

## EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA FIEVRE APHTEUSE\*

E. Thiry<sup>1</sup>, E. Baranowski<sup>2</sup> et E. Domingo<sup>2</sup>

**RESUME :** Les méthodes d'épidémiologie moléculaire permettent de comparer les isolats de virus de la fièvre aphteuse en se basant essentiellement sur une partie du gène codant pour la protéine de capsid VP1. Des isolats dont les différences entre séquences nucléotidiques sont inférieures à 15% sont considérés comme appartenant au même génotype. Cette méthode d'analyse a été utilisée dans de nombreux cas. L'exemple des épizooties en Afrique du Nord (1987-1994) est détaillé. L'utilisation conjointe des épidémiologies moléculaire et descriptive est nécessaire pour établir l'évolution temporelle et géographique du virus aphteux. Les données moléculaires disponibles pour l'épizootie européenne de 2001 sont également présentées.

**SUMMARY :** Molecular epidemiology provides a methodology allowing to compare foot-and-mouth disease virus isolates based on the analysis of a nucleotide sequence located in the gene encoding VP1 capsid protein. When the nucleotide difference between viral isolates is less than 15%, viruses are considered belonging to the same genotype. This method of analysis was used in several studies. The example of foot-and-mouth epizootics in North Africa (1987-1994) is detailed. The combined use of molecular and descriptive epidemiology is required to determine the temporal and geographical evolution of foot-and-mouth disease virus. Molecular data available for the 2001 European epizootic are also presented.



### I - INTRODUCTION

L'épidémiologie moléculaire des maladies virales est basée sur l'utilisation de méthodes qui explorent les macromolécules virales, principalement les acides nucléiques, pour la comparaison d'isolats appartenant à une même espèce virale. Le degré de variabilité de l'espèce virale et de la région génomique analysée est dès lors un paramètre important de l'analyse phylogénétique. L'analyse des régions hautement variables facilite l'identification de différences entre isolats et permet un suivi sensible de l'infection virale dans le temps et dans l'espace. La difficulté résiderait cependant dans un niveau trop élevé de variation, qui rendrait impossible toute analyse épidémiologique.

La fièvre aphteuse est une maladie du bétail dont les conséquences économiques sont particulièrement

graves. La maladie est enzootique dans de nombreuses régions du monde et a récemment fait sa réapparition en Europe [Knowles *et al.*, 2001 ; Sobrino et Domingo, 2001]. L'agent responsable de la fièvre aphteuse est un picornavirus dont le génome est composé d'ARN. Ce virus possède un taux de mutations très élevé qui se manifeste par une grande capacité de variation et une importante hétérogénéité génétique [Domingo *et al.*, 1980 ; 1990]. L'évolution génétique du virus de la fièvre aphteuse est rapide, en particulier au niveau du gène codant pour la protéine de capsid VP1, mais le taux de mutations est toutefois compatible avec l'identification d'un profil type d'isolats à l'intérieur d'une épizootie ainsi que les suivis géographique et temporel du virus.

\* Texte de l'exposé présenté lors de la Journée AEEMA, 17 mai 2001

<sup>1</sup> Virologie-épidémiologie, département des maladies infectieuses et parasitaires, faculté de médecine vétérinaire, université de Liège, boulevard de Colonster, 20, B43b, B-4000 Liège, Belgique

<sup>2</sup> Centro de Biología Molecular « Severo Ochoa » (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Espagne

## II - LE VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE

Le virus de la fièvre aphteuse appartient à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Aphthovirus* [Rueckert, 1996]. La particule virale de symétrie icosaédrique est formée par l'assemblage de 60 copies des quatre protéines de capsid (VP1, VP2, VP3 et VP4) autour d'une molécule d'ARN de polarité positive [Acharya *et al.*, 1989]. La taille du génome viral est d'environ 8500 nucléotides et se compose d'une région codante flanquée de deux régions régulatrices. La traduction de la région codante donne naissance à un précurseur polypeptidique qui est rapidement clivé par différentes protéases virales en 4 protéines de structure et plusieurs

protéines non structurales, dont l'ARN-polymérase, impliquées dans la réplication du génome aphteux [Belsham, 1993]. La surface de la capsid est marquée par la présence d'une protubérance mobile formée par la boucle G-H de la protéine VP1 [Acharya *et al.*, 1989 ; Lea *et al.*, 1994]. Cette boucle G-H joue un rôle particulièrement important dans la biologie du virus aphteux. Elle est la cible de nombreux anticorps neutralisants [Hewat *et al.*, 1997 ; Verdaguer *et al.*, 1995] et est également impliquée dans l'interaction du virus avec son récepteur cellulaire [Berinstein *et al.*, 1995 ; Jackson *et al.*, 1997 ; Neff *et al.*, 1998].

## III - HETEROGENEITE ET VARIABILITE GENETIQUE DU VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE

L'hétérogénéité génétique du virus de la fièvre aphteuse a été largement documentée [Domingo *et al.*, 1990 ; Sobrino *et al.*, 2001]. Plusieurs travaux rapportent des différences de séquence entre clones individuels isolés de plusieurs lésions chez un même animal [Domingo *et al.*, 1980 ; King *et al.*, 1981, Rowlands *et al.*, 1983 ; Taboga *et al.*, 1997]. Cette hétérogénéité trouve son origine dans l'absence d'activité correctrice associée à la réplication des ARN viraux. Le taux de mutations durant la réplication des génomes à ARN est en moyenne de  $10^{-4}$  substitutions par nucléotide copié, un taux d'erreur supérieur de plusieurs milliers de fois à celui rencontré au cours de la réplication de l'ADN cellulaire. En d'autres termes, lors de la réplication du génome aphteux, chaque molécule copiée sera en moyenne affectée par l'introduction d'une mutation. Chaque cycle de multiplication contribue donc au maintien d'une distribution complexe de génomes viraux étroitement liés mais non identiques, appelée quasi-espèces virales [Domingo *et al.*, 1999 ; 2000b]. Bien que cette collection de génomes mutants soit souvent représentée par une séquence consensus ou génome moyen, les propriétés biologiques du virus aphteux sont définies par l'ensemble des différents virus mutants qui peuplent la quasi-espèce. Ce spectre de mutants représente une réserve importante de variants phénotypiques qui peuvent être mobilisés suite à l'apparition de facteurs de sélection comme par exemple la présence d'anticorps neutralisants ou d'antiviraux qui sélectionnent rapidement des variants antigéniques ou des mutants de résistance [Domingo, 1999 ; Baranowski *et al.*, 1999 ; Domingo *et al.*,

2000a]. L'hétérogénéité des populations virales à ARN est responsable de leur extraordinaire capacité d'adaptation. Le modèle de quasi-espèces est une caractéristique commune à tous les virus à ARN étudiés à ce jour [Domingo *et al.*, 2000b].

Bien que le taux d'erreur de l'ARN-polymérase du virus aphteux soit peu influencé par la région génétique copiée, la fixation de mutations au niveau du génome aphteux n'est pas homogène. Il existe par exemple une différence significative du taux de fixation de mutations entre les gènes VP1 et 3D (gène codant pour l'ARN-polymérase). Cette différence répond à l'accumulation de mutations dans un spectre déterminé par les conditions du milieu de multiplication du virus. La fixation des mutations répond à la fois d'événements aléatoires et de mécanismes de sélection. L'événement aléatoire peut être l'infection d'un animal par un ou quelques virus et la reconstitution d'une quasi-espèce chez cet animal. La sélection positive sera particulièrement évidente dans une population immunisée où des modifications antigéniques donnent un avantage sélectif à un virus. Enfin, la sélection négative éliminera les génomes mutants porteurs de mutations délétères.

Un taux important de mutations des gènes codant pour les protéines de structure a été rapporté durant des épizooties de fièvre aphteuse [Martinez *et al.*, 1988 ; Sobrino *et al.*, 1986]. Ce taux de mutations peut atteindre des valeurs aussi élevées que  $7 \times 10^{-2}$  substitutions par site et par an, lors d'infections persistantes chez le bovin [Gebauer *et al.*, 1988].

## IV - VARIABILITE ANTIGENIQUE DU VIRUS DE LA FIEVRE APHTEUSE

Le virus aphteux possède une grande capacité de variation et d'adaptation qui se manifeste par l'existence de sept sérotypes différents (O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 et Asia 1) et d'un nombre important de sous-types et de variants antigéniques [Domingo *et al.*, 1990]. L'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisants a permis de calculer le nombre de variants antigéniques présents au sein d'une même population. En culture de cellules, la fréquence d'isolement de ces mutants d'échappement varie entre  $4 \times 10^{-5}$  et  $8 \times 10^{-3}$  [Martinez *et al.*, 1988 ; 1997].

Les anticorps neutralisants jouent un rôle déterminant dans la protection contre la fièvre aphteuse. Des études génétiques, immunochimiques et structurales ont permis de caractériser la structure antigénique du virus aphteux et de comprendre les mécanismes d'échappement du virus à la neutralisation [Mateu, 1995]. Le virus contient trois sites antigéniques importants. Le site antigénique majeur, appelé site A chez le sérotype C, est composé de plusieurs épitopes linéaires situés sur la boucle G-H de la protéine VP1 qui est largement exposée à la surface de la capsid. Chez le porc, 30 à 50 % de la réponse neutralisante est dirigée contre ce site [Mateu *et al.*, 1995]. Deux autres sites importants ont été identifiés. Le site C est situé sur la région carboxy-terminale de la protéine VP1. Le site D est discontinu et formé par plusieurs résidus des protéines VP1, VP2 et VP3.

La variation antigénique constitue un obstacle majeur pour le contrôle de la fièvre aphteuse [Sobrino *et al.*, 2001]. Elle peut être responsable de la mauvaise performance de la vaccination, si le vaccin contient un virus trop éloigné du variant prévalent au cours de l'épizootie [Thiry, 2001 ; Thiry et Baazizi, 1999]. Des analyses génétiques et immunologiques ont révélé l'importante diversité antigénique du virus aphteux. Des différences antigéniques ont été rapportées chez plusieurs isolats contemporains de même origine géographique, voire même chez différents clones dérivés du même isolat. A l'heure actuelle, la définition de sous-types est supplantée par l'analyse génétique qui se base sur la séquence de la partie de VP1 correspondant à la boucle G-H.

L'analyse de la variation antigénique de la boucle G-H de la protéine VP1 a montré que le virus aphteux évolue, à l'instar du virus influenza, selon deux modes. La dérive antigénique résulte de l'accumulation progressive de changements en d'acides aminés des régions les plus variables. La cassure antigénique est provoquée par des mutations ponctuelles qui affectent plusieurs épitopes [Mateu *et al.*, 1990]. Ces cassures sont donc uniquement expliquées par des mutations, contrairement à ce qui est décrit pour les virus influenza. Les autres événements qui peuvent altérer la séquence génomique, insertions, délétions et recombinaisons, sont rares et ne contribuent que de façon mineure à son évolution génétique.

## V - METHODES D'ETUDE DE LA VARIABILITE

L'analyse moléculaire des virus isolés de foyers de fièvre aphteuse nécessite la réalisation d'une cascade de méthodes : isolement viral, propagation du virus en culture de cellules, extraction de l'ARN viral, amplification génique après rétro-transcription, séquençage du produit d'amplification et analyse de la séquence nucléotidique obtenue avec d'autres séquences après alignement par des programmes informatiques.

L'isolement et la propagation du virus en culture de cellules implique plusieurs cycles de multiplication dans un environnement différent de celui rencontré par le virus *in vivo*. Dès lors, l'adaptation du virus à ce nouvel environnement peut se traduire par une modification de sa séquence consensus. Des altérations génétiques et phénotypiques importantes ont été observées suite à la propagation du virus aphteux en culture de cellules. Ces altérations ont été associées à des modifications de l'interaction virus-récepteur [Baranowski *et al.*, 2000 ; 2001 ; Sa-Carvalho *et al.*, 1997]. La localisation de certaines de ces mutations sur

plusieurs sites antigéniques du virus aphteux indique que des altérations antigéniques peuvent être sélectionnées en culture de cellules, même en absence de pression immune [Bolwell *et al.*, 1989 ; Díez *et al.*, 1989 ; Domingo *et al.*, 1993]. La propagation du virus en culture de cellules est donc critiquable, même s'il semble souvent difficile de procéder autrement.

Pour des raisons pratiques, une séquence de petite taille est analysée. La protéine VP1, et en particulier la partie C-terminale de la protéine, présente une variabilité compatible avec l'obtention de données épidémiologiques fiables. Elle code pour un site antigénique majeur et les données moléculaires sont en partie parallèles aux résultats obtenus par les tests immunologiques, utilisant des anticorps monoclonaux pour différencier les types de virus aphteux. La détermination fine de l'isolat fait intervenir le séquençage de cette région, après rétro-transcription et amplification génique.

Il faut s'assurer que cette très petite séquence soit représentative des isolats. Pour le prouver, il est nécessaire de construire des arbres phylogénétiques pour différentes séquences basées à plusieurs endroits du génome et d'explorer si les arbres obtenus sont similaires quelle que soit la séquence analysée.

Une fois que la séquence dans VP1 est déterminée, on l'utilise pour caractériser un isolat. L'épidémiologie moléculaire va classer les isolats en fonction du pourcentage de différence en nucléotides. Selon

plusieurs auteurs [cités par Samuel et Knowles, 2001], un niveau de 15 % est un seuil valable pour objectiver des différences entre séquences nucléotidiques chez les picornavirus. Aussi, au-dessus de ce seuil, les isolats de virus aphteux sont distingués en géotypes. Il faut cependant considérer que cette analyse est relative et ne vaut que dans le cadre de la comparaison entre isolats. En fonction du taux de mutations, le virus va évoluer au sein d'une épizootie et aussi d'un point à l'autre quand l'épizootie s'étend géographiquement.

## VI - UN MARQUEUR GENETIQUE N'EST PAS UN MARQUEUR GEOGRAPHIQUE

Les isolats de virus aphteux sont caractérisés par la séquence nucléotidique d'une partie du gène codant pour VP1. Ces isolats sont donc comparés en fonction du pourcentage de différences en nucléotides dans cette partie restreinte du génome. L'analyse porte sur des virus discrets : deux virus comparés ont été isolés à une distance correspondant au nombre de générations durant l'intervalle de temps qui a couru entre les deux isolements. Au cours de cette période, d'autres événements génétiques peuvent survenir comme la recombinaison ou la perte de quasi-espèces dues à des phénomènes de « goulot de bouteille ». Ce dernier phénomène est illustré de la façon suivante. On pourrait s'attendre à ce que, dans la nature, l'infection d'un nouvel animal par un nombre très limité de virus puisse engendrer une nouvelle quasi-espèce. Par exemple, l'importation d'un virus exotique dans un pays pourrait s'accompagner de l'expansion d'une nouvelle quasi-espèce, avec un génome moyen différent du génome moyen du virus à l'origine de l'infection, mais présent dans un autre pays.

De plus, les mutations létales ne sont pas non plus prises en considération, puisque les virus ont rapidement disparu. L'analyse ignore par approximation ces modifications importantes de la séquence virale. Elle prend en compte le pourcentage de mutations fixées dans la partie du génome étudiée. Les substitutions identifiées résulteront donc à la fois de mutations fixées dues à une sélection positive et de mutations synonymes, soit qui ne modifient pas la séquence peptidique, soit qui substituent un acide aminé par un autre de même contribution pour la structure de la protéine.

En acceptant ces approximations, il est possible d'établir une relation directe entre le pourcentage de différences de substitutions nucléotidiques et l'intervalle de temps entre les deux isolats. Le taux de substitutions nucléotidiques est une valeur semblable à

une vitesse. Il est fréquemment exprimé par année. Cette déduction est valable pour connaître la distance entre deux isolats discrets.

La relation géographique entre deux isolats est connue de manière beaucoup plus spéculative que les relations génétiques et temporelles. La séquence génomique n'est pas informative pour les caractères spatiaux. Il faut donc savoir que l'analyse spatiale se base sur une déduction qui porte sur les relations génétiques entre deux virus et leur distance temporelle. Cette constatation ne doit pas remettre en cause des informations sur les relations géographiques entre deux isolats basées sur des données génétiques évidentes. Elle suggère cependant une grande prudence dans les autres cas. Le fait que l'analyse soit rétrospective et se base sur des données épidémiologiques complémentaires est aussi de nature à renforcer la valeur de la déduction.

Même l'introduction récente par Samuel et Knowles [2001] de la notion de « toptype » de virus aphteux ne modifie pas cette analyse. Les deux auteurs ont réalisé une étude moléculaire très approfondie de la variabilité du sérotype O. Sur base de l'analyse de séquences et de l'utilisation du seuil de 15 % en différences nucléotidiques, huit lignées génétiques ont été obtenues et désignées toptypes, car elles sont principalement présentes dans des régions géographiques distinctes. Ces toptypes restent très constants au cours du temps et semblent être des culs-de-sac du point de vue évolutif. Comme des virus appartenant à plusieurs toptypes peuvent être présents dans une région particulière, la définition de toptype doit donc être prise avec précaution : elle rend d'abord compte d'une grande parenté génétique entre isolats, mais n'exclut pas que des virus de même toptype puissent circuler dans plusieurs régions, après leur introduction par des animaux ou des matières contaminées.

## VII - MARQUEURS STABLES CHEZ UN VIRUS INSTABLE

La disponibilité d'un nombre important de séquences d'ARN de la protéine VP1 a permis la construction d'arbres phylogénétiques qui relient de nombreux isolats des 7 sérotypes [Dopazo *et al.*, 1988 ; 1994]. Une première diversification fut à l'origine de l'apparition des trois sérotypes sud-africains (SAT1, SAT2 et SAT3) d'une part, et d'une lignée précurseur des sérotypes eurasiatiques actuels (A, O, C et Asia 1) d'autre part. La diversification qui a donné naissance aux sérotypes A, O, C et Asia 1 est plus récente. Les sept sérotypes sont fixés et il n'y a aucun indice actuel pour prédire l'émergence d'un nouveau type. Au contraire, les données rétrospectives sur une durée de soixante ans démontrent une stabilité des propriétés antigéniques à l'intérieur d'un sérotype, en l'occurrence le sérotype C, malgré une évolution génétique constante [Martínez *et al.*, 1992].

Pratiquement tous les isolats peuvent être assignés à l'un de ces sérotypes.

La stabilité des marqueurs antigéniques peut paraître paradoxale chez un virus dont le taux de mutations est particulièrement élevé. Elle trouve son explication dans les contraintes imposées par le respect de la conformation des protéines de capsid. Des contraintes physiques empêchent des mutations non synonymes de se fixer dans le génome viral. Elles siègent au niveau des domaines importants des protéines de capsid, en particulier VP1 : la conformation de la protéine ne peut pas être altérée, surtout au niveau du site de reconnaissance avec le récepteur cellulaire. Dans ces parties du génome, les mutations synonymes peuvent cependant s'accumuler et être utiles pour la caractérisation d'isolats.

## VIII - EXEMPLE : LES EPIZOOTIES EN AFRIQUE DU NORD (1987-1994)

L'épidémiologie moléculaire de la fièvre aphteuse est explicitée sous la forme d'un exemple. Les virus isolés d'épizooties en Afrique du Nord ont été comparés entre eux et avec des virus provenant de foyers soupçonnés d'être à l'origine de ces épizooties.

Les séquences nucléotidiques (171 nucléotides) correspondant à la partie 3' de la région génomique 1D codant pour la protéine VP1 ont été obtenues après isolement des virus en cellules primaires de thyroïde bovine et leur adaptation en cellules IB-RS-2. Trente virus isolés entre 1987 et 1994 ont été analysés de cette manière et leurs séquences ont été comparées à 9 isolats asiatiques et 5 souches vaccinales. Les séquences entre les nucléotides 469 et 639 ont été analysées par la méthode UPGMA (unweighted pair group mean average). Cette méthode construit un arbre phylogénétique par groupage successif en utilisant une méthode moyenne de liaison [Samuel *et al.*, 1999]. Les résultats sont interprétés en terme de pourcentages de différences en nucléotides. Les souches qui présentent une différence inférieure à 15 % sont considérées appartenir au même génotype. Lorsque la divergence est inférieure à 5 %, elles sont déclarées étroitement apparentées. Une analyse complémentaire (« bootstrap resampling ») fut utilisée pour construire un arbre par la méthode « neighbor-joining ». La fourche séparant deux branches, l'une pour les isolats du Proche-Orient, l'autre pour les isolats d'Afrique du Nord, survient à une fréquence de 97,8 % (figure 1).

Les virus isolés avant l'épizootie, jusqu'en 1988, sont assez distants du groupe qui a provoqué l'épizootie de 1989-1992 comprenant des souches du Proche-Orient (O/ISR/2/85, O/SYR/1/87) et d'Afrique du Nord

(O/LIB/6/88, O/EGY/4/87). D'un point de vue chronologique, le génotype prévalent dans l'épizootie fut d'abord identifié au Proche-Orient, en Israël et au Liban (O/ISR/1/88, O/LEB/A/88) en 1988. Le premier isolat de ce type en Afrique du Nord provient de Libye en 1989 (O/LIB/10/89). Ensuite, des virus appartenant au même génotype furent isolés en Tunisie, Algérie et Maroc. Cette analyse ne permet pas de déterminer si l'épizootie s'est étendue directement de la Libye vers la Tunisie ou s'il y a eu réintroduction du virus en provenance du Proche-Orient. L'extension géographique de l'épizootie suit son évolution temporelle, de la Tunisie vers l'Algérie puis le Maroc. L'analyse génétique corrobore le fait qu'il s'agisse de la même épizootie puisque les virus isolés dans ces trois pays sont étroitement apparentés. Aussi, la dispersion apparente du virus de l'est vers l'ouest peut être déduite de la parenté génétique étroite entre les isolats, de la chronologie des isollements de ces virus et des informations épidémiologiques provenant du terrain.

Après l'épisode qui a sévi entre 1988 et 1992, de nouveaux foyers de fièvre aphteuse ont été recensés au Proche-Orient et en Afrique du Nord. L'analyse génétique des souches a révélé que ces foyers ne trouvaient pas leur origine dans l'épisode de 1988-1992, car les isolats (O/EGY/1/93, O/LIB/3/94, O/TUN/100/94) étaient plus apparentés aux virus isolés auparavant au Proche-Orient.

Les virus isolés ont également été comparés à des séquences de virus vaccinaux, notamment : O1/Lausanne/65, O1/Manisa/69 et O1/Sharquia/72. La variation par rapport à ces souches virales est

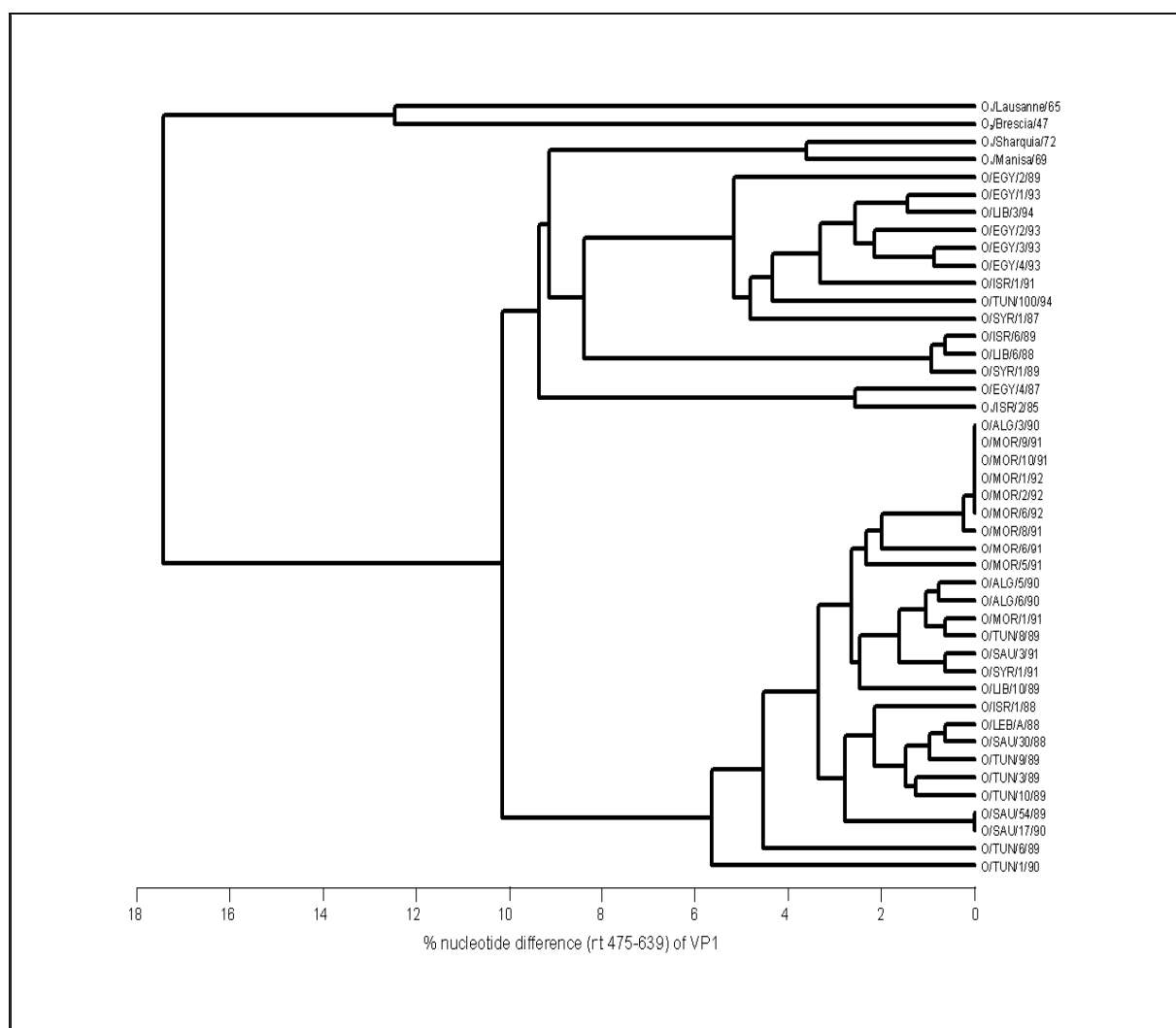
importante, avec des pourcentages de différence nucléotidique s'étendant de 10 à plus de 16 %. Ces résultats suggèrent fortement que ces souches vaccinales ne sont pas adéquates pour la protection du cheptel dans ces épizooties. Ils doivent être confirmés par des études immunologiques : des tests de séroneutralisation croisée doivent vérifier que ces souches sont éloignées d'un point de vue antigénique.

Le test final consiste en des expériences de protection d'animaux inoculés.

Cet exemple a été choisi car il montre qu'une seule population virale peut être à l'origine d'une épizootie de fièvre aphteuse. Ce n'est cependant pas toujours le cas. L'épidémiologie moléculaire peut aussi révéler que plusieurs lignées de virus circulent conjointement dans une même région géographique [Samuel *et al.*, 1997].

FIGURE 1

**Arbre phylogénétique sans racine montrant les parentés génétiques des virus de la fièvre aphteuse de type O isolés en Afrique du Nord comparés aux isolats provenant du Proche-Orient et à des souches de référence**  
[Samuel *et al.*, 1999, reproduit avec la permission d'*Epidemiology and Infection*].



## IX - L'ÉPIZOOTIE EUROPÉENNE DE 2001

Les données relatives à la dernière épizootie européenne commencent à être disponibles. La source de l'infection fait l'objet d'investigations, mais il est probable qu'il sera extrêmement difficile de la connaître avec certitude. Cependant, des études d'épidémiologie moléculaire basées sur la comparaison de séquences au niveau du gène VP1 ont permis de suivre l'évolution du virus PanAsia qui est à l'origine de l'épizootie de fièvre aphteuse en Europe [Knowles *et al.*, 2001, Samuel et Knowles, 2001].

L'épizootie a débuté en Grande-Bretagne par l'entrée accidentelle du virus PanAsia qui circule principalement en Asie et au Proche-Orient. Cette souche appartient au sérotype O et a été détectée pour la première fois en Inde, en 1990. Elle s'est ensuite

rapidement propagée à l'Est, au Népal, en Chine, à Taiwan, en Corée, au Japon, en Russie et en Mongolie, et à l'Ouest, en Arabie Saoudite et au Proche-Orient. De Turquie, le virus a rejoint la Grèce et la Bulgarie. Il parvint finalement en Europe occidentale où il fut introduit au début de l'année 2001. Il est remarquable de constater qu'une seule souche, le virus PanAsia, a maintenant largement remplacé toutes les autres souches circulant au Proche-Orient et à Taiwan [Knowles *et al.*, 2001]. L'analyse de la séquence de la VP1 du virus isolé en Grande-Bretagne confirme sa proche parenté avec des isolats provenant de différents pays, tous appartenant au génotype PanAsia, y compris un virus provenant d'Afrique du Sud.

## X - CONCLUSIONS

Les données moléculaires sont des éléments importants pour la compréhension de l'épidémiologie de la fièvre aphteuse. Cependant, elles n'en constituent qu'une partie. Les éléments d'épidémiologie descriptive sont indispensables pour une interprétation correcte des

résultats moléculaires. Ensemble, ces données permettent de dresser un état précis des épizooties de fièvre aphteuse et de poser des hypothèses raisonnables sur leur source et leur évolution dans le temps et dans l'espace.

## XI - BIBLIOGRAPHIE

1. Acharya R., Fry E., Stuart D., Fox G., Rowlands D., Brown F. - The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 1989, **337**, 709-716.
2. Baranowski E., Ruiz-Jarabo C. M., Domingo E. - Evolution of cell recognition by viruses. *Science*, 2001, **292**, 1102-1105.
3. Baranowski E., Ruiz-Jarabo C. M., Escarmis C., Domingo E. - Variabilité et évolution des populations virales : bilan et implications. *Méd. Trop.*, 1999, **59**, 430-434.
4. Baranowski E., Ruiz-Jarabo C. M., Sevilla N., Andreu D., Beck E., Domingo E. - Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J. Virol.*, 2000, **74**, 1641-1647.
5. Belsham G. J. - Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1993, **60**, 241-260.
6. Berinstein A., Roivainen M., Hovi T., Mason P. W., Baxt B. - Antibodies to the vitronectin receptor (integrin  $\alpha_v \beta_3$ ) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.*, 1995, **69**, 2664-2666.
7. Bolwell C., Brown A. L., Barnett P. V., Campbell R. O., Clarke B. E., Parry N. R., Ouldrige E. J., Brown F., Rowlands D. J. - Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 1989, **70**, 45-57.
8. Díez J., Mateu M. G., Domingo E. - Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *J. Gen. Virol.*, 1989, **70**, 3281-3289.
9. Domingo E. - Vers une compréhension des virus comme systèmes complexes et dynamiques. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 225-235.
10. Domingo E., Baranowski E., Nunez J. I., Ruiz-Jarabo C. M., Sierra S., Molina N., Sobrino F. - Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 2000a, **19**, 55-63.

11. Domingo E., Biebricher C., Eigen M., Holland J. J. - Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences, Landes Bioscience, Austin, 2000b 221 pages.
12. Domingo E., Davila M., Ortin J. - Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene*, 1980, **11**, 333-346.
13. Domingo E., Díez J., Martínez M. A., Hernández J., Holguín A., Borrego B., Mateu M. G. - New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J. Gen. Virol.*, 1993, **74**, 2039-2045.
14. Domingo E., Mateu M. G., Martínez M. A., Dopazo J., Moya A., Sobrino F. - Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In : Applied Virology Research. E. Kurkstak, R. G. Marusyk, S. A. Murphy, M. H. V. Van-Regenmortel (Ed.), Plenum Publishing Co., New York, 1990, 233-266.
15. Domingo E., Webster R. G., Holland J. J. - Origin and Evolution of Viruses, Academic Press, San Diego, 1999. 499 pages.
16. Dopazo J., Sobrino F., Palma E. L., Domingo E., Moya A. - Gene encoding capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus: a quasispecies model of molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, **85**, 6811-6815.
17. Dopazo J., Rodrigo M. J., Rodríguez A., Sáiz J. C., Sobrino F. - Aftovirus evolution. In : Molecular evolution of viruses. A. Gibbs, C. H. Calisher (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 1994, 310-320.
18. Gebauer F., de la Torre J. C., Gomes I., Mateu M. G., Barahona H., Tiraboschi B., Bergmann I., de Mello P. A., Domingo E. - Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 1988, **62**, 2041-2049.
19. Hewat E. A., Verdaguer N., Fita I., Blakemore W., Brookes S., King A., Newman J., Domingo E., Mateu M. G., Stuart D. I. - Structure of the complex of an Fab fragment of a neutralizing antibody with foot-and-mouth disease virus: positioning of a highly mobile antigenic loop. *EMBO J.*, 1997, **16**, 1492-1500.
20. Jackson T., Sharma A., Ghazaleh R. A., Blakemore W. E., Ellard F. M., Simmons D. L., Newman J. W., Stuart D. I., King A. M. - Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin  $\alpha(v)\beta 3$  in vitro. *J. Virol.*, 1997, **71**, 8357-8361.
21. King A. M., Underwood B. O., McCahon D., Newman J. W., Brown. - F. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK. *Nature*, 1981, **293**, 479-480.
22. Kitching R.P. - A recent history of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.*, 1998, **118**, 89-108.
23. Kitching R.P. - Foot-and-mouth disease: current world situation. *Vaccine*, 1999, **17**, 1772-1774.
24. Knowles N. J., Samuel A. R., Davies P. R., Kitching R. P., Donaldson A. I. - Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Vet Rec*, 2001, **148**, 258-259.
25. Lea S., Hernández J., Blakemore W., Brocchi E., Curry S., Domingo E., Fry E., Abu-Ghazaleh R., King A., Newman J., Stuart D., Mateu M. G. - The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 1994, **2**, 123-139.
26. Martin M.J., Nunez J.I., Sobrino F., Dopazo J. - A procedure for detecting selection in highly variable viral genomes : evidence of positive selection in antigenic regions of capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Meth.*, 1998, **74**, 215-221.
27. Martínez M. A., Carrillo C., Plana J., Mascarella R., Bergada J., Palma E. L., Domingo E., Sobrino F. - Genetic and immunogenic variations among closely related isolates of foot-and-mouth disease virus. *Gene*, 1988, **62**, 75-84.
28. Martínez M. A., Dopazo J., Hernández J., Mateu M. G., Sobrino F., Domingo E., Knowles N. J. - Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J. Virol.*, 1992, **66**, 3557-3565.
29. Martínez M. A., Verdaguer N., Mateu M. G., Domingo E. - Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, **94**, 6798-6802.
30. Mateu M. G. - Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res.*, 1995, **38**, 1-24.
31. Mateu M. G., Camarero J. A., Giralt E., Andreu D., Domingo E. - Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. *Virology*, 1995, **206**, 298-306.
32. Mateu M. G., Martínez M. A., Capucci L., Andreu D., Giralt E., Sobrino F., Brocchi E., Domingo E. - A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. Gen. Virol.*, 1990, **71**, 629-637.



33. Neff S., Sá-Carvalho D., Rieder E., Mason P. W., Blystone S. D., Brown E. J., Baxt B. - Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin  $\alpha(v)\beta 3$  as its receptor. *J. Virol.*, 1998, **72**, 3587-3594.
34. Rowlands D. J., Clarke B. E., Carroll A. R., Brown F., Nicholson B. H., Bittle J. L., Houghten R. A., Lerner R. A. - Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 1983, **306**, 694-697.
35. Rueckert R. R. - Picornaviridae: the viruses and their replication. In : Fields Virology. Fields B. N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock R.M., Melnick J.L., Monath T.P., Roizman B. (Ed.), Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, 1996, 609-654.
36. Sa-Carvalho D., Rieder E., Baxt B., Rodarte R., Tanuri A., Mason P. W. - Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.*, 1997, **71**, 5115-5123.
37. Samuel A. R., Knowles N. J. - Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *J. Gen. Virol.*, 2001, **82**, 609-621.
38. Samuel A.R., Knowles N.J., Mackay D.K.J. - Genetic analysis of type O viruses responsible for epidemics of foot-and-mouth disease in North Africa. *Epidemiol. Inf.*, 1999, **122**, 529-538.
39. Sobrino F., Domingo E. - Foot-and-mouth disease in Europe: FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep*, 2001, **2**, 459-461.
40. Sobrino F., Palma E. L., Beck E., Dávila M., de la Torre J. C., Negro P., Villanueva N., Ortín J., Domingo E. - Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease: heterogeneity and rate variations. *Gene*, 1986, **50**, 149-159.
41. Sobrino F., Saiz M., Jimenez-Clavero M. A., Nunez J. I., Rosas M. F., Baranowski E., Ley V. - Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.*, 2001, **32**, 1-30.
42. Taboga O., Tami C., Carrillo E., Nunez J. I., Rodriguez A., Saiz J. C., Blanco E., Valero M. L., Roig X., Camarero J. A., Andreu D., Mateu M. G., Giralt E., Domingo E., Sobrino F., Palma E. L. A. - large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J. Virol.*, 1997, **71**, 2606-2614.
43. Thiry E. - La fièvre aphteuse : rappels épidémiologiques et cliniques. *Point Vét.*, 2001, **32**, 44-47.
44. Thiry E., Baazizi R. - La fièvre aphteuse : les propriétés du virus expliquent sa grande contagiosité. *Bulletin des GTV*, 1999, **4**, 267-270.
45. Verdaguer N., Mateu M. G., Andreu D., Giralt E., Domingo E., Fita I. - Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO J.*, 1995, **14**, 1690-1696.

