

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

Mémoire

présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en virologie et immunologie

**CONTRIBUTION À L'ÉTUDE
DU RÔLE DE LA BICP27
DANS LA RÉPLICATION
DU VIRUS DE L'HERPÈS BOVIN 1**

par

BARBARA BÉLANGER

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Avril 1999

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Table des matières	ii
Liste des figures.....	iv
Liste des abréviations.....	v
Sommaire.....	vii
Introduction	1
Revue bibliographique	3
1. Virus de l'herpès bovin 1.....	4
1.1 Classification et structure.....	4
1.2 Pathologie et manifestations cliniques.....	4
1.3 Vaccins.....	8
1.3.1 Vaccins conventionnels.....	9
1.3.1.1 Vaccins vivants atténués.....	9
1.3.1.2 Vaccins inactivés.....	10
1.3.2 Vaccins de nouvelle génération.....	10
1.3.2.1 Vaccins sous-unitaires.....	10
1.3.2.2 Vaccins obtenus par génie génétique.....	11
1.4 Mode de répllication.....	12
1.5 Protéines du BHV-1.....	13
1.6 BICP27 et protéines homologues.....	17
Approche expérimentale	22
Lignées cellulaires.....	23
Virus.....	23
Infection des cellules MDBK au BHV-1.....	23
1. Rôle de la BICP27 comme transactivateur.....	24
1.1 Cartographie des cosmides représentant le génome viral.....	25
1.1.1 Préparation des ADN plasmidiques et cosmidiqes.....	25
1.1.2 Électrophorèse en gel d'agarose et transfert de type Southern.....	26
1.1.3 Préparation de sondes radioactives.....	27
1.1.4 Hybridation des transferts de type Southern.....	28
1.2 Construction du vecteur eucaryotique exprimant la BICP27.....	28
1.2.1 Préparation de cellules compétentes de <i>E. coli</i> et transformation.....	29
1.3 Expression transitoire de la BICP27 dans des cellules eucaryotes.....	30
1.3.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, transfert de type Western et immunoempreinte de la BICP27.....	31
1.4 Construction des plasmides pET28a/BTIF334 et pET28a/BTIF505 et développement d'un sérum monospécifique contre la BTIF.....	32
1.4.1 Cinétique d'induction à l'IPTG.....	36
1.4.2 Développement d'un sérum anti-BTIF.....	37

1.5	Construction du vecteur eucaryotique exprimant la BTIF	39
1.5.1	Préparation du vecteur pSVSport: déphosphorylation des extrémités 5' franches	39
1.5.2	Expression transitoire de la BTIF dans des cellules eucaryotes	40
1.6	Analyse des transcrits transactivés	41
1.6.1	Co-transfection transitoire et récolte des ARNs totaux	41
1.6.2	Électrophorèse dénaturante des ARNs et transferts de type Northern	41
1.6.3	Hybridation de type Northern	43
2.	Développement d'outils pour la construction d'un mutant BHV-1/BICP27	44
2.1	Développement d'une lignée stable MDBK/BICP27 ⁺	44
2.1.1	Co-transfection de cellules MDBK avec pSV/BICP27 et pSV2neo ou pSV3neo	44
2.1.2	Inductibilité du promoteur d'expression eucaryotique pRetroTetOff	45
2.2	Construction des plasmides de transfert pour la création de mutants BICP27	46
2.2.1	Construction du plasmide pKS/NJ-Bln1/β-gal ⁺	46
2.2.2	Construction du plasmide pKS/NJ-Bln1ΔBICP27/β-gal ⁺	47
2.2.3	Essai β-galactosidase	50
	Résultats	52
1.	Rôle de la BICP27 comme transactivateur	53
1.1	Caractérisation des cosmides	53
1.2	Expression de la BICP27 native dans les cellules eucaryotiques	60
1.3	Développement d'un sérum anti-BTIF	61
1.4	Co-transfections transitoires de cellules cos-7 avec les cosmides recombinants du BHV-1 et un plasmide exprimant ou non soit la BICP27 ou la BTIF	70
2.	Rôle de la BICP27 dans la réplication du BHV-1	76
2.1	Développement d'une lignée cellulaire MDBK exprimant la BICP27	77
2.1.1	Système à deux plasmides	77
2.1.2	Système inductible	78
2.2	Fonctionnalité de la cassette β-gal dans les plasmides de transfert	79
	Discussion	83
	Conclusion	88
	Remerciements	91
	Bibliographie	92

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1: Micrographie électronique du BHV-1	5
Figure 2: Organisation génomique du BHV-1	7
Figure 3: Cycle de réplication du BHV-1	14
Figure 4: Protéines du BHV-1	16
Figure 5: Construction des vecteurs procaryotiques exprimant la BTIF du BHV-1 (pET28a/BTIF334 et pET28a/BTIF505)	33
Figure 6: Construction des plasmides de transfert pKS/NJ-Bln1/ β -gal ⁺ et pKS/NJ-Bln1 Δ BICP27/ β -gal ⁺	48
Figure 7: Analyses de type Southern des cosmides	54
Figure 8: Cartographie des cosmides représentant le génome complet du BHV-1	59
Figure 9: Immunoempreinte des lysats de cellules MDBK et cos-7 transfectées avec pSV/BICP27	62
Figure 10: Expression de la BTIF dans <i>E. coli</i>	65
Figure 11: Spécificité du sérum anti-BTIF	68
Figure 12: Immunoempreinte des lysats protéiques et hybridation des ARNs totaux de cellules cos-7 co-transfectées avec l'un ou l'autre des cosmides N4, i15, K2, K9 et L9, en présence de pSVSport ou pSV/BICP27	71
Figure 13: Immunoempreinte des lysats protéiques et hybridation des ARNs totaux de cellules cos-7 co-transfectées avec l'un ou l'autre des cosmides N4, i15, K2, K9 et L9, en présence de pSVSport ou pSV/BTIF	73
Figure 14: Efficacité du système inductible pRetroTetOffLuc dans les cellules MDBK	80
Figure 15: Efficacité de la cassette β -gal dans les cellules MDBK	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	acide désoxyribonucléique
ARN:	acide ribonucléique
BHV-1:	virus de l'herpès bovin 1
BICP27:	"bovine infectious cell protein # 27"
BSA:	albumine sérique bovine
BTIF:	facteur de transinduction des gènes α du BHV
CMV:	cytomégalovirus
DAB :	3,3'-diaminobenzidine hypochloride
Denhardt's:	0,2% BSA, 0,2% Ficoll-400, 0,2% Polyvinylpyrrolidone-40
DEPC:	diéthylpyrocarbonate
DMEM:	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO:	sulfoxyde de diméthyle
D.O.:	densité optique
EDTA:	acide éthylène diamine tétra-acétique
EHV-1:	virus de l'herpès équin
ICP27:	"infectious cell protein # 27"
IPTG:	isopropylthio- β -galactoside
Hepes:	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
HSV-1:	virus de l'herpès simplex
kb:	kilobases
kDa:	kiloDaltons
kpb:	kilo paires de bases
M:	molarité
MDBK:	"Madin Darby Bovine Kidney"
mM:	millimolaire
MOI:	multiplicité d'infection
MOPS :	acide 3-[N-morpholino]propanesulfonique
N:	normalité

ORF:	cadre de lecture ("open reading frame")
PBS:	tampon salin phosphaté
PPi:	pyrophosphate
PVDF:	difluorure de polyvinylidène
rpm:	rotation par minute
SBF:	sérum bovin fœtal
SSC:	0,15 M NaCl, 0,015 M citrate de sodium pH 7,0
SDS:	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE:	Électrophorèse en Gel de PolyAcrylamide-DodécylSulfate de Sodium
TBS:	tampon Tris-salin
TCA:	acide trichloroacétique
TE:	Tris-EDTA
U:	unité
VZV:	virus de la varicelle-zona

Sommaire

Le virus herpès bovin 1 (BHV-1) est un pathogène d'importance économique du bétail, associé à de sévères manifestations cliniques. Pour le développement de nouveaux vaccins plus efficaces et plus sécuritaires, l'étude des gènes viraux est primordiale. Dans ce projet, le rôle du gène codant pour la BICP27 ("bovine infectious cell protein # 27") dans la réplication du BHV-1 a été étudié. Pour identifier les gènes potentiellement transactivés par la BICP27, une stratégie a été développée. Des cellules cos-7 ont été co-transfectées avec un vecteur d'expression eucaryotique exprimant la BICP27 et l'un ou l'autre d'une série de cinq cosmides recombinants représentant globalement tout le génome viral. Après avoir vérifié la présence de la BICP27 dans les cellules transfectées, les acides ribonucléiques (ARN) totaux ont été isolés, fractionnés en gels d'agarose, transférés sur une membrane de nylon puis hybridés avec les cosmides afin d'identifier les transcrits potentiellement transactivés par le polypeptide. Les cinq essais réalisés en présence du vecteur exprimant la BICP27 ont permis la détection de deux transcrits de 3,3 et 2,4 kilobases (kb), indépendamment du cosmide à l'étude. Par contre, les essais témoins en présence du vecteur d'expression original (sans insertion) n'ont révélé aucune bande d'hybridation. Ces résultats suggèrent donc que les deux transcrits détectés correspondent à ceux générés par le vecteur d'expression recombinant pour la synthèse de la BICP27, le transcrit de 3,3 kb représentant présumément un précurseur de l'ARN messager de 2,4 kb. Parallèlement, la même stratégie a été utilisée avec un témoin positif qui est un transactivateur connu du BHV-1: la BTIF. Un sérum anti-BTIF, préalablement développé, nous a permis de confirmer la présence de la BTIF dans les cellules co-transfectées. Pourtant, aucun transcrit spécifiquement transactivé par le polypeptide n'a pu être détecté, suggérant donc que notre stratégie n'était pas assez sensible.

Dans le but éventuel de déterminer si le gène codant la BICP27 est nécessaire dans le cycle de réplication du BHV-1, la seconde partie du projet consistait à développer les outils nécessaires à la construction d'un mutant de délétion BHV-1/BICP27, à partir duquel les conséquences de la mutation seraient analysées *in vitro* puis *in vivo*. La

procédure courante pour créer des mutants du BHV-1 consiste à co-transfecter des cellules permissives avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) viral purifié et un plasmide de transfert recombinant dont le gène viral d'intérêt, bordé des séquences proximales intactes (~1 000 paires de bases (pb) de chaque côté), a été soit remplacé ou inactivé par insertion d'un gène rapporteur. Le mutant désiré, généré par recombinaison homologue des séquences communes entre l'ADN plasmidique et l'ADN viral, est ensuite sélectionné selon le phénotype du gène rapporteur. Au cours des travaux, deux plasmides de transfert différents ont été construits: le premier (pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺) contient les séquences codantes complètes de la BICP27 à l'intérieur duquel une cassette β -galactosidase (β -gal) a été insérée au niveau du codon 141, alors que chez le second plasmide (pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺), 93 % des séquences codantes de la BICP27 ont été remplacées par la cassette β -gal. Par la suite, la fonctionnalité de la cassette β -gal introduite dans chacun des plasmides de transfert a été démontrée enzymatiquement dans les lysats de cellules MDBK ("Madin Darby Bovine Kidney") suite à leur transfection transitoire.

Finalement, étant donné que les données actuelles de la littérature montrent que le gène de l'ICP27 ("infectious cell protein # 27"), chez des virus herpès homologues au BHV-1, est absolument requis à la réplication virale, il fallait développer une lignée de complémentation apte à permettre la multiplication du mutant BHV-1/BICP27, c'est-à-dire une lignée cellulaire stable qui soit capable de fournir en *trans* le polypeptide BICP27. Pour ce faire, un système comportant deux vecteurs a été utilisé, l'un exprimant la forme native de la BICP27 (pSV/BICP27), l'autre (pSV2neo ou pSV3neo) encodant (pSV3neo) ou non (pSV2neo) l'antigène grand T du SV40 de même qu'un marqueur de sélection eucaryotique, le gène de résistance à la généticine. Les cellules MDBK ont donc été co-transfectées avec pSV/BICP27 et soit pSV2neo ou pSV3neo puis sélectionnées en présence de généticine. Les colonies résistantes à la drogue ont été par la suite clonées à l'aide d'anneaux de clonage. Pour identifier les clones exprimant la BICP27, des lysats cellulaires de chacun des clones ont été préparés, fractionnés en gel de polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), électrotransférés sur des membranes puis

immunodéectés avec un sérum anti-BICP27. Malheureusement, aucun des clones isolés n'a révélé l'expression de la BICP27, du moins pas à un niveau détectable. Ces résultats, ajoutés à d'autres obtenus antérieurement dans notre laboratoire par le biais de divers systèmes d'expression eucaryotique constitutifs à un seul vecteur (i.e. où le gène d'intérêt et le marqueur phénotypique sont portés sur la même molécule), suggèrent que la BICP27 est toxique aux cellules. Pour pallier ces problèmes, le système d'expression inductible commercial pRetroTetOff, lequel est sensible à la présence de tétracycline (ou de doxycycline) dans le milieu, a été testé dans les cellules MDBK. Cette étude, effectuée via le vecteur recombinant pRetroTetOffLuc encodant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur inductible, a permis de démontrer que le système pRetroTetOff était fonctionnel dans les cellules MDBK. Ce système sera utilisé sous peu pour le développement d'une lignée cellulaire MDBK/BICP27⁺.

Introduction

Introduction

Le BHV-1 est un membre de la sous-famille des *alphaherpesvirinae*. Il est responsable d'infections sévères au niveau des systèmes respiratoire et génital du bétail. Malgré l'utilisation de vaccins conventionnels depuis plusieurs décennies, la maladie est toujours en progression et occasionne des pertes économiques importantes au Canada. L'échec des vaccins conventionnels à prévenir efficacement la maladie démontre l'importance d'élucider la fonction des gènes viraux dans le cycle de réplication et dans la pathogenèse virale afin de permettre le développement rationnel de vaccins plus sécuritaires et performants. Le gène codant la BICP27 représente une cible particulièrement intéressante puisqu'il a été démontré que l'immunisation de souris avec un vaccin vivant déficient dans sa réplication constitué d'un mutant de délétion du gène homologue (ICP27) chez le virus herpès simplex 1 (HSV-1) conduisait à leur protection complète contre l'épreuve virale avec le virus sauvage. Chez le HSV-1, l'ICP27 a été impliquée dans de multiples fonctions essentielles au virus, comme la transactivation des gènes viraux, de sorte que la délétion du gène chez le génome est létale au virus. Par contre, les fonctions que pourraient jouer la BICP27 chez le BHV-1 sont encore inconnues. Dans le présent travail, nous avons d'une part tenté de déterminer si la BICP27, tout comme l'ICP27, est impliquée dans la transactivation de gènes viraux. Pour ce faire, nous avons élaboré une stratégie originale consistant à identifier les ARNs messagers viraux potentiellement transactivés par la BICP27 dans des cellules hôtes du BHV-1 préalablement co-transfectées avec un vecteur eucaryotique exprimant la BICP27 sous sa forme native et l'un ou l'autre de cinq cosmides recombinants représentant globalement tout le génome viral. D'autre part, dans le but éventuel de déterminer si la BICP27 est requise ou non à la réplication virale, le développement de quelques outils requis pour la construction d'un mutant de délétion BHV-1/BICP27 a été entrepris.

Revue bibliographique

Revue bibliographique

1. Virus de l'herpès bovin 1

1.1 Classification et structure

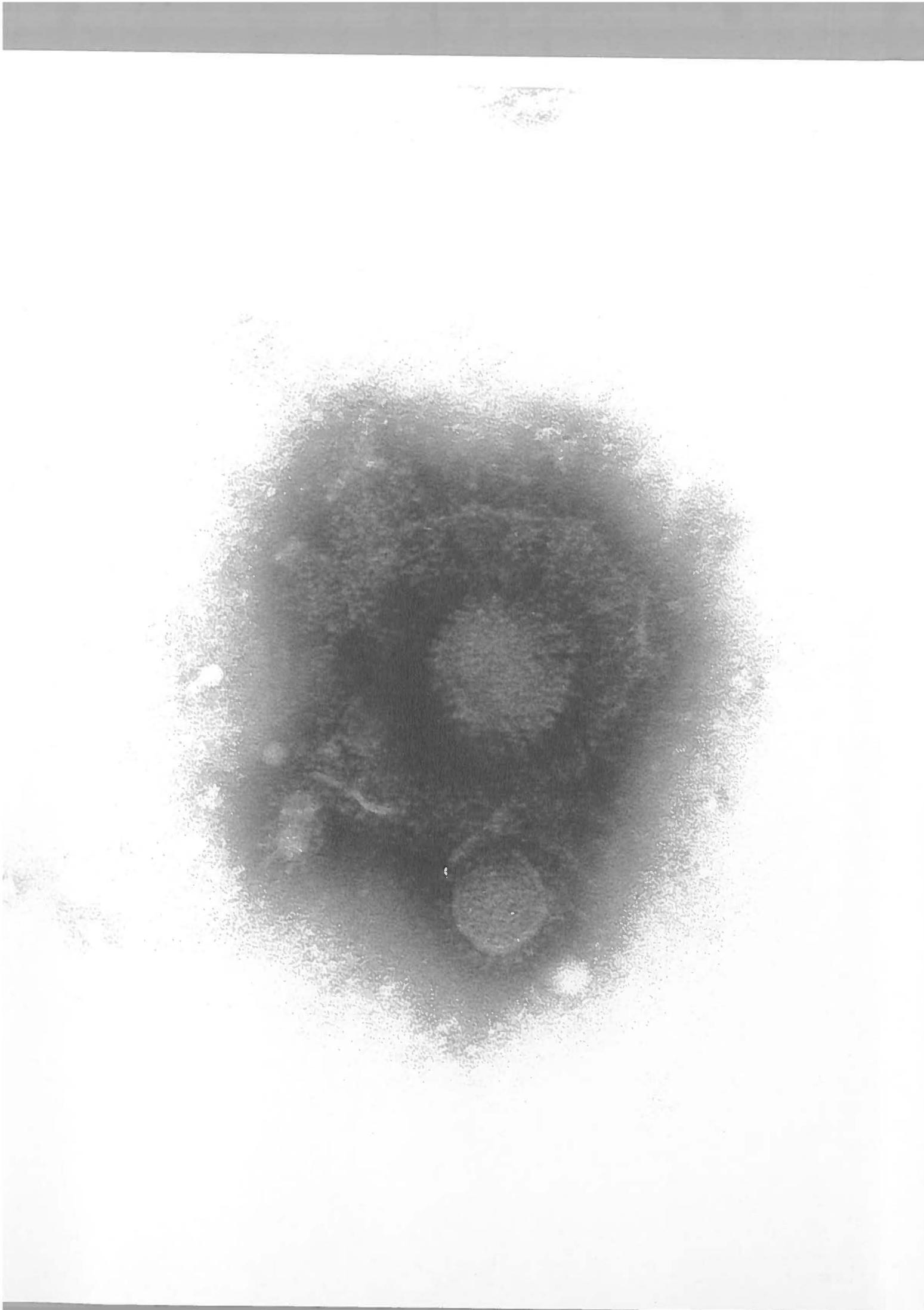
Le BHV-1 est un membre de la famille des *Herpesviridae* et de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. La plupart des gènes du BHV-1 montrent une identité de séquence avec ceux du HSV-1, modèle dans le monde des alphaherpès. L'ultrastructure du BHV-1, comme celle de tous les autres virus herpès, montre la présence d'une nucléocapside de symétrie icosaédrale d'un diamètre de 95 à 110 nm (Armstrong *et al.*, 1961; Cruickshank et Berry, 1965), d'un tégument (Valicek et Smid, 1976) et d'une enveloppe bilipidique. Les virions pléomorphiques ont un diamètre de 150 à 200 nm (figure 1). Le génome est riche en G et C et l'ADN viral linéaire double brin de 135,3 kilopaires de bases (kpb) a été séquencé complètement, grâce à une collaboration internationale dirigée par le Docteur Schwyzer en Suisse (1995). Le génome du BHV-1 est composé d'un segment unique long (U_L) et d'un segment unique court (U_S) lequel est bordé de séquences répétées inversées (IR_S et TR_S). La région U_S a la capacité d'inverser son orientation par rapport au segment U_L , de sorte que le génome se présente sous deux formes isomériques équimolaires (figure 2).

1.2 Pathologie et manifestations cliniques

Le BHV-1 est responsable de maladies sévères des systèmes respiratoire et génital du bétail, occasionnant la rhinotrachéite infectieuse bovine et la vulvovaginite pustulaire infectieuse. La rhinotrachéite infectieuse bovine est une maladie contagieuse caractérisée par une fièvre, une toux rauque, une dépression générale, une anorexie, une baisse de la production de lait et une perte de poids. La vulvovaginite pustulaire infectieuse se caractérise par la sécrétion de mucus et l'apparition de pustules au niveau des muqueuses vaginales et vulvaires chez les femelles et au niveau des muqueuses du pénis et du

Figure 1 Micrographie électronique du BHV-1

Aspect d'une particule du BHV-1 en microscopie électronique après imprégnation négative avec de l'acide phosphotungstique (3%, pH 6,0) et un grossissement de 300 000 X. Cette photographie a été prise par le service de microscopie électronique de l'Institut Armand-Frappier.



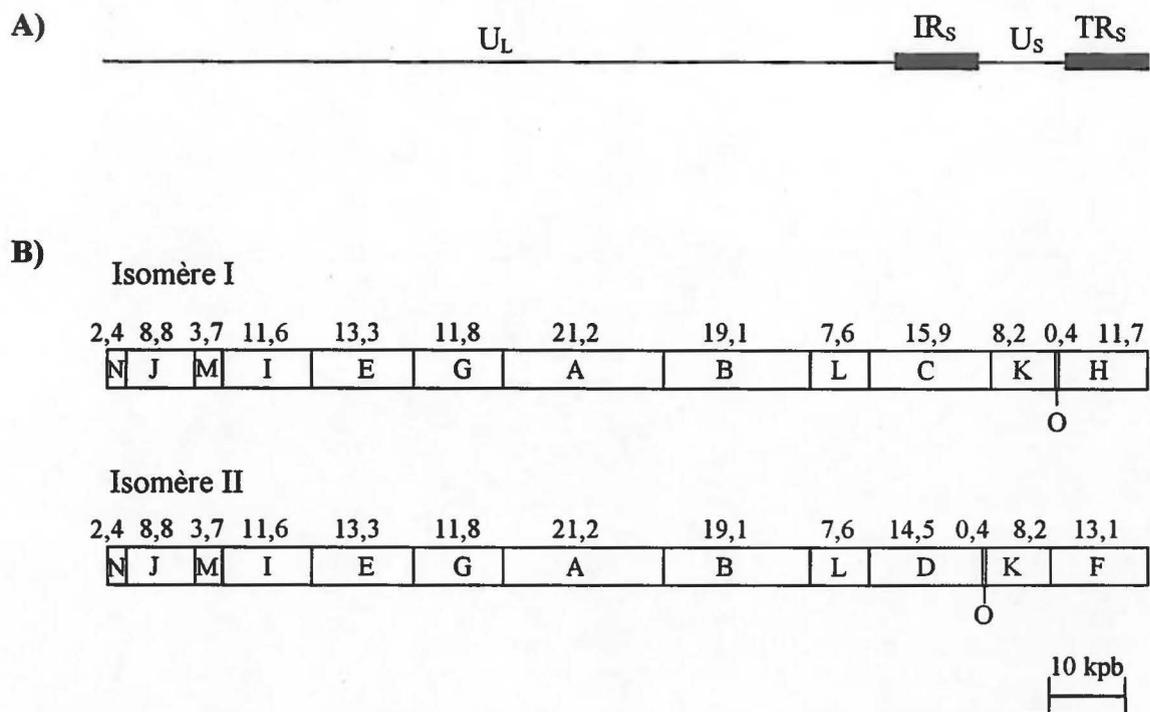


Figure 2 Organisation génomique du BHV-1

A) Le génome du BHV-1 comporte un segment unique long (U_L) et un segment unique court (U_S), lequel est entouré de deux séquences répétées inversées (IR_S et TR_S). B) Cartes de restriction *Hind* III des 2 formes isomériques du génome du BHV-1 (Mayfield *et al.*, 1983). Les fragments obtenus sont identifiés par des lettres selon un ordre décroissant de grandeur. Les fragments des 2 isomères sont identiques au niveau du segment unique long mais du côté du segment unique court, on observe différents fragments étant donné que le segment unique court peut inverser son orientation par rapport au segment U_L . Ainsi, l'isomère I comporte les fragments C, K, O et H et l'isomère II, les fragments D, O, K et F.

prépuce chez les mâles. De façon moins fréquente, le BHV-1 est la cause d'avortements, de méningoencéphalites, de conjonctivites et d'entérites. En général, l'avortement se produit entre le cinquième et le huitième mois de la gestation, après une incubation du virus de trois à six semaines, chez 25% des femelles en gestation (Wyler *et al.*, 1989). De plus, le virus a la capacité d'établir une infection latente c'est-à-dire qu'il persiste chez l'hôte au niveau des ganglions trijumeaux (Ackermann *et al.*, 1982) et sacraux (Ackermann et Wyler, 1984) sans symptômes apparents. Suite à l'établissement de la latence dans les cellules nerveuses, l'expression des gènes est très limitée. Une réactivation peut survenir spontanément ou suite à certains stimuli comme le transport, la parturition, des traitements immunosuppresseurs avec des glucocorticoïdes ou l'infection par un autre virus ou micro-organisme (Wyler *et al.*, 1989).

1.3 Vaccins

Étant donné les pertes économiques importantes associées au BHV-1, des vaccins plus ou moins efficaces ont été développés et d'autres sont en voie de développement. Le vaccin idéal devrait pouvoir induire une réponse immunitaire semblable à celle rencontrée chez un animal infecté naturellement, afin de bien protéger cet animal d'une infection subséquente. Il devrait donc être efficace afin de réduire au minimum les signes cliniques et ainsi diminuer les pertes économiques. De plus, il devrait être sécuritaire en empêchant la sécrétion du virus après la vaccination et ainsi prévenir la propagation du virus d'un animal vacciné à un autre non vacciné. La vaccination devrait prévenir l'établissement d'une infection latente. Le vaccin idéal devrait aussi être stable afin de faciliter son entreposage et son transport. De plus, le coût de production et la fréquence des rappels devraient être réduits au minimum. Enfin, il est important de pouvoir distinguer les animaux vaccinés de ceux naturellement infectés. Les différents vaccins développés ou qui sont à l'étude aujourd'hui sont classés en deux groupes: il y a les vaccins conventionnels et les vaccins de nouvelle génération.

1.3.1 Vaccins conventionnels

Les vaccins conventionnels comportent les vaccins vivants atténués et ceux inactivés. Ces vaccins permettent de diminuer les symptômes cliniques associés au BHV-1. Par contre, leur utilisation depuis de nombreuses années n'a pas permis de réduire la morbidité et la mortalité des bovins (Kit, 1989; Wyler *et al.*, 1989). De plus, ils ne permettent pas de différencier un animal qui a été vacciné par rapport à un animal qui a été infecté naturellement. Les avantages et les inconvénients de ces deux types de vaccins sont décrits ci-bas.

1.3.1.1 Vaccins vivants atténués

Ce type de vaccin est produit par passage multiple du virus sur feuillettes cellulaires d'hôtes ce qui entraîne des formes moins virulentes suite à des mutations spontanées dans le génome. Les bovins sont immunisés suite à une application intranasale ou à une injection intramusculaire. Ce type de vaccin est le premier à avoir été développé pour lutter contre le BHV-1 (Kendrick *et al.*, 1956). Il comporte plusieurs avantages comme par exemple, l'induction rapide des réponses immunitaires humorale et mucoale (Sutton, 1980). De plus, comme le virus est capable de se répliquer, il induit une réponse immunitaire très efficace. Par contre, le virus est capable d'établir une infection latente chez les animaux vaccinés ce qui implique qu'il peut y avoir des périodes de réactivation (Darcel et Dorward, 1975). De plus, la vaccination par injection intramusculaire des vaches en gestation peut provoquer des avortements (Mitchell, 1974). Ces vaccins sont aussi très instables: ils présentent des risques de réversion et leur entreposage nécessite des conditions spéciales (Misra *et al.*, 1983; Whetstone *et al.*, 1989). En 1984, Nettleton *et al.*, ont rapporté que les vaccins atténués étaient transmissibles horizontalement. Enfin, suite à l'immunisation, des symptômes cliniques (Curtis et Angulo, 1974; Jensen *et al.*, 1976) et une immunosuppression passagère (Yates, 1982) peuvent survenir. Ces vaccins comportent donc une certaine efficacité mais ne sont pas très sécuritaires.

1.3.1.2 Vaccins inactivés

Ces vaccins sont produits par traitement chimique (bétapropiolactone, éthanol ou formaline), physique (U.V.) ou thermique du virus. Le vaccin est très stable et donc facile à entreposer et à transporter. Contrairement aux vaccins atténués, les vaccins inactivés sont incapables de se répliquer et ne peuvent donc pas provoquer de symptômes cliniques chez le vacciné ni d'avortement chez les femelles en gestation. Par le fait même, il ne peut établir la latence et il n'y a donc pas de période de réactivation. Ces vaccins sont donc beaucoup plus sécuritaires que les vaccins atténués mais beaucoup moins efficaces, car les traitements utilisés pour obtenir des vaccins inactivés provoquent bien souvent la perte des épitopes importants pour une réponse immunitaire adéquate et durable (Levings *et al.*, 1984; Duque *et al.*, 1989). De plus, des doses de rappel doivent être administrées chaque année aux animaux car la réponse immunitaire induite est de courte durée (Schipper et Kelling, 1975). Enfin, un adjuvant doit être ajouté au vaccin pour induire une bonne réponse immunitaire, ce qui en augmente les coûts d'utilisation.

1.3.2 Vaccins de nouvelle génération

L'utilisation depuis plus de trente ans de vaccins de type vivant/atténué ou inactivé n'a pas empêché l'augmentation de la morbidité des animaux due au BHV-1. C'est pourquoi des alternatives doivent être considérées pour le développement de nouveaux vaccins. Afin de développer des vaccins à la fois sécuritaires et efficaces, une nouvelle génération de vaccins a vu le jour. Dans cette catégorie, deux types principaux de vaccins sont retrouvés: les vaccins sous-unitaires et les vaccins obtenus par génie génétique.

1.3.2.1 Vaccins sous-unitaires

Ce type de vaccin est constitué de composantes protéiques purifiées du virion telles que des glycoprotéines de l'enveloppe, en combinaison ou individuelles. Il a déjà été démontré qu'un vaccin fabriqué à partir de la glycoprotéine gD du BHV-1 induit des

réponses immunitaires humorale et cellulaire (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1990). Comme le vaccin ne contient pas de particules virales complètes, les animaux vaccinés n'encourent aucun symptôme ni d'immunosuppression et ne sont pas sujets à des avortements. De plus, le vaccin permet de différencier les animaux vaccinés de ceux infectés naturellement (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1993). Ce type de vaccin est donc efficace et sécuritaire. Par contre, cette approche nécessite l'utilisation coûteuse d'adjuvants pour favoriser l'induction de l'immunité.

1.3.2.2 Vaccins obtenus par génie génétique

Cette catégorie comporte l'utilisation d'ADN recombinant ou de mutants de délétion. L'approche de l'ADN recombinant consiste à injecter un plasmide exprimant un antigène majeur du BHV-1 pour induire une réponse immunitaire dans l'animal. Ainsi, il a été démontré qu'un plasmide exprimant la glycoprotéine D du BHV-1 induit la production d'anticorps spécifiques (Cox *et al.*, 1993). L'approche des mutants de délétion consiste à supprimer du génome viral un gène essentiel à la réplication ou à l'assemblage du virion. Une glycoprotéine non-essentielle à la réplication virale peut aussi être ciblée pour tenter d'atténuer la virulence ou pour la fabrication d'un vaccin marqueur. La stratégie généralement adoptée pour construire des mutants de délétion de virus herpès consiste à co-transfecter des cellules hôte avec l'ADN viral et un plasmide de transfert comportant les séquences bordantes du gène d'intérêt à l'intérieur desquelles le gène lui-même a été préalablement soit inactivé ou supprimé par l'insertion d'un gène rapporteur. Le mutant désiré est généré par recombinaison homologue entre les séquences communes du plasmide de transfert et l'ADN viral et peut être sélectionné selon le phénotype du gène rapporteur. Évidemment, si le gène supprimé est essentiel à la réplication virale ou à l'assemblage, une lignée de complémentation produisant la protéine du gène supprimé doit préalablement être produite afin de permettre la croissance du mutant et sa production. Suite à l'immunisation avec ce type de vaccin vivant déficient dans sa réplication, le virus infecte les cellules de l'animal et peut procéder normalement à son cycle de réplication jusqu'à ce que la protéine codée par le gène supprimé soit nécessaire à la continuation du

cycle répliatif. Comme l'animal n'encode pas cette protéine, le cycle de répliation avorte irrémédiablement. Par contre, les réponses immunitaires humorale et cellulaire de l'animal auront été enclenchées. Des souris vaccinées avec un mutant de délétion du gène précoce-immédiat ICP27 ou du gène précoce ICP8 du HSV-1 ont été protégées de l'infection par un virus sauvage (Nguyen *et al.*, 1992; Morrison et Knipe, 1994). Des protéines essentielles à l'assemblage ou à la structure du virion pourraient aussi être ciblées. Les vaccins constitués de virus déficients dans leur répliation sont très prometteurs car ce type de vaccin serait très efficace, sécuritaire et préviendrait probablement l'établissement de la latence. Afin de développer des vaccins constitués de virus incapables de se réplier, il est essentiel de définir les rôles des protéines dans la répliation virale.

1.4 Mode de répliation

Lors de l'infection d'une cellule permissive au BHV-1, il y a d'abord attachement de glycoprotéines virales aux récepteurs cellulaires de surface (Okazaki *et al.*, 1987, 1991; Liang *et al.*, 1991, 1993), puis fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire (Okazaki *et al.*, 1986). Cette fusion entraîne la libération de la nucléocapside et des protéines du tégument dans le cytoplasme de la cellule. Deux protéines du virion sont alors relâchées: la VHS ou "virion host shut off" qui provoque l'arrêt de la synthèse des protéines cellulaires et l' α TIF ou "facteur de trans-induction des gènes α " (Carpenter et Misra 1992; Misra *et al.*, 1994). La capsid migre vers un pore nucléaire et l'ADN viral est relâché dans le noyau où il se circularise rapidement. Une cascade de transactivation comportant trois phases (précoce-immédiate, précoce et tardive) est alors enclenchée (Misra *et al.*, 1981; Wirth *et al.*, 1989). Tout d'abord, l' α TIF induit la transcription des gènes α ou précoces-immédiats. Les transcrits α (BICP0, BICP4, BICP22) sont ensuite traduits dans le cytoplasme et les protéines produites retournent dans le noyau induire une deuxième série de gènes: les gènes β ou immédiats (e.g. thymidine kinase et ADN polymérase). Il y a, de nouveau, transcription et traduction. La plupart des protéines précoces sont impliquées dans la répliation de l'ADN viral ou dans la transactivation des gènes tardifs. Ensuite, l'ADN viral commence à se réplier selon le modèle du cercle

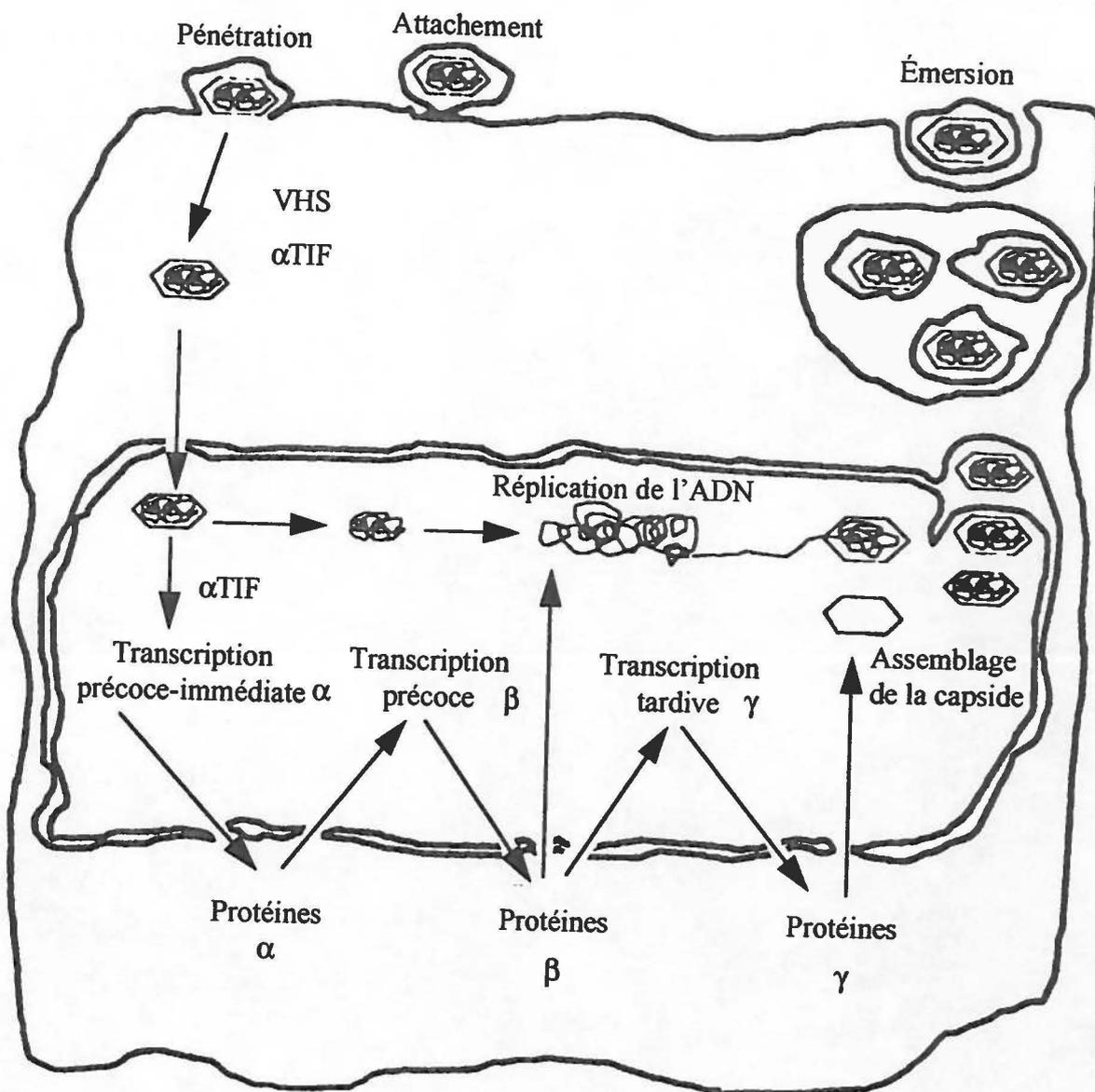
roulant (Hammerschmidt *et al.*, 1988) et les gènes tardifs sont induits. Les gènes γ ou tardifs codent surtout pour des protéines de structure comme la glycoprotéine C (gC) ou la VP8. Par la suite, les protéines s'assemblent dans le noyau pour former des capsides (Ludwig, 1983) et l'ADN viral est encapsidé. La formation du virion est complétée par l'ajout des protéines du tégument puis l'enveloppe virale est acquise au niveau de la membrane nucléaire. Enfin, les nouveaux virions s'accumulent dans le réticulum endoplasmique et sont relâchés dans le milieu extracellulaire en entraînant la lyse des cellules infectées (figure 3).

1.5 Protéines du BHV-1

L'ADN du BHV-1 comprend potentiellement 67 gènes uniques et 2 gènes dupliqués dans les séquences répétées inversées. Le génome code donc au moins 69 protéines virales (Schwyzer et Ackermann, 1996) (figure 4). Dix d'entre elles sont des glycoprotéines (gB, gC, gD, gE, gI, gH, gL, gG, gK et gM) de 17 à 101 kiloDaltons (kDa) qui se retrouvent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Les glycoprotéines du BHV-1 ont un rôle important dans l'infection virale. Elles permettent l'attachement et la fusion du virus à la membrane de la cellule hôte. Les glycoprotéines virales constituent la première cible du système immunitaire. D'autre part, quatre protéines de l'enveloppe, neuf protéines du tégument (dont la VHS et l' α TIF) et six protéines de la capside ont été identifiées. Au moins sept autres protéines virales ont été impliquées dans la réplication de l'ADN dont la protéine majeure de liaison à l'ADN (UL29), l'ADN polymérase (UL42, ADN pol.), l'hélicase-primase (UL52) et la protéine de liaison à l'origine de réplication (UL9). Six autres protéines sont nécessaires au clivage et à l'encapsidation de l'ADN viral. Plusieurs enzymes ont été caractérisées, comme par exemple la thymidine kinase (UL23, TK) (Bello *et al.*, 1992) et la ribonucléotide réductase (RR constituées de deux sous-unités; UL39 et UL40) (Simard *et al.*, 1992, 1995). De plus, quatre protéines de régulation ont été identifiées. Trois d'entre elles sont des protéines

Figure 3 Cycle de réplication du BHV-1

Les étapes du cycle répliatif lytique illustrées sur cette figure sont décrites dans le texte. Le schéma est adapté de Tikoo *et al.* (1995).



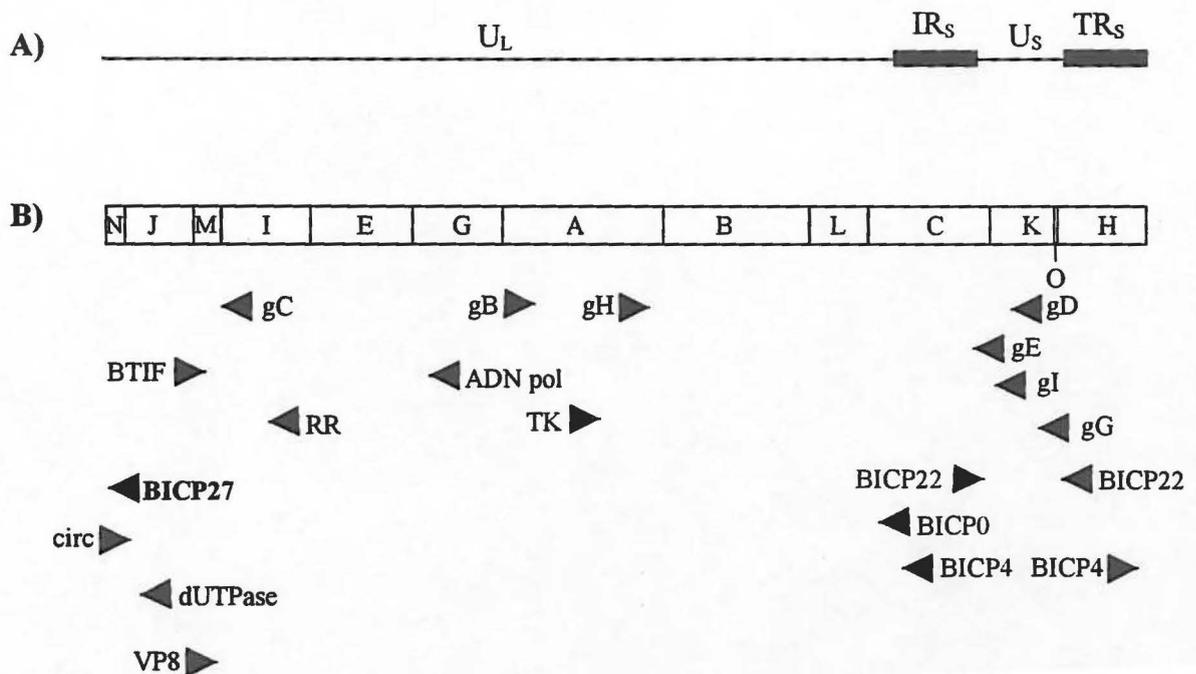


Figure 4 Protéines du BHV-1

A) Organisation génomique du BHV-1. **B)** La localisation de certains gènes du BHV-1 est représentée par des flèches qui indiquent l'orientation du cadre de lecture. Sur cette figure, les glycoprotéines B, C, D, E, G, H et I sont représentées par gB, gC, gD, gE, gG, gH et gI respectivement. ADN pol., RR et TK représentent respectivement l'ADN polymérase, la ribonucléotide réductase et la thymidine kinase.

précoces-immédiates (BICP0, BICP4 et BICP22) qui ont un rôle de transactivation ou de transrépression sur d'autres gènes viraux (Wirth *et al.*, 1992; Schwyzer *et al.*, 1993, 1994; Fraefel *et al.*, 1994); la quatrième (BICP27) est une protéine précoce (Köppel *et al.*, 1995; Chalifour *et al.*, 1996). Enfin, quatre gènes spécifiques au BHV-1 (UL0.5, UL3.5, circ et US1.5) c'est-à-dire n'ayant pas d'homologue chez le HSV-1, ont été identifiés. Mentionnons toutefois que le gène circ comporte une contrepartie chez les virus de la varicelle et de l'herpès équin (Fraefel *et al.*, 1993).

1.6 BICP27 et protéines homologues

La protéine ciblée dans ce projet de recherche est la BICP27 ou "bovine infectious cell protein" #27. Cette protéine précoce (β) du BHV-1 n'est pas retrouvée chez le virion. Son cadre de lecture (ORF) de 1 200 paires de bases, situé aux positions (3') 1 661 ← 2 860 (5') du génome, code pour une protéine de 50 kDa qui est surtout localisée dans le noyau des cellules infectées (Singh *et al.*, 1996).

Une cinétique d'expression transcriptionnelle et traductionnelle du gène a été réalisée par Chalifour *et al.* (1996). Le transcrit de la BICP27 a été détecté à partir de 3 heures post-infection pour atteindre une abondance maximale à 12 heures post-infection. Par la suite, l'accumulation du transcrit diminue graduellement mais il est toujours présent 24 heures post-infection. La cinétique traductionnelle a démontré que la protéine est détectable à 3 heures post-infection et son abondance maximale est atteinte à 15 heures post-infection. Par la suite, l'accumulation de la protéine diminue. Cette étude et certaines antérieures démontrent que la BICP27 et son homologue (à 61%) chez le HSV-1 (ICP27) comportent différentes cinétiques d'expression. En effet, l'ICP27 est une protéine précoce-immédiate (α) alors que la BICP27 est une protéine immédiate (β). Malgré cette différence, les deux protéines semblent posséder des fonctions communes, ayant toutes deux été impliquées dans la maturation des ARNs messagers au niveau de la polyadénylation des transcrits (Singh *et al.*, 1996). Jusqu'à maintenant, plusieurs fonctions de l'ICP27 ont été identifiées.

L'ICP27 du HSV-1 a été abondamment étudiée. L'ARN messager de 1,8 kb (Anderson *et al.*, 1980; Whitton *et al.*, 1983) code pour une phosphoprotéine de 512 acides aminés d'une masse moléculaire de 63 kDa (Pereira *et al.*, 1977; Ackermann *et al.*, 1984). L'ICP27 comporte des groupements phosphates stables et d'autres instables dépendant du moment de l'infection (Wilcox *et al.*, 1980). La protéine est localisée dans le noyau (Fenwick *et al.*, 1978; Knipe et Smith, 1986; Hardwicke *et al.*, 1989; Rice *et al.*, 1989) et les différents signaux de localisation nucléaire ont été identifiés (Mears *et al.*, 1995).

L'ICP27 joue un rôle essentiel dans la régulation de la réplication virale lytique (Sacks *et al.*, 1985; McCarthy *et al.*, 1989; Rice *et al.*, 1993; Rice et Lam, 1994). Elle permet d'accroître de dix fois le niveau de réplication de l'ADN viral (Rice et Knipe, 1990) en transactivant l'expression des gènes tardifs impliqués dans la réplication de l'ADN (Uprichard et Knipe, 1996; McGregor *et al.*, 1996). Agissant comme transrépresseur ou transactivateur en combinaison avec l'ICP0 et/ou l'ICP4 (Sekulovich *et al.*, 1988), l'ICP27 serait impliquée dans le cycle de réplication pour permettre le passage de l'expression des gènes précoces (β) aux gènes tardifs (γ): les gènes précoces subiraient une répression (Sacks *et al.*, 1985; McCarthy *et al.*, 1989; Rice et Knipe, 1990) alors que les gènes tardifs seraient transactivés (Rice et Knipe, 1990; Rice et Lam, 1994; Hibbard et Sandri-Goldin, 1995). En effet, des études réalisées avec des mutants thermosensibles ou de délétion de l'ICP27 ont démontré que les transcrits des gènes précoces s'accumulaient alors que les gènes tardifs n'étaient pratiquement pas exprimés (Sandri-Goldin *et al.*, 1981; Sacks *et al.*, 1985; McCarthy *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1992). Les acides aminés 434 à 505 de la protéine seraient impliqués dans la répression alors que ceux de 262 à 505 auraient un rôle dans l'activation des gènes (Hardwicke *et al.*, 1989; Rice *et al.*, 1989; Sandri-Goldin 1991; Smith *et al.*, 1991). Les différents rôles de l'ICP27 en tant que transactivateur ou transrépresseur peuvent probablement être expliqués par les différents états de phosphorylation qu'elle peut adopter. De plus, l'ICP27 contribue à l'arrêt de

l'expression des gènes cellulaires (Hardwicke et Sandri-Goldin, 1994) et de la synthèse des protéines cellulaires (Sacks *et al.*, 1985).

L'ICP27 a aussi un rôle important dans la maturation des ARNs messagers viraux, agissant au niveau de leur polyadénylation et de leur épissage (McLauchlan *et al.*, 1992; Sandri-Goldin et Mendoza, 1992; McGregor *et al.*, 1996). En effet, l'ICP27 altère la distribution intranucléaire des facteurs d'épissage (Phelan *et al.*, 1993; Sandri-Goldin *et al.*, 1995) et inhibe conséquemment l'épissage des ARNs messagers immatures (Hardy et Sandri-Goldin, 1994). De plus, la protéine stabilise les ARNs messagers en se liant à leur extrémité 3' (Brown *et al.*, 1995; Ingram *et al.*, 1996) par le biais d'une région riche en arginine-glycine (Mears et Rice, 1996). La protéine joue aussi un rôle dans l'exportation des ARNs messagers viraux du noyau au cytoplasme en inhibant l'exportation des transcrits immatures (Phelan *et al.*, 1996). En effet, l'ICP27 joue un rôle dans l'exportation des ARNs viraux du HSV-1, en utilisant un signal d'exportation nucléaire riche en leucine et en liant les ARNs viraux matures via la région riche en arginine-glycine (Sandri-Goldin, 1998). L'ICP27 contribue aussi à diminuer le niveau des ARNs messagers cellulaires durant l'infection (Hardwicke et Sandri-Goldin, 1994). Elle est également impliquée dans le transport des protéines virales dans le noyau. En effet, une surexpression ou une inhibition d'expression de l'ICP27 entraîne une localisation anormale de certaines protéines précoces-immédiates. Il a été démontré que l'ICP27 peut inhiber le signal de localisation nucléaire de l'ICP4 durant l'infection (Zhu et Schaffer, 1995). De plus, l'ICP27 agit en coopération avec l'ICP4 pour influencer la localisation intracellulaire de l'ICP0 (Zhu *et al.*, 1994, 1996). Tout récemment, il a été démontré que l'ICP27 voyage du noyau au cytoplasme et que cette activité ne serait pas dépendante de l'infection virale ou de d'autres protéines virales mais serait grandement impliquée dans l'activation des gènes viraux tardifs (Mears et Rice, 1998).

Chez le virus de l'herpès équin (EHV-1), l'UL3 est l'homologue du gène codant l'ICP27. Il a été démontré que le produit de l'UL3 est nécessaire pour une activation de l'expression des gènes tardifs (Smith *et al.*, 1993). Une protéine hybride comprenant des

portions de l'ICP22 et de l'ICP27 a aussi été étudiée. Cette protéine hybride IR4/UL3 a probablement un rôle à jouer lors de l'infection persistante (Chen *et al.*, 1996).

Chez le cytomégalovirus humain (CMV), il a été démontré que l'ORF UL69, homologue du gène codant l'ICP27 du HSV-1, code un transactivateur pour l'expression de certains gènes (Winkler *et al.*, 1994).

Chez le virus de la varicelle-zona (VZV), l'ORF 4 code pour une protéine précoce-immédiate qui est homologue, selon sa localisation et sa séquence en acides aminés, à l'ICP27. Cependant, l'ORF 4 joue un rôle différent lors de la réplication du virus. L'ICP27 peut être transactivateur ou transrépresseur en présence de d'autres transactivateurs du HSV-1. Par contre, le produit de l'ORF 4 peut directement transactiver certains gènes régulés par des promoteurs homologues ou hétérologues. De plus, la protéine ne semble pas avoir d'activité de transrépression (Moriuchi *et al.*, 1994).

Les nombreuses fonctions de l'ICP27 et des protéines homologues en font une protéine absolument requise au virus. Et de fait, la délétion du gène chez le HSV-1 entraîne irrémédiablement l'avortement prématuré du cycle de réplication viral *in vitro* et *in vivo*. Il a été démontré que l'immunisation de souris avec un mutant HSV-1/ICP27 induit une immunité suffisante pour les protéger d'une infection létale avec le virus sauvage (Nguyen *et al.*, 1992). En sachant cela, nous avons voulu déterminer si le rôle de la BICP27 est aussi important que celui de son homologue chez le HSV-1. Dans ce projet de recherche, une stratégie a été développée pour vérifier si la BICP27 est un transactivateur. Des cellules eucaryotes ont été co-transfectées avec des cosmides représentant tout le génome viral et un vecteur d'expression eucaryotique encodant la BICP27, puis les ARNs messagers totaux ont été analysés afin de vérifier s'il y avait des transcrits transactivés. En parallèle, la même expérience a été réalisée avec un transactivateur connu du BHV-1, la BTIF.

La protéine BTIF est un facteur de trans-induction des gènes α du BHV-1. Elle a été ainsi nommée étant donné sa grande homologie (en acides aminés) avec l' α TIF du HSV-1 (aussi nommée Vmw65, VP16 ou ICP25). L'ORF UL48, codant la BTIF, se situe aux positions 10 275 \rightarrow 11 792 du génome du BHV-1 (Carpenter et Misra, 1992). De plus, la BTIF est une composante du virion. La transactivation de gènes α par cette protéine nécessite la reconnaissance de la séquence TAATGAGCT présente chez les gènes précoces-immédiats. En effet, la BTIF forme un complexe avec des facteurs cellulaires et des oligonucléotides comportant cette séquence (Misra *et al.*, 1994). La transactivation des gènes précoces-immédiats par la BTIF requiert les régions aminée et carboxylique de la protéine, contrairement à l' α TIF du HSV-1 où la portion aminée n'est pas requise. Malgré ces différences, la protéine α -TIF et ses homologues peuvent transactiver une grande catégorie de promoteurs de gènes précoces-immédiats (Misra *et al.*, 1995).

La deuxième partie de ce projet consistait à préparer les outils pour la construction d'un mutant de délétion BHV-1/BICP27; c'est-à-dire une lignée cellulaire MDBK/BICP27⁺ et des plasmides de transfert Δ BICP27/ β -gal⁺. Ces outils pourraient éventuellement permettre de créer un mutant BHV-1/BICP27/ β -gal⁺ afin de déterminer le rôle de la BICP27 dans la réplication virale.

Approche expérimentale

Approche expérimentale

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, É-U) et qui ont été utilisées dans ce projet de maîtrise sont les MDBK (cellules de rein bovin, ATCC CCL 22), les cos-7 (cellules de rein du singe vert africain, ATCC CRL 1 651) et les HeLa (cellules de carcinome épithélial cervical humain, ATCC CCL-2). Les cellules ont été maintenues dans du milieu Dulbecco modifié (DMEM, Sigma Chemical Company, Oakville, ON) supplémenté avec 10% de sérum de bovin fœtal (SBF, Gibco/BRL, Canadian Life Technologies Inc. Grand Island, NY, É-U), dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ et un environnement humide.

Virus

L'isolat #34 du BHV-1, provenant du champ (fourni par le Dr. Mitchell, Gouvernement du Canada, Lethbridge, Alberta), apparenté à la souche Colorado selon les patrons de digestion d'enzymes de restriction, a été utilisé dans cette étude. La propagation du virus a été effectuée sur des feuillets cellulaires confluent de MDBK.

Infection des cellules MDBK au BHV-1

La veille de l'infection, des cellules MDBK ont étéensemencées dans des plats de Pétri de 60 mm de diamètre. Le lendemain, les cellules d'un des plats de Pétri ont été trypsinées pour effectuer un comptage cellulaire à l'aide d'un hémacytomètre. Par la suite, la dilution de la semence du virus à effectuer a été calculée pour avoir une multiplicité d'infection (MOI) de 1, ce qui signifie une particule virale pour une cellule. Après avoir lavé les cellules avec du DMEM sans sérum, la semence virale a été diluée dans du DMEM sans sérum sur glace et 1 mL de cette dilution a été déposé sur le feuillet cellulaire d'un plat de Pétri. Les plats de Pétri ont ensuite été incubés à 37°C durant 90 minutes avec une

légère agitation. Suite à cette incubation, les cellules peuvent être transfectées ou trypsinées et lysées pour effectuer différents tests.

1. Rôle de la BICP27 comme transactivateur

Afin de faciliter l'étude du BHV-1, une banque cosmétique représentant tout le génome viral a été construite dans notre laboratoire. Pour ce faire, l'ADN purifié du BHV-1 avait été partiellement digéré par *Bam* HI ou *Sau* 3A de façon à générer des fragments d'environ 40 kpb. Après déphosphorylation, les fragments avaient été insérés dans le site *Bam* HI du vecteur cosmétique SuperCos/HPS (Ananvoranich et Simard, 1997), dérivé du vecteur commercial SuperCos1 (Stratagene, La Jolla, CA, É-U). Le vecteur SuperCos/HPS avait été créé de façon à border le site de clonage (*Bam* HI) de sites *Hind* III, facilitant ainsi la cartographie des insertions par rapport au génome. Suite à l'encapsidation *in vitro*, des cellules de *E. coli* XL1-BlueMR avaient été infectées puis étalées sur des plats de Pétri LB-agar (0,5% (p/v) de "bacto yeast extract", 1% (p/v) de "bacto tryptone", 1% (p/v) de NaCl et 1,5% (p/v) de bacto-agar) contenant 50 µg/mL d'ampicilline. Les colonies recombinantes avaient été sélectionnées par hybridation en utilisant comme sondes quelques fragments *Hind* III du génome BHV-1. De cette façon, deux séries de cinq clones, représentant tout le génome viral sur la base de leur capacité à régénérer du virus infectieux suite à la co-transfection de cellules hôtes du BHV-1, avaient été isolés. Dans la présente étude, cette banque a été mise à profit pour étudier le rôle de la BICP27 dans la transactivation de gènes du BHV-1 par co-transfection de cellules avec un vecteur eucaryotique exprimant le polypeptide natif et l'un ou l'autre de cinq des cosmides représentant tout le génome viral. La cartographie précise des insertions cosmétiques par rapport au génome viral a donc été préalablement réalisée.

1.1 Cartographie des cosmides représentant le génome viral

Neuf cosmides recombinants ont été cartographiés par hybridation de type Southern des ADNs digérés par *Hind* III en utilisant comme sondes les fragments *Hind* III individuels du génome.

1.1.1 Préparation des ADNs plasmidiques et cosmidiqes

Pour chaque ADN recombinant à purifier, un volume de 200 mL de LB (0,5% (p/v) bacto yeast extract, 1% (p/v) bacto tryptone, 1% (p/v) NaCl) additionné de 15 mg d'ampicilline a étéensemencé à partir d'une colonie isolée prélevée à l'aide d'un fil à boucle d'un plat de Pétri contenant un étalement du clone d'intérêt, puis incubé à 37°C à 225 rotations par minute (rpm) durant environ 16 heures. La culture a été transférée dans une bouteille à centrifuger de 250 mL et les cellules récoltées par centrifugation à 3 500 rpm à 4°C durant 7 minutes (Sorvall RC5C, rotor GSA). Après un lavage au STE-glycérol (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), 100 mM NaCl et 10% glycérol), le culot a été resuspendu dans 4 mL de PEB (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 mM EDTA et 40 mM glucose) et le mélange transféré dans un tube en polycarbonate de 50 mL puis incubé sur glace durant 5 minutes. Par la suite, les cellules bactériennes ont été lysées en ajoutant 8 mL de 0,2 N NaOH, 1% dodécylsulfate de sodium (SDS) suivi d'une incubation à 25°C durant 10 minutes. L'ADN chromosomique a été sélectivement précipité par l'addition de 6 mL d'acétate de potassium (KOAc) 3 M pH 5,0 froid, suivi d'une incubation sur glace durant 20 minutes, puis éliminé par centrifugation à 15 000 rpm durant 15 minutes à 4°C (rotor SS34). L'ADN plasmidique ou cosmidique contenu dans le surnageant a été précipité à 25°C durant 10 minutes suite à l'addition de 1 volume d'isopropanol puis récolté par centrifugation à 10 000 rpm durant 15 minutes à 4°C (rotor SS34). Le culot obtenu a alors été lavé à l'éthanol 70%, redissous dans 300 µL de Tris-EDTA (TE ; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) et l'ADN transféré dans un microtube de 1,5 mL. Les ARNs cellulaires ont été précipités par l'addition de 300 µL de 5 M LiCl froid et éliminés par centrifugation à vitesse maximale

(Micromax IEC) durant 8 minutes. L'ADN contenu dans le surnageant a été précipité une seconde fois à l'isopropanol. Le culot a ensuite été lavé à l'éthanol 70% et redissous dans 250 μL d' H_2O . Après l'addition de 250 μL de TE 10X, 2 μL de RNase A à 10 mg/mL ont été ajoutés et une incubation à 37°C durant 30 minutes a été effectuée afin d'éliminer les ARNs résiduels. Le mélange a été extrait trois fois au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) puis l'ADN précipité à -20°C suite à l'addition de 1/10 de volume de 3 M NaOAc pH 5,0 et de 2 volumes d'éthanol 95%. Après centrifugation, l'ADN a été redissous dans de l'eau déionisée stérile puis dosé au spectrophotomètre en utilisant la relation: 1 densité optique (D.O.)_{260 nm} = 50 $\mu\text{g/mL}$, de façon à avoir environ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Enfin, une aliquote de la préparation a été analysée sur gel d'agarose afin de vérifier la qualité et la concentration de l'ADN obtenu.

1.1.2 Électrophorèse en gel d'agarose et transfert de type Southern

Les ADN cosmiques digérés par *Hind* III ont été fractionnés à 14 volts durant 16 heures dans un gel d'agarose 0,5% préparé dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-acétate pH 7,8, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA), contenant 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de bromure d'éthidium, en parallèle avec l'ADN purifié du BHV-1 digéré par *Hind* III. Suite à l'électrophorèse, le gel a été irradié 5 minutes sur un transilluminateur U.V. de façon à produire des cassures dans les molécules d'ADN. Le gel a ensuite été déposé sur une membrane de nylon (MSI, Micron Separations inc., Westborough, MA, É-U) placée dans l'appareil "Vacugene" de LKB Bromma afin de réaliser le transfert de l'ADN sur la membrane. L'appareil a été branché sur un réservoir de vidange de liquide (erlenmeyer), lui-même branché à une pompe à vide. Trente à 50 mL de solution dénaturante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) ont été déposés sur le gel puis le transfert sous vide a été réalisé à 50 cm^3 d'eau durant 20 minutes. Après avoir aspiré la solution dénaturante, 30 à 50 mL de solution neutralisante (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7,5) ont été ajoutés et le transfert poursuivi pour une autre période de 20 minutes. La solution neutralisante a ensuite été remplacée par 200 mL de solution de transfert (20X SSC: 3 M NaCl, 300 mM citrate de sodium pH 7,2) et le transfert poursuivi sous vide durant une heure. Après avoir vidangé la

solution, les puits du gel ont été identifiés sur la membrane à l'aide d'un crayon, puis celle-ci a été récupérée, séchée sur un papier Whatman 3 MM puis irradiée 5 minutes sur un transilluminateur U.V. pour y lier l'ADN de façon covalente.

1.1.3 Préparation de sondes radioactives

Une banque génomique des différents fragments *Hind* III du BHV-1 est disponible dans notre laboratoire (Simard *et al.*, 1990). Les ADNs plasmidiques ont été digérés par *Hind* III, de façon à libérer les insertions du vecteur pKS, puis fractionnés sur gel d'agarose. Les bandes d'ADN représentant les fragments génomiques ont été découpées du gel puis l'ADN purifié à l'aide de la trousse Sephaglas Band Prep de Pharmacia (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC). Cent ng de chacun des fragments purifiés ont été marqués à l'aide de la trousse de marquage trousse "oligolabelling" de Pharmacia. L'ADN a d'abord été dénaturé à 95°C durant 3 minutes puis rapidement refroidi dans un bain d'eau glacée. Par la suite, 10 µL de mélange réactionnel 5X de la trousse, 50 µCurie de dCTP α ³²P (3 000 Curie/mme) et 1 µL de Klenow (6,4 unité (U)/µL) ont été ajoutés pour obtenir un volume total de 50 µL. Une incubation a été effectuée à 37°C durant 1 à 2 heure(s) et la réaction a été arrêtée en ajoutant 50 µL d'une solution de 10 mM EDTA, 1% SDS. L'ADN a ensuite été précipité par l'addition de 100 µg d'ADN de sperme de saumon, de 1 mL de 10% d'acide trichloroacétique (TCA), 1% pyrophosphate (PPi) froid suivi d'une incubation sur glace durant 15 minutes. L'ADN a été récolté par centrifugation à 13 000 rpm durant 5 minutes et lavé une première fois avec 1 mL de 10% TCA, 1% PPi froid et une deuxième fois avec 300 µL d'éthanol 70% afin d'éliminer les désoxyribonucléotides non incorporés. Par la suite, le culot a été dissous dans 100 µL de 1 N NaOH à la température de la pièce durant 10 minutes et enfin, 200 µL d'H₂O ont été ajoutés pour un volume total de 300 µL. L'activité spécifique de la sonde a été évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard/Canberra) en utilisant un centième de la sonde totale (soit 3 µL). Une moyenne de 2X10⁷ coups par minute a été obtenue. La sonde a été conservée à -20°C et juste avant l'hybridation, elle a été neutralisée en ajoutant 100 µL de 1 M Tris-HCl pH 8,0 et 100 µL de 1 N HCl.

1.1.4 Hybridation des transferts de type Southern

La membrane d'un transfert de type Southern a été préhybridée à 65°C durant 4 à 6 heures, dans un plat de plastique contenant 100 mL de 6X SSC autoclavé, 10X Denhardt's (0,2% d'albumine sérique de bœuf (BSA), 0,2% Ficoll-400, 0,2% Polyvinylpyrrolidone-40), 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% SDS et 50 µg/mL d'ADN de sperme de saumon. Par la suite, la membrane a été transférée dans un plat contenant la sonde neutralisée (un des fragments de la carte *Hind* III du BHV-1), diluée dans 50 mL de 6X SSC, 10X Denhardt's, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% SDS et 400 µg/mL d'ADN de sperme de saumon, puis l'incubation poursuivie à 65°C durant 16 heures. La membrane a ensuite été lavée trois fois 5 minutes dans 100 mL de 2X SSC à la température de la pièce et deux fois une heure dans 100 mL de 2X SSC/0,1% SDS à 65°C. Un dernier lavage dans 50 mL de 0,1X SSC à 65°C a été effectué selon le signal détecté avec le compteur Geiger. La membrane a ensuite été exposée sur un film à rayons X (X-OMAT de Kodak) avec ou sans écran intensifiant selon l'intensité du signal.

1.2 Construction du vecteur eucaryotique exprimant la BICP27

Pour exprimer la protéine BICP27 dans les cellules de mammifères, l'ORF complet a été cloné dans le vecteur d'expression eucaryotique commercial pSVSport (Gibco BRL, Burlington, ON). Ce vecteur de 3 160 pb contient une origine de réplication, le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine et le promoteur précoce de SV40, un site de clonage multiple et le signal de polyadénylation du SV40. Le cadre de lecture complet de la BICP27 a été obtenu en digérant le plasmide pcDNA3/BICP27 (Chalifour *et al.*, 1996) par *Kpn* I et *Xho* I. Le fragment de 1 270 pb représentant l'ORF complet de la BICP27 a été purifié puis ligué avec le vecteur pSVSport préalablement digéré par les enzymes de restriction *Kpn* I et *Sal* I. Pour ce faire, les concentrations du vecteur et du fragment ont d'abord été évaluées empiriquement sur un gel d'agarose sur la base de l'intensité de la fluorescence par rapport à celle d'un ADN linéaire de concentration connue. Le vecteur et

l'insertion ont été ajoutés dans un rapport molaire 1:3, dans un microtube de 0,45 mL placé sur la glace, puis le volume complété à 7 μ L avec de l' H_2O stérile. Par la suite, 2 μ L de tampon 5X ADN ligase de T4 (250 mM Tris-HCl pH 8,0, 35 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT et 10 mM ATP) et 1 μ L d'ADN ligase de T4 (1 U/ μ L) ont été ajoutés. La réaction a été incubée à 4°C durant 16 heures puis l'ADN utilisé pour transformer des cellules compétentes de *E. coli* XL1-Blue.

1.2.1 Préparation de cellules compétentes de *E. coli* et transformation

La souche de *E. coli* XL1-Blue, a été étalée sur un plat de Pétri LB-agar et incubée à 37°C durant environ 16 heures afin d'obtenir des colonies isolées. Un volume de 20 mL de milieu TYM (2% bactotryptone, 0,5% yeast extract, 0,1 M NaCl et 10 mM $MgSO_4$) contenu dans un erlenmeyer de 2 L a étéensemencé avec une colonie isolée du plat de Pétri et incubé à 37°C à 225 rpm jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0,2 à 0,8 à 600 nm. Cent mL de TYM ont alors été ajoutés et l'incubation à 37°C a été prolongée jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0,5 à 0,9. Un autre 380 mL de TYM ont été ajoutés et l'incubation à 37°C a été prolongée jusqu'à une D.O. de 0,6 à 600 nm afin d'avoir des cellules en phase exponentielle de croissance. La culture a été rapidement refroidie dans un bain d'eau glacée afin d'arrêter la multiplication cellulaire. Par la suite, les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation à 4 000 rpm à 4°C durant 15 minutes, lavées avec 100 mL de TFB I (30 mM KOAc, 50 mM $MnCl_2$, 100 mM KCl, 10 mM $CaCl_2$, 15% glycérol) puis resuspendues dans 20 mL de TFB II froid (10 mM acide 3-[N-morpholino]propanesulfonique (MOPS), 10 mM KCl, 75 mM $CaCl_2$, 15% glycérol). Les cellules bactériennes ont enfin été aliquotées en 300 μ L dans des microtubes de 1,5 mL placés sur glace et rapidement congelées dans l'azote liquide pour être conservées à -70°C.

Lors de la transformation, 5 μ L de chaque ligation ont été ajoutés à 100 μ L de cellules compétentes de *E. coli* XL1-Blue. Suite à une incubation sur glace de 30 minutes, un choc thermique a été effectué à 37°C durant 5 minutes afin de rendre la membrane

cellulaire plus perméable. Les cellules ont été diluées en ajoutant 900 μL de LB et incubées à 37°C à 225 rpm durant 1 heure avant d'être étalées sur des plats de Pétri LB-agar contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline. Des colonies isolées ont été cultivées à 37°C durant 16 heures dans 2 mL de LB contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline puis des mini-préparations d'ADN plasmidiques ont été réalisées. Les clones positifs ont été sélectionnés par une digestion avec les enzymes de restriction *Kpn* I et *Xba* I, qui libère l'ORF complet de la BICP27 du vecteur recombinant pSV/BICP27. Afin de pouvoir réaliser plusieurs transfections, les plasmides pSVSport et pSV/BICP27, ont été produits en grandes quantités (voir section 1.1.1).

1.3 Expression transitoire de la BICP27 dans des cellules eucaryotes

Afin de vérifier si le plasmide pSV/BICP27 exprime bien la protéine BICP27 dans des cellules de mammifères, une expression transitoire a été réalisée dans les cellules MDBK et les cellules cos-7. Les protéines cellulaires ont ensuite été fractionnées sur un gel de polyacrylamide-SDS, électrotransférées sur une membrane de difluorure de polyvinylène (PVDF, Bio-Rad) puis immunodétectées avec un sérum anti-BICP27.

Cent mille cellules contenues dans 5 mL de milieu DMEM contenant 10% SBF ont d'abord étéensemencées dans des plats de Pétri à culture cellulaire de 60 mm de diamètre. Le dénombrement des cellules avait préalablement été déterminé au microscope à l'aide d'un hémacytomètre (Brigh-Line, American Optical, Buffalo, NY, É-U). Lorsque les plateaux ont atteints 60 à 90% de confluence, ou après environ 24 heures, les cellules ont été transfectées avec le plasmide pSVSport ou pSV/BICP27. Pour ce faire, de 15 à 20 μg de plasmide ont été dilués dans 379 μL de HEBS (140 mM NaCl, 0,75 mM NaH_2PO_4 , 25 mM acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique (Hepes) pH 7,1) puis précipités en y ajoutant 21 μL de CaCl_2 2,5 M tout en mélangeant doucement. Le mélange a ensuite été incubé à la température de la pièce durant 15 minutes. Par la suite, le milieu de culture des cellules a été enlevé des plateaux et l'ADN précipité ajouté goutte à goutte sur le feuillet cellulaire. Les plats de Pétri ont été incubés à 37°C dans un incubateur à CO_2

durant 30 minutes puis 4 mL de milieu DMEM contenant 10% SBF ont été ajoutés. L'incubation à 37°C a été prolongée de 4 à 8 heures. Un choc au sulfoxyde de diméthyle (DMSO, J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N. J., É-U) a ensuite été réalisé afin d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire. Les cellules ont d'abord été lavées avec du milieu DMEM sans sérum puis incubées durant 4 minutes en présence de 30% (v/v) de DMSO préparé dans du HEBS. Le DMSO étant très toxique pour les cellules, ces dernières ont ensuite été lavées deux fois avec du milieu DMEM sans sérum. Après l'addition de 4 mL de DMEM contenant 10% SBF, les cellules ont été incubées à 37°C jusqu'à 24 ou 48 heures post-transfection.

Au moment de la récolte, les cellules ont d'abord été lavées avec du tampon salin phosphaté (PBS) 1X pour ensuite être récoltées dans 1 mL de PBS à l'aide d'un râteau ("Cell Scraper", Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, É-U) et transférées dans un microtube de 1,5 mL. Par la suite, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 1 000 rpm durant 10 minutes et lysées dans 30 µL de tampon protéine 1X (40 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycérol, 2% β-mercaptoéthanol, 2% SDS et 0,01% de bromophénol bleu).

1.3.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, transfert de type Western et immunoempreinte de la BICP27

Un gel de 10% polyacrylamide de 9X8 cm a été préparé en utilisant l'appareil "mini protean" pour électrophorèse de gels de polyacrylamide de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, É-U). Les échantillons protéiques ont été bouillis durant 3 minutes avant d'être déposés à l'aide d'une seringue Hamilton. Les protéines ont été fractionnées à 80 volts durant 2 heures dans un tampon d'électrode composé de 25 mM Trizma base, 192 mM glycine et 0,1% (p/v) SDS. Suite à l'électrophorèse, les protéines fractionnées ont été transférées sur une membrane PVDF préalablement activée par trempage dans du méthanol, à l'aide de l'appareil "Trans-Blot Cell" de Bio-Rad. L'électrotransfert a été effectué à 50 volts dans un tampon composé de 80% de tampon

d'électrode ci-haut et de 20% de méthanol durant 90 minutes ou 3 heures pour les gels de 0,75 mm et 1,5 mm d'épaisseur respectivement.

Par la suite, la BICP27 a été détectée par immunoempreinte. La membrane a d'abord été incubée dans une solution de blocage composée de 1,5% (p/v) de BSA dans du TBS (tampon Tris-salin: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,01% (p/v) merthiolate de sodium) durant 16 heures, avec agitation et à la température de la pièce, afin d'en bloquer les sites de liaison non spécifiques. La membrane a ensuite été incubée durant 90 minutes dans du TBS contenant 0,05% de Tween-20 (TBS-T 0,05%) et un sérum spécifique dirigé contre la BICP27 (Chalifour *et al.*, 1996) dilué 1/1 000. La membrane a été lavée six fois 5 minutes dans du TBS-T 0,2% puis les complexes anticorps:BICP27 ont été détectés par incubation avec une dilution 1/2 000 d'un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Organon Teknika Corporation, Durham, NC, É-U) préparée dans du TBS-T 0,05%. La membrane a été relavée six fois 5 minutes dans du TBS-T 0,2% avant de procéder à la révélation dans 30 mL de TBS contenant 7,5 mg de 3,3'-diaminobenzidine hypochloride (DAB, Bio-Rad) et 0,03% de peroxyde d'hydrogène. La réaction a été arrêtée en lavant la membrane dans de l'eau distillée. Les résultats obtenus démontrant l'expression effective de la BICP27 native dans les cellules transfectées, les co-transfections transitoires des cellules cos-7 avec les cosmides représentant tout le génome viral et le plasmide pSVSport ou pSV/BICP27 pouvaient être effectuées pour tenter d'identifier les transcrits potentiellement transactivés par la BICP27. Auparavant toutefois, afin d'obtenir un essai témoin positif de notre stratégie, nous avons procédé au clonage de l'ORF complet d'un transactivateur connu du BHV-1, la BTIF.

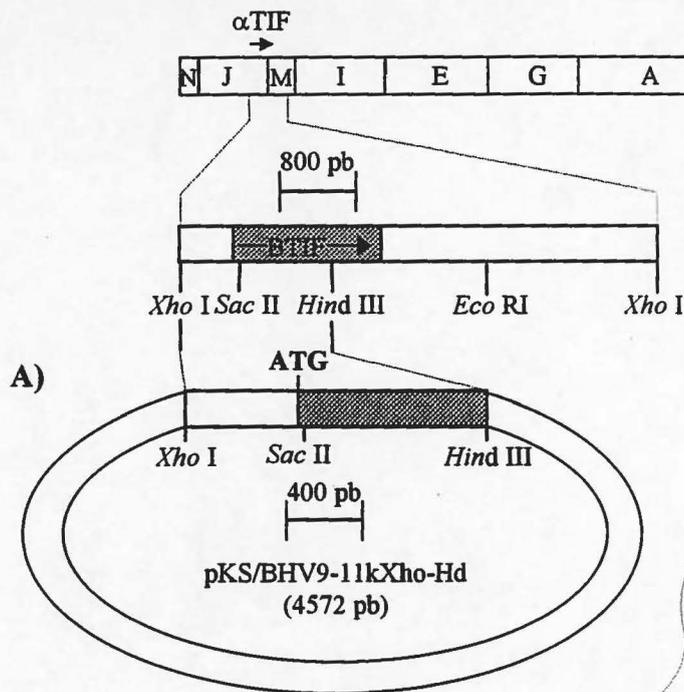
1.4 Construction des plasmides pET28a/BTIF334 et pET28a/BTIF505 et développement d'un sérum monospécifique contre la BTIF

Le cadre de lecture de la BTIF est situé aux positions 10 275 → 11 792 du génome BHV-1, à la jonction des fragments *Hind* III J et M (figure 5). Un sous-clonage a d'abord

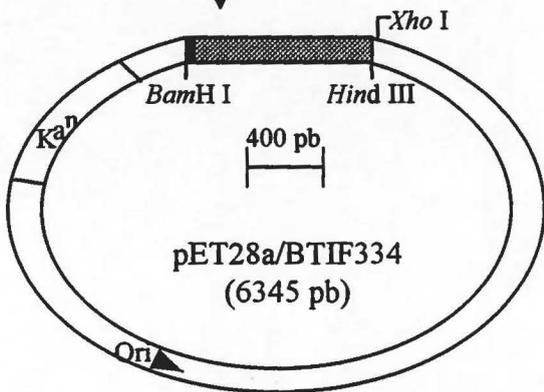
Figure 5 Construction des vecteurs procaryotiques exprimant la BTIF du BHV-1 (pET28a/BTIF334 et pET28a/BTIF505)

La séquence codante de la BTIF est située à la jonction des fragments *Hind* III J et M du génome du BHV-1. A) Le plasmide pKS/BHV9-11kXho-Hd comportant la région codant les 334 premiers acides aminés de la BTIF a d'abord été construit en insérant le fragment *Xho* I-*Hind* III de pKS/Jhd dans les sites *Xho* I-*Hind* III du vecteur pKS. Comme le montre la figure, un site unique *Sac* II est situé près du codon d'initiation de l'ORF et a été utilisé pour liguer un adaptateur *Bam* HI encodant les 7 premiers codons et générant des extrémités cohésives *Sac* II. Après digestion avec *Bam* HI et *Hind* III, le fragment de 1 kpb obtenu, encodant les 334 premiers acides aminés de la BTIF, a été inséré dans pET28a préalablement digéré par les mêmes enzymes, générant ainsi le recombinant pET28a/BTIF334. B) Le vecteur recombinant pET28a/BTIF505 codant l'ORF complet de la BTIF a été obtenu en insérant le fragment *Hind* III-*Xho* I de pKS/Mhd dans les mêmes sites de restriction du vecteur pET28a/BTIF334. Kan et Ori représentent respectivement le gène de résistance à la kanamycine et l'origine de réplication des vecteurs.

Carte *Hind* III du génome BHV-1

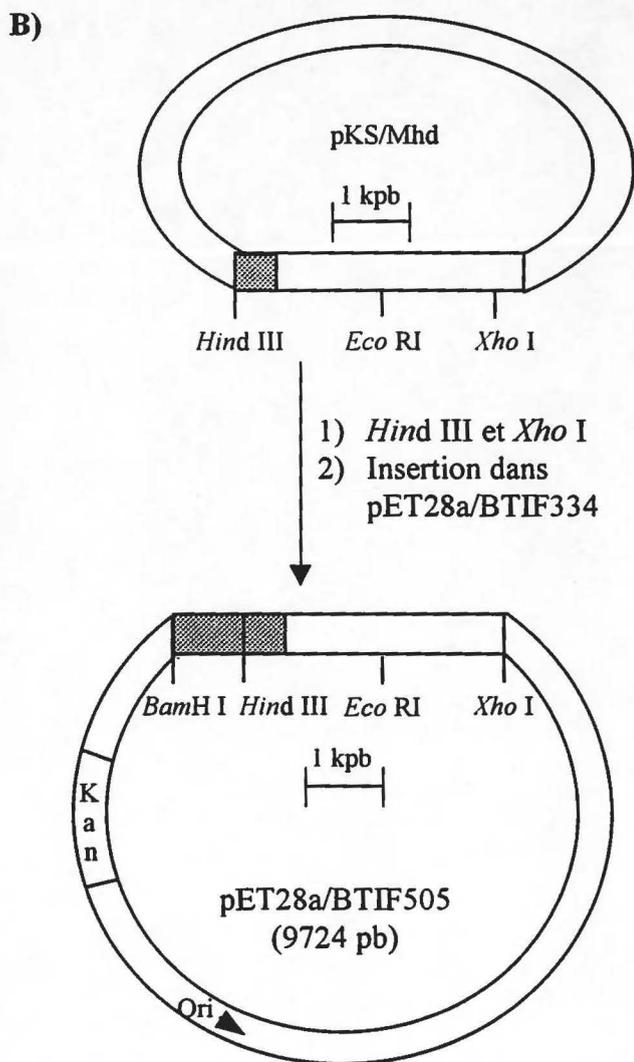


- 1) *Sac* II
- 2) Ligation avec oligo BTIF
- 3) *Bam* HI et *Hind* III
- 4) Purification du fragment de 1 kpb
- 5) Insertion dans pET28a



■ oligo BTIF *Bam* HI

5'GGTTTTTATGCGCCCGCTCATGGATCCATGA
GCGGGCGCATAAAAACCGC-3'



été réalisé à partir du clone pKS/Jhd représentant le fragment J. Une double digestion de ce plasmide a été réalisée avec les enzymes de restriction *Xho* I et *Hind* III. Le fragment de 1 608 pb obtenu (région 9 663 à 11 270 du génome) a ensuite été inséré dans le vecteur pKS préalablement digéré par les mêmes enzymes. Le recombinant obtenu, pKS/BHV-9-11k*Xho*-*Hd* encodant les acides aminés 1 à 334 de l'ORF de la BTIF, a ensuite été digéré par *Sac* II (position 10 297 du génome) afin d'y liguer un adaptateur *Bam* HI encodant les acides aminés 1 à 7 et générant des extrémités cohésives *Sac* II (5' -GGTTTTTATGCGCCCGCTCATGGATCCATGAGCGGGCGCATAAAAACCGC-3'). Environ 300 picomoles de l'adaptateur ont été phosphorylés à 37°C durant une heure dans un volume total de 20 µL dans un microtube de 0,45 mL contenant 2 µL de tampon kinase 10X (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT et 10 mM ATP) et 1 µL de T4 polynucléotide kinase (9,5 U/µL de Pharmacia). L'enzyme a ensuite été dénaturée à 65°C durant 10 minutes et l'oligonucléotide phosphorylé a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation. Par la suite, le plasmide pKS/BHV-9-11k*Xho*-*Hd* digéré par *Sac* II a été ligué à l'adaptateur phosphorylé tel que décrit à la section 1.2. Les molécules recombinantes ont ensuite été digérées par *Bam* HI et *Hind* III puis fractionnées sur un gel d'agarose. Le fragment de 1 kpb obtenu, représentant les 334 premiers acides aminés de la BTIF, a été purifié puis cloné dans les sites *Bam* HI et *Hind* III du vecteur pET28a (Novagen, Madison, WI, É-U). Ce vecteur permet l'expression d'un polypeptide en fusion avec le peptide T7-Tag, pour lequel un anticorps monoclonal spécifique est disponible commercialement ce qui permettra ultérieurement d'identifier le polypeptide de fusion par immunoempreinte. Après transformation de *E. coli* XL1-Blue et étalement des cellules sur des plats de Pétri LB-agar contenant 30 µg/mL de kanamycine, des mini-préparations d'ADN plasmidique de cultures bactériennes ensemencées avec des colonies isolées ont été réalisées afin de sélectionner les recombinants pET28a/BTIF334. Par la suite, quelques plasmides recombinants ont servi à transformer des cellules de *E. coli* BL21. Des mini-préparations d'ADN plasmidique ont finalement été réalisées pour sélectionner les recombinants puis une cinétique d'induction à l'IPTG a été effectuée afin d'exprimer la protéine recombinante chez *E. coli*.

1.4.1 Cinétique d'induction à l'IPTG

Deux mL de LB contenant 60 µg de kanamycine ont étéensemencés avec une colonie isolée d'un recombinant pET28a/BTIF334 de *E. coli* BL21 puis incubés à 37°C avec agitation durant 16 heures. Par la suite, 0,2 mL de cette préculture a servi à ensemencer 20 mL de milieu LB contenant 30 µg/mL de kanamycine et la culture a été réincubée à 37°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0,6 à 600 nm. Juste avant d'ajouter 80 µL de 100 mM IPTG à la culture, 1 mL de culture a été prélevé et congelé à -20°C (ce qui correspond au temps 0 de l'induction). Suite à l'induction, des aliquotes de 1 mL de culture ont été prélevées à toutes les heures durant 5 heures. Les cultures congelées ont été dégelées et les cellules récoltées par centrifugation à 3 500 rpm durant 5 minutes puis resuspendues dans 100 µL de TEN (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) contenant 1 mg/mL de lysozyme. Les cellules bactériennes ont été lysées par trois cycles d'ultrasons de 30 secondes à vitesse maximale. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 2 000 rpm durant 8 minutes et les protéines solubles contenues dans les surnageants ont été transférées dans un autre microtube afin de les séparer des protéines insolubles contenues dans les culots. Le volume des surnageants a été mesuré et un même volume de TEN a été ajouté aux culots. Du tampon protéine 5X a été ajouté à chacun des échantillons de façon à obtenir une concentration 1X finale. Afin d'analyser les échantillons, un gel de polyacrylamide-SDS 9X8 cm a été réalisé tel que décrit à la section 1.3.1. Après la migration, le gel a été coloré dans une solution de bleu de coomassie (30% méthanol, 10% d'acide acétique et 0,1% de bleu de coomassie) durant une heure, décoloré dans une solution de fixation (30% méthanol, 10% acide acétique) durant 16 heures puis séché sur un papier Whatman 3 MM à l'aide d'un sécheur de gel Bio-Rad à 80°C durant 90 minutes.

En parallèle, l'ORF complet de la BTIF a été cloné dans le vecteur pET28a. Tout d'abord, le recombinant pET28a/BTIF334 a été digéré par *Hind* III et *Xho* I et le fragment généré de 6 330 pb a été purifié en gel d'agarose pour ensuite y insérer le fragment *Hind* III-*Xho* I de 3 394 pb obtenu par digestion de pKS/Mhd, permettant ainsi de générer

un recombinant encodant l'ORF complet de la BTIF, pET28a/BTIF505. Après transformation de *E. coli* BL21, une cinétique d'induction a été effectuée tel que décrit ci-haut. Les protéines recombinantes T7-Tag/BTIF334 et T7-Tag/BTIF505 ont été analysées sur un gel de polyacrylamide-SDS et immunodétectées avec l'anticorps monoclonal commercial anti-T7-Tag (Novagen) (dilution 1/5 000) afin de confirmer leur identité (voir procédure à la section 1.3.1).

1.4.2 Développement d'un sérum anti-BTIF

Afin de produire un sérum polyclonal monospécifique, une grande quantité de protéine doit être produite et purifiée. Suite à une cinétique d'induction à l'IPTG, le temps optimal de production de la protéine T7-Tag/BTIF334 a été déterminé et une induction préparative a ensuite été réalisée. Dix mL de LB contenant 300 µg de kanamycine ont étéensemencés avec une colonie isolée du recombinant pET28a/BTIF334 de *E. coli* BL21 puis incubés à 37°C durant 16 heures. Par la suite, 100 mL de LB contenant 3 mg de kanamycine ont étéensemencés avec 2 mL de préculture et incubés à 37°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0,6 à 600 nm. À ce moment, une aliquote de 1 mL, représentant le témoin non induit (T=0) a été récolté et congelé à -20°C. Par la suite, 400 µL de 100 mM IPTG ont été ajoutés à la culture et l'incubation poursuivie jusqu'au temps optimal d'induction, soit 5 heures. La culture a ensuite été transférée dans une bouteille de 250 mL, centrifugée à 4 000 rpm durant 10 minutes et le culot lavé avec 20 mL de STE-glycérol. Suite à une centrifugation à 8 000 rpm à 4°C durant 10 minutes, le surnageant a été retiré puis le culot congelé à -20°C. Deux cycles de congélation-décongélation ont ensuite été effectués. Le culot a alors été resuspendu dans 13 mL de TEN, puis la suspension transférée dans un tube de 50 mL. Un volume de 250 µL de lysozyme à 100 mg/mL a été ajouté suivi d'une incubation de 2 heures à la température de la pièce. Quatre cycles d'ultrasons de 30 secondes ont été effectués tout en gardant le lysat de cellules bactériennes sur glace, puis le lysat a été centrifugé à 4 000 rpm durant 15 minutes et le culot #1 conservé. Le surnageant a été recentrifugé à 7 500 rpm durant 10 minutes puis le surnageant #1 a été congelé et le culot #2 conservé. Les culots #1 et #2 ont été

resuspendus séparément dans 5 mL de TEN contenant 0,1% de déoxycholate. Par la suite, 80 μ L de 1 M $MgCl_2$ et 7 μ L de DNase (7,5 mg/mL) ont été ajoutés à chacun des tubes et les mélanges incubés à 37°C durant une heure. Après centrifugation à 10 000 rpm durant 15 minutes, les surnageants ont été regroupés et congelés (surnageant #2). Les 2 culots ont été resuspendus séparément dans 5 mL de TEN contenant 1% de NP40 et les suspensions mélangées jusqu'à homogénéité. Une dernière centrifugation a été réalisée à 10 000 rpm durant 15 minutes et les surnageants ont été regroupés et congelés (surnageant #3). Les culots #1 et #2 résultants ont été resuspendus dans 5 mL de TEN et congelés à -20°C. Suite à l'ajout de 0,2 volume de tampon protéine 5X, une aliquote de chaque fraction protéique (surnageants #1 à 3 et culots #1 et 2) a été analysée sur un gel de polyacrylamide-SDS (section 1.3.1). La fraction protéique contenant la plus grande quantité de protéine T7-Tag/BTIF334 a ainsi pu être déterminée suite à la coloration du gel au bleu de coomassie. Un gel préparatif de polyacrylamide-SDS de cette fraction a ensuite été réalisé sur l'appareil « protein II » de Bio-Rad.

Les bordures du gel ont ensuite été colorées au bleu de coomassie afin de localiser la protéine à purifier puis la bande correspondante dans la portion centrale du gel (non coloré) a été découpée et broyée de façon mécanique en la passant à plusieurs reprises dans différentes aiguilles (de 18G à 22G) à l'aide d'une seringue de 5 mL et de PBS 1X. La quantité de protéine T7-Tag/BTIF334 purifiée a été évaluée empiriquement en faisant migrer une aliquote sur un gel de protéines en parallèle avec différentes quantités connues de BSA. L'intensité des bandes protéiques obtenues suite à la coloration du gel au bleu de coomassie a été comparée pour évaluer la concentration de l'échantillon.

La protéine de fusion T7-Tag/BTIF334 purifiée a finalement été utilisée pour immuniser sept souris femelles BALB/c. Au jour 0, les sérums pré-immuns ont été prélevés par une saignée sous oculaire. Aux jours 1, 17 et 32 chacune des souris a été immunisée par injection intra-péritonéale avec 25 à 50 μ g de protéines recombinantes. Aux jours 15 et 49, des sérums immuns ont été prélevés par une saignée sous oculaire. Les souris ont toutes été sacrifiées au jour 51 et les sérums récoltés. Les sérums des différentes souris ont

été comparés par immunoempreintes des corps d'inclusion de *E. coli*, en parallèle avec des lysats de cellules MDBK infectées avec le BHV-1 pour différents temps. Ces essais ont permis de confirmer que les sérums sont spécifiques à la BTIF.

1.5 Construction du vecteur eucaryotique exprimant la BTIF

Afin de pouvoir exprimer la BTIF dans des cellules de mammifères, la séquence codante complète a été clonée dans le vecteur eucaryotique pSVSport. Le fragment représentant l'ORF complet de la BTIF a été obtenu par digestion de pET28a/BTIF505 avec *Bam* HI et *Eco* RI (figure 5). Les extrémités cohésives générées ont ensuite été traitées avec la Klenow afin de les rendre franches. Pour ce faire, l'ADN a d'abord été précipité à -20°C durant 2 heures suite à l'addition de 1/2 volume de 7,5 M NH₄OAc et de 2,2 volumes d'éthanol 95%. Après centrifugation, le culot séché a été dissous dans 41,5 µL d'eau stérile puis 5 µL de tampon Klenow 10X (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 2,5 µL de 10 mM dNTP et 1 µL de Klenow (10-15 U) ont été ajoutés. Le milieu réactionnel a été incubé à la température de la pièce durant 20 minutes puis l'ADN reprécipité une première fois avec ½ volume de 7,5 M NH₄OAc et 2,2 volumes d'éthanol 95% et une deuxième fois avec 1/10 volume de 3 M NaOAc pH 5,0 et 2,2 volumes d'éthanol 95%. L'ADN a finalement été lavé à l'éthanol 70%, redissous dans de l'H₂O stérile, fractionné sur un gel d'agarose puis le fragment de 2 642 pb représentant l'ORF complet de la BTIF a été purifié à l'aide de la trousse Sephaglas, Band Prep de Pharmacia.

1.5.1 Préparation du vecteur pSVSport: déphosphorylation des extrémités 5' franches

Le vecteur pSVSport (3 159 pb) a d'abord été complètement digéré par *Sma* I dans un volume final de 100 µL puis un volume de 100 mM Tris-HCl pH 8,0 a été ajouté. Pour la déphosphorylation, comme les extrémités générées par l'enzyme sont franches, l'ADN a d'abord été dénaturé à 95°C durant 4 minutes, puis rapidement refroidi dans un bain d'eau glacée durant 4 minutes. Cinquante U de la phosphatase bactérienne alcaline

(BAP, Gibco/BRL) ont alors été ajoutées et le mélange incubé à 65°C durant une heure. L'ADN a été redénaturé, 50 U d'enzyme ont été ajoutées et une deuxième incubation a été effectuée à 37°C durant 30 minutes puis à 65°C durant 30 minutes. Cette dernière étape a été répétée une autre fois. Le mélange a été extrait une fois au phénol et une deuxième fois au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1). La phase aqueuse a été transférée dans un tube propre puis extraite deux fois avec 2 volumes d'éther diéthylique saturé d'eau. L'ADN a été précipité deux fois à -20°C durant 2 heures ou plus, suite à l'addition de 0,1 volume de 3 M NaOAc pH 5,0 et de 2,2 volumes d'éthanol 95%, centrifugé, lavé à l'éthanol 70%, redissous dans de l'H₂O stérile, puis analysé en gel d'agarose pour estimer sa concentration. Finalement, le vecteur a été ligué avec le fragment purifié de 2 642 pb codant la BTIF et les molécules recombinantes utilisées pour transformer des cellules compétentes de *E. coli* XL1-Blue. Des mini-préparations d'ADN plasmidique de cultures ensemencées avec des colonies recombinantes isolées ont été réalisées afin de sélectionner les recombinants. Les clones contenant l'insertion BTIF dans la bonne orientation par rapport au promoteur SV40 du plasmide ont été discriminés par digestion avec l'enzyme de restriction *Hind* III.

1.5.2 Expression transitoire de la BTIF dans des cellules eucaryotes

Afin de vérifier si la BTIF est bien exprimée dans les cellules cos-7, une transfection transitoire a été effectuée dans les conditions décrites précédemment (section 1.3). Les lysats des cellules récoltées à 24, 48 et 72 heures post-transfection ont été fractionnés sur un gel de polyacrylamide-SDS, transférés sur une membrane PVDF puis immunodétectés avec le sérum produit contre la BTIF (section 1.3.1). Les lysats protéiques ont démontré l'expression maximale d'une protéine de grosseur attendue, dans les cellules transfectées avec le vecteur recombinant pSV/BTIF et récoltées 72 heures post-transfection.

1.6 Analyse des transcrits transactivés

1.6.1 Co-transfection transitoire et récolte des ARNs totaux

Les cellules cos-7 ont été transfectées tel que décrit précédemment (section 1.3) avec 10 μg de pSVSport ou de pSV/BICP27 et 5 μg de l'un des cinq cosmides de l'isomère II du BHV-1 (N4, i15, K2, K9, L9), puis récoltées (24 et 48 heures post-transfection) dans 1 mL de PBS. Pour vérifier que la BICP27 avait bel et bien été exprimée, 20% de la suspension cellulaire a été centrifugée à 1 000 rpm durant 5 minutes et les cellules lysées dans du tampon protéine 1X. Les lysats ont ensuite été fractionnés sur un gel de polyacrylamide-SDS puis analysés par immunoempreinte à l'aide du sérum anti-BICP27. Le restant des cellules (80%) a été utilisé pour isoler les ARNs totaux. Pour ce faire, la suspension cellulaire a été centrifugée à 1 000 rpm durant 5 minutes, 300 μL de trizol (Gibco BRL) ont été ajoutés au culot et le lysat incubé à la température de la pièce durant 5 minutes. Le mélange a ensuite été extrait suite à l'addition de 60 μL de chloroforme, puis les ARNs précipités par l'addition de 150 μL d'isopropanol suivi d'une incubation à la température de la pièce durant 10 minutes. Les ARNs ont été récoltés par centrifugation à 10 000 rpm durant 10 minutes, lavés à l'éthanol 70%, dissous dans 100 μL d' H_2O préalablement traitée au diéthylpyrocarbonate ($\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$) puis dosés au spectrophotomètre selon la relation: $1 \text{ D.O.}_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g}/\text{mL}$. Enfin, les ARNs ont été reprécipités par l'addition de 0,1 volume de 3 M KOAc pH 5,0 et de 2,2 volumes d'éthanol 95% pour être conservés à -20°C . Des expériences témoins ont été similairement réalisées en utilisant le plasmide pSV/BTIF505.

1.6.2 Électrophorèse dénaturante des ARNs et transferts de type Northern

Les ARNs conservés dans l'éthanol à -20°C ont été récoltés par centrifugation à 10 000 rpm durant 8 minutes. Les culots obtenus ont été lavés à l'éthanol 70% et redissous dans 20 μL de tampon phosphate (40 mM NaH_2PO_4 pH 7,1 et 6 mM MgCl_2) préalablement traité au DEPC. L'ADN contaminant a été éliminé par digestion à 37°C

durant 15 minutes suite à l'addition de 0,5 μL de DNase libre de RNase (7,5 U/ μL) (Pharmacia). Les ARNs ont ensuite été reprécipités à -20°C durant 16 heures suite à l'addition de 0,1 volume de 3 M KOAc pH 5,0 et de 2,2 volumes d'éthanol 95%. Les ARNs ont été récoltés par centrifugation à 10 000 rpm pendant 8 minutes, lavés à l'éthanol 70% et redissous dans de l' $\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$ à 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, selon les dosages obtenus auparavant. Quinze μg d'ARN ont été dénaturés à 50°C durant une heure dans un volume total de 20 μL de 1 M glyoxal (Sigma, St-Louis, MO, É-U) préalablement déionisé à l'aide de résine AG501-X8 (Sigma), 50% DMSO et 10 mM NaH_2PO_4 pH 7,1. Suite à l'incubation, les échantillons ont été directement déposés dans les puits d'un gel d'agarose 1,5% (de 11X14 cm) préalablement traité au DEPC. L'électrophorèse a été effectuée à 70 volts durant 4 heures avec recirculation du tampon d'électrode (10 mM NaH_2PO_4 pH 7,1) dans un appareil à électrophorèse (modèle H5; Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, É-U). Les puits contenant le standard d'ARN de 0,24 à 9,5 kb (Gibco BRL) et les échantillons témoins ont été découpés du gel, colorés durant une heure dans 30 μg d'acridine orange/mL de tampon d'électrode, décolorés dans le tampon d'électrode à 4°C durant environ 16 heures, puis photographiés sur un transilluminateur U.V., à côté d'une règle fluorescente en utilisant un film Polaroid 667. Les ARNs des autres puits du gel ont été transférés sur une membrane de nylon. Pour ce faire, le gel a été déposé sur deux papiers Whatman 3 MM de même dimension, lesquels étaient placés sur une pile de papiers absorbants contenus dans un plat et immergés dans du 20X SSC. Un papier "saran wrap" a été déposé tout autour du gel pour confiner la capillarité du tampon à travers le gel. Une membrane de nylon (MSI) puis deux papiers Whatman 3 MM de mêmes dimensions que le gel à transférer, ont ensuite été déposés sur le gel. Enfin, le montage a été complété par une pile de papier absorbant sec, d'une plaque de verre et d'un poids d'environ 500 g. Le transfert de type Northern a été effectué à la température de la pièce durant environ 20 heures. La membrane de nylon a été récupérée suite à l'identification des puits du gel. Après avoir été séchée à l'air, la membrane a été irradiée 5 minutes sur un transilluminateur U.V. et incubée à 80°C durant 2 heures dans un four à vide afin d'effectuer la fixation covalente et la déglyoxylation des ARNs.

1.6.3 Hybridation de type Northern

Pour détecter les transcrits potentiellement transactivés par la BICP27, 250 ng de l'ADN viral purifié du BHV-1 ou 500 ng de chacun des cosmides (N4, i15, K2, K9 et L9) préalablement digérés par *Hind* III, ont été marqués au ^{32}P selon le protocole décrit à la section 1.1.3. La membrane d'un transfert de type Northern a été préhybridée à 42°C durant 16 heures dans 50 mL de 50% formamide, 5X SSC, 1X Denhardt's, 0,5 mg/mL d'ADN de sperme de saumon et 0,05% DEPC. Au moment de l'hybridation, cette solution a été remplacée par 50 mL de 50% formamide, 5X SSC, 0,1% SDS, 0,05% DEPC additionné de la sonde neutralisée et l'incubation à 42°C a été poursuivie durant 48 heures. La membrane a ensuite été lavée deux fois dans 50 mL de 2X SSC, 0,1% SDS à la température de la pièce durant 10 minutes, deux fois dans 50 mL de 0,2X SSC, 0,1% SDS à la température de la pièce durant 30 minutes et deux fois dans 50 mL de 0,2X SSC, 0,1% SDS à 42°C durant 15 minutes. Un dernier lavage a été effectué dans 50 mL de 0,1X SSC, 0,1% SDS à 68°C durant un temps variable, dépendant du signal obtenu avec le compteur Geiger. La membrane a ensuite été exposée sur un film à rayons X (X-OMAT AR de Kodak) avec ou sans écran intensifiant selon l'intensité voulue.

2. Développement d'outils pour la construction d'un mutant BHV-1/BICP27

Pour déterminer si le rôle de la BICP27 dans la réplication virale du BHV-1 est aussi important que celui de son homologue chez le HSV-1, il est nécessaire de créer un mutant de délétion BICP27 afin de permettre l'analyse des conséquences de cette mutation dans la réplication du virus. La création d'un tel mutant requiert un plasmide de transfert et une lignée de complémentation. La co-transfection de cellules hôtes du BHV-1 par un plasmide de transfert et l'ADN du BHV-1 permet d'obtenir un mutant BHV-1/BICP27 par recombinaison homologue.

2.1 Développement d'une lignée stable MDBK/BICP27⁺

2.1.1 Co-transfection de cellules MDBK avec pSV/BICP27 et pSV2neo ou pSV3neo

Pour développer une lignée de complémentation stable exprimant la BICP27 et pouvant ainsi supporter la réplication d'un mutant BHV-1/BICP27/ β -gal⁺, les plasmides pSV/BICP27 et soit pSV2neo ou pSV3neo ont été utilisés. Ainsi, pSV/BICP27 portait le gène encodant la BICP27, tandis que les plasmides pSV2neo et pSV3neo fournissaient un marqueur de sélection eucaryotique, soit le gène de résistance à la néomycine. Pour optimiser la sélection de cellules MDBK doublement transfectées, un rapport molaire de 30:1 en faveur de pSV/BICP27 a été utilisé, soit 15 μ g de pSV/BICP27 versus 0,5 μ g de pSV2neo ou de pSV3neo. Par ailleurs, pour favoriser l'intégration des plasmides dans l'ADN chromosomique des cellules transfectées, des essais ont été réalisés avec les ADNs plasmidiques préalablement linéarisés par digestion avec *Sca* I, enzyme ne comportant qu'un site unique au niveau du gène de résistance à l'ampicilline des trois plasmides. Des cellules MDBK ont été co-transfectées avec les plasmides correspondants en utilisant les conditions décrites à la section 1.3. Les cellules ont été trypsinées 24 heures post-transfection puis ensemencées dans des plats de Pétri de 150 mm de diamètre à raison de 3 000 (plasmides circulaires) ou de 300 000 cellules (plasmides linéarisés). Un mg/mL de généticine (G418, Gibco BRL) a ensuite été ajouté au milieu de culture afin de créer une

pression sélective, puis les cellules incubées à 37°C en présence de 5% CO₂. Le milieu de culture a par la suite été renouvelé à tous les deux jours, jusqu'à l'obtention de colonies résistantes à la drogue. Les colonies individuelles ont ensuite été clonées par trypsination en utilisant des anneaux de clonage, puisensemencées individuellement dans un puits d'un plateau à 12 puits. Après quelques jours de croissance cellulaire, toujours sous pression sélective, les cellules des puits confluents ont été trypsinées etensemencées dans 2 puits d'un plateau à 6 puits. À l'atteinte de la confluence, les cellules d'un des deux puits ont été trypsinées puis lysées dans du tampon protéine 1X. L'expression de la BICP27 a alors été vérifiée en analysant les lysats par une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS suivi d'une immunoempreinte avec le sérum anti-BICP27 (section 1.3.1).

2.1.2 Inductibilité du promoteur d'expression eucaryotique pRetroTetOff

En parallèle à ces études, des essais avec un plasmide comportant un promoteur eucaryotique inductible ont été réalisés. De cette manière, un autre système pour le développement d'une lignée cellulaire MDBK/BICP27⁺ serait prêt dans le cas où l'expression de la BICP27 serait trop faible ou que la BICP27 serait toxique pour les cellules MDBK. Pour tester l'efficacité d'un promoteur inductible à la doxycycline dans les cellules MDBK, le système pRetroTetOffLuc (Clontech, Palo Alto, CA, É-U) codant la luciférase sous le contrôle du promoteur inductible a été utilisé. Des cellules MDBK (permissives au BHV-1) et HeLa (témoin positif pour l'essai luciférase) ont étéensemencées dans deux plats de Pétri de 60 mm de diamètre et transfectées avec 15 µg de pRetroTetOff ou de pRetroTetOffLuc dans les conditions décrites à la section 1.3, excepté que lors de l'ajout du milieu DMEM, le milieu était supplémenté avec 200 ng/mL de doxycycline afin de rendre silencieux l'expression du gène rapporteur. Le lendemain de la transfection, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS sans calcium ni magnésium, récoltées par grattage puis subdivisées dans 8 puits d'un plateau de 12 puits. Dans 4 des 8 puits, la doxycycline a été ajoutée à une concentration finale de 200 ng/mL. Après 12, 24, 48 et 72 heures, les cellules de 2 puits avec ou sans doxycycline ont été lavées deux fois avec du PBS puis lysées dans 50 µL de tampon de lyse (Cell Culture Lysis Reagent, CCLR

1X, Promega, Madison, WI, É-U) préalablement équilibré dans un bain d'eau à 25°C durant une heure. Les lysats ont ensuite été grattés, transférés dans un microtube de 1,5 mL, centrifugés à vitesse maximale durant 5 secondes puis congelés à -70°C jusqu'à l'essai luciférase. Pour ce faire, le système "Luciferase assay system" (Promega) a été utilisé. Au préalable, les lysats cellulaires congelés, de même qu'un volume suffisant de réactif luciférase (LAR, "Luciferase Assay Reagent", Promega) ont été équilibrés dans un bain d'eau à 25°C durant une heure. Avant de procéder à l'essai proprement dit, les lysats ont été mélangés puis centrifugés à vitesse maximale de 5 à 10 secondes. Vingt µL de surnageant clarifié puis 100 µL de LAR ont été déposés au fond d'un tube à luminomètre et mélangés par pipettages répétés. Le tube a ensuite été rapidement inséré dans un luminomètre Lumat LB 9507 (EG & G Berthold) pour quantifier l'intensité des photons émis par la réaction.

2.2 Construction des plasmides de transfert pour la création de mutants BICP27

Pour la création d'un mutant par recombinaison homologue entre l'ADN viral et le plasmide de transfert, ce dernier doit contenir au moins 1 000 paires de bases des séquences bordantes du gène ciblé. De plus, pour distinguer un mutant d'un virus sauvage, un gène rapporteur est utilisé pour remplacer ou inactiver le gène cible dans le plasmide de transfert. Dans ce projet, le gène rapporteur utilisé est celui de la β -galactosidase. Dans notre laboratoire, la cassette β -gal bordée de sites *Hind* III est retrouvée dans le plasmide pEC10 gracieusement fourni par le Docteur Bello. Dans cette construction, le gène de la β -galactosidase est sous le contrôle du promoteur de la glycoprotéine B du BHV-1.

2.2.1 Construction du plasmide pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺

Les séquences codantes de la BICP27 sont situées aux positions (3') 1 661 ← 2 860 (5') du génome BHV-1, à la jonction des fragments *Hind* III N et J. Pour cette stratégie, les plasmides pKS/Nhd et pKS/Jhd disponibles dans notre laboratoire ont été utilisés. Un sous-clonage du fragment *Hind* III/*Bln* I de pKS/Jhd a d'abord été

réalisé dans le plasmide pKS/Nhd préalablement digéré par *Hind* III et *Xba* I, afin d'avoir l'ORF complet de la BICP27 et au moins 1 000 pb de ses séquences bordantes sur un même plasmide nommé pKS/NJ-BlnI (région 1 à 5 109 du génome; figure 6 A). Le gène de la BICP27 a ensuite été inactivé en insérant la cassette β -gal de pEC10 dans le seul site *Hind* III du plasmide pKS/NJ-BlnI (position 2 439 du génome) qui se retrouve dans l'ORF de la BICP27. La transformation a été réalisée dans des cellules bactériennes compétentes XL1-Blue et les cellules ont été étalées sur des plats de Pétri LB-agar contenant 50 μ g/mL d'ampicilline tel que décrit à la section 1.2.1. Des mini-préparations d'ADN plasmidique ont été réalisées afin de vérifier les colonies comportant le vecteur recombinant pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺.

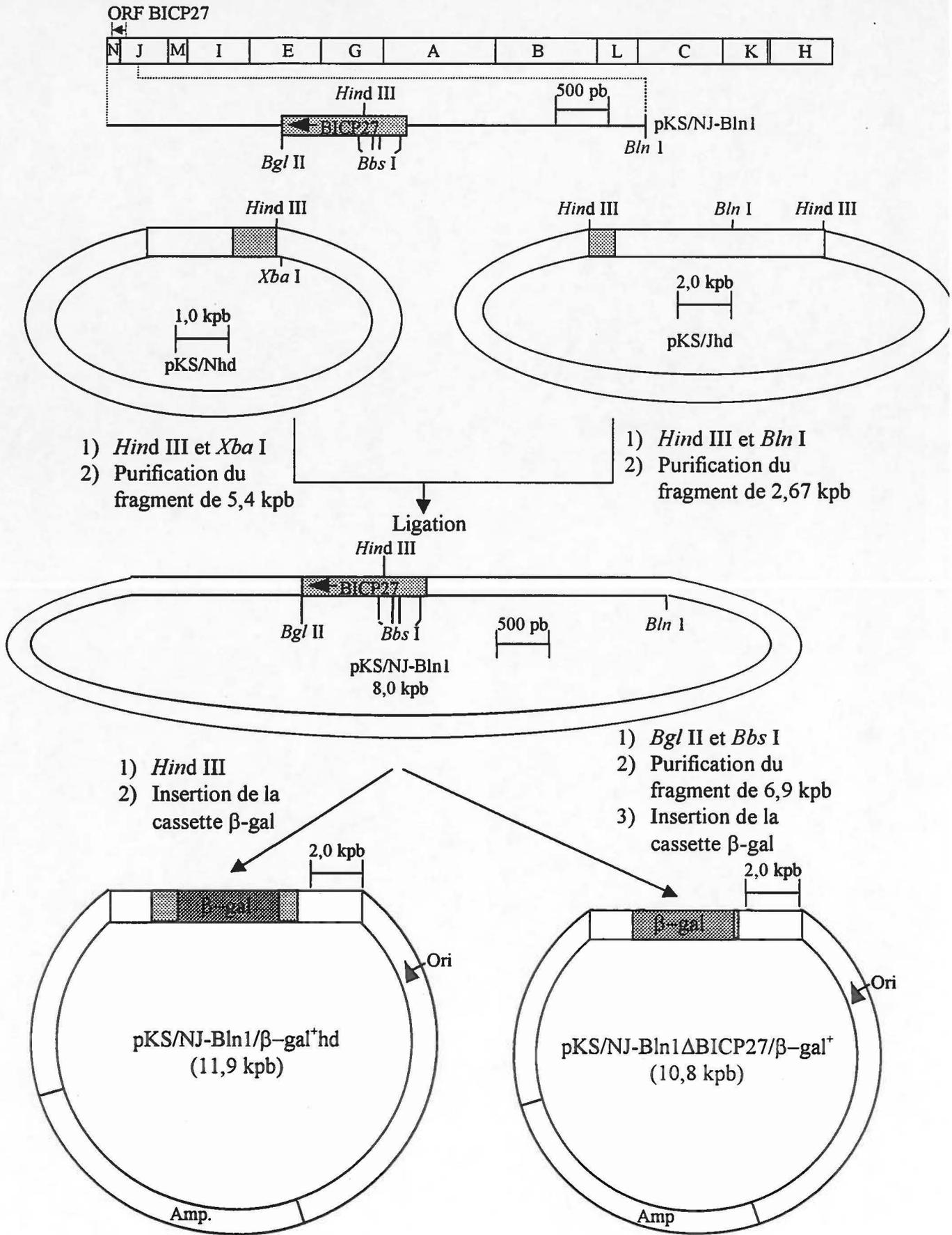
2.2.2 Construction du plasmide pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺

Pour éviter la réversion du mutant BHV-1/BICP27⁻, les chevauchements de séquence entre ce mutant et la lignée de complémentation (qui contient tout l'ORF de la BICP27) doivent être éliminés. Pour obtenir la construction pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺, dans laquelle 93% de l'ORF de la BICP27 ont été éliminés, le plasmide pKS/NJ-BlnI a été digéré par *Bgl* II (position 1 663 du génome) et *Bbs* I (positions 2 397, 2 509, 2 562 et 2 770 du génome dans pKS/NJ-BlnI; figure 6 B). Les extrémités du plasmide ont ensuite été traitées à la Klenow pour les rendre franches (section 1.5) puis déphosphorylées (section 1.5.1) afin d'éviter la recircularisation lors de la ligation. Le fragment résiduel de 6 900 pb a ensuite été purifié en gel d'agarose puis ligué avec le fragment *Hind* III de 3,88 kpb représentant la cassette β -gal et préalablement traité à la Klenow, pour créer le plasmide de transfert pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺. Après transformation de *E. coli* XL1-Blue, des mini-préparations d'ADN plasmidique ont été réalisées afin d'identifier les colonies comportant l'insertion désirée.

Figure 6 Construction des plasmides de transfert pKS/NJ-Bln1/ β -gal⁺ et pKS/NJ-Bln1 Δ BICP27/ β -gal⁺

Le plasmide pKS/NJ-Bln1, portant l'ORF complet de la BICP27 flanqué de chaque côté d'au moins 1000 pb de séquences bordantes du gène, a d'abord été construit en insérant le fragment *Hind* III/*Bln* I de pKS/Jhd dans les sites *Hind* III-*Xba* I de pKS/Nhd. Tel qu'illustré sur la figure, le plasmide pKS/NJ-Bln I contient un site unique *Hind* III, situé au centre de l'ORF BICP27, qui a été utilisé pour inactiver le gène en y insérant une cassette β -gal, créant ainsi le plasmide pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺hd. Le plasmide de transfert pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺ a quant à lui été construit en insérant une cassette β -gal dans les sites *Bgl* II et *Bbs* I du plasmide pKS/NJ-BlnI, éliminant ainsi 93% de la séquence codante de la BICP27. Amp et ori représentent respectivement le gène de résistance à l'ampiciline et l'origine de réplication du vecteur de clonage.

Carte *Hind* III du génome du BHV-1



2.2.3 Essai β -galactosidase

Pour vérifier l'activité de la cassette β -gal dans les plasmides pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺ et pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺, un essai fonctionnel de la β -galactosidase a été effectué en utilisant le système " β -galactosidase enzyme assay system with reporter lysis buffer" de Promega, suite à la transfection transitoire de cellules MDBK avec les plasmides. Comme la cassette β -gal utilisée est sous le contrôle du promoteur de la glycoprotéine B du BHV-1 et qu'il est possible que des facteurs viraux soient nécessaires à sa transactivation, les transfections ont été effectuées sur des cellules MDBK infectées ou non par le BHV-1.

Pour réaliser les transfections, des dilutions de 15 μ g de pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺hd, de pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺hd, de pKS/NJ-BlnI (témoin négatif) et de pEC10 (témoin positif) ont été effectuées séparément dans un volume total de 150 μ L de DMEM sans sérum. Dans 4 autres tubes, 25 μ L de lipofectamine ont été ajoutés à 125 μ L de DMEM sans sérum. Les plasmides dilués ont été ajoutés à 1 tube de lipofectamine diluée puis les milieux incubés à la température de la pièce durant 30 minutes après quoi 1,4 mL de DMEM a été ajouté. Le feuillet cellulaire a été lavé avec du DMEM sans sérum et la solution de 1,7 mL final comprenant la lipofectamine et l'ADN, a été ajoutée à chacun des plats de Pétri. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C durant 5 heures, un même volume de DMEM contenant 20% SBF a été ajouté de façon à obtenir 10% de sérum total et l'incubation a été prolongée jusqu'à la récolte. Après 24 et 48 heures, les cellules ont été lavées au PBS pour ensuite être lysées par l'addition de 150 μ L de tampon de lyse ("Reporter Lysis Buffer, RLB, Promega") suivi d'une incubation à la température de la pièce durant 15 minutes sur un plateau berçant ("rocker plate"). Les lysats ont été grattés avec un râteau puis transférés dans un microtube de 1,5 mL déposé sur glace. Par la suite, les échantillons ont été vigoureusement mélangés durant 15 secondes et centrifugés à vitesse maximale durant 2 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants ont été transférés dans de nouveaux microtubes et les lysats conservés à -70°C jusqu'à l'essai β -galactosidase.

L'essai β -galactosidase a été réalisé suite à la décongélation de tous les composants du système et des échantillons. Aux 150 μL d'extraits récoltés, 150 μL de "Assay Buffer 2X" ont été ajoutés. Après avoir mélangé brièvement les milieux réactionnels, les tubes ont été incubés à 37°C durant 16 heures et la réaction colorimétrique a été arrêtée par l'ajout de 500 μL de carbonate de sodium 1 M. L'absorbance des échantillons a finalement été mesurée à 420 nm.

Résultats

Résultats

1. Rôle de la BICP27 comme transactivateur

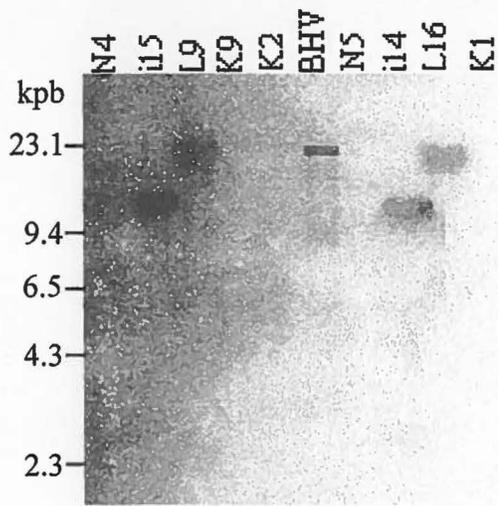
1.1 Caractérisation des cosmides

Afin d'identifier les régions du génome contenues dans les insertions des cosmides, des transferts de type Southern ont été réalisés avec chacun des cosmides digérés par *Hind* III et fractionnés en parallèle avec l'ADN du BHV-1 digéré par *Hind* III. La digestion des cosmides par *Hind* III permet de libérer l'insertion cosmétique du vecteur étant donné que cette dernière a été insérée dans le site *Bam* HI du vecteur SuperCos/HPS qui est bordé de sites *Hind* III (Ananvoranich et Simard, 1997). Comme chacun des fragments *Hind* III du BHV-1 sont disponibles dans une banque génomique dans notre laboratoire, ils ont été utilisés pour fabriquer des sondes. Après la purification et le marquage de ces fragments, des hybridations de chacun des transferts de type Southern ont été effectuées. Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 7.

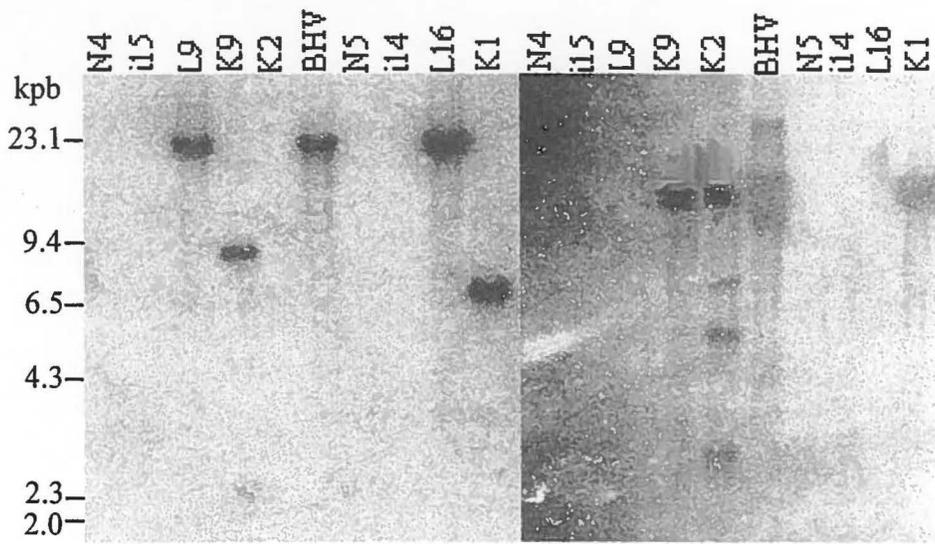
La sonde A a permis la détection d'un fragment de 21,2 kpb dans les cosmides L9 et L16, correspondant au fragment *Hind* III A complet du BHV-1 (puits: BHV), alors que les cosmides i15 et i14 n'en contiennent que 10,4 kpb (figure 7 A). L'hybridation avec la sonde B montre que le fragment *Hind* III B du BHV-1 de 19,1 kpb (puits: BHV) est entièrement contenu dans les cosmides L9 et L16, alors que les cosmides K9 et K1 n'en contiennent que des portions équivalentes à 9,0 et 6,6 kpb respectivement (figure 7 B). La sonde D de 14,5 kpb a détecté des fragments de 15,9, 14,5, 13,1, et 11,7 kpb dans le puits BHV. Ceux-ci correspondraient aux fragments C, D, F et H respectivement; C-H faisant partie de l'isomère I et D-F faisant partie de l'isomère II. La sonde D hybride avec ces quatre fragments étant donné qu'ils font partie des séquences répétées inversées des 2 isomères (voir la figure 2). Le fragment D de 14,5 kpb est complet dans les cosmides K9 et K2, alors que dans le cosmide K1, le fragment détecté est un peu plus gros, ce qui correspondrait au fragment C de 15,9 kpb (figure 7 D). L'insertion cosmétique du

Figure 7 Analyses de type Southern des cosmides

Les cosmides N4, i15, L9, K9, K2, N5, i14, L16 et K1 digérés par *Hind* III, ont été fractionnés en gel d'agarose 0,5% en parallèle avec l'ADN du BHV-1 digéré par *Hind* III. Suite à la migration, les ADN ont été transférés sur une membrane de nylon puis hybridés avec des sondes représentant l'un ou l'autre des fragments *Hind* III (A, B, D, E, G, I, J, K, L, M et N) du génome du BHV-1. Les marqueurs de taille en kilopaires de bases (kpb) sont indiqués à gauche.

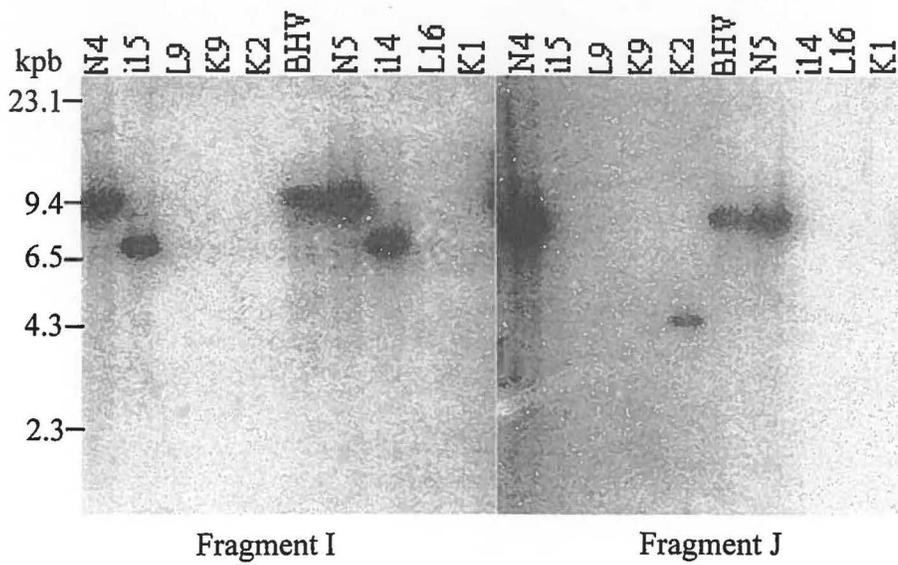
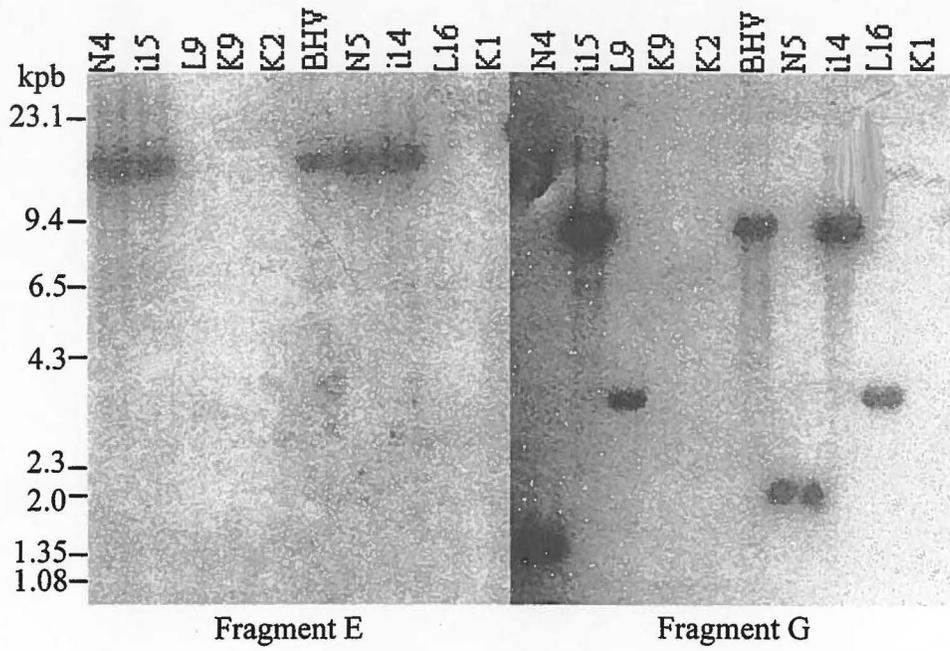


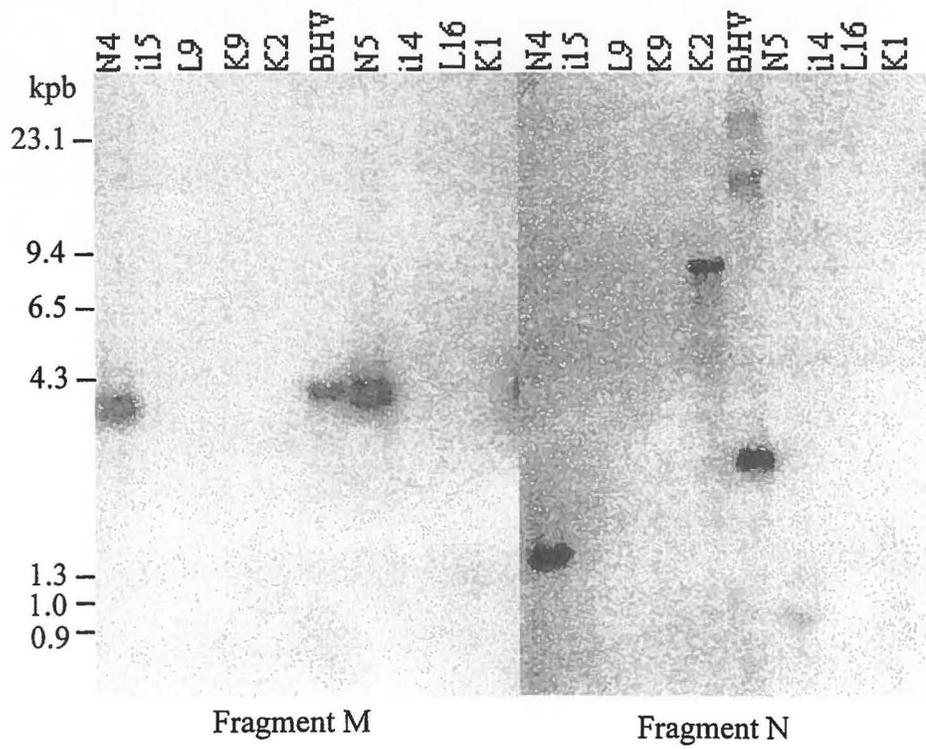
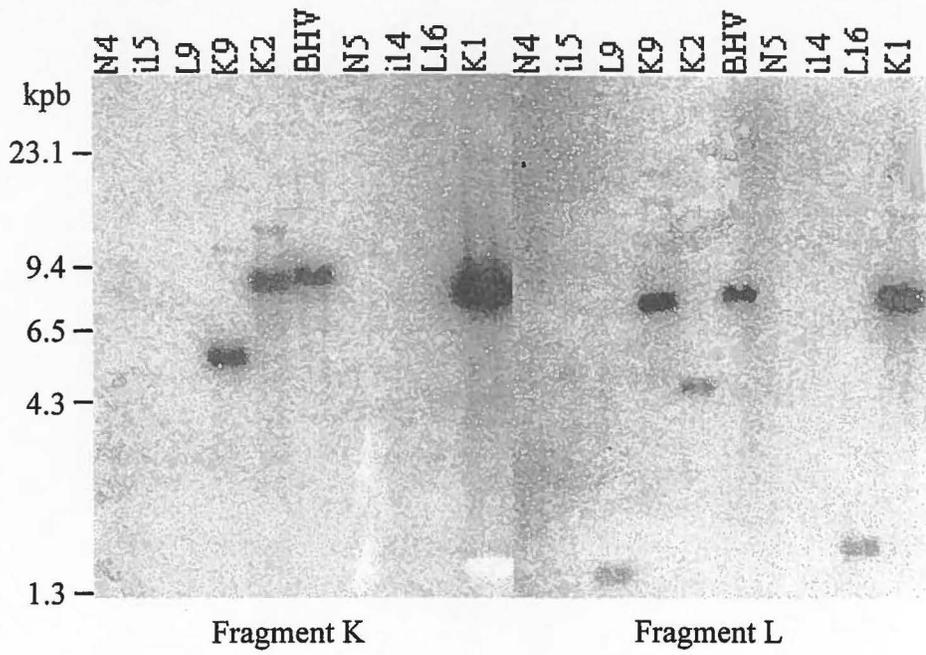
Fragment A



Fragment B

Fragment D





cosmide K1 proviendrait donc de l'isomère I du BHV-1 alors que celles des cosmides K9 et K2 proviendraient de l'isomère II (figure 8). Les cosmides N4, i15, N5 et i14 contiennent tous le fragment *Hind* III E complet de 13,3 kpb tel que retrouvé chez le BHV-1 (puits: BHV, figure 7 E). La sonde G de 11,8 kpb a détecté un fragment dans plusieurs cosmides. Les cosmides i15 et i14 contiennent le fragment G au complet comme celui retrouvé chez le BHV-1, alors que les cosmides N4, L9, N5 et L16 n'en ont que des fragments de 1,4, 3,4, 2,0 et 3,4 kpb respectivement (figure 7 G). Le fragment I de 11,6 kpb est complet dans les cosmides N4 et N5 tel que retrouvé chez le BHV-1 alors que les cosmides i15 et i14 n'en ont que 7,2 kpb (figure 7 I). Les cosmides N4 et N5 contiennent le fragment J de 8,8 kpb au complet comme celui retrouvé chez le BHV-1 alors que le cosmide K2 n'en comporte que 4,4 kpb (figure 7 J). La sonde K a détecté un fragment complet de 8,2 kpb dans les cosmides K2 et K1 alors que le cosmide K9 en contient seulement 5,6 kpb (figure 7 K). Les cosmides K9 et K1 possèdent le fragment L de 7,6 kpb en entier tel que retrouvé chez le BHV-1 alors que les cosmides L9, K2 et L16 n'en ont respectivement que 1,5, 4,8 et 1,7 kpb (figure 7 L). Le fragment M de 3,7 kpb du BHV-1 est entier dans les cosmides N4 et N5 (figure 7 M). Enfin, la sonde N de 2,4 kpb a respectivement hybridé des fragments de 1,4 et 7,6 kpb chez les ADNs cosmidiqes N4 et K2. Il est intéressant de remarquer que, chez l'ADN du BHV-1, la sonde a non seulement hybridé avec le fragment N attendu de 2,4 kpb mais aussi avec des bandes de plus faible intensité correspondant à des grosseurs de 14,0 et 15,5 kpb (les quelques bandes plus larges représentent fort probablement des fragments partiellement digérés; figure 7 N). Mentionnons que ces résultats ont été reproduits plusieurs fois dans notre laboratoire (résultats non montrés). En fait, la grosseur des bandes de 14,0 et 15,5 kpb correspond respectivement à celles des fragments N + H et N + F des isomères I et II de l'ADN viral (figure 8). La présence reproductible de ces bandes démontre qu'une portion de l'ADN encapsidé dans les virions se retrouve sous forme circulaire, alors que la littérature scientifique rapporte que l'ADN génomique des alphaherpesviridae ne se retrouve que sous forme linéaire dans les particules virales. Nos résultats sont d'ailleurs corroborés par le fait que 7 des 600 clones recombinants analysés en hybridation de colonies représentaient les deux extrémités du génome (Simard *et al.*, manuscrit en préparation).

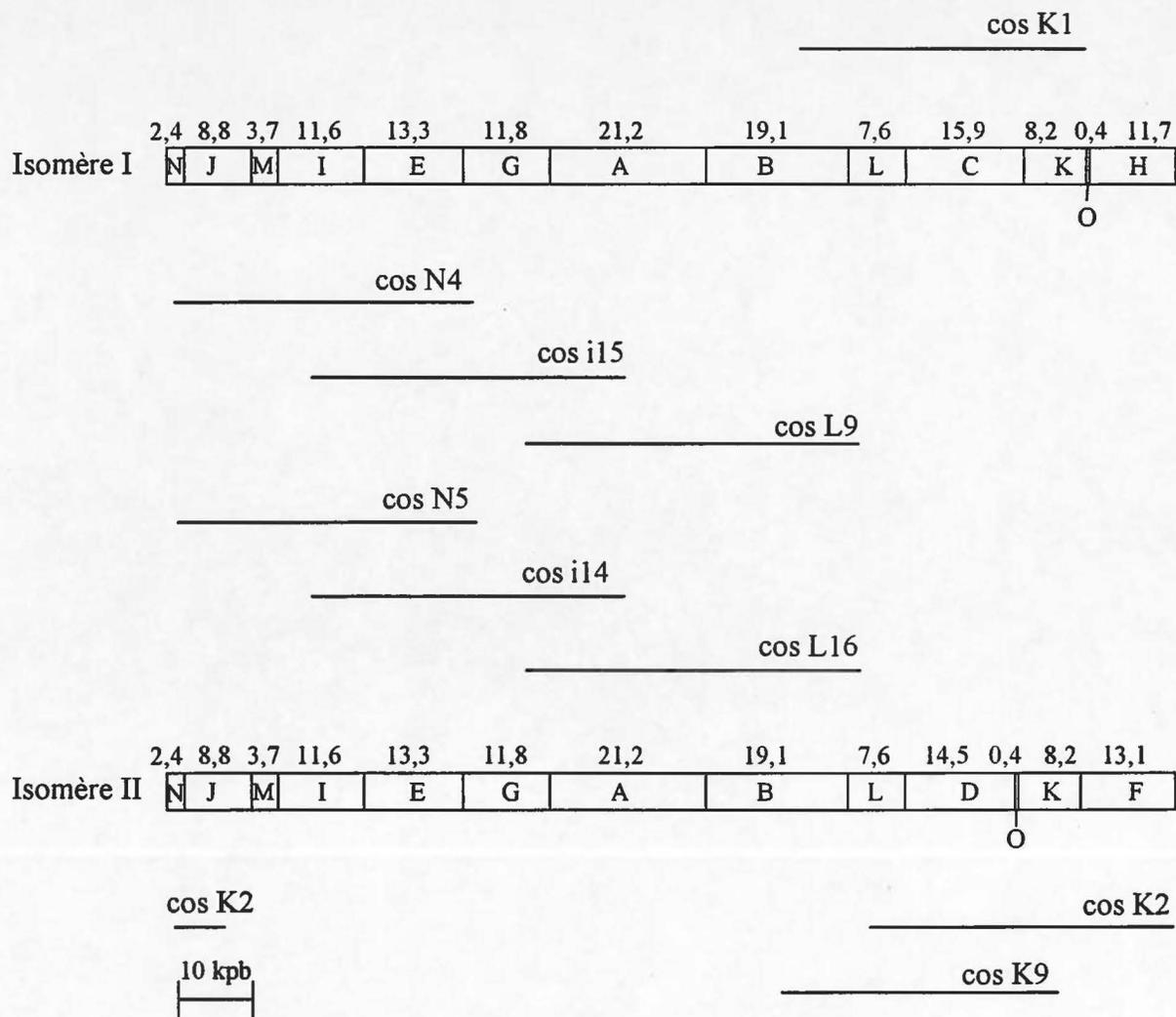


Figure 8 Cartographie des cosmides représentant le génome complet du BHV-1

Cartographie des insertions cosmidiqes en parallèle avec les cartes *Hind* III des 2 isomères du BHV-1. Les régions du génome viral représentées dans chacun des cosmides analysés sont indiquées. Le cosmide K1, contenant le fragment C représenté dans le haut de la figure, et les cosmides K2 et K9 contenant le fragment D représenté dans le bas de la figure proviennent respectivement de l'isomère I et II du génome viral. Les cosmides situés entre les deux cartes *Hind* III des 2 isomères du BHV-1 proviennent de l'un ou l'autre isomère. L'échelle (kpb) est indiquée au bas de la figure.

Finalement, étant donné que le cosmide K2 hybride colinéairement avec les sondes J, N, F, K, D et L (figure 8), il est curieux que la grosseur du fragment détecté par la sonde N soit de 7,6 et non pas de 15,5 kpb. À présent, l'explication la plus plausible serait qu'une mutation spontanée ait créé un site *Hind* III à l'intérieur du fragment F, générant ainsi un fragment plus court.

Les résultats obtenus de ces expériences ont été compilés à la figure 8. La longueur moyenne des insertions cosmidiqes est de 35 kpb et l'on observe que plusieurs cosmides comportent des régions de chevauchement. Ainsi, suite à la co-transfection de cellules MDBK avec les cosmides N4, i15, K2, K9 et L9, représentant globalement le génome entier du BHV-1, du virus infectieux est régénéré. C'est la raison pour laquelle ces cinq cosmides ont été choisis pour tenter d'identifier les transcrits potentiellement transactivés par la BICP27.

1.2 Expression de la BICP27 native dans les cellules eucaryotiques

Afin d'obtenir une source de la protéine BICP27 dans sa forme native, le cadre de lecture complet du gène a été exprimé via le vecteur d'expression eucaryotique pSVSport. Une expression transitoire dans les cellules MDBK et cos-7 a été réalisée pour déterminer laquelle de ces lignées cellulaires permettait l'expression maximale. Les lysats de cellules transfectées ou non (nt) avec le vecteur pSVSport ou le vecteur recombinant pSV/BICP27 exprimant la BICP27, ont été récoltées 24 et 48 heures post-transfection puis analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, transfert de type Western et immunoempreinte, en parallèle avec un lysat de cellules MDBK infectées au BHV-1 et récoltées 22 heures post-infection. Le sérum anti-BICP27 n'a pas réagit avec les protéines des lysats de cellules non transfectées ou transfectées avec le vecteur pSVSport, démontrant sa spécificité. Il n'a pas non plus réagit avec les protéines des lysats des cellules MDBK transfectées avec le vecteur recombinant pSV/BICP27. Par contre, une protéine de 50 kDa a été détectée par le sérum anti-BICP27 dans les lysats des cellules cos-7 transfectées avec le vecteur recombinant pSV/BICP27 et récoltées 24 et 48 heures post-

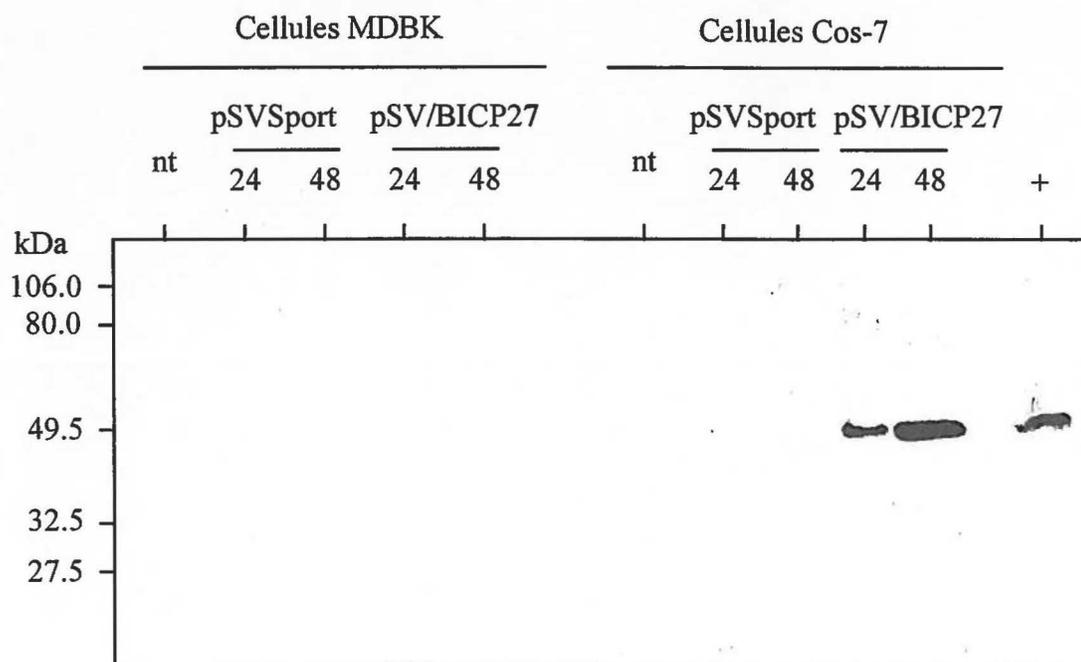
transfection (figure 9). Cette protéine correspond à la BICP27 comme celle retrouvée dans le lysat de cellules MDBK infectées au BHV-1 et récoltées 22 heures post-infection qui a aussi réagit spécifiquement avec le sérum anti-BICP27 (puits +). Le niveau d'expression maximale de la BICP27 a été détecté dans les lysats des cellules cos-7 transfectées avec pSV/BICP27 et récoltées 48 heures post-transfection. Par contre, le niveau d'expression obtenu 24 heures post-transfection est semblable à celui observé dans le lysat de cellules MDBK infectées par le BHV-1 et récoltées 22 heures post-infection (puits +). C'est pourquoi, lors de l'expérience consistant à déterminer si la BICP27 transactive certains gènes viraux, les co-transfections transitoires avec les cosmides et soit pSVSport ou pSV/BICP27 ont été réalisées dans les cellules cos-7 et que les lysats cellulaires ont été récoltés 24 et 48 heures post-transfection.

1.3 Développement d'un sérum anti-BTIF

En parallèle à ces études, un témoin positif a été développé pour vérifier la sensibilité de la stratégie utilisée pour identifier les transcrits potentiellement transactivés par la BICP27. Un transactivateur connu du BHV-1, la BTIF, a été utilisé pour effectuer des co-transfections transitoires de cellules eucaryotes avec l'un ou l'autre des cinq cosmides choisis et le vecteur pSVSport exprimant ou non la BTIF. Pour réaliser cette expérience, plusieurs clonages ont dû être réalisés et un sérum polyclonal monospécifique contre la BTIF a dû être développé pour s'assurer de la présence de la BTIF dans les cellules co-transfectées. La séquence codant les 334 premiers acides aminés de la BTIF a d'abord été clonée dans le vecteur pET28a afin d'obtenir le plasmide pET28a/BTIF334. Une cinétique d'induction à l'IPTG a ensuite été réalisée dans les cellules bactériennes BL21 afin de déterminer le temps d'induction optimal. Les lysats des cellules bactériennes ont été analysés sur un gel de polyacrylamide-SDS et par une coloration au bleu de coomassie. Les lysats de cellules induites de 1 à 5 heures post-induction en comparaison avec des lysats de cellules non-induites ont révélé la présence de deux polypeptides abondants, de 52 et 44 kDa (résultats non montrés). À cinq heures post-induction, une quantité maximale de protéines a été obtenue. Par la suite, le cadre de

Figure 9 Immunoempreinte des lysats de cellules MDBK et cos-7 transfectées avec pSV/BICP27

Des cellules MDBK et cos-7 ont été transfectées ou non (puits nt) avec les plasmides pSVSport ou pSV/BICP27. Les lysats, récoltés 24 et 48 heures post-transfection, ont été fractionnés sur gel SDS-Page en parallèle avec un lysat de cellules MDBK infectées avec le BHV-1 durant 22 heures (puits +). Les protéines fractionnées ont été électrotransférées sur une membrane de PVDF puis incubées avec un sérum de souris spécifique à la BICP27. Suite à une incubation avec un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase, les complexes immuns ont été révélés en présence de 3,3'-diaminobenzidine hypochloride (DAB) et de peroxyde. Les marqueurs de poids moléculaire en kiloDaltons (kDa) sont indiqués à gauche.



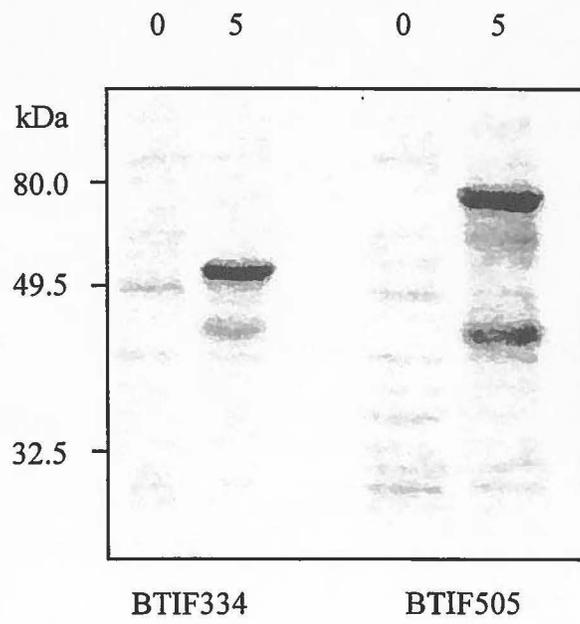
lecture complet de la BTIF a été cloné dans le vecteur procaryotique pET28a pour obtenir le vecteur recombinant pET28a/BTIF505. Comme pour pET28a/BTIF334, une cinétique d'induction à l'IPTG a été réalisée et les lysats des cellules bactériennes ont été analysés sur un gel de polyacrylamide-SDS. Cette fois-ci, la grosseur de la protéine de fusion (T7-Tag/BTIF505) attendue était de 56,5 kDa. La coloration de lysats de cellules induites de 1 à 5 heures post-induction en comparaison avec des lysats de cellules non-induites a révélé la présence de deux polypeptides abondants de 44 et 70 kDa. Comme dans le cas de pET28a/BTIF334, une quantité maximale de protéine a été obtenue à 5 heures post-induction (résultats non montrés). Une comparaison des deux inductions obtenues a ensuite été réalisée en effectuant deux gels de polyacrylamide: un gel a été coloré au bleu de coomassie (figure 10 A) et l'autre a été transféré sur une membrane de PVDF et une immunoempreinte a été réalisée avec l'anticorps anti-T7-Tag (figure 10 B). La coloration au bleu de coomassie a permis de révéler encore une fois, la présence des deux polypeptides abondants dans les lysats de cellules induites à l'IPTG et récoltées 5 heures post-induction (puits 5) par rapport aux lysats de cellules non-induites (puits 0) (figure 10 A). De plus, le polypeptide de 44 kDa obtenu lors des deux inductions (avec pET28a/BTIF334 et pET28a/BTIF505) semble être le même. Les résultats suggèrent que les polypeptides de 52 et 70 kDa correspondraient respectivement aux protéines de fusion T7-Tag/BTIF334 et T7-Tag/BTIF505. Le polypeptide de 44 kDa serait un produit de clivage des polypeptides de 52 et 70 kDa. L'immunoempreinte qui a été réalisée avec l'anticorps anti-T7-Tag (figure 10 B) confirme que les polypeptides induits sont des protéines de fusion. De plus, il est possible d'ajouter que le clivage des protéines de fusion se produit du côté carboxylique, puisque l'anticorps anti-T7-Tag est capable de détecter le produit généré.

Pour le développement d'un sérum polyclonal monospécifique contre la BTIF, les polypeptides obtenus lors de l'induction de pET28a/BTIF334 ont été individuellement utilisés de façon à pouvoir confirmer que le polypeptide de 44 kDa représente bien un sous-produit de la protéine de fusion T7-Tag/BTIF334. Suite à une méga-induction à l'IPTG, les polypeptides de 44 et 52 kDa ont été purifiés en gel de polyacrylamide-SDS.

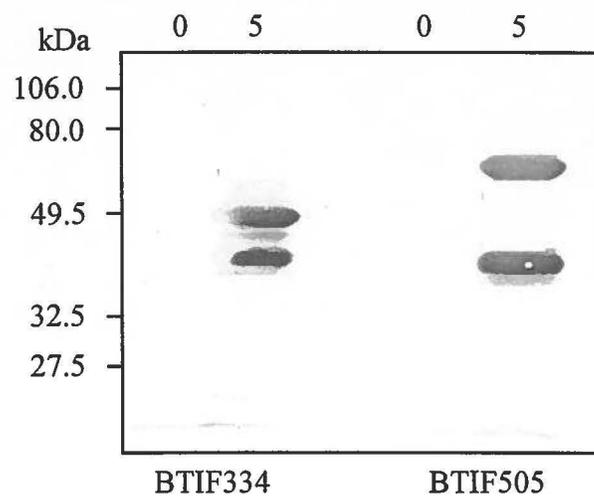
Figure 10 Expression de la BTIF dans *E. coli*

Des lysats protéiques de cellules de *E. coli* BL21 transformées avec pET28a/BTIF334 ou pET28a/BTIF505 et non induites (puits 0) ou induites à l'IPTG durant 5 heures (puits 5) ont été fractionnés sur gel SDS-Page. Les protéines fractionnées ont ensuite été soit colorées au bleu de coomassie (A) ou électrotransférées sur une membrane de PVDF puis immunodétectées avec l'anticorps monoclonal commercial anti-T7-Tag (B). Les marqueurs de poids moléculaire en kDa sont indiqués à gauche.

A)



B)



Quatre souris (# 1 à 4) ont été immunisées avec le produit de 52 kDa et trois (# 5 à 7) avec le produit de 44 kDa. La spécificité des sérums individuels a été vérifiée par immunoempreintes de corps d'inclusion isolés de *E. coli* contenant pET/BTIF334 de même que des lysats de cellules infectées durant 24 heures avec le BHV-1. Pour faciliter ces essais, des gels préparatifs de polyacrylamide-SDS contenant les corps d'inclusion 5 heures post-induction de pET/BTIF334 et un lysat de cellules MDBK infectées avec le BHV-1 et récoltées 24 heures post-infection ont été réalisés. Ensuite, des transferts de type Western ont été effectués et les membranes découpées en fines languettes afin de comparer les sept sérums par immunoempreinte. Les sept sérums permettaient l'immunodétection de deux polypeptides de 44 et 52 kDa dans les corps d'inclusion de pET28a/BTIF334 et d'un polypeptide de 50 kDa dans les lysats de cellules MDBK infectées au BHV-1 (résultats non montrés). Ces résultats démontrent que le polypeptide de 44 kDa présent dans les corps d'inclusion représente un sous-produit de la protéine de fusion T7-Tag/BTIF334. Le sérum anti-BTIF de la souris #4 a été retenu pour réaliser la suite des expériences.

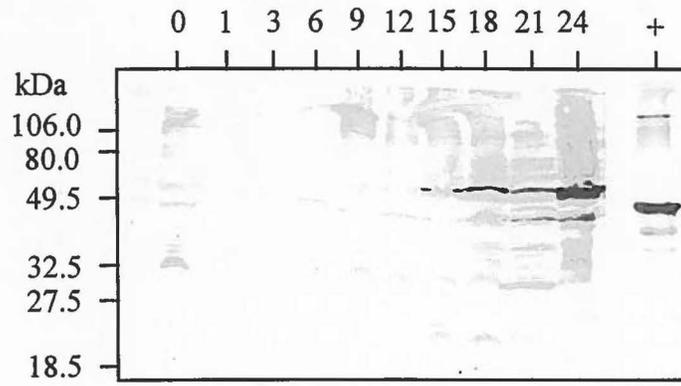
Pour confirmer la spécificité du sérum, une cinétique d'expression traductionnelle de la BTIF au cours du cycle infectieux du BHV-1 a été réalisée par immunoempreinte de lysats protéiques de cellules MDBK infectées pour différents temps avec le BHV-1. L'immunoempreinte a été réalisée à l'aide du sérum anti-BTIF de la souris #4. Avant 15 heures post-infection, le sérum anti-BTIF n'a détecté aucun polypeptide. L'apparition de la BTIF est observée à 15 heures post-infection et l'expression est maximale à 24 heures post-infection (figure 11 A). Le témoin positif dans le dernier puits correspond aux corps d'inclusion obtenus suite à l'induction de pET28a/BTIF334 dans les cellules bactériennes, 5 heures post-induction. Ces résultats démontrent la spécificité du sérum anti-BTIF qui peut reconnaître la protéine BTIF dans les lysats de cellules MDBK infectées avec le BHV-1.

Suite au développement du sérum anti-BTIF, l'ORF complet de la BTIF a été inséré dans le vecteur pSVSport, afin de réaliser une expression transitoire de la protéine

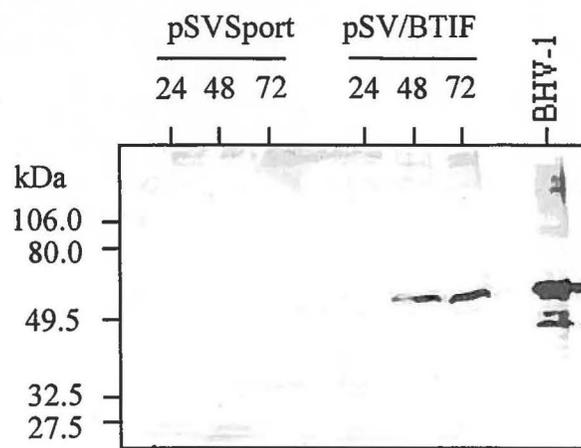
Figure 11 Spécificité du sérum anti-BTIF

- A)** Des cellules MDBK infectées au BHV-1 ont été récoltés à 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 et 24 heures post-infection. Les lysats ont été fractionnés sur gel SDS-Page en parallèle avec un lysat de cellules de *E. coli* pET/BTIF334 induites 5 heures à l'IPTG (puits +). Les protéines fractionnées ont été électrotransférées sur une membrane de PVDF puis incubées avec un sérum de souris spécifique à la BTIF. Suite à une incubation avec un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase les complexes immuns ont été révélés en présence de DAB et de peroxyde. Les marqueurs de poids moléculaire en kiloDaltons (kDa) sont indiqués à gauche.
- B)** Des cellules cos-7 ont été transfectées avec les plasmides pSVSport et pSV/BTIF. Les lysats, récoltés 24, 48 et 72 heures post-transfection, ont été fractionnés sur gel SDS-Page en parallèle avec un lysat de cellules MDBK infectées avec le BHV-1 durant 22 heures (puits +). Les protéines fractionnées ont été électrotransférées sur une membrane de PVDF puis incubées avec un sérum de souris spécifique à la BTIF. Suite à une incubation avec un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase, les complexes immuns ont été révélés en présence de DAB et de peroxyde. Les marqueurs de poids moléculaire en kiloDaltons (kDa) sont indiqués à gauche.

A)



B)



dans un système eucaryote. La transfection transitoire a été réalisée afin de déterminer le temps d'expression optimal de la BTIF dans le même système cellulaire que celui utilisé avec la BICP27, soit dans les cellules cos-7. Les cellules ont d'abord été transfectées avec le vecteur pSVSport ou le vecteur recombinant pSV/BTIF puis les lysats cellulaires ont été récoltés 24, 48 et 72 heures post-transfection, fractionnés sur gel de polyacrylamide-SDS puis électrotransférés sur une membrane de PVDF en parallèle avec du BHV-1 purifié qui contient la BTIF sous sa forme native (témoin positif). Le sérum anti-BTIF n'a pas réagi avec les protéines des lysats des cellules transfectées avec le vecteur pSVSport ou avec le lysat de cellules transfectées avec pSV/BTIF et récoltées 24 heures post-transfection. Par contre, un polypeptide de 53 kDa a été immunodéecté par le sérum anti-BTIF dans les lysats de cellules transfectées avec pSV/BTIF et récoltées 48 et 72 heures post-transfection, de même que dans le puits contenant le BHV-1 purifié. Ce polypeptide correspond à la BTIF qui est exprimée par le vecteur recombinant pSV/BTIF de façon optimale dans les cellules cos-7 à 72 heures post-transfection (figure 11 B). Donc, lors de l'expérience réalisée pour identifier des transcrits transactivés par un témoin positif (la BTIF), les cellules cos-7 co-transfectées avec les cosmides et le plasmide exprimant ou non la BTIF (pSV/BTIF-pSVSport) ont été récoltées à 72 heures post-transfection.

1.4 Co-transfections transitoires de cellules cos-7 avec les cosmides recombinants du BHV-1 et un plasmide exprimant ou non soit la BICP27 ou la BTIF

Suite à la co-transfection transitoire de cellules eucaryotes avec des cosmides et un plasmide exprimant ou non soit la BICP27 ou la BTIF, les cellules ont été récoltées et une immunoempreinte a été réalisée avec une portion des cellules, afin de s'assurer que la protéine virale correspondante, BICP27 ou BTIF, était bel et bien exprimée. Les cosmides utilisés individuellement représentent globalement tout le génome de l'isomère II (N4, i15, K2, K9 et L9). Aucun des lysats de cellules co-transfectées avec pSVSport ne démontre une réaction avec le sérum anti-BICP27 (figure 12 A) ou le sérum anti-BTIF (figure 13 A). Par contre, le sérum anti-BICP27 a réagi spécifiquement avec une protéine

Figure 12 Immunoempreinte des lysats protéiques et hybridation des ARNs totaux de cellules cos-7 co-transfectées avec l'un ou l'autre des cosmides N4, i15, K2, K9 et L9, en présence de pSVSport ou pSV/BICP27

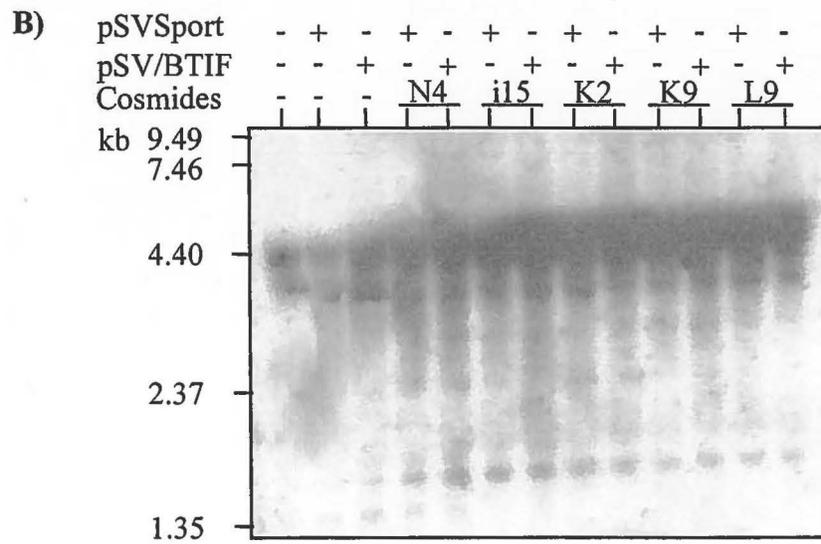
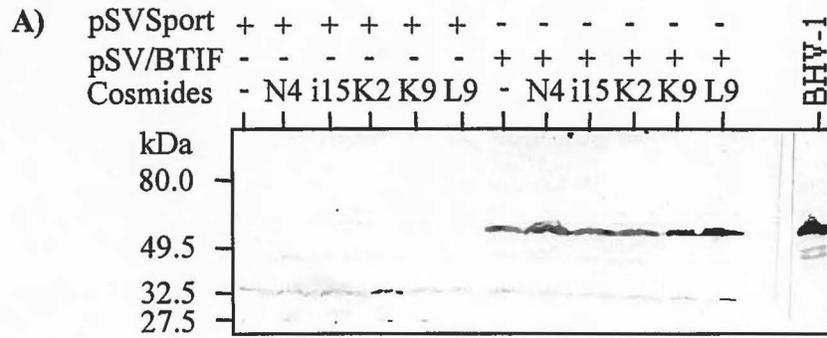
A) Des cellules cos-7 ont été co-transfectées avec les plasmides pSVSport ou pSV/BICP27 et un des cosmides recombinants du BHV-1 (N4, i15, K2, K9 et L9). Les lysats récoltés 24 heures post-transfection ont été fractionnés sur gel SDS-Page en parallèle avec un lysat de cellules cos-7 transfectées avec pSV/BICP27 (puits +). Les protéines fractionnées ont été électrotransférées sur une membrane de PVDF puis incubées avec un sérum de souris spécifique à la BICP27. Suite à une incubation avec un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase, les complexes immuns ont été révélés en présence de DAB et de peroxyde. Les marqueurs de poids moléculaire en kiloDaltons (kDa) sont indiqués à gauche.

B) Les ARNs totaux isolés des cellules cos-7 co-transfectées ou non (puits "-" à gauche) et récoltés 24 heures post-transfection, ont été fractionnés sur un gel d'agarose 1,5% dénaturant puis transférés sur une membrane de nylon. Les ARNs ont été détectés par hybridation avec une sonde constituée des 5 cosmides préalablement digérés par *Hind* III puis marqués au ³²P. Les marqueurs de taille en kilobases (kb) sont indiqués à gauche.

Figure 13 Immunoempreinte des lysats protéiques et hybridation des ARNs totaux de cellules cos-7 co-transfectées avec l'un ou l'autre des cosmides N4, i15, K2, K9 et L9, en présence de pSVSport ou pSV/BTIF

A) Des cellules cos-7 ont été co-transfectées avec les plasmides pSVSport ou pSV/BTIF et un des cosmides recombinants du BHV-1 (N4, i15, K2, K9 et L9). Les lysats récoltés 72 heures post-transfection ont été fractionnés sur gel SDS-Page en parallèle avec un lysat de cellules MDBK infectées au BHV-1, 22 heures post-infection (puits +). Les protéines fractionnées ont été électrotransférées sur une membrane de PVDF puis incubées avec un sérum de souris spécifique à la BTIF. Suite à une incubation avec un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase, les complexes immuns ont été révélés en présence de DAB et de peroxyde. Les marqueurs de poids moléculaire en kiloDaltons (kDa) sont indiqués à gauche.

B) Les ARNs totaux isolés des cellules cos-7 co-transfectées ou non (puits "-" à gauche) et récoltés 72 heures post-transfection, ont été fractionnés sur un gel d'agarose 1,5% dénaturant puis transférés sur une membrane de nylon. Les ARNs ont été détectés par hybridation avec une sonde constituée des 5 cosmides préalablement digérés par *Hind* III puis marqués au ^{32}P . Les marqueurs de taille en kilobases (kb) sont indiqués à gauche.



de 50 kDa contenue dans tous les lysats de cellules co-transfectées avec le plasmide pSV/BICP27 et récoltées 24 heures post-transfection (figure 12 A). Des résultats similaires ont été obtenus avec les lysats des cellules récoltées 48 heures post-transfection (résultats non montrés). En parallèle, tous les lysats de cellules co-transfectées avec le vecteur pSV/BTIF et récoltées 72 heures post-transfection ont exprimé une protéine de 53 kDa correspondant à la BTIF et réagissant avec le sérum anti-BTIF tout comme la protéine native retrouvée dans le virus (puits BHV-1, figure 13 A). Les bandes obtenues à environ 27 à 33 kDa sont dues à des réactions croisées avec le sérum. Ces immunoempreintes démontrent la fonctionnalité des vecteurs recombinants pSV/BICP27 et pSV/BTIF, de même que l'efficacité de la transfection. Par la suite, des électrophorèses dénaturantes des ARNs et des transferts de type Northern ont été réalisés afin de vérifier si l'une ou l'autre protéine virale transactivait des gènes viraux.

Les ARNs totaux des cellules co-transfectées ont été hybridés avec un mélange de cinq sondes cosmiques préparées à partir des cosmides N4, i15, K2, K9 et L9 et préalablement digérés par *Hind* III. Lors des co-transfections concernant la BICP27, l'hybridation des ARNs totaux isolés des cellules co-transfectées avec l'un ou l'autre des cosmides et en présence du plasmide pSVSport n'a permis la détection d'aucun transcrite. Par contre, l'hybridation des ARNs de cellules transfectées avec les cosmides en présence du plasmide pSV/BICP27 a permis la détection spécifique de deux transcrits de 3,3 et 2,4 kb, indépendamment du cosmide utilisé lors de la transfection (figure 12 B). Des résultats similaires ont été obtenus avec les ARNs des cellules récoltées 48 heures post-transfection (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent donc que ces deux transcrits codent pour la BICP27, celui de 3,3 kb représentant présumément une forme immature de celui de 2,4 kb.

De ces résultats, trois hypothèses peuvent être émises: soit, la BICP27 n'est pas un transactivateur, soit la BICP27 requiert un autre facteur viral pour transactiver certains gènes ou soit la stratégie utilisée n'est pas assez sensible. Pour tester la sensibilité de la stratégie utilisée pour tenter d'identifier les gènes potentiellement transactivés, la suite des

expériences avec un transactivateur connu du BHV-1, la BTIF, a été effectuée. Donc, l'hybridation des ARNs totaux de cellules co-transfectées avec les cosmides et un plasmide exprimant ou non la BTIF a été réalisée. Un transcrite d'environ 4,4 kb a été détecté dans tous les puits (figure 13 B). L'identité de ce transcrite est à présent inconnu. Mais, suite à ces résultats, une hypothèse a été émise: le transcrite détecté pourrait représenter l'ARN ribosomique de la sous-unité ribosomique 28S des cellules eucaryotiques. Alternativement, la bande détectée pourrait possiblement correspondre à des contaminants plasmidiques ou cosmidiqes contenus dans les ARNs totaux. Aucun autre transcrite n'a été détecté. Ces résultats suggèrent que la stratégie utilisée n'est pas assez sensible. En parallèle à ces études, les outils requis à la construction d'un mutant BHV-1 Δ BICP27 ont été développés.

2. Rôle de la BICP27 dans la réplication du BHV-1

Pour déterminer le rôle de la BICP27 dans la réplication du BHV-1, un mutant de délétion BHV-1/BICP27⁻ constitue un outil essentiel. La construction d'un tel mutant (BHV-1/BICP27⁻/ β -gal⁺) par recombinaison nécessite préalablement le développement d'une lignée cellulaire de complémentation (MDBK/BICP27⁺) apte à permettre la croissance du mutant puisque le gène BICP27 est potentiellement essentiel à la réplication du virus. Un plasmide de transfert comportant les séquences bordantes d'au moins 1 000 pb du gène de la BICP27 et un gène rapporteur qui inactive ou remplace le gène de la BICP27 est aussi nécessaire à la construction d'un tel mutant. La présence des séquences bordantes du gène d'intérêt dans le plasmide de transfert est très importante pour permettre la recombinaison avec l'ADN viral. Lorsque ces outils sont développés, la co-transfection de cellules MDBK/BICP27⁺ avec le plasmide de transfert et l'ADN viral du virus sauvage permet d'obtenir un mutant (BHV-1/BICP27⁻/ β -gal⁺) par recombinaison homologue. Le mutant est ensuite sélectionné à l'aide du marqueur phénotypique et de son substrat. Donc, pour produire un mutant BHV-1/BICP27⁻/ β -gal⁺, une lignée cellulaire permissive au BHV-1 et permettant la réplication du mutant (lignée cellulaire de complémentation; MDBK/BICP27⁺) doit d'abord être développée.

2.1 Développement d'une lignée cellulaire MDBK exprimant la BICP27

Préalablement, dans notre laboratoire, un système à un plasmide avait été utilisé pour le développement d'une lignée cellulaire MDBK/BICP27⁺. Le plasmide pcDNA3/BICP27⁺, comportant l'ORF complet de la BICP27 sous le contrôle du promoteur du CMV et codant pour le gène de résistance à la généticine, avait été construit. Des transfections stables dans les cellules MDBK avaient été réalisées menant à l'isolation de plusieurs colonies de cellules résistantes à la généticine. Malheureusement, l'expression de la BICP27 n'avait pu être démontrée dans aucun des clones sélectionnés. C'est pourquoi dans ce projet, un système à deux plasmides a été utilisé.

2.1.1 Système à deux plasmides

Pour le développement d'une lignée cellulaire MDBK/BICP27⁺, plusieurs transfections stables de cellules MDBK avec les plasmides pSV/BICP27 et pSV2neo ou pSV3neo, ont été réalisées. Dans ce système, l'ORF complet de la BICP27 était sous le contrôle du promoteur de SV40 et le gène de résistance à la généticine était retrouvé sur les plasmides pSV2neo et pSV3neo. De nombreux clones résistants à la généticine ont été sélectionnés et une portion des cellules de chacun des clones a été lysée et analysée sur un gel de polyacrylamide-SDS en parallèle avec un lysat de cellules MDBK infectées au BHV-1 et récoltées 22 heures post-infection, suivi d'un transfert de type Western et d'une immunoempreinte. Malheureusement, le sérum anti-BICP27 n'a détecté aucun polypeptide dans les lysats des cellules de clones résistants à la généticine. Par contre, un polypeptide de 50 kDa, correspondant à la BICP27 retrouvée dans le lysat de cellules MDBK infectées au BHV-1 et récoltées 22 heures post-infection, a réagit spécifiquement avec le sérum anti-BICP27 démontrant l'efficacité de l'immunoempreinte (résultats non montrés). Comme des plasmides linéarisés devraient s'intégrer plus facilement dans l'ADN chromosomique des cellules transfectées, les mêmes co-transfections ont été réalisées avec les plasmides pSV/BICP27, pSV2neo et pSV3neo préalablement linéarisés avec *Sca I*. Les

résultats lors de l'utilisation des plasmides linéaires ont été les mêmes que ceux obtenus lors de l'utilisation des plasmides circulaires. Ces résultats suggèrent que la protéine BICP27 est toxique pour les cellules MDBK. Un système inductible constitue donc une alternative intéressante pour contrer le problème.

2.1.2 Système inductible

Le vecteur commercial pRetroTetOff comporte des sites uniques de clonage pour l'insertion d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle de l'élément de réponse à la tétracycline ("Tet-responsive element") et le gène de résistance à la puromycine pour la sélection de lignées cellulaires. De plus, pRetroTetOff encode le tTA qui est un transactivateur hybride comportant la portion transactivatrice de l' α TIF du HSV-1 couplé au répresseur de l'opéron tet de *E. coli*. Lorsque le tTA se lie au niveau de l'élément de réponse à la tétracycline, il y a transactivation de l'expression du gène d'intérêt. Par contre, la tétracycline ou la doxycycline se lie au tTA et empêche celui-ci de se lier à l'élément de réponse à la tétracycline et donc d'induire la transactivation du gène d'intérêt. Donc, en présence de tétracycline ou de doxycycline, le gène d'intérêt demeure silencieux alors qu'en absence de tétracycline ou de doxycycline, il est exprimé. Le vecteur commercial pRetroTetOffLuc, contenant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur inductible à la doxycycline, a été utilisé pour vérifier la fonctionnalité de ce système d'expression inductible dans les cellules MDBK en comparaison avec les cellules HeLa (témoin positif). Suite à une transfection transitoire des cellules avec le vecteur pRetroTetOffLuc et à l'induction ou non avec la doxycycline, un essai luciférase a été réalisé avec les lysats des cellules transfectées, afin de vérifier si le gène de la luciférase a été induit ou non. Si le gène de la luciférase a été induit, une réaction se produit lors de l'ajout de son substrat et les résultats sont lus au luminomètre. Les lysats des cellules HeLa transfectées avec pRetroTetOffLuc et induites ou non à la doxycycline ont démontré la présence de luciférase 24, 48 et 72 heures post-induction confirmant la fonctionnalité de l'essai luciférase (résultats non montrés). En comparant les résultats obtenus avec les lysats de cellules MDBK transfectées avec pRetroTetOffLuc et

induites ou non à la doxycycline, avant 18 heures post-induction, aucune différence ne peut être remarquée. Par contre, une induction a été observée à partir de 18 heures jusqu'à 72 heures post-induction (figure 14). Ces essais démontrent que le système est fonctionnel dans les cellules MDBK et il servira au développement futur d'une lignée cellulaire MDBK/BICP27⁺.

2.2 Fonctionnalité de la cassette β -gal dans les plasmides de transfert

Pour la construction future d'un mutant de délétion BHV-1/BICP27⁺, deux plasmides de transfert ont été construits: pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺hd et pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺. Le plasmide pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺hd a été construit par l'insertion d'une cassette β -gal dans le site *Hind* III du plasmide pKS/NJ-BlnI, inactivant ainsi le gène de la BICP27. Le plasmide pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺ a été construit en digérant le plasmide pKS/NJ-BlnI par *Bgl* II et *Bbs* I puis en insérant une cassette β -gal, ce qui permettait de remplacer 93 % de l'ORF de la BICP27 par le gène rapporteur. Pour vérifier la fonctionnalité de la cassette β -gal, des cellules MDBK ont été transfectées avec soit les plasmides de transfert, le plasmide duquel la cassette β -gal originale a été obtenue (pEC10) et un plasmide ne contenant pas de cassette β -gal (pKS/NJ-BlnI). Comme le gène de la β -galactosidase de la cassette β -gal obtenue du Dr. Bello (Pennsylvanie, États-unis) est sous le contrôle du promoteur de la glycoprotéine B du BHV-1, des transfections ont aussi été réalisées avec des cellules MDBK préalablement infectées pour le cas où des facteurs viraux du BHV-1 seraient nécessaires à la transactivation du promoteur. Par la suite, les essais β -galactosidase ont été réalisés avec les lysats des cellules récoltées 24 et 48 heures post-transfection. Aucune activité β -galactosidase n'a été retrouvée dans les lysats de cellules non transfectées (nt) ou transfectées avec pKS/NJ-BlnI (figure 15). De plus, il n'y a pas eu de réaction dans les cellules qui n'étaient pas préalablement infectées. Par contre, tous les lysats des cellules préalablement infectées et transfectées avec pEC10, pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺hd et pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺ ont démontré une activité β -galactosidase à 24 et 48 heures post-transfection. Un témoin positif de l'essai β -galactosidase a été réalisé avec l'enzyme β -galactosidase fournie avec la trousse de

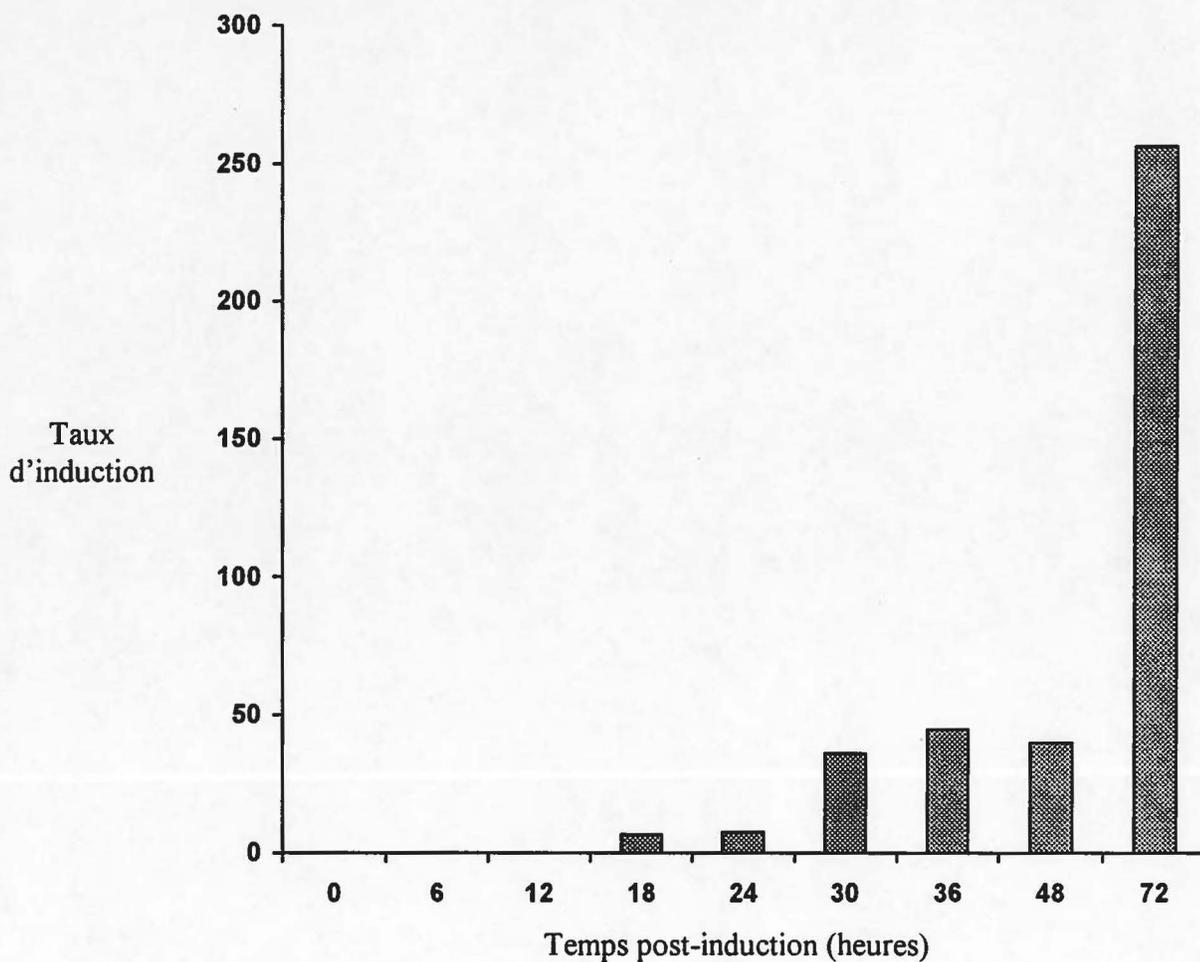


Figure 14 Efficacité du système inductible pRetroTetOffLuc dans les cellules MDBK

Des lysats de cellules MDBK transfectées avec le vecteur pRetroTetOffLuc et induites (sans doxycycline) ou non (avec doxycycline) ont été récoltés à 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48 et 72 heures post-transfection. Un essai luciférase et une lecture au luminomètre ont été réalisés. Le taux d'induction a été déterminé en utilisant le rapport induit/non induit.

Plasmides transfectés	Temps (heures)	Densité optique à 420 nm	
		MDBK non infectées	MDBK infectées
nt	24	<0,09	<0,09
pKS/NJ-BlnI	24	<0,09	<0,09
pKS/NJ-BlnI	48	<0,09	<0,09
pEC10	24	<0,09	>1,15
pEC10	48	<0,09	>1,15
pKS/NJ-BlnI/ β -gal ⁺ hd	24	<0,09	>1,15
pKS/NJ-BlnI/ β -gal ⁺ hd	48	<0,09	>1,15
pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal ⁺	24	<0,09	>1,15
pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal ⁺	48	<0,09	>1,15
β -gal (1:30 000)	-	>1,15	

Figure 15 Efficacité de la cassette β -gal dans les cellules MDBK

Des essais fonctionnels de la β -galactosidase ont été réalisés sur des lysats de cellules MDBK infectées ou non au BHV-1 et transfectées soit avec pKS/NJ-BlnI, pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺hd, pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺ et pEC10 puis récoltées 24 et 48 heures post-transfection. En parallèle, l'essai enzymatique a aussi été réalisé avec l'enzyme β -galactosidase pure.

Promega. Les résultats démontrent la fonctionnalité de la cassette β -gal originale (pEC10) et des deux plasmides de transfert pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺hd et pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺ dans les cellules préalablement infectées, ce qui montre que des facteurs viraux sont nécessaires à la transactivation du promoteur de la glycoprotéine B, contrôlant le gène de la β -galactosidase.

Discussion

Discussion

Dans cette étude, nous avons voulu étudier le rôle de la BICP27 au niveau de la transactivation des gènes viraux et au niveau de la réplication virale, sachant que son homologue chez le HSV-1 (l'ICP27) joue un rôle essentiel à ces deux niveaux (Sekulovich *et al.*, 1988; Uprichard et Knipe, 1990; McGregor *et al.*, 1996). Il est à se rappeler qu'une étude des cinétiques d'expression transcriptionnelle et traductionnelle de la BICP27 démontre que cette dernière est une protéine précoce (β) (Chalifour *et al.*, 1996) alors que l'ICP27 est une protéine précoce-immédiate (α). Par contre, il a été démontré que la BICP27 agit au niveau de la maturation des ARNs messagers (Singh *et al.*, 1996) tout comme l'ICP27 ce qui laisse supposer que ces deux protéines pourraient avoir d'autres fonctions communes.

La stratégie que nous avons adoptée pour tenter d'identifier les gènes potentiellement transactivés par la BICP27 consistait à vérifier la présence ou la plus grande abondance d'un transcrit viral suite à la co-transfection de cellules cos-7 avec un de cinq cosmides recombinants du BHV-1 en présence de pSV/BICP27 par rapport à celle en présence de pSVSport. Malheureusement, cette stratégie a été infructueuse; aucun transcrit transactivé par la BICP27 n'a été détecté. De cela, deux hypothèses pouvaient être formulées: 1) la BICP27 n'est pas un transactivateur, 2) la stratégie utilisée n'est pas assez sensible. C'est pourquoi, en parallèle à cette étude, la même stratégie pour tenter d'identifier des transcrits transactivés a été utilisée avec un transactivateur connu, la BTIF. Nos résultats obtenus avec la BTIF suggèrent que la stratégie adoptée n'est pas assez sensible pour détecter les transcrits des gènes transactivés. Cependant, deux autres hypothèses doivent être prises en considération. Comme la BTIF forme des complexes avec des facteurs cellulaires et avec l'ADN à transactiver (Misra *et al.*, 1994) et comme nos essais ont été réalisés dans des cellules de singe, des facteurs cellulaires propres aux cellules de bovin pouvaient être absents dans nos conditions. Ensuite, la BTIF a peut-être besoin de facteurs viraux pour transactiver les gènes.

D'autres méthodes alternatives pourraient être utilisées pour tenter d'identifier des transcrits transactivés, comme des essais de protection à la ribonucléase ou l'analyse des transcrits de cellules infectées avec un mutant BHV-1/BICP27⁻ par rapport au virus sauvage. À cet égard, la seconde partie de cette étude consistait à développer certains des outils requis pour la construction d'un mutant BHV-1/BICP27⁻/β-gal⁺. Des essais infructueux pour obtenir une lignée cellulaire MDBK/BICP27⁺ avaient déjà été réalisés dans le laboratoire à l'aide d'un système à un seul vecteur recombinant codant et la BICP27 et le marqueur de sélection phénotypique (pcDNA3/BICP27). Dans cette construction, l'ORF complet de la BICP27 se retrouvait sous le contrôle du promoteur du CMV. Comme aucun résultat positif n'a été obtenu, deux hypothèses avaient été émises: soit le promoteur qui régule l'expression du gène d'intérêt n'est pas fonctionnel ou assez fort pour exprimer la BICP27 de façon détectable dans les cellules MDBK ou soit la BICP27 est toxique pour les cellules MDBK.

Dans le but d'essayer un autre promoteur constitutif, l'ORF complet de la BICP27 a été cloné dans le vecteur commercial pSVSport, soit sous le contrôle du promoteur du SV40. Le vecteur recombinant pSV/BICP27 obtenu a été utilisé en combinaison avec le vecteur pSV2neo ou pSV3neo, tous deux encodant le gène de résistance à la généticine. La différence entre pSV2neo et pSV3neo est que pSV3neo encode aussi l'antigène grand T du SV40 lequel permet la réplication épisomale des plasmides, tel pSV3neo, portant l'origine de réplication du SV40. Malheureusement, la co-transfection de cellules MDBK avec le vecteur recombinant pSV/BICP27 et pSV2neo ou pSV3neo n'a pas permis d'obtenir une lignée cellulaire qui exprime de façon immunodétectable la BICP27. Pourtant, l'utilisation des vecteurs pSV2neo et surtout pSV3neo a permis la transformation de nombreuses lignées cellulaires de mammifères (Southern et Berg, 1982; Chang *et al.*, 1986; Choi *et al.*, 1990) mais, il est à noter qu'aucune de ces lignées ne sont des cellules de bovins. Une hypothèse a alors été émise: des structures secondaires se formant dans l'ARN messager de la BICP27 provenant de pSV/BICP27 pourraient rendre sa traduction impossible; mais la présence de la BICP27 dans les cellules cos-7 transfectées avec pSV/BICP27 contredit cette hypothèse. Nos résultats suggèrent que la protéine BICP27

pourrait être toxique pour les cellules MDBK. En effet, si la BICP27 est une protéine transactivatrice, il est possible qu'elle transactive des gènes cellulaires qui dérèglent le métabolisme de la cellule, d'où sa toxicité. Pour pallier à cette éventualité, l'utilisation d'un système inductible serait grandement avantageux. Nous avons donc entrepris de démontrer que le système pRetroTetOff inductible à la doxycycline est fonctionnel dans les cellules MDBK. Étant donné que les résultats obtenus démontrent l'efficacité du système inductible dans les cellules MDBK, la lignée de complémentation pourra être construite suite au clonage des séquences codantes de la BICP27 dans le vecteur pRetroTetOff puis à la transfection de cellules MDBK avec le vecteur recombinant. Dans le cas où aucune lignée exprimant la BICP27 ne serait obtenu avec le système inductible, l'utilisation d'une autre lignée cellulaire hôte et permissive au BHV-1 devrait être envisagée.

Le deuxième outil à développer est un plasmide de transfert. Pour prévenir la réversion *in vitro* du mutant de délétion désiré par recombinaison homologue entre les séquences du gène de la BICP27 présentes dans l'ADN viral du mutant et la lignée de complémentation comprenant tout l'ORF de la BICP27, 93% des séquences codantes de la BICP27 ont été supprimées et remplacées par une cassette β -gal pour former le plasmide de transfert pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺. Comme il y a possibilité qu'il y ait chevauchement d'un autre gène avec celui de la BICP27, un autre plasmide de transfert (pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺) a été construit par l'insertion d'une cassette β -gal pour inactiver le gène de la BICP27: la possibilité d'inactiver un gène ou des séquences contrôles adjacentes au gène de la BICP27 est ainsi minimale. En effet, si un gène essentiel à la réplication du virus et adjacent à celui de la BICP27 était inactivé en créant le plasmide de transfert, la lignée MDBK/BICP27⁺ ne pourrait pas jouer son rôle de complémentation et le mutant BHV-1/BICP27⁺ ne pourrait pas être produit.

Les résultats obtenus avec l'essai β -galactosidase démontrent la fonctionnalité de la cassette β -gal originale du plasmide pEC10 et des deux plasmides de transfert pKS/NJ-BlnI/ β -gal⁺ et pKS/NJ-BlnI Δ BICP27/ β -gal⁺ dans les cellules MDBK préalablement infectées par le BHV-1. Ces résultats montrent que le promoteur de la

glycoprotéine B du BHV-1 contrôlant le gène de la β -galactosidase dans la cassette β -gal requiert des facteurs viraux pour son activation.

En résumé, ce projet a contribué à élaborer certains des outils requis pour la création d'un mutant de délétion BHV-1/BICP27. Suite au développement d'une lignée stable MDBK/BICP27⁺ avec le système pRetroTetOff qui est fonctionnel dans ces cellules eucaryotes, les plasmides de transfert seront individuellement utilisés pour co-transfecter la lignée en présence de l'ADN purifié du BHV-1. Ces expériences permettront de créer un mutant BHV-1/BICP27/ β -gal⁺ par recombinaison homologue entre les séquences communes des plasmides de transfert et de l'ADN viral. Les mutants seront facilement identifiés des virus sauvages régénérés par sélection phénotypique en présence d'un substrat chromogénique de la β -galactosidase. En infectant les cellules MDBK originales avec les mutants BHV-1/BICP27/ β -gal⁺, il sera possible de déterminer si la BICP27 est essentielle ou non à la réplication du BHV-1. Par la suite, le sauvetage du mutant sera réalisé en co-transfectant des cellules MDBK avec l'ADN purifié du mutant BHV-1/BICP27/ β -gal⁺ sélectionné et le vecteur pKS/NJ-BlnI (qui contient tout l'ORF de la BICP27 et au moins 1 000 pb de ses séquences bordantes). Cette dernière étape permettra d'obtenir et de sélectionner des révertants BHV-1/ β -gal⁻. La virulence de ces révertants sera analysée en parallèle avec celle du mutant BHV-1/BICP27/ β -gal⁺ sélectionné et celle du virus sauvage. Ces analyses permettront de s'assurer que le génome du mutant BHV-1/BICP27/ β -gal⁺ sélectionné ne comporte pas d'autres modifications que celle introduite dans le gène codant la BICP27.

Conclusion

Conclusion

Le BHV-1 provoque encore aujourd'hui d'importantes pertes économiques au Canada. Pour réussir à réduire ces pertes, de nouveaux vaccins doivent être développés. Notre laboratoire travaille sur l'élaboration de mutants de délétion déficients dans leur réplication qui pourraient représenter une avenue des plus prometteuses en vaccinologie. Au préalable toutefois, le rôle des protéines virales dans la réplication virale doit être élucidé. La BICP27 a été ciblée dans ce projet de recherche, étant donné que son homologue chez le HSV-1 joue un rôle essentiel dans la transactivation des gènes viraux et, en conséquence, dans la réplication virale.

Une stratégie pour tenter d'identifier les gènes potentiellement transactivés par la BICP27 a été élaborée. Des cosmides représentant tout le génome du BHV-1 en sous-fragments se chevauchant ont d'abord été cartographiés. Des co-transfections transitoires ont ensuite été réalisées avec ces cosmides et un plasmide exprimant ou non la BICP27, à la suite de quoi les ARNs cellulaires ont été extraits, fractionnés en gel d'agarose puis hybridés avec une sonde représentant le génome complet du BHV-1 pour révéler les transcrits potentiellement transactivés par la BICP27. Malheureusement, cette stratégie n'a permis l'identification d'aucun transcrit transactivé par la BICP27. C'est pourquoi la même expérience a été réalisée avec un transactivateur connu du BHV-1, la BTIF. Un sérum polyclonal monospécifique a été développé afin de s'assurer que la BTIF était bien exprimée dans les cellules co-transfectées. Par la suite, la co-transfection transitoire de cellules avec les cosmides et un plasmide exprimant ou non la BTIF a été réalisée, suivie d'une hybridation des ARNs totaux avec une sonde représentant le génome du BHV-1 mais malheureusement, aucun transcrit transactivé par la BTIF n'a été détecté, suggérant que la stratégie utilisée n'était pas assez sensible. Une nouvelle approche devrait être utilisée comme par exemple des essais de protection à la ribonucléase.

En parallèle à ces études, le développement d'outils pour la construction d'un mutant BHV-1/BICP27⁻ a été entrepris; c'est-à-dire une lignée cellulaire MDBK/BICP27⁺ et des plasmides de transfert. Comme des systèmes à un et deux plasmides n'ont pas été efficaces pour développer la lignée cellulaire, le système inductible pRetroTetOff devra être utilisé. En effet, un essai d'induction à la doxycycline réalisé dans les cellules MDBK avec le vecteur pRetroTetOffLuc a démontré l'efficacité de ce système dans ce type de cellules. Ensuite, deux plasmides de transfert contenant le gène rapporteur de la β -galactosidase qui remplace ou inactive le gène de la BICP27, ont été construits. Des essais β -galactosidase démontrent l'efficacité de la cassette β -gal dans ces deux constructions. Ainsi, suite à l'obtention d'une lignée cellulaire MDBK/BICP27⁺ avec le système inductible, un mutant BHV-1/BICP27⁻ pourra être généré par co-transfection de la lignée de complémentation avec l'ADN viral du BHV-1 et l'un des plasmides de transfert. Si la BICP27 s'avère nécessaire à la multiplication du virus, le mutant BHV-1/BICP27⁻ pourrait éventuellement être utilisé comme vaccin pour prévenir l'infection du bétail par le BHV-1.

Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche, la Dre. Claire Simard, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir fait confiance dès le début de mon stage d'été. Sa supervision, ses conseils judicieux et sa grande disponibilité m'ont beaucoup aidée tout au long de ce projet. L'environnement dans son laboratoire m'a permis d'acquérir plusieurs connaissances et techniques qui me seront très utiles dans le futur.

Je tiens à remercier Nicole Gagnon pour sa grande disponibilité, sa bonne humeur et son support technique. Je désire aussi remercier tous les étudiant(e)s et les employé(e)s qui ont rendu mon passage agréable à l'Institut Armand-Frappier.

Je remercie le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et l'Institut Armand-Frappier pour leur soutien financier sous la forme de bourses d'études.

Finalement, je désire remercier Richard, mes ami(e)s et ma famille, tout particulièrement mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours encouragée à persévérer.

Merci!

Bibliographie

Bibliographie

- Ackermann, M., Braun, D. K., Pereira, L., Roizman, B. 1984. Characterization of herpes simplex virus 1 α proteins 0, 4, and 27 with monoclonal antibodies. *J. Virol.* **52**:108-118.
- Ackermann, M., Peterhans, E., Wyler, R. 1982. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.* **43**:36-40.
- Ackermann, M., Wyler, R. 1984. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* **9**:53-63.
- Ananvoranich, S., Simard, C. 1997. Cosmid vector for the cloning and study of complex GC-rich genomes. *Biotechniques* **23**:812-814.
- Anderson, K. P., Costa, R. H., Holland, L. E., Wagner, E. K. 1980. Characterization of herpes simplex virus type 1 RNA present in the absence of de novo protein synthesis. *J. Virol.* **34**:9-27.
- Armstrong, J. A., Pereira, H. G., Andrewes, C. H. 1961. Observations of the virus of infectious bovine rhinotracheitis, and its affinity with the herpesvirus group. *Virology* **14**:276-285.
- Bello, L. J., Whitbeck, J. C., Lawrence, W. C. 1992. Sequence and transcript analysis of the bovine herpesvirus 1 thymidine kinase locus. *Virology* **189**:407-414.
- Brown, C. R., Nakamura, M. S., Mosca, J. D., Hayward, G. S., Straus, S. E., Perera, L. P. 1995. Herpes simplex virus *trans*-regulatory protein ICP27 stabilizes and binds to 3' ends of labile mRNA. *J. Virol.* **69**:7187-7195.
- Carpenter, D. E., Misra, V. 1992. Sequences of the bovine herpesvirus 1 homologue of herpes simplex virus type-1 α -*trans*-inducing factor (UL48). *Gene* **119**:259-263.
- Chalifour, A., Basso, J., Gagnon, N., Trudel, M., Simard, C. 1996. Transcriptional and translational expression kinetics of the early gene encoding the BICP27 protein of bovine herpesvirus type 1. *Virology* **224**:326-329.
- Chang, P. L., Gunby, J. L., Tomkins, D. J., Mak, I., Rosa, N. E., Mak, S. 1986. Transformation of human cultured fibroblasts with plasmids carrying dominant selection markers and immortalizing potential. *Exp. Cell Res.* **167**:407-416.
- Chen, M., Harty, R. N., Zhao, Y., Holden, V. R., O'Callaghan, D. J. 1996. Expression of an equine herpesvirus 1 ICP22/ICP27 hybrid protein encoded by defective interfering particles associated with persistent infection. *J. Virol.* **70**:313-320.

- Choi, C. S., Murtaugh, M. P., Molitor, T. W. 1990. Establishment of transformed swine fibroblast cell lines using SV40 large T antigen. *Arch. Virol.* **115**:227-237.
- Cox, G. J. M., Zamb, T. J., Babiuk, L. A. 1993. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* **67**:5664-5667.
- Cruickshank, J. G., Berry, D. M. 1965. Morphology of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Virology* **25**:481-482.
- Curtis, R. A., Angulo, A. 1974. A field trial to evaluate an intranasal infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. *Can. Vet. J.* **15**:327-330.
- Darcel, C. le Q., Dorward, W. J. 1975. Recovery of infectious bovine rhinotracheitis virus following corticosteroid treatment of vaccinated animals. *Can. Vet. J.* **16**:87-88.
- Duque, H., Marshall, R. L., Israel, B., Letchworth, G. J. 1989. Effects of formalin inactivation on bovine herpesvirus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine* **7**:13-20.
- Fenwick, M. L., Walker, M. J., Petkevich, J. M. 1978. On the association of virus proteins with the nuclei of cells infected with herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* **39**:519-529.
- Fraefel, C., Wirth, U. V., Vogt, B., Schwyzer, M. 1993. Immediate-early transcription over covalently joined genome ends of bovine herpesvirus 1: the *circ* gene. *J. Virol.* **67**:1328-1333.
- Fraefel, C., Zeng, J., Choffat, Y., Engels, M., Schwyzer, M., Ackermann, M. 1994. Identification and zinc dependence of the bovine herpesvirus 1 transactivator protein BICP0. *J. Virol.* **68**:3154-3162.
- Hammerschmidt, W., Ludwig, H., Buhk, H. J. 1988. Specificity of cleavage in replicative-form DNA of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* **62**:1355-1363.
- Hardwicke, M. A., Sandri-Goldin, R. M. 1994. The herpes simplex virus regulatory protein ICP27 contributes to the decrease in cellular mRNA levels during infection. *J. Virol.* **68**:4797-4810.
- Hardwicke, M. A., Vaughan, P. J., Sekulovich, R. E., O'Conner, R., Sandri-Goldin, R. M. 1989. The regions important for the activator and repressor functions of herpes simplex virus type 1 α protein ICP27 map to the C-terminal half of the molecule. *J. Virol.* **63**:4590-4602.
- Hardy, W. R., Sandri-Goldin, R. M. 1994. Herpes simplex virus inhibits host cell splicing and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J. Virol.* **68**:7790-7799.

- Hibbard, M. K., Sandri-Goldin, R. M. 1995. Arginine-rich regions succeeding the nuclear localization region of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 are required for efficient nuclear localization and late gene expression. *J. Virol.* **69**:4656-4667.
- Ingram, A., Phelan, A., Dunlop, J., Clements J. B. 1996. Immediate early protein IE63 of herpes simplex virus type 1 binds RNA directly. *J. Gen. Virol.* **77**:1847-1851.
- Jensen, R., Pierson, R. E., Braddy, P. M. 1976. Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **169**:500-506.
- Kendrick, J. W., York, C. J., McKercher, D. G. 1956. A controlled field trial of a vaccine for infectious bovine rhinotracheitis. *Proc. U.S. Livestock San. Assoc.* **60**:155-158.
- Kit, S. 1989. Recombinant-derived modified-live herpesvirus vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* **251**:219-236.
- Knipe, D. M., Smith, J. L. 1986. A mutant herpesvirus protein leads to a block in nuclear localization of other viral proteins. *Mol. Cell. Biol.* **6**:2371-2381.
- Köppel, R., Singh, M., Fraefel, C., Ackermann, M., Schwyzer, M. 1995. Characterization of bovine herpesvirus 1 immediate-early proteins BICP0, BICP4, BICP22, *CIRC*, and early protein BICP27. Dans "Immunobiology of viral infections". *Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol.* Edited by: Schwyzer, M. *et al.*, pp. 126-131.
- Levings, R. L., Kaerberle, M. L., Reed, D. E. 1984. The effect of some common inactivation procedures on the antigens of bovine herpesvirus 1. *Vet. Microbiol.* **9**:313-328.
- Liang, X., Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van Den Hurk, S., Fitzpatrick, D. R., Zamb, T. J. 1991. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. *J. Virol.* **65**:1124-1132.
- Liang, X., Babiuk, L. A., Zamb, T. J. 1993. Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology* **194**:233-243.
- Ludwig, H. 1983. Bovine herpesviruses. Dans "The herpesviruses" Volume 2, Edited by: Roizman, B., Plenum Publishing Corp., New York, pp. 135-214.
- Mayfield, J. E., Good, P. J., VanOort, H. J., Campbell, A. R., Reed, D. E. 1983. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J. Virol.* **47**:259-264.

- McCarthy, A. M., McMahan, L., Schaffer, P. A. 1989. Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. *J. Virol.* **63**:18-27.
- McGregor, F., Phelan, A., Dunlop, J., Clements, J. B. 1996. Regulation of herpes simplex virus poly(A) site usage and the action of immediate-early protein IE63 in the early-late switch. *J. Virol.* **70**:1931-1940.
- McLauchlan, J., Phelan, A., Loney, C., Sandri-Goldin, R. M., Clements, J. B. 1992. Herpes simplex virus IE63 acts at the posttranscriptional level to stimulate viral mRNA 3' processing. *J. Virol.* **66**:6939-6945.
- Mears, W. E., Lam, V., Rice, S. A. 1995. Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *J. Virol.* **69**:935-947.
- Mears, W. E., Rice, S. A. 1996. The RGG box motif of the herpes simplex virus ICP27 protein mediates an RNA-binding activity and determines *in vivo* methylation. *J. Virol.* **70**:7445-7453.
- Mears, W. E., Rice, S. A. 1998. The herpes simplex virus immediate-early protein ICP27 shuttles between nucleus and cytoplasm. *Virology* **242**:128-137.
- Misra, V., Babiuk, L. A., Darcel, C. le Q. 1983. Analysis of bovine herpesvirus type-1 isolates by restriction endonuclease finger-printing. *Arch. Virol.* **73**:193-198.
- Misra, V., Blumenthal, R. M., Babiuk, L. A. 1981. Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (Infectious bovine rhinotracheitis virus). *J. Virol.* **40**:367-378.
- Misra, V., Bratanich, A. C., Carpenter, D., O'Hare, P. 1994. Protein and DNA elements involved in transactivation of the promoter of the bovine herpesvirus (BHV) 1 IE-1 transcription unit by the BHV α gene *trans*-inducing factor. *J. Virol.* **68**:4898-4909.
- Misra, V., Walker, S., Hayes, S., O'Hare, P. 1995. The bovine herpesvirus α gene *trans*-inducing factor activates transcription by mechanisms different from those of its herpes simplex virus type 1 counterpart VP16. *J. Virol.* **69**:5209-5216.
- Mitchell, D. 1974. An outbreak of abortion in a dairy herd following inoculation with an intramuscular infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. *Can. Vet. J.* **15**:148-150.
- Moriuchi, H., Moriuchi, M., Smith, H. A., Cohen, J. I. 1994. Varicella-zoster virus open reading frame 4 protein is functionally distinct from and does not complement its herpes simplex virus type 1 homolog, ICP27. *J. Virol.* **68**:1987-1992.

- Morrison, L. A., Knipe, D. M. 1994. Immunization with replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1: Sites of immune intervention in pathogenesis of challenge virus infection. *J. Virol.* **68**:689-696.
- Nettleton, P. F., Sharp, J. M., Herring, A. 1984. Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination, challenge and immunosuppression. Dans "Latent Herpesvirus infection in veterinary medicine". Edited by: Whittman, G. *et al.*, Martinus Nijhoff, Boston, pp. 191-209.
- Nguyen, L. H., Knipe, D. M., Finberg, R. W. 1992. Replication-defective mutants of herpes simplex virus (HSV) induce cellular immunity and protect against lethal HSV infection. *J. Virol.* **66**:7067-7072.
- Okazaki, K., Honda, E., Minetoma, T., Kumagai, T. 1986. Mechanisms of neutralization by monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *Virology* **150**:260-264.
- Okazaki, K., Honda, E., Minetoma, T., Kumagai, T. 1987. Bovine herpesvirus type 1 gp87 mediates both attachment of virions to susceptible cells and hemagglutination. *Arch. Virol.* **97**:297-307.
- Okazaki, K., Matsuzaki, T., Sugahara, Y., Okada, J., Hasebe, M., Iwamura, Y., Ohnishi, M., Kanno, T., Shimizu, M., Honda, E., Kono, Y. 1991. BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparin-like moiety on the cell surface. *Virology* **181**:666-670.
- Pereira, L., Wolff, M. H., Fenwick, M., Roizman, B. 1977. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. V. Properties of α polypeptides made in HSV-1 and HSV-2 infected cells. *Virology* **77**:733-749.
- Phelan, A., Carmo-Fonseca, M., McLauchlan, J., Lamond, A. I., Clements, J. B. 1993. A herpes simplex virus type 1 immediate-early gene product, IE63, regulates small nuclear ribonucleoprotein distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9056-9060.
- Phelan, A., Dunlop, J., Clements, J. B. 1996. Herpes simplex virus type 1 protein IE63 affects the nuclear export of virus intron-containing transcripts. *J. Virol.* **70**:5255-5265.
- Rice, S. A., Knipe, D. M. 1990. Genetic evidence for two distinct transactivation functions of the herpes simplex virus α protein ICP27. *J. Virol.* **64**:1704-1715.
- Rice, S. A., Lam, V. 1994. Amino acid substitution mutations in the herpes simplex virus ICP27 protein define an essential gene regulation function. *J. Virol.* **68**:823-833.

- Rice, S. A., Lam, V., Knipe, D. M. 1993. The amino-terminal region of herpes simplex virus type 1 alpha protein ICP27 is required for an essential lytic function. *J. Virol.* **67**:1778-1787.
- Rice, S. A., Su, L., Knipe, D. M. 1989. Herpes simplex virus alpha protein ICP27 possesses separable positive and negative regulatory activities. *J. Virol.* **63**:3399-3407.
- Sacks, W. R., Greene, C. C., Aschman, D. P., Schaffer, P. A. 1985. Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J. Virol.* **55**:796-805.
- Sandri-Goldin, R. M. 1991. Analysis of the regulatory activities of the HSV-1 α protein ICP27. Dans "Herpesvirus transcription and its regulation". Edited by: Wagner, E. K., pp. 77-103.
- Sandri-Goldin, R. M. 1998. ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. *Genes & Dev.* **12**:868-879.
- Sandri-Goldin, R. M., Hibbard, M. K., Hardwicke, M. A. 1995. The C-terminal repressor region of herpes simplex virus type 1 ICP27 is required for redistribution of small nuclear ribonucleoprotein particles and splicing factor SC35; however, these alterations are not sufficient to inhibit host cell splicing. *J. Virol.* **69**:6063-6076.
- Sandri-Goldin, R. M., Levine, M., Glorioso, J. C. 1981. Method for induction of mutations in physically defined regions of the herpes simplex virus genome. *J. Virol.* **38**:41-49.
- Sandri-Goldin, R. M., Mendoza, G. E. 1992. A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing. *Genes & Dev.* **6**:848-863.
- Schipper, I. A., Kelling, C. L. 1975. Evaluation of inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Can. J. Comp. Med.* **39**:402-405.
- Schwyzer, M. 1995. Sequence analysis of the bovine herpesvirus 1 genome: an exercise in international cooperation. Dans "Immunobiology of viral infections". Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol. Edited by: Schwyzer, M. *et al.*, pp. 108-113.
- Schwyzer, M., Ackermann, M. 1996. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Microbiol.* **53**:17-29.
- Schwyzer, M., Vlcek, C., Menekse, O., Fraefel, C., Paces, V. 1993. Promoter, spliced leader, and coding sequence for BICP4, the largest of the immediate-early proteins of bovine herpesvirus 1. *Virology* **197**:349-357.

- Schwzyer, M., Wirth, U. V., Vogt, B., Fraefel, C. 1994. BICP22 of bovine herpesvirus 1 is encoded by a spliced 1.7 kb RNA which exhibits immediate-early and late transcription kinetics. *J. Gen. Virol.* **75**:1703-1711.
- Sekulovich, R. E., Leary, K., Sandri-Goldin, M. 1988. The herpes simplex virus type 1 α protein ICP27 can act as a *trans*-repressor or a *trans*-activator in combination with ICP4 and ICP0. *J. Virol.* **62**:4510-4522.
- Simard, C., Ananvoranich, S., Bélanger, B., Misra, V., Trudel, M. A fraction of the DNA packaged within bovine herpesvirus type 1 virion exists as a circular form. Manuscrit en préparation pour *Virology*.
- Simard, C., Bastien, N., Trudel, M. 1992. Sequencing and 5'- and 3'-end transcript mapping of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from bovine herpesvirus type 1. *Virology* **190**:689-701.
- Simard, C., Langlois, I., Styger, D., Vogt, B., Vlcek, C., Chalifour, A., Trudel, M., Schwzyer, M. 1995. Sequence analysis of the UL39, UL38, and UL37 homologues of bovine herpesvirus 1 and expression studies of UL40 and UL39, the subunits of ribonucleotide reductase. *Virology* **212**:734-740.
- Simard, C., Nadon, F., Séguin, C., LaBoissière, S., Trudel, M. 1990. Gene mapping of infectious bovine rhinotracheitis viral DNA genome. *Arch. Virol.* **110**:63-75.
- Singh, M., Fraefel, C., Bello, L. J., Lawrence, W. C., Schwzyer, M. 1996. Identification and characterization of BICP27, an early protein of bovine herpesvirus 1 which may stimulate mRNA 3' processing. *J. Gen. Virol.* **77**:615-625.
- Smith, I. L., Hardwicke, M. A., Sandri-Goldin, R. M. 1992. Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. *Virology* **186**:74-86.
- Smith, I. L., Sekulovich, R. E., Hardwicke, M. A., Sandri-Goldin, R. M. 1991. Mutations in the activation region of herpes simplex virus regulatory protein ICP27 can be *trans* dominant. *J. Virol.* **65**:3656-3666.
- Smith, R. H., Zhao, Y., O'Callaghan, D. J. 1993. The equine herpesvirus 1 (EHV-1) UL3 gene, an ICP27 homolog, is necessary for full activation of gene expression directed by an EHV-1 late promoter. *J. Virol.* **67**:1105-1109.
- Southern, P. J., Berg, P. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**:327-341.

- Sutton, M. L. 1980. Rapid onset of immunity in cattle after intramuscular injection of a modified-live-virus IBR vaccine. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **75**:1447-1456.
- Tikoo, S. K., Campos, M., Babiuk, L. A. 1995. Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1): Biology, Pathogenesis, and Control. *Adv. Virus Res.* **45**:191-223.
- Uprichard, S. L., Knipe, D. M. 1996. Herpes simplex ICP27 mutant viruses exhibit reduced expression of specific DNA replication genes. *J. Virol.* **70**:1969-1980.
- Valicek, L., Smid, B. 1976. Envelopment and the envelopes of infectious bovine rhinotracheitis virus in ultrathin sections. *Arch. Virol.* **51**:131-140.
- van Drunen Littel-van den Hurk, S., Gifford, G. A., Babiuk, L. A. 1990. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. *Vaccine* **8**:358-367.
- van Drunen Littel-van den Hurk, S., Tikoo, S. K., Liang, X., Babiuk, L. A. 1993. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunol. and Cell Biol.* **71**:405-420.
- Whetstone, C., Miller, J., Bortner, D., van der Maaten, M. 1989. Changes in the restriction endonuclease patterns of four modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) vaccines after one passage in host animal. *Vaccine* **7**:527-532.
- Whitton, J. L., Rixon, F. J., Easton, A. J., Clements, J. B. 1983. Immediate-early mRNA-2 of herpes simplex viruses types 1 and 2 is unspliced: conserved sequences around the 5' and 3' termini correspond to transcription regulatory signals. *Nucleic Acids Res.* **11**:6271-6287.
- Wilcox, K. W., Kohn, A., Sklyanskaya, E., Roizman, B. 1980. Herpes simplex virus phosphoproteins. I. Phosphate cycles on and off some viral polypeptides and can alter their affinity for DNA. *J. Virol.* **33**:167-182.
- Winkler, M., Rice, S. A., Stamminger, T. 1994. UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. *J. Virol.* **68**:3943-3954.
- Wirth, U. V., Fraefel, C., Vogt, B., Vlcek, C., Paces, V., Schwyzer, M. 1992. Immediate-early RNA 2.9 and early RNA 2.6 of bovine herpesvirus 1 are 3' coterminal and encode a putative zinc finger transactivator protein. *J. Virol.* **66**:2763-2772.
- Wirth, U. V., Gunkel, K., Engels, M., Schwyzer, M. 1989. Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. *J. Virol.* **63**:4882-4889.

- Wyler, R., Engels, M., Schwyzer, M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). Dans "Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs". Edited by: Wittmann, G., pp. 1-72.
- Yates, W. D. G. 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.* **46**:225-263.
- Zhu, Z., Cai, W., Schaffer, P. A. 1994. Cooperativity among herpes simplex virus type 1 immediate-early regulatory proteins: ICP4 and ICP27 affect the intracellular localization of ICP0. *J. Virol.* **68**:3027-3040.
- Zhu, Z., DeLuca, N. A., Schaffer, P. A. 1996. Overexpression of the herpes simplex virus type 1 immediate-early regulatory protein, ICP27, is responsible for aberrant localization of ICP0 and mutant forms of ICP4 in ICP4 mutant virus-infected cells. *J. Virol.* **70**:5346-5356.
- Zhu, Z., Schaffer, P. A. 1995. Intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 major transcriptional regulatory protein, ICP4, is affected by ICP27. *J. Virol.* **69**:49-59.