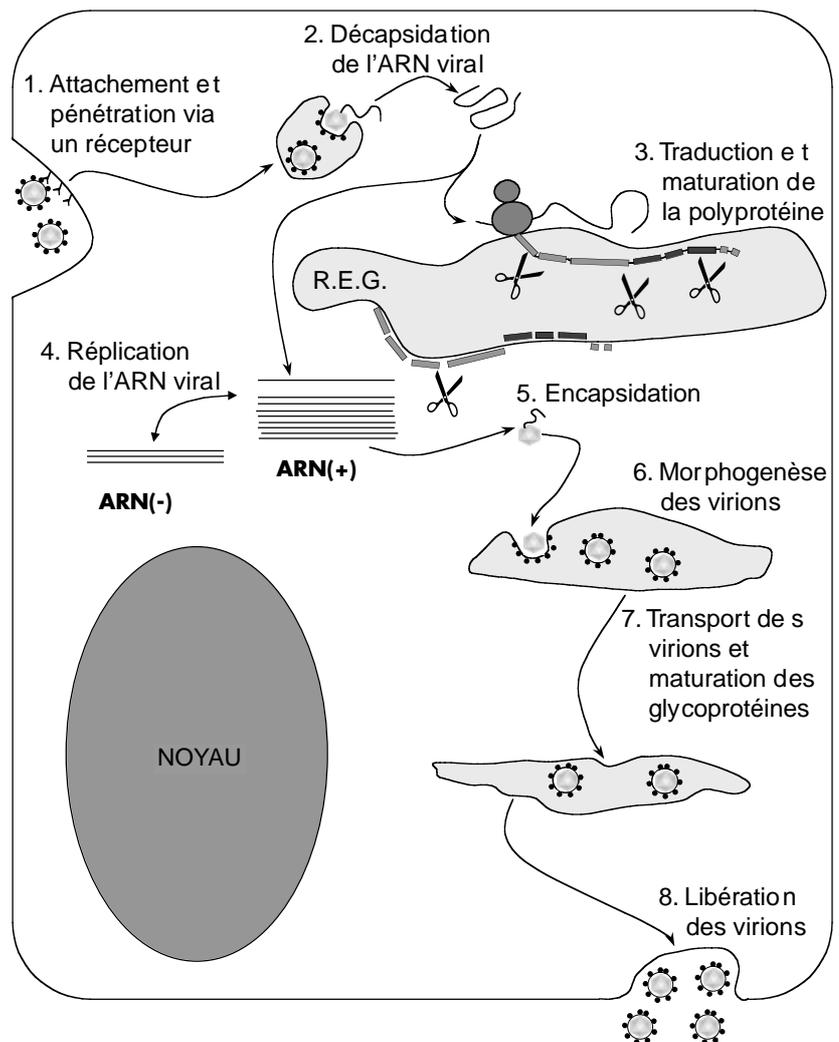


Figure 2 :

Représentation schématique simplifiée du cycle de multiplication du BVDV (modifié d'après Rice (1996)).

Après l'attachement et la pénétration du virus via un récepteur (1), la décapsulation (2) a lieu dans des vésicules d'endocytose, où l'abaissement du pH favorise la fusion des membranes et la pénétration de l'ARN dans le cytosol. La molécule d'ARN viral est immédiatement traduite (3) grâce à la 5' UTR qui interagit directement avec le ribosome. Après clivage de la polyprotéine par des protéases virales et cellulaires, les protéines virales subissent des translocations à, travers la membrane du réticulum endoplasmique granuleux (R.E.G.). Seules les glycoprotéines structurales (représentées en rouge) resteraient majoritairement orientées vers la lumière du réticulum. Les autres protéines virales (représentées par des rectangles gris) passeraient sur la face cytosolique de la membrane du réticulum, tout en y restant associées. Pour se répliquer (4), l'ARN viral positif (ARN +) doit passer par un intermédiaire d'ARN négatif (ARN -). L'encapsulation de l'ARN viral (5) aurait lieu dans le cytosol et, au cours de la morphogénèse virale (6), la capsidie entourée par une membrane phospholipidique décorée de glycoprotéines virale formera un virion immature. Les glycoprotéines virales subiront ensuite une maturation (7) et une glycosylation au cours de leur transfert vers l'espace extracellulaire dans des vésicules d'exocytose.

1995). Le fonctionnement de la 5' UTR a fait l'objet d'études détaillées utilisant la transfection de la séquence de la 5' UTR en amont d'un gène rapporteur (Rijnbrand et al., 1997; Chon et al., 1998). Des portions actives et inhibitrices de la traduction ont été mises en évidence mais la régulation fine de cette 5'UTR n'est pas encore comprise, en partie à cause de divergences entre les résultats des études avec gènes rapporteurs et celles utilisant des clones d'ADNc infectieux (Moser et al., 2000). Une étude récente réalisée sur HCV a montré des mutations dans la 5'UTR

spécifiques du type cellulaire infecté (Lerat et al., 2000). La 5'UTR pourrait donc participer au tropisme viral pour un type cellulaire déterminé, ce qui pourrait expliquer certains aspects de la pathogénie virale. L'utilisation de clones d'ADNc infectieux a mis en évidence l'importance des 32 premiers nucléotides de la zone 5' UTR pour la réplication mais aussi pour la traduction du génome viral (Yu et al., 2000).

La 3' UTR comporte également des structures secondaires complexes (Yu et al., 1999). Elle interviendrait dans la régulation de la traduction et sur-

tout de la réplication du génome viral, par l'intermédiaire de séquences cis-régulatrices.

En résumé, les zones 3' et 5' UTR jouent un rôle majeur dans le cycle viral en régulant finement la traduction et la réplication du génome. Cette importance se traduit évolutivement par une grande conservation de ces séquences parmi les pestivirus et même les flaviviridae. Ces séquences pourraient constituer la cible de mutations dirigées expérimentalement pour créer des virus atténués.

5. PHYLOGÉNIE DU VIRUS DE LA DIARRHÉE VIRALE BOVINE

La comparaison des séquences des zones UTR (Paton, 1995) ainsi que d'autres parties du génome viral (N pro (Becher et al., 1997), E2 (van Rijn et al., 1997)) ont permis d'établir la phylogénie des souches de BVDV. Il apparaît que 2 lignées distinctes de BVDV circulent dans les populations bovines (Ridpath et al., 1994). Il s'agit des génotypes BVDV I et BVDV II qui semblent tous deux répartis dans le monde entier. Par exemple en Belgique, Letellier et collaborateurs (1999) dénombrent 12% de génotype BVDV II. Les souches hypervirulentes épidémiques d'apparition récentes en Amérique du Nord appartiennent au génotype BVDV II mais la plupart des souches de type II trouvées en Europe sont de virulence modérée à faible (Hamers et al., 2000). La figure 3 résume sous forme dichotomique les signes cliniques associés à l'infection par les deux génotypes et met en évidence l'indépendance entre hypervirulence et appartenance au génotype BVDV II.

6. BASES MOLÉCULAIRES DE LA VIRULENCE

Peu d'informations sont disponibles pour expliquer les différences de virulence constatées pour les différentes souches NCP de BVDV. En effet, alors que toutes les souches NCP se multiplient *in vitro* sans effet apparent sur la cellule infectée; *in vivo*, seules les souches NCP hypervirulentes induisent une thrombocytopénie marquée et un état morbide qui peut être létal même chez des bovins adultes (Pellerin et al., 1994). L'identification d'un marqueur d'hypervirulence serait d'un réel intérêt.

Topliff et Kelling (1998) ont analysé la 5' UTR et ont déterminé 2 substitutions de nucléotides spécifiques des souches hypervirulentes. La disponibilité d'un clone d'ADNc infectieux de souche de BVDV hypervirulent faciliterait grandement l'approche expérimentale et permettrait de mieux appréhender les bases moléculaires de la virulence.

7. PERSPECTIVES

Dans les prochaines années, le contrôle de l'infection par le BVDV passera en grande partie par la mise au point de nouveaux vaccins conférant une protection de longue durée contre les souches de génotypes I et II. De plus, ces vaccins devront également prévenir l'infection transplacentaire qui génère des animaux IPI. Diminuer la proportion remarquablement stable des animaux IPI dans les cheptels réduirait en effet considérablement la circulation du BVDV. Des essais de vaccination par ADN plasmidique ont déjà été tentés mais jusqu'ici avec une efficacité limitée (Harpin et al., 1997; Harpin et al., 1999). L'utilisation de vaccins sous-unitaires marqués, permettant la discrimination entre les animaux vaccinés et ceux ayant acquis une immunité contre les souches circulant sur le terrain, a été également envisagée pour le BVDV comme pour le virus de la peste porcine classique (van Rijn et al., 1999; Widjoatmodjo et al., 2000). Ces objectifs ont été rendus possibles par les récents progrès de la biologie moléculaire du BVDV qui ont modifié notre approche de la diarrhée virale bovine et de la maladie des muqueuses. Cette évolution changera également les méthodes de diagnostic qui dans un avenir proche ne reposeront plus uniquement sur des méthodes immunologiques (ELISA, immunohistochimie), mais sur l'amplification des séquences virales par PCR (Radwan et al., 1995; Fulton et al., 1999). Cette technique se caractérise par une sensibilité élevée et autorise donc une détection plus précoce de la circulation virale.

Récemment, un vaccin anti-rhinotrachéine infectieuse bovine contaminé a donné lieu à une dissémination accidentelle d'une souche hypervirulente de BVDV (Falcone et al., 1999). Cet accident a mis en évidence l'absence de moyens de protection universels contre toutes les souches de BVDV ainsi que l'importance de moyens de

lutte concertés pour prévenir la dissémination de nouveaux variants hypervirulents.

SUMMARY :

Molecular biology of bovine viral diarrhea virus: a review

This review highlights new information on molecular biology of bovine viral diarrhea virus and other pestiviruses. The intensive research on this subject has profound effects on our understanding of the pathogenesis of the bovine viral diarrhea and the mucosal disease, leading to the development of new techniques for diagnosis and vaccination.

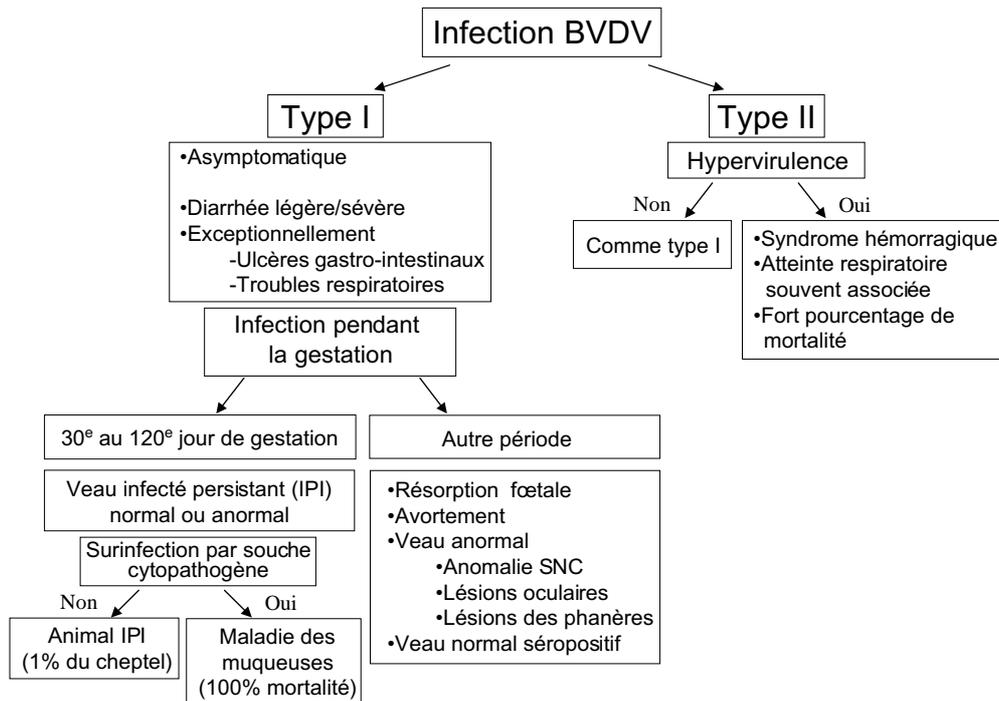


Figure 3 : Présentation dichotomique des tableaux cliniques associés à des souches BVDV de type I et II

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BECHER P., ORLICH M., SHANNON A.D., HORNER G., KONIG M., THIEL H.J. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.*, 1997, 78, 1357-1366.
- BEHRENS S.E., GRASSMANN C.W., THIEL H.J., MEYERS G., TAUTZ N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.*, 1998, 72, 2364-2372.
- BROES A., WELLEMANS G., DHEEDENE J. Syndrome hémorragique chez les bovins infectés par le virus de la diarrhée bovine (BVD/MD). *Ann. Méd.Vét.*, 1992, 137, 33-38.
- BROWNLIE J., CLARKE M.C., HOWARD C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.*, 1984, 114, 535-536.
- CHASTANT S., MAILLARD R. BVD et troubles de la reproduction. *Point Vét.*, 1999, 30, 59-66.
- CHON S.K., PEREZ D.R., DONIS R.O. Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 1998, 251, 370-382.
- COLLETT M.S. Molecular genetics of pestiviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1992, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 145-154.
- CORAPI W.V., FRENCH T.W., DUBOVI E.J. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.*, 1989, 63, 3934-3943.
- DE MOERLOOZE L., DESPORT M., RENARD A., LECOMTE C., BROWNLIE J., MARTIAL J.A. The coding region for the 54-kDa protein of several pestiviruses lacks host insertions but reveals a "zinc finger-like" domain. *Virology*, 1990, 177, 812-815.
- DENG R., BROCK K.V. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 1949-1957.
- DONIS R.O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 1995, 11, 393-423.
- DONIS R.O. et DUBOVI E.J. Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells. *J. Gen. Virol.*, 1987, 68, 1597-1605.
- ELBERS K., TAUTZ N., BECHER P., STOLL D., RUMENAPF T., THIEL H.J. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.*, 1996, 70, 4131-4135.
- FALCONE E., TOLLIS M., CONTI G. Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine*, 1999, 18, 387-388.
- FULTON R.W., D'OFFAY J.M., SALIKI J.T., BURGE L.J., HELMAN R.G., CONFER A.W., BOLIN S.R., RIDPATH J.F. Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for typing ruminant pestiviruses: bovine viral diarrhoea viruses and border disease virus. *Can. J. Vet. Res.*, 1999, 63, 276-281.
- GRASSMANN C.W., ISKEN O., BEHRENS S.E. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J. Virol.*, 1999, 73, 9196-9205.
- HAMERS C., COUVREUR B., DEHAN P., LETELLIER C., LEWALLE P., PASTORET P.P., KERKHOF P. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea virus strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet. J.*, 2000, 160, 250-258.
- HARPIN S., HURLEY D.J., MBIKAY M., TALBOT B., ELAZHARY Y. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. *J. Gen. Virol.*, 1999, 80, 3137-3144.
- HARPIN S., TALBOT B., MBIKAY M., ELAZHARY Y. Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein gp53 (E2). *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, 146, 229-234.

- HOFF H.S., DONIS R.O. Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection. *Virus Res.*, 1997, 49, 101-113.
- HOUH H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.*, 1999, 64, 89-107.
- HULST M.M., HIMES G., NEWBIGIN E., MOORMANN R.J. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, 1994, 200, 558-565.
- JARVIS T.C., KIRKEGAARD K. Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J.*, 1992, 11, 3135-3145.
- LAI V.C., ZHONG W., SKELTON A., INGRAVALLO P., VASILEV V., DONIS R.O., HONG Z., LAU J.Y. Generation and characterization of a hepatitis C virus NS3 protease-dependent bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.*, 2000, 74, 6339-6347.
- LAMBOT M., HANON E., LECOMTE C., HAMERS C., LETESSON J.J., PASTORET P.P. Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J. Gen. Virol.*, 1998, 79, 1745-1749.
- LECOMTE C., NAVETAT H., HAMERS C., LAMBOT M., SCHELCHER F., CABANIE P., PASTORET P.P. Isolement de souches non-cytopathogènes du virus BVD/MD de cas de syndrome hémorragiques thrombocytopeniques chez des bovins de race charolaise. *EMBO J.*, 1996, 140, 435-438.
- LERAT H., SHIMIZU Y.K., LEMON S.M. Cell type-specific enhancement of hepatitis C virus internal ribosome entry site-directed translation due to 5' nontranslated region substitutions selected during passage of virus in lymphoblastoid cells. *J. Virol.*, 2000, 74, 7024-7031.
- LETELLIER C., KERKHOF P., WELLEMANS G., VANOPDENBOSCH E. Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet. Microbiol.*, 1999, 64, 155-167.
- LIEBLER E.M., WASCHBUSCH J., POHLENZ J.F., MOENIG V., LIESS B. Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease. *Arch. Virol. Suppl.*, 1991, 3:109-24, 109-124.
- LIESS B., FREY H.R., KITTSTEINER H., BAUMANN F., NEUMANN W. Bovine mucosal disease, an immunobiologically explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a "slow virus infection". *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, 1974, 81, 481-487.
- LINDBERG A.L., ALENIUS S. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.*, 1999, 64, 197-222.
- MENDEZ E., RUGGLI N., COLLETT M.S., RICE C.M. Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.*, 1998, 72, 4737-4745.
- MEYERS G., RUMENAPF T., TAUTZ N., DUBOVI E.J., THIEL H.J. Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhoea virus. *Arch. Virol. Suppl.*, 1991, 3:133-42, 133-142.
- MEYERS G., TAUTZ N., STARK R., BROWNLIE J., DUBOVI E.J., COLLETT M.S., THIEL H.J. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*, 1992, 191, 368-386.
- MEYERS G., THIEL H.J. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.*, 1996, 47, 53-118.
- MOENNIG V., PLAGEMANN P.G. The pestiviruses. *Adv. Virus Res.*, 1992, 41, 53-98.
- MOSER C., BOSSHART A., TRATSCHIN J.D., HOFMANN M.A. A recombinant classical swine fever virus with a marker insertion in the internal ribosome entry site. *Proc. 5th int. Congress Vet. Virol.*, 27-30 August 2000, Brescia, 424-425.
- OLAFSON P., MC CALLUM A.D., FOX F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, 1946, 36, 205-213.
- PATON D.J. Pestivirus diversity. *J. Comp. Pathol.*, 1995, 112, 215-236.
- PELLERIN C., VAN DEN HURK J.V., LECOMTE J., TIJSSEN P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 1994, 203, 260-268.
- POOLE T.L., WANG C., POPP R.A., POTGIETER L.N., SIDDIQUI A., COLLETT M.S. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology*, 1995, 206, 750-754.
- QI F., RIDPATH J.F., LEWIS T., BOLIN S.R., BERRY E.S. Analysis of the bovine viral diarrhoea virus genome for possible cellular insertions. *Virology*, 1992, 189, 285-292.
- RADWAN G.S., BROCK K.V., HOGAN J.S., SMITH K.L. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, 1995, 44, 77-91.
- REED K.E., GORBALENYA A.E., RICE C.M. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.*, 1998, 72, 6199-6206.
- RENARD A., GUIOT C., SCHMETZ D., DAGENAIS L., PASTORET P.P., DINA D., MARTIAL J.A. Molecular cloning of bovine viral diarrhoea virus sequences. *DNA*, 1985, 4, 429-438.
- RICE C. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Field B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields virology*. Lippincott-Raven: Philadelphia, 1996, 931-959.
- RIDPATH J.F., BOLIN S.R., DUBOVI E.J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 1994, 205, 66-74.
- RIJNBRAND R., VAN DER S.T., VAN RIJN P.A., SPAAN W.J., BREDENBEEK P.J. Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J. Virol.*, 1997, 71, 451-457.
- RUMENAPF T., UNGER G., STRAUSS J.H., THIEL H.J. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.*, 1993, 67, 3288-3294.
- SCHNEIDER R., UNGER G., STARK R., SCHNEIDER-SCHERZER E., THIEL H.J. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science*, 1993, 261, 1169-1171.
- SCHWEIZER M., PETERHANS E. Oxidative stress in cells infected with bovine viral diarrhoea virus: a crucial step in the induction of apoptosis. *J. Gen. Virol.*, 1999, 80, 1147-1155.

- SHATKIN A.J. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*, 1976, 9, 645-653.
- STARK R., MEYERS G., RUMENAPF T., THIEL H.J. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.*, 1993, 67, 7088-7095.
- TAMURA J.K., WARRENER P., COLLETT M.S. RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 1993, 193, 1-10.
- TAUTZ N., KAISER A., THIEL H.J. NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology*, 2000, 273, 351-363.
- TEICHMANN U., LIEBLER-TENORIO E.M., POHLENZ J.F. Ultrastructural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal diseases in calves. *Am. J. Vet. Res.*, 2000, 61, 174-182.
- THIEL H.J., STARK R., WEILAND E., RUMENAPF T., MEYERS G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.*, 1991, 65, 4705-4712.
- TOPLIFF C.L., KELLING C.L. Virulence markers in the 5' untranslated region of genotype 2 bovine viral diarrhoea virus isolates. *Virology*, 1998, 250, 164-172.
- TRATSCHIN J.D., MOSER C., RUGGLI N., HOFMANN M.A. Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture. *J. Virol.*, 1998, 72, 7681-7684.
- VAN OLPHEN A. et DONIS R.O. Identification of bovine viral diarrhoea virus nonstructural polypeptide NS4B/P38. *Virus Res.*, 1997, 51, 197-201.
- VAN RIJN P.A., MIEDEMA G.K., WENSVOORT G., VAN GENNIP H.G., MOORMANN R.J. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J. Virol.*, 1994, 68, 3934-3942.
- VAN RIJN P.A., VAN GENNIP H.G., MOORMANN R.J. An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test both based on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine*, 1999, 17, 433-440.
- VAN RIJN P., VAN GENNIP H., LEENDERTSE C.H., BRUSCHKE C.J., PATON D.J., MOORMANN R.J., VAN O.J. Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology*, 1997, 237, 337-348.
- WARRENER P., COLLETT M.S. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.*, 1995, 69, 1720-1726.
- WEILAND E., STARK R., HAAS B., RUMENAPF T., MEYERS G., THIEL H.J. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.*, 1990, 64, 3563-3569.
- WIDJOJOATMODJO M.N., VAN GENNIP H.G., BOUMA A., VAN RIJN P.A., MOORMANN R.J. Classical swine fever virus E(rns) deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. *J. Virol.*, 2000, 74, 2973-2980.
- WISKERCHEN M., COLLETT M.S. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology*, 1991, 184, 341-350.
- XU J., MENDEZ E., CARON P.R., LIN C., MURCKO M.A., COLLETT M.S., RICE C.M. Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.*, 1997, 71, 5312-5322.
- XUE W., MINOCHA H.C. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.*, 1993, 74, 73-79.
- YU H., GRASSMANN C.W., BEHRENS S.E. Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J. Virol.*, 1999, 73, 3638-3648.
- YU H., ISKEN O., GRASSMANN C.W., BEHRENS S.E. A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J. Virol.*, 2000, 74, 5825-5835.
- ZHONG W., GUTSHALL L.L., DEL V.A. Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.*, 1998, 72, 9365-9369.
- ZITZMANN N., MEHTA A.S., CARROUEE S., BUTTERS T.D., PLATT F.M., MCCAULEY J., BLUMBERG B.S., DWEK R.A., BLOCK T.M. Imino sugars inhibit the formation and secretion of bovine viral diarrhoea virus, a pestivirus model of hepatitis C virus: implications for the development of broad spectrum anti-hepatitis virus agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96, 11878-11882.