

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

ISABELLE LANGLOIS

ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES SOUS-UNITÉS DE LA RIBONUCLÉOTIDE
RÉDUCTASE DE L'HERPÈS BOVIN DE TYPE 1.

AVRIL 1996

À mon grand-père

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	i
TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	v
SOMMAIRE.....	vi
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. L'étiologie du BHV-1.....	5
2. Les maladies associées au BHV-1.....	5
3. Isolats du BHV-1.....	6
4. La pathogenèse du BHV-1.....	7
5. La pathogénie du BHV-1.....	8
5.1 Réservoir et distribution.....	8
5.2 Période d'incubation et transmission.....	8
6. Morphologie.....	9
7. Génome, gènes et transcrits viraux.....	12
8. Les protéines virales.....	17
8.1 Protéines du tégment.....	17
8.2 Protéines précoces-immédiates.....	17
8.3 Glycoprotéines de surface.....	18
8.4 Les enzymes.....	19
9. La réplication virale.....	20
10. Diagnostic et thérapie.....	23
11. Prévention et contrôle.....	24
12. L'immunité et le BHV-1.....	24
13. Les vaccins.....	26
13.1 Vaccins conventionnels.....	26
13.1.1 Vaccins atténués.....	27
13.1.2 Vaccins inactivés.....	28
13.2 Vaccins de nouvelle génération.....	28
13.2.1 Les vaccins sous-unitaires.....	28
13.2.2 Les vaccins développés par génie génétique.....	29
13.2.2.1 L'immunisation à l'aide d'ADN.....	30
13.2.2.2 Les mutants de délétion.....	30
14. Généralités sur la ribonucléotide réductase.....	30
14.1 Ribonucléotides réductases de classe I.....	31
14.2 Ribonucléotides réductases de classe II.....	34
14.3 Ribonucléotides réductases de classe III.....	35
14.4 Réaction enzymatique.....	35
14.5 Ribonucléotides réductases des virus herpès.....	36
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	41
1. Virus, cellules et ARNs.....	42
2. Souches de <i>Escherichia coli</i>	42
2.1 Culture de <i>E. coli</i>	42
3. Vecteurs de clonage.....	43
3.1 pBluescript KS.....	43
3.2 pET-21b.....	43

4.	Manipulation de l'ADN.....	44
4.1	Préparation de l'ADN plasmidique et digestion.....	44
4.2	Électrophorèse sur gel d'agarose.....	44
4.3	Déphosphorylation des extrémités 5' dépassantes.....	45
4.4	Marquage radioactif des extrémités 5'OH.....	46
4.5	Réparation des extrémités 5' dépassantes.....	46
4.6	Ligation des fragments d'ADN au vecteur de clonage.....	47
4.7	Transformation de <i>E. coli</i>	47
4.8	Séquençage d'ADN par la méthode enzymatique.....	48
5.	Manipulation des protéines.....	48
5.1	Analyse électrophorétique (SDS-PAGE).....	48
5.2	Transfert de type Western et immunoempreinte.....	49
5.3	Analyses en dot.....	50
6.	Expression des sous-unités de la RNR du BHV-1 chez <i>E. coli</i>	50
6.1	Clonage des gènes dans le vecteur pET-21b	50
6.2	Expression des protéines recombinantes chez <i>E. coli</i>	53
7.	Production des sérums monospécifiques.....	55
7.1	Préparation des antigènes.....	55
7.2	Protocole d'immunisation.....	56
8.	Cinétique d'expression de la RNR du BHV-1.....	57
9.	Localisation de l'extrémité 5' du transcrit codant la R1.....	57
10.	Séquençage de la région 3' du gène de la R1.....	59
	RÉSULTATS.....	60
1.	Expression des protéines recombinantes chez <i>E.coli</i>	61
1.1	Expression de la petite sous-unité.....	62
1.2	Expression de la grosse sous-unité.....	62
2.	Production et calibration des sérums monospécifiques.....	67
3.	Cinétique d'expression des sous-unités de la RNR du BHV-1.....	68
4.	Localisation de l'extrémité 5' du transcrit codant la R1.....	73
	DISCUSSION.....	77
	CONCLUSION.....	86
	REMERCIEMENTS.....	88
	BIBLIOGRAPHIE.....	89
	ANNEXES.....	101
	ANNEXE 1.....	102
	ANNEXE 2.....	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARNt	:	ARN de transfert
α TIF	:	facteur de trans-induction des gènes α
ADCC	:	cytotoxicité dépendante des anticorps
ATCC	:	"American Type Culture Collection"
BHV-1	:	virus de l'herpès bovin de type 1
BHV-5	:	virus de l'herpès bovin de type 5
BICP	:	"bovine infected cell protein"
BSA	:	albumine sérique bovine
BTIF	:	facteur de trans-induction des gènes α bovin
dNTP	:	désoxyribonucléotides triphosphates
dUTPase	:	désoxyuridine triphosphatase
EHV	:	virus de l'herpès équin
HSV-1	:	virus de l'herpès simplex de type 1
hre	:	heure(s)
IBR	:	rhinotrachéite infectieuse bovine
IPTG	:	isopropyl- β -D thiogalactoside
IPV	:	exanthème coïtal
kDa	:	kiloDalton
kpb	:	kilopaires de base
MEM	:	milieu essentiel minimal
m.o.i	:	multiplicité d'infection
NaOAc	:	acétate de sodium
NH ₄ OAc	:	acétate d'ammonium
NK	:	cellules tueuses naturelles
p.i.	:	post-infection
PIPES	:	acide 1,4-piperazine diéthanesulfonique
PBS	:	solution saline tamponnée au phosphate
PRV	:	virus de la pseudorange porcine
PVDF	:	polyvinylidène difluoride
TK	:	thymidine kinase
RNR	:	ribonucléotide réductase
U	:	unité
VZV	:	virus de la varicelle-zona

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1** : Aspect du BHV-1 en microscopie électronique
- FIGURE 2** : Génome du BHV-1
- FIGURE 3** : Cycle de réplication du BHV-1
- FIGURE 4** : Ribonucléotide réductase de classe I
- A) Représentation schématique de la structure quaternaire de l'enzyme
- B) Chaîne de transfert d'hydrogènes
- C) Mécanisme de la réaction enzymatique
- FIGURE 5** : Cinétique d'apparition des transcrits de la RNR du BHV-1
- FIGURE 6** : Stratégies de clonage des gènes des sous-unités de la RNR virale
- FIGURE 7** : Analyse de l'expression du polypeptide de fusion R2-T7 Tag chez *E. coli*
- FIGURE 8** : Analyse de l'expression du polypeptide de fusion R1-T7 Tag chez *E. coli*
- FIGURE 9** : Calibration des sérums
- FIGURE 10** : Cinétique d'expression des sous-unités de la RNR virale
- FIGURE 11** : Localisation du site d'initiation de la transcription du gène de la R1
- FIGURE 12** : Schéma comparatif des régions promotrices potentielles des gènes de la RNR du BHV-1

SOMMAIRE

Le virus de l'herpès bovin de type 1 (BHV-1) code plusieurs enzymes dont la ribonucléotide réductase (RNR). Celle-ci est impliquée dans la synthèse des nucléotides précurseurs de l'ADN. La RNR est constituée de deux sous-unités distinctes (petites et grosses sous-unités) présentes en quantités stœchiométriques. Cependant, l'équivalence observée au niveau des holoenzymes de différentes sources ne se retrouve pourtant pas au niveau des transcrits chez le BHV-1, celui de la petite sous-unité (R2) étant plus abondant. Il était donc intéressant de déterminer si ce rapport non-stœchiométrique des transcrits se reflétait au niveau protéique. Des sérums monospécifiques contre chacune des sous-unités ont été produits et utilisés afin de déterminer la cinétique d'expression de la RNR virale. Contrairement à ce qui était attendu, l'étude montre que la grosse sous-unité (R1) s'accumule en plus grande abondance que la R2. La région promotrice du gène de la R1 ainsi que la région 5' non-traduite du transcrit correspondant ont été caractérisées puis comparées à celles de la R2. Ces comparaisons nous ont permis d'émettre des hypothèses permettant d'expliquer le fait que les rapports observés au niveau des transcrits ne correspondent pas à ceux observés au niveau protéique.

INTRODUCTION

Le virus de l'herpès bovin de type 1 (BHV-1) code pour sa propre ribonucléotide réductase (RNR), l'enzyme responsable de la réduction des ribonucléotides diphosphates en leurs formes désoxy correspondantes qui sont les précurseurs de la synthèse d'ADN. Les RNR eucaryotiques caractérisées à ce jour sont constituées de deux sous-unités (R1 et R2), chacune d'elle étant présente au niveau de l'holoenzyme sous la forme d'un homodimère stable (Reichard, 1993; Ingemarson et Lankinen, 1987). Chez le BHV-1, la stœchiométrie des sous-unités R1 et R2 dans l'holoenzyme ne peut être associée à une abondance comparable de leurs transcrits respectifs. En effet, il a été démontré que le transcrit codant pour la sous-unité R2 s'accumule toujours en plus grande abondance que celui de la R1 (Simard *et al.*, 1992). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à déterminer si l'abondance non-stœchiométrique des transcrits de la RNR du BHV-1 se reflétait au niveau protéique. Pour ce faire, les deux polypeptides viraux ont été individuellement produits dans un système d'expression procaryotique afin de permettre le développement de sérums monospécifiques. Après calibration préalable, les sérums ont ensuite été utilisés pour étudier la cinétique d'expression des protéines R1 et R2 dans les cellules infectées par le BHV-1. Les sérums ont spécifiquement détecté des polypeptides de grosseurs comparables à celles prédites à partir des structures primaires déduites du séquençage de leurs gènes respectifs. Cependant, nos résultats montrent que la synthèse de la R1 dans les cellules infectées précède celle de la R2. De plus, contrairement à ce qui était attendu, la protéine R1 s'accumule en plus grande abondance que la R2. Nos observations suggèrent que le transcrit codant la R1 est plus efficacement traduit que celui de la R2. Cette hypothèse est appuyée par l'analyse des

caractéristiques des régions 5' non codantes des transcrits respectifs. Enfin, les régions promotrices potentielles des deux gènes ont été comparées afin de vérifier si elles pourraient être responsables de l'accumulation différentielle des transcrits.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'étiologie du BHV-1

Le BHV-1 est un membre caractéristique de la famille des *Herpesviridae* et en raison de ses propriétés biologiques, il appartient à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* tout comme les virus de la varicelle-zona, de l'herpès simplex et de la pseudorange porcine. La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* est subdivisée en deux genres soit, les simplexvirus et les varicellovirus. Le BHV-1 est classé dans le genre varicellovirus en raison de ses caractéristiques moléculaires (Roizman *et al.*, 1992).

2. Les maladies associées au BHV-1

Le BHV-1 est associé à la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) et à l'exanthème coïtal (IPV), deux syndrômes cliniques majeurs observés chez les bovins infectés (Wyler *et al.*, 1989). Moins fréquemment, le BHV-1 peut aussi être associé à des conjonctivites, des avortements, des encéphalites, des entérites et des dermatites (Kahrs, 1977). Le BHV-1 est, de plus, l'un des agents pathologiques de la fièvre du transport, une maladie respiratoire complexe de nature bactérienne et virale causant de lourdes pertes économiques chez les producteurs de bovidés (Yates, 1982).

La rhinotrachéite infectieuse est une maladie affectant le système respiratoire supérieur. Les symptômes rencontrés chez les animaux atteints sont la fièvre, une diminution de l'appétit, une respiration difficile et rapide, un état de dépression général ainsi que la présence de substances mucopurulentes au niveau des voies respiratoires. De plus, on remarque la présence de débris nécrotiques blanchâtres et de pustules au niveau des muqueuses du système

respiratoire supérieur (Kahrs, 1977). L'exanthème coïtal est une maladie vénérienne qui se caractérise par de la fièvre, la présence de substances mucopurulentes et de lésions pustuleuses au niveau des organes génitaux des animaux atteints (Wyler *et al.*, 1989). Cependant, le taux de mortalité relié au BHV-1 est faible. La mort survient presque exclusivement lors de complications par des infections secondaires de nature bactérienne ou virale (Rosner, 1968) et chez les jeunes animaux (Kahrs, 1977).

3. Isolats du BHV-1

Auparavant, les isolats du BHV-1 étaient classés en deux souches selon leur origine clinique: les souches isolées soit au niveau des voies respiratoires (IBR) ou du système reproducteur (IPV). Cette classification devint désuète lorsqu'il a été démontré par des tests de neutralisation qu'il s'agissait d'un seul et même virus (McKercher *et al.*, 1959).

L'avènement de la biologie moléculaire et des anticorps monoclonaux a permis d'élaborer une nouvelle classification. Dès lors, les isolats du BHV-1 ont été classifiés en 5 sous-types (1a, 1b, 2a, 2b et 3) sur la base des profils de restriction de l'ADN viral et de la réactivité des protéines avec un panel d'anticorps monoclonaux (Wyler *et al.*, 1989). Les caractéristiques biologiques telles que le spectre d'hôtes, la croissance à haute température, la neutralisation et la morphologie des plages de lyse des différents sous-types ont montré qu'il n'y avait aucune différence entre eux. Cependant, des différences au niveau de la virulence entre les divers sous-types ont été rapportées.

Les sous-types 1 (1a et 1b) et 2 (2a et 2b) représentent généralement et

respectivement les souches américaines (souche de référence Colorado) et européennes (souche de référence K22). Dans le cas des sous-types 1 et 2, aucune corrélation absolue n'a été établie avec leurs origines cliniques (Wyler *et al.*, 1989). Par contre, une corrélation partielle a été établie pour les isolats du sous-type 3 sur la base de leur potentiel neuropathologique (Engels *et al.*, 1986). Plus récemment, les isolats du sous-type 3 ont été classés dans un groupe distinct, le BHV-5 (Roizman *et al.*, 1992).

4. La pathogenèse du BHV-1

Selon son site d'entrée, le BHV-1 infecte soit les muqueuses du système respiratoire ou reproducteur. Il détruit les cellules épithéliales, donnant ainsi une porte d'entrée à d'autres pathogènes. Lors de la primo-infection, le BHV-1 se propage dans plusieurs tissus, tels le système nerveux central, le tractus digestif, les mamelles et le fœtus (Wyler *et al.*, 1989). Étonnamment, le BHV-1 ne provoque qu'une faible virémie. Il a été postulé que le transport du virus vers les différents tissus était médié par un nombre restreint de leucocytes circulants. De plus, il a été observé que le virus se propage également dans l'organisme via le transport neuronal et les ponts intercellulaires ce qui lui permet d'éviter l'action neutralisante des anticorps (Wyler *et al.*, 1989).

Lors de l'invasion neuronale, le virus entre en latence au niveau des ganglions trijumeaux (Ackermann *et al.*, 1982) et sacraux (Ackermann et Wyler, 1984) où il persiste silencieusement dans l'organisme jusqu'à sa réactivation. Le virus peut se réactiver spontanément, ou bien sous l'influence de certains facteurs tels les rayons ultraviolets (UV), les glucocorticoïdes, le stress, les surinfections et le transport des animaux (Wyler *et al.*, 1989). Le virus réactivé

est transporté en périphérie via le transport axonal au niveau des muqueuses où il provoque une infection locale se traduisant par son excrétion dans les sécrétions; la réactivation est parfois accompagnée de faibles signes cliniques (Nettleton *et al.*, 1984).

5. La pathogénie du BHV-1

5.1 Réservoir et distribution

Les bovins constituent le principal réservoir du BHV-1 (Kahrs, 1977). Cependant, le BHV-1 a aussi été détecté chez d'autres espèces comme la chèvre (Mohanty *et al.*, 1972), le porc (Nelson *et al.*, 1972), le buffle (Kahrs, 1977) et d'autres ruminants tels le caribou et le renne (Wyler *et al.*, 1989). La répartition du BHV-1 est mondiale (Wyler *et al.*, 1989). Au Canada, environ 65% du cheptel est séropositif pour le BHV-1 (communication personnelle, Serge Dea, vétérinaire IAF). Il n'y a pas de variations dans la distribution du BHV-1 selon l'âge ou le sexe des animaux. Néanmoins, les cas plus graves amenant la mort se produisent surtout chez les jeunes animaux car leur immunité est peu développée, les rendant ainsi plus vulnérables à l'infection (Kahrs, 1977).

5.2 Période d'incubation et transmission

La période d'incubation suite à l'exposition varie de 2 à 6 jours. Plusieurs facteurs font varier le temps d'incubation et la sévérité de la maladie: la souche, la dose reçue, la route d'inoculation, le statut immunitaire de l'animal et l'environnement (Kahrs, 1977).

Le BHV-1 peut être transmis horizontalement lors de la primo-infection

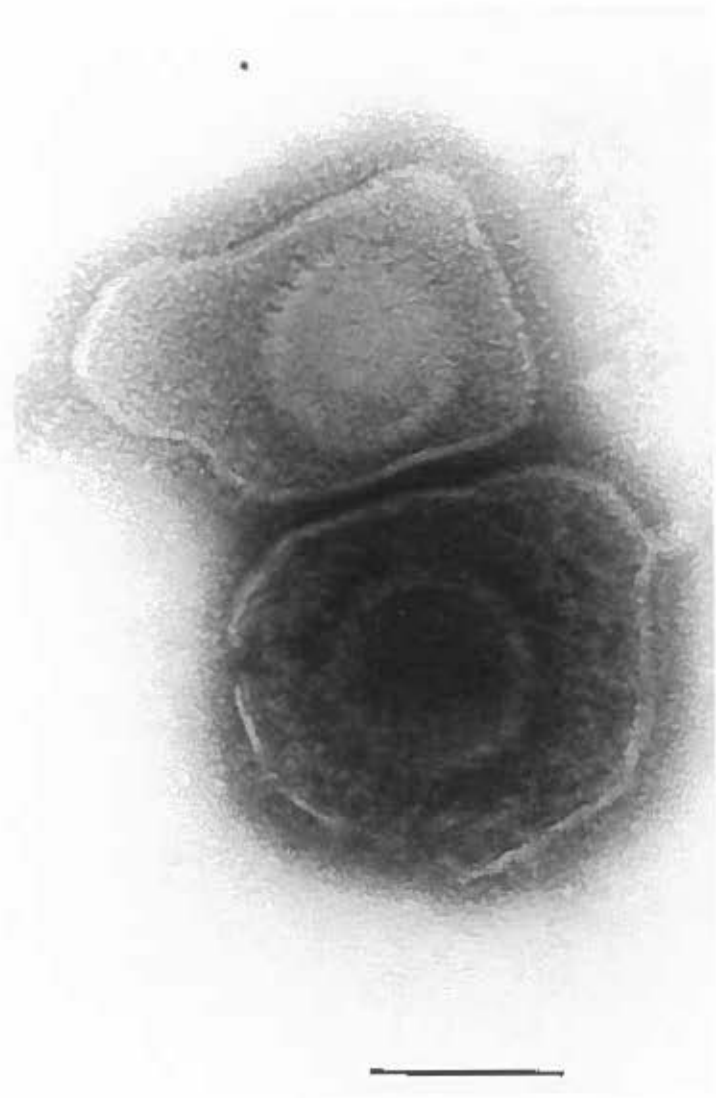
ou de la réactivation du virus. Il peut aussi être transmis verticalement au fœtus lors d'une primo-infection chez la mère (Kahrs, 1977). De plus, des cas de transmission horizontale d'un animal vacciné à un autre non vacciné ont été rapportés lors de l'utilisation de vaccins atténués (Nettleton *et al.*, 1984). Le potentiel de transmission du BHV-1 est élevé car le virus est excrété en grandes quantités dans les sécrétions oculaires de même que dans les sécrétions des systèmes respiratoire et reproducteur des animaux infectés (Yates, 1982). La transmission s'effectue par contact des muqueuses respiratoires ou génitales avec des aérosols et des micro-gouttelettes de sécrétions (Kahrs, 1977). Le BHV-1 peut également être transmis par le sperme des animaux infectés lors de l'accouplement ou de l'insémination artificielle (Saxegaard, 1970; White et Snowdon, 1973).

Il a été observé qu'en pâturage, où un grand nombre d'animaux sont réunis, la rapidité de transmission et la sévérité de l'infection sont plus élevées (Rosner, 1968). La susceptibilité des bovins varie donc selon la proximité des animaux. Plusieurs autres facteurs environnementaux propres aux pâturages modulent aussi la susceptibilité des animaux au BHV-1 comme leur transport, leurs conditions de stress, leur exposition à d'autres pathogènes et les variations dans leur alimentation (Kahrs, 1977).

6. Morphologie

L'architecture du virion (Fig. 1) a permis sa classification chez les *Herpesviridae*. Ainsi, le BHV-1 possède les quatre constituants de base des virus herpès, soit une nucléocapside contenant le matériel génétique, une capsidie icosaédrale de 100 nm de diamètre, un tégument et une enveloppe. Le diamètre

Figure 1: Aspect du BHV-1 en microscopie électronique après coloration par imprégnation négative avec l'acide phosphotungstique (PTA 3%, pH 6,0). La barre correspond à 100 nm. Cette photographie nous a été fournie par le service de microscopie électronique de l'Institut Armand-Frappier pour notre laboratoire.



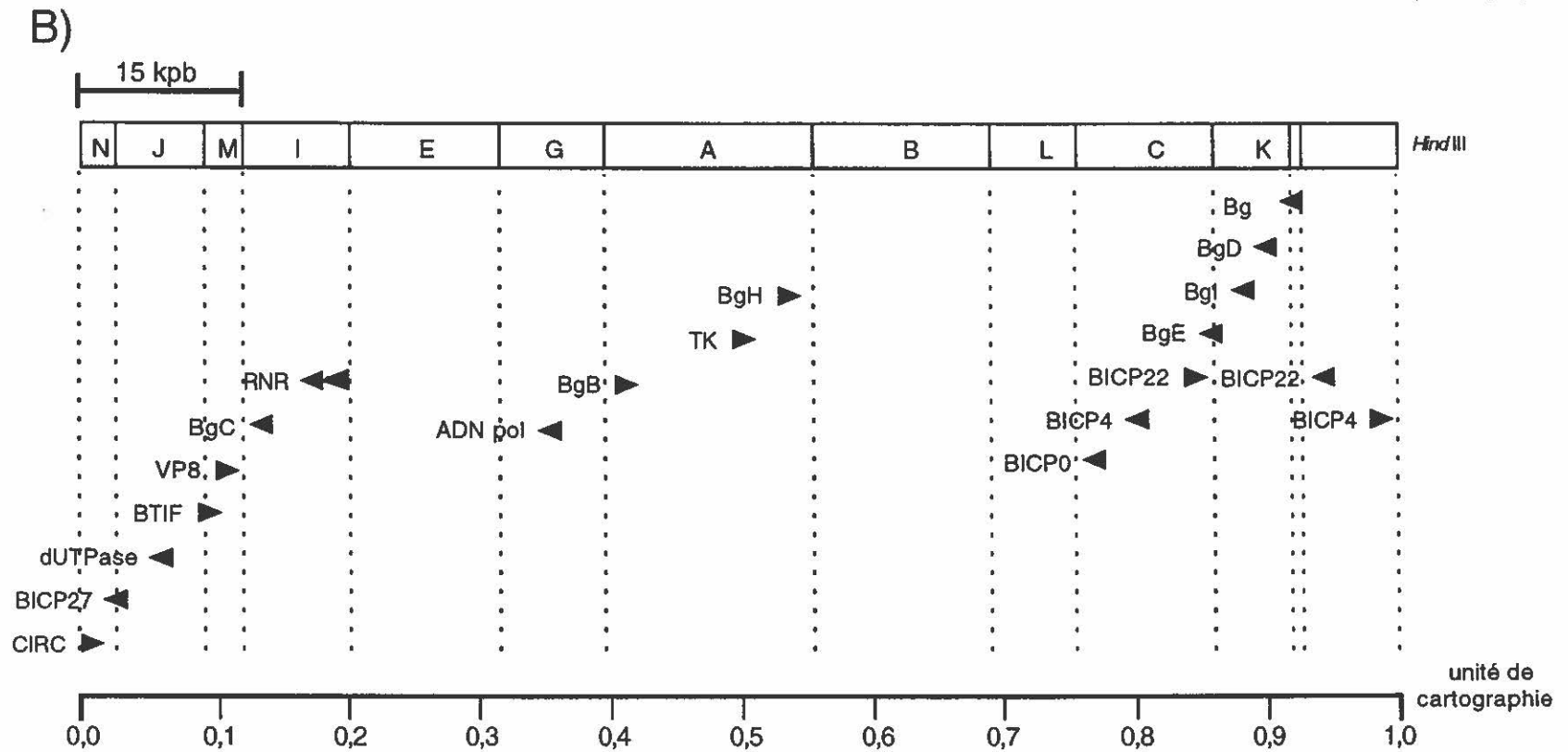
de la particule virale est d'environ 200 nm (Watrach et Bahnemann, 1966).

L'enveloppe dérive de la membrane nucléaire des cellules hôtes. Elle est composée d'une double couche de phospholipides et comporte à sa surface des projections formées de glycoprotéines. Pour sa part, la capside est constituée de 162 capsomères et comporte une symétrie axiale de 5:3:2 (Wyler *et al.*, 1989). Chez les virus herpès, la disposition du génome à l'intérieur de la capside suit une forme toroïdale autour d'un noyau protéique (Rixon, 1993). Jusqu'à ce jour, les protéines impliquées dans le mécanisme d'enroulement de l'ADN n'ont pas été identifiées. Le tégument est une structure amorphe de nature fibreuse située entre la capside et l'enveloppe. Il est pléomorphique, dense aux électrons et son diamètre varie selon son degré de condensation. Son rôle semble être de supporter la croissance du virus dans les cellules permissives (Rixon, 1993).

7. Génome, gènes et transcrits viraux

Le génome du BHV-1 est constitué d'un ADN double brin linéaire de 140 kpb subdivisé en deux sections uniques (Fig. 2). La section courte (Us; 11 kpb) est bordée de séquences répétitives inversées (IR et TR; 12 kpb). La section longue (UL; 104 kpb) ne comporte qu'une séquence répétitive située sur le bras droit (Wyler *et al.*, 1989). Grâce aux séquences répétitives, la section courte peut inverser son orientation par rapport à la section longue. Le génome du BHV-1 existe donc sous deux formes isomériques se retrouvant en quantités équivalentes (Mayfield *et al.*, 1983). Ainsi, tout comme les virus de la varicelle-zona (VZV), de la pseudorange porcine (PRV) et de l'herpès équin (EHV), le

Figure 2: Génome du BHV-1. Le génome viral (A) est constitué d'un ADN double brin linéaire de 140 kpb subdivisé en deux sections uniques, soit la section longue (UL; 104 kpb) et la section courte (Us; 11 kpb). Cette dernière est bordée de séquences répétitives inversées (IR et TR; 12 kpb). La localisation des gènes du BHV-1 (B) est indiquée sous forme de flèches dont le sens désigne l'orientation des gènes représentés (modifié d'après Tikoo *et al.*, 1995).



BHV-1 est classifié selon son nombre d'isomères chez le groupe D ou 2 des virus herpès (Roizman, 1993). La caractérisation physico-chimique du génome a été effectuée en 1972 par Graham et collaborateurs. L'étude a déterminé que le génome comporte 72% de bases GC avec une température de dénaturation de 82,7°C et une densité de 1,73 g/cm³.

Le génome du BHV-1 (Fig. 2) n'est que partiellement caractérisé. Ainsi, seules sont connues les séquences de l'ADN polymérase (Owen et Field, 1988), la VP8 (Carpenter et Misra, 1991; LaBoissière *et al.*, 1992), la BTIF (facteur de trans-induction des gènes α bovin) (Carpenter et Misra, 1992), la BICP0 ("bovine infected cell protein 0") (Wirth *et al.*, 1992), la BICP4 (Schwyzer *et al.*, 1993), la BICP22 (Schwyzer *et al.*, 1994), la protéine CIRC (Fraefel *et al.*, 1993), la thymidine kinase (TK) (Bello *et al.*, 1992), la désoxyuridine triphosphatase (dUTPase) (Liang *et al.*, 1993), les sous-unités de la ribonucléotide réductase (RNR) (Simard *et al.*, 1992; ANNEXE 2; Simard *et al.*, 1995) et les glycoprotéines majeures telles la BgB (Whitbeck *et al.*, 1988; Misra *et al.*, 1988), la BgC (Fitzpatrick *et al.*, 1989), la BgD (Tikoo *et al.*, 1990), la BgH (Meyer *et al.*, 1991) ainsi que la séquence complète de la section unique courte: BgE, BgG, BgI (Leung-Tack *et al.*, 1994). Pour pallier à ce manque d'informations, un projet international visant à séquencer la totalité du génome est en cours. Ce projet instauré par le docteur Schwyzer en 1991 regroupe plusieurs laboratoires dont le nôtre.

Le BHV-1 exprime 59 transcrits durant sa réplication (Seal *et al.*, 1991). Ces gènes sont transcrits par l'ARN polymérase II cellulaire et classés en trois groupes d'expression: précoces-immédiats (IE ou α), précoces (E ou β) ou tardifs

(L ou γ) (Seal *et al.*, 1992). La régulation de l'expression des gènes chez les virus herpès réside en la complexité de leurs promoteurs qui varient selon le groupe d'expression auquel ils appartiennent. Il est à noter que les informations portant sur la régulation de l'expression des gènes proviennent pour la plupart de la revue de question de Weinheimer et McKnight (1987) et se base sur celle du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) chez lequel cet aspect de la réplication virale a été plus amplement étudié et caractérisé.

Les gènes précoces-immédiats codent des protéines impliquées dans la coordination de l'expression des gènes. Ces transcrits sont exprimés en absence de synthèse protéique et de réplication de l'ADN viral. Leurs promoteurs se caractérisent par la présence d'une boîte TATA, d'éléments distaux (boîte CAAT, boîte GC) et d'une séquence cis-activatrice (TAATGARAT) sur laquelle se lie un hétérodimère de transactivateurs constitué de l' α TIF d'origine virale et d'une seconde protéine d'origine cellulaire. L'expression des gènes β ou précoces requiert la présence des protéines précoces-immédiates. Ces gènes précoces codent principalement des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral et dans le métabolisme des nucléotides. Leurs promoteurs ne comportent en général qu'une boîte TATA et des éléments distaux. Finalement, les gènes tardifs ou γ codent les protéines de la capsidie et celles requises à l'assemblage des nouveaux virions; leurs promoteurs ne comportent en général qu'une boîte TATA.

Lorsque le BHV-1 entre en latence, seul un transcrit appelé LAT est exprimé. Ce dernier est codé sur le brin d'ADN opposé à celui portant le gène codant la protéine précoce-immédiate BICP0 (Wirth *et al.*, 1991; Wirth *et al.*,

1992). Jusqu'à maintenant, très peu d'informations existent quant au fonctionnement de ce mécanisme de persistance propre à tous les virus herpès.

8. Les protéines du BHV-1

Le BHV-1 synthétise de 40 à 48 polypeptides dont 25 à 33 seraient structuraux (Misra *et al.*, 1981). Douze polypeptides non-structuraux ont été identifiés et comprennent différentes enzymes et les protéines précoces-immédiates. Il est à noter que la nomenclature utilisée pour identifier les polypeptides du BHV-1 est basée sur celle du virus HSV-1.

8.1 Protéines du tégment

Chez le BHV-1, deux polypeptides du tégment ont été identifiés soit, les protéines VP8 et BTIF. La BTIF (homologue à l' α TIF du HSV-1) est une protéine de 68 kDa. Elle joue un rôle prédominant lors de l'initiation du cycle répliatif en trans-activant l'expression des gènes précoces-immédiats (Misra *et al.*, 1994); la BTIF est exprimée à la fin de la phase précoce du cycle répliatif (Carpenter et Misra, 1992). Le rôle de la VP8, un polypeptide de 96 kDa (Carpenter et Misra, 1991; LaBoissière *et al.*, 1992), n'a pas encore été déterminé comme tel chez le BHV-1; cependant, des évidences suggèrent que tel son homologue chez le HSV-1, la VP8 modulerait l'activité trans-activatrice de la BTIF (Tikoo *et al.*, 1995).

8.2 Protéines précoces-immédiates

Jusqu'à ce jour, cinq protéines précoces-immédiates ont été identifiées chez le BHV-1 (BICP0, BICP4, BICP27, BICP22, CIRC). La BICP4, une protéine de

180 kDa, trans-active l'expression des gènes de la phase précoce tout en régulant sa propre expression. En effet, elle peut réprimer sa synthèse en se liant au niveau de son propre promoteur (Schwyzer *et al.*, 1993). Pour sa part, la BICP0, un polypeptide de 97kDa, trans-active l'expression de plusieurs gènes dont sa propre synthèse (Wirth *et al.*, 1992). Cependant, elle réprime l'expression de la BICP22 (Wirth *et al.*, 1992). La BICP22 est une protéine de 55 kDa (Hayes et Rock, 1990) mais son rôle dans la réplication virale est encore mal défini. Cependant, il a été démontré que ce gène est réactivé lors de la phase tardive de l'infection (Schwyzer *et al.*, 1994). La protéine CIRC (34 kDa), dont la fonction biologique est encore inconnue, s'est avérée non-essentielle à la réplication *in vitro* du BHV-1 (Fraefel *et al.*, 1994). Finalement, le rôle de la BICP27 dans la réplication du BHV-1 n'a pas encore été élucidé. Cependant, son homologue chez le HSV-1 (ICP27) est impliqué dans la coordination de l'activité trans-activatrice des protéines précoces-immédiates (Sandri-Goldin, 1991).

8.3 Glycoprotéines de surface

Chez le BHV-1, sept glycoprotéines de surface ont été identifiées jusqu'à ce jour soit: BgB, BgC, BgD, BgE, BgG, BgH et BgI. Les glycoprotéines BgB, BgC et BgD constituent les principales cibles du système immunitaire de l'hôte (Tikoo *et al.*, 1995). Le gène de la glycoprotéine BgB code un précurseur de 130 kDa dont la maturation fait suite à son clivage par une protéase cellulaire encore non-identifiée, pour former un hétérodimère constitué de deux chaînes protéiques de 55 et 74 kDa liées par un pont disulfure (Van Drunen Littel-Van Den Hurk et Babiuk, 1986). En raison de son patron d'expression, la BgB est considérée comme une protéine de la phase précoce du cycle réplcatif (Nelson *et al.*, 1989).

Cette glycoprotéine est impliquée dans l'attachement et la pénétration du virus dans les cellules cibles (Liang *et al.*, 1991; Fitzpatrick *et al.*, 1990). De plus, elle serait impliquée au niveau de la dissémination du virus via les ponts intercellulaires car il a été démontré qu'elle induit la fusion des cellules l'exprimant (Fitzpatrick *et al.*, 1990; Kopp *et al.*, 1994).

La glycoprotéine BgC (90 kDa) est présente dans les cellules infectées sous la forme d'un homodimère de 180 kDa (Van Drunen Littel-Van Den Hurk et Babiuk, 1986). Elle est exprimée durant la phase tardive de l'infection. Il s'agit de la principale protéine impliquée dans l'attachement du virus aux cellules cibles via le récepteur à héparine (Okazaki *et al.*, 1991, Liang *et al.*, 1991). La glycoprotéine BgC n'est cependant pas essentielle à la réplication virale (Liang *et al.*, 1992). La glycoprotéine BgD (70 kDa) est présente sous la forme d'un homodimère de 140 kDa (Van Drunen Littel-Van Den Hurk et Babiuk, 1986). Elle est impliquée dans le mécanisme de pénétration du virus dans la cellule cible (Fehler *et al.*, 1992) et est exprimée durant la phase précoce (Nelson *et al.*, 1989). Il s'agit d'une glycoprotéine essentielle à la réplication car il a été démontré qu'un mutant BgD⁻ est non viable (Fehler *et al.*, 1992). Enfin, peu d'informations sont disponibles sur les glycoprotéines BgE, BgI, BgH et BgG.

8.4 Les enzymes

Tout comme les autres virus herpès, le BHV-1 code pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Jusqu'à ce jour, l'ADN polymérase, la dUTPase, la ribonucléotide réductase (RNR) et la thymidine kinase (TK) ont été identifiées (Tikoo *et al.*, 1995). La TK n'est pas essentielle à la réplication virale *in vitro* du BHV-1 (Kit et Qavi, 1983). Cependant, un mutant TK⁻ s'est a-

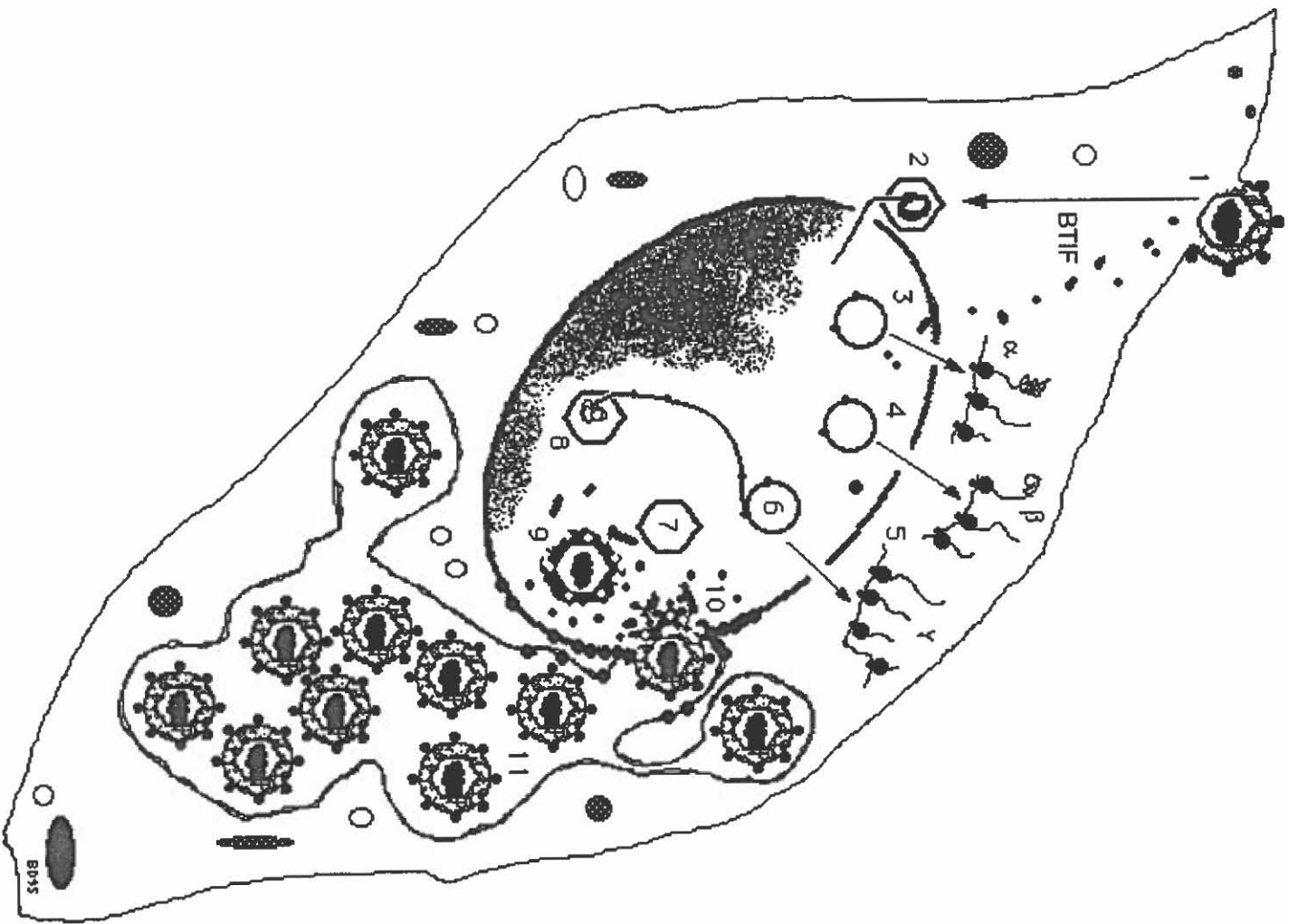
vééré moins virulent *in vivo* que le virus sauvage, ce qui met en évidence l'une des fonctions possibles de la TK comme facteur de virulence chez le BHV1 (Kit *et al.*, 1986). La dUTPase catalyse la déphosphorylation des dUTP en dUMP (Tikoo *et al.*, 1995); elle n'est pas essentielle à la réplication *in vitro* du BHV-1 (Liang *et al.*, 1993). Dans le cas de la RNR qui fait l'objet de la présente étude, il s'agit de l'enzyme responsable de la réduction des ribonucléotides diphosphates en désoxyribonucléotides correspondants. Les caractéristiques de cette enzyme seront plus amplement traitées dans la section 14.

9. La réplication virale

Il est à noter que la plupart des informations de cette section proviennent de la revue de question de Tikoo et collaborateurs (1995). Le cycle répliatif du BHV-1 est illustré à la Figure 3. L'attachement du BHV-1 aux cellules cibles est médié par l'interaction de la glycoprotéine BgC et du récepteur à héparine cellulaire. La pénétration du virus s'effectue par fusion entre l'enveloppe du virion et la membrane cytoplasmique de la cellule cible. Après la pénétration, les protéines du tégment, dont la BTIF, sont libérées dans le cytoplasme et cette dernière est rapidement transportée au noyau. La capsid est transportée près des pores nucléaires; ce transport implique probablement le cytosquelette de la cellule infectée. Après la décapsidation, l'ADN viral est relargué dans le noyau au niveau duquel il se circularise rapidement. Dès lors, la transcription des gènes viraux s'effectuent de manière séquentielle.

Les gènes précoces-immédiats sont exprimés suite à leur transactivation par la BTIF. Ils serviront à leur tour à transactiver l'expression des gènes précoces. Ces gènes codent généralement des protéines impliquées dans le

FIGURE 3: Cycle de réplication du BHV-1. Les différentes étapes de la réplication virale sont représentées telles que traitées dans le texte. Cette illustration a été modifiée d'après un schéma gracieusement fourni par Benoit D'Amours.



métabolisme des nucléotides et la réplication de l'ADN. L'ADN viral se réplique selon le modèle du cercle roulant. Finalement, les gènes tardifs sont exprimés et serviront à l'assemblage et à la maturation des nouveaux virions; ces processus (maturation, assemblage) s'effectuent dans le noyau. Les particules virales matures acquièrent leur enveloppe en bourgeonnant à travers la membrane nucléaire. Elles sont ensuite transportées via l'appareil de Golgi à la surface de la cellule où elles seront relâchées dans le milieu extracellulaire.

10. Diagnostic et thérapie

Dans plusieurs cas, les signes cliniques ne sont pas suffisants pour établir le diagnostic car plusieurs autres pathologies présentent des symptômes similaires à ceux occasionnés par le BHV-1. Il devient donc nécessaire de confirmer le diagnostic par des tests en laboratoire. À cet effet, plusieurs tests diagnostiques pour le BHV-1 sont actuellement disponibles. Ainsi l'on retrouve l'isolation du virus sur culture cellulaire, des tests de détection des antigènes viraux (ELISA, technique d'immunofluorescence) et de l'ADN viral (hybridation, PCR) ainsi que des tests sérologiques (Wyler *et al.*, 1989).

Plusieurs mesures thérapeutiques contre le BHV-1 ont été proposées. L'utilisation de drogues antivirales, l'administration d'interféron et la vaccination intranasale suite à l'infection de l'animal ont été successivement analysées. Les drogues antivirales se sont avérées inefficaces à la dose non-toxique tandis que l'administration d'interféron comportait un coût d'utilisation prohibitif pour le traitement de grands troupeaux et ce, malgré son

efficacité (Babiuk *et al.*, 1985; Wyler *et al.*, 1989). Pour sa part, la vaccination intranasale effectuée rapidement suite à l'infection de l'animal peut retarder l'apparition des symptômes sans toutefois empêcher l'infection et la maladie (Todd *et al.*, 1971; Todd *et al.*, 1972). Ainsi, il n'existe pas de thérapie comme telle contre le BHV-1 mais seulement des moyens permettant d'éviter les complications associées aux infections secondaires tel que l'utilisation d'antibiotiques (Kahrs, 1977).

11. Prévention et contrôle

L'hygiène et les procédures d'isolement des animaux suspectés d'infection constituent les moyens de prévention actuellement utilisés par les producteurs (Kahrs, 1977). Dans le cas des programmes de contrôle, seules l'éradication et la vaccination ont été proposées jusqu'à maintenant.

L'éradication est très controversée en Amérique du Nord car comme nous l'avons précédemment mentionné, environ 65% du cheptel est séropositif pour le BHV-1. De plus, le fait que les animaux voyagent fréquemment d'une région à l'autre complique considérablement les modalités exigées par ce type de contrôle (Van Drunen Littel-Van Den Hurk *et al.*, 1993). Notons toutefois que le BHV-1 a été éradiqué dans les années 80 en Suisse, au Danemark ainsi qu'en Bretagne (Wyler *et al.*, 1989). En Amérique du nord, les efforts ont été investis principalement dans l'élaboration de vaccins efficaces.

12. L'immunité et le BHV-1

Les mécanismes de défense contre le BHV-1 recrutent les défenses spécifiques et non-spécifiques de l'hôte (Rouse et Babiuk, 1978). Les défenses

non-spécifiques se caractérisent principalement par la production d'interféron (Aguilar-Setién *et al.*, 1980). Ce dernier module plusieurs des mécanismes impliqués dans la défense de l'organisme, tels la migration des leucocytes, l'activation de la phagocytose, l'augmentation de l'activité des cellules tueuses naturelles (NK), l'augmentation de la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) et la résistance des cellules au BHV-1 (Van Drunen Littel-Van Den Hurk *et al.*, 1993). Les cibles des cellules NK sont les glycoprotéines virales BgB et BgD (Palmer *et al.*, 1990). Ces cellules agissent en lysant les cellules infectées par un mécanisme indépendant des anticorps.

Les mécanismes de défense spécifique contre le BHV-1 mobilisent la réponse humorale, mucoale et cellulaire (Tikoo *et al.*, 1995). Lors de l'infection, il y a induction de la production d'anticorps neutralisants dirigés contre les glycoprotéines de surface BgB, BgC et BgD (Babiuk *et al.*, 1987). Ces anticorps, en plus d'empêcher l'entrée du virus dans les cellules permissives, sont impliqués dans la convalescence des animaux infectés en aidant à l'élimination du virus par des mécanismes tels l'ADCC et la lyse des cellules par le complément (Rouse *et al.*, 1977a; Rouse *et al.*, 1977b; Rouse *et al.*, 1976a; Rouse *et al.*, 1976b).

L'immunité cellulaire joue un rôle clé dans la lutte contre le BHV-1. En effet, il a été démontré que les lymphocytes T sont essentiels à la rémission (Rouse et Babiuk, 1978). Les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent les glycoprotéines BgB, BgC et BgD ainsi que la VP8 du BHV-1 (Hutchings *et al.*, 1990). Ces lymphocytes suite à leur stimulation produisent des cytokines qui modulent la réponse immunitaire spécifique et non-spécifique de l'hôte (Rouse et Babiuk,

1978). Les lymphocytes cytotoxiques agissent pour leur part en lysant les cellules infectées qui expriment les antigènes viraux à leur surface par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Les cibles des T CD8⁺ sont les glycoprotéines de surface BgC et BgD (Denis *et al.*, 1993).

Cependant, le BHV-1 a la capacité de déjouer les mécanismes de défense de l'animal en entrant en latence dans les cellules neuronales des ganglions sensitifs (trijumeaux et sacraux). Dès lors, le virus est hors d'atteinte du système de surveillance immunitaire car, n'exprimant aucune protéine durant ce processus de persistance, le virus ne peut être détecté par les cellules du système immunitaire (Wyler *et al.*, 1989). Le BHV-1 est également immunosuppresseur (Yates, 1982) ce qui provoque une augmentation de la susceptibilité des animaux à d'autres infections et constitue un obstacle important au développement de vaccins et de thérapies.

13. Les vaccins

Les pertes économiques encourues par les producteurs de bovidés ont amené la nécessité de développer un vaccin efficace contre le BHV-1. Plusieurs approches ont été proposées suivant les années et l'avancement des connaissances. Il existe deux catégories de vaccins contre le BHV-1, les uns dit conventionnels et les autres réunissant de nouvelles approches. Dans cette partie, nous énumérerons les différents types de vaccins développés ou proposés jusqu'à ce jour et analyserons leurs avantages et inconvénients.

13.1 Vaccins conventionnels

À l'intérieur de cette catégorie, nous retrouvons les vaccins atténués et

les vaccins inactivés. La nature de ces vaccins constitue une barrière contre l'établissement d'un programme de contrôle efficace car il est impossible de discriminer les animaux vaccinés de ceux naturellement infectés (Van Drunen Littel-Van Den Hurk *et al.*, 1993). Par le fait même, l'utilisation des vaccins conventionnels empêche une surveillance immunologique efficace des troupeaux.

13.1.1 Vaccins atténués

Le premier vaccin développé contre le BHV-1 a été un vaccin atténué par des passages successifs et rapides sur une lignée de cellules bovines, puis administré par voie parentale (Schwartz *et al.*, 1957). Plusieurs autres protocoles d'atténuation et d'immunisation ont été développés durant les années subséquentes (Schwartz *et al.*, 1958; Zuscsek et Chow, 1961; Bartha, 1974; Todd, 1974; Zygraich *et al.*, 1974). L'avantage des vaccins atténués est qu'ils induisent rapidement une immunité humorale ainsi qu'une immunité mucoale (Sutton, 1980). Par contre, ces vaccins sont peu stables et leur entreposage est problématique (Misra *et al.*, 1983; Whetsone *et al.*, 1989). De plus, plusieurs cas d'avortements chez des vaches immunisées (Mitchell, 1974), la présence de symptômes (Curtis et Angulo, 1974; Jensen *et al.*, 1976), l'immunosuppression passagère (Yates, 1982), l'établissement de la latence avec des épisodes de réactivation (Darcel et Dorward, 1975) et des cas de transmission horizontale du BHV-1 d'un animal vacciné à un autre non vacciné ont été rapportés (Nettleton *et al.*, 1984). Les vaccins atténués sont efficaces mais comportent un risque dans leur utilisation.

13.1.2 Vaccins inactivés

Plusieurs vaccins ont été produits par l'inactivation chimique (formaline, éthanol, bétapropiolactone), physique (UV) ou thermique du BHV-1 (Van Drunen Littel-Van Den Hurk *et al.*, 1993). Plusieurs avantages sont reliés à ce type de vaccins. Ainsi, contrairement aux vaccins atténués, les vaccins inactivés ne provoquent aucun avortement, aucune immunosuppression, n'établissent pas la latence et donc aucun épisode de réactivation et de plus, leur entreposage est facilité par leur bonne stabilité (Van Drunen Littel-Van Den Hurk *et al.*, 1993). Cependant, ce type de vaccin requiert la présence d'adjuvants et doit être administré annuellement pour être efficace (Schipper et Kelling, 1975). La faible efficacité des vaccins inactivés est probablement provoquée par la perte d'un certain nombre d'épitopes protecteurs lors des traitements d'inactivation (Levings *et al.*, 1984; Duque *et al.*, 1989).

13.2 Vaccins de nouvelle génération développés contre le BHV-1

Les limites des vaccins conventionnels ont amené les chercheurs à développer de nouvelles avenues. Par l'avènement des techniques d'isolement des protéines et du génie moléculaire, plusieurs nouveaux vaccins ont été proposés. Dans cette catégorie, nous retrouvons les vaccins sous-unitaires et les vaccins développés par génie génétique.

13.2.1 Les vaccins sous-unitaires

Les premiers vaccins sous-unitaires ont été préparés en isolant les membranes cytoplasmiques des cellules infectées par le BHV-1. L'administration intramusculaire ou intranasale de ces extraits antigéniques bruts en présence

d'un adjuvant a induit une protection contre la maladie et contre les infections subséquentes. Il a été démontré que les anticorps produits suite à la vaccination étaient dirigés contre les glycoprotéines BgB, BgC et BgD (Lupton et Reed, 1980). Afin d'identifier les préparations d'antigènes plus efficaces, les glycoprotéines ont été isolées individuellement sur des colonnes d'affinité à l'aide d'anticorps spécifiques. Ceci a permis de découvrir que la BgD induisait le plus haut taux d'anticorps neutralisants et contribuait à une protection efficace contre la maladie et l'infection (Babiuk *et al.*, 1987). Suite à ces résultats, des systèmes d'expression de la BgD ont été développés. La supériorité des systèmes d'expression eucaryotique a démontré que la glycosylation était essentielle pour l'induction d'une immunité efficace. De plus, aucun signe clinique et aucun cas d'immunosuppression et d'avortement n'ont été décelés chez les animaux immunisés. Étonnamment, l'immunisation intramusculaire permet l'obtention d'anticorps neutralisants au niveau des muqueuses nasales et ce, en quantité similaire à celle retrouvée dans le sérum (Van Drunen Littel-Van den Hurk *et al.*, 1993). Les vaccins sous-unitaires constituent d'excellents candidats pour l'établissement d'un programme de contrôle car ils sont efficaces, sécuritaires et permettent de discriminer les animaux vaccinés de ceux naturellement infectés.

13.2.2 Les vaccins développés par génie génétique

Cette catégorie de vaccins regroupe les mutants de délétion et l'immunisation à l'aide d'ADN. Ces vaccins sont encore à un stade expérimental.

13.2.2.1 L'immunisation à l'aide d'ADN

Cox et collaborateurs en 1993 ont rapporté que l'injection intramusculaire de veaux avec des plasmides exprimant la BgD stimule la production d'anticorps spécifiques et contribue à induire une immunité partielle contre le BHV-1. Cette nouvelle approche est de plus en plus envisagée pour le développement de vaccins car elle permet d'induire l'immunité cellulaire et humorale chez les animaux vaccinés.

13.2.2.2 Les mutants de délétion

Cette approche consiste à supprimer du génome viral un gène essentiel à la réplication du BHV-1. Le cycle répliatif se déroulera donc normalement jusqu'à la période d'expression du gène ciblé. Ce gène étant non-fonctionnel, il y aura arrêt prématuré de la réplication. Le virus mutant ainsi obtenu sera nettement atténué mais permettra d'établir un début de cycle répliatif favorisant ainsi l'induction de l'immunité cellulaire aussi bien qu'umorale. Dans cette catégorie de vaccins, plusieurs cibles potentielles ont été identifiées telles que les glycoprotéines non-essentiellles, les protéines du tégument et les protéines impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques (Van Drunen Littel-Van den Hurk *et al.*, 1993).

14. Généralités sur la ribonucléotide réductase

Au début des années 50, des expériences effectuées chez le rat ont permis de suggérer que les désoxyribonucléotides précurseurs à la synthèse d'ADN provenaient de la réduction des ribonucléotides correspondants. De fait, une enzyme catalysant cette réaction a été isolée et, en raison de sa fonction, a été

appelée ribonucléotide réductase (RNR) (Thelander et Reichard, 1979). Son rôle essentiel dans le métabolisme de l'ADN en fait une enzyme ubiquitaire chez les organismes procaryotiques et eucaryotiques. De plus, l'enzyme est exprimée chez plusieurs virus à ADN dont les *Herpesviridae*, les *Poxviridae*, le virus de la fièvre Africaine du porc et le phage T4 (Reichard, 1993).

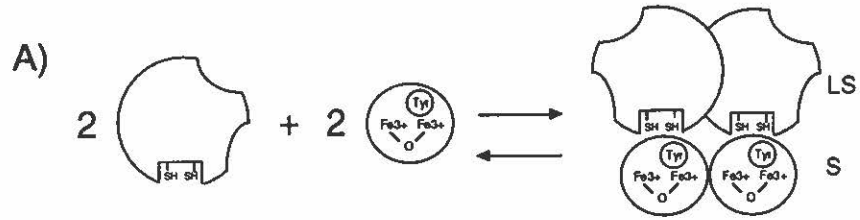
Jusqu'à présent, la ribonucléotide réductase a été purifiée et caractérisée chez de nombreux organismes. L'enzyme diffère substantiellement quant à sa source au niveau de sa structure, de ses besoins en co-facteur, de sa régulation allostérique ou encore de ses substrats. Ainsi, les RNR ont été regroupées en 3 classes distinctes identifiées I, II ou III (Reichard, 1993). La description qui suit des trois classes de RNR se base sur les revues de question de Thelander et Reichard (1979) ainsi que de Reichard (1993).

14.1 Ribonucléotides réductases de classe I

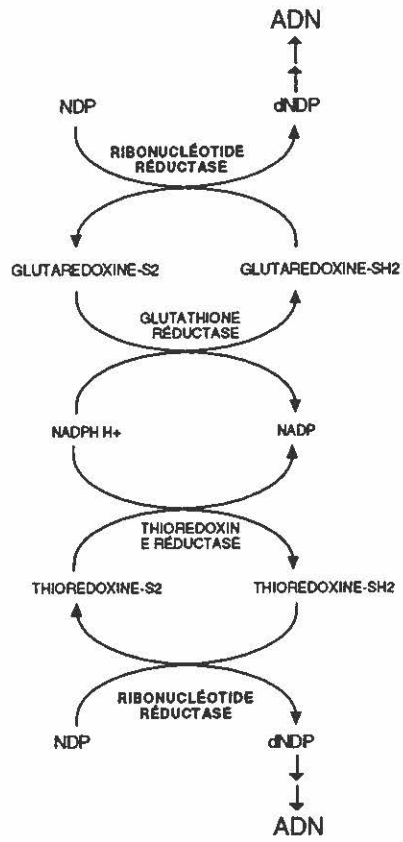
Les RNR de classe I sont retrouvées chez tous les eucaryotes et chez *Escherichia coli*. L'enzyme d'*E. coli* représente le modèle du groupe. Les enzymes de cette classe utilisent comme substrats les ribonucléotides diphosphates (NDP). L'holoenzyme est constituée de petites sous-unités appelées β ou R2 et de grosses sous-unités dénommées α ou RR1 (Fig. 4A) lesquelles sont présentes sous forme d'homodimères stables. Les sites actifs sont situés à l'interface des petites et des grosses sous-unités. La sous-unité R1 porte deux sites de régulation allostérique ainsi que le site de fixation du substrat. La sous-unité R2 porte un radical tyrosine libre à la position 122 de sa chaîne protéique et deux atomes de fer (Fe^{+3}) essentiels à l'activité enzymatique (Nordlund *et al.*, 1990). Il s'agit donc d'une métalloprotéine. Cette classe d'enzyme est sensible

FIGURE 4: Ribonucléotide réductase de classe I

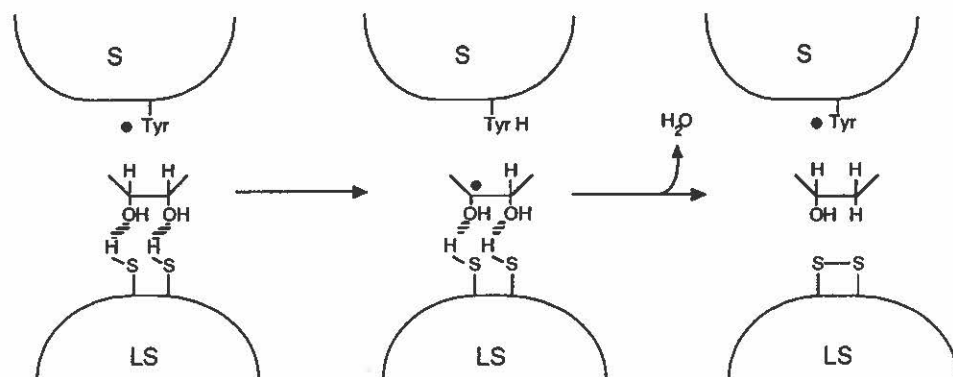
- A) Représentation schématique de la structure quaternaire de l'enzyme (modifié d'après Reichard, 1993). Dans ce schéma, LS et SS représentent respectivement la petite et la grosse sous-unités.
- B) Chaîne de transfert d'hydrogènes (modifié d'après Holmgren, 1989)
- C) Mécanisme de la réaction enzymatique (modifié d'après Reichard, 1993). LS et SS représentent respectivement la petite et la grosse sous-unités.



B)



C)



à l'hydroxyurée. Ce composé inhibe en effet de manière réversible l'activité enzymatique en altérant les radicaux tyrosines libres, démontrant ainsi leur importance dans le mécanisme de réduction. Par ailleurs, l'enzyme subit une régulation allostérique, étant inhibée par le dTTP et le dATP. Enfin, l'enzyme requiert la présence de Mg^{2+} et d'ATP (effecteur positif).

14.2 Ribonucléotides réductases de classe II

Cette classe de RNR est présente chez la majorité des bactéries autres que *E. coli*. Celle de *Lactobacillus leichmania* a été plus amplement étudiée au cours des années et représente le modèle du groupe. L'enzyme de cet organisme est composée d'un monomère de 81,9 kDa et utilise comme substrats les ribonucléotides triphosphates (NTP). Cette protéine globulaire comporte au niveau de son unique chaîne protéique une séquence particulière à l'extrémité aminée où l'on retrouve deux résidus cystéines impliqués dans la réaction catalytique. L'enzyme requiert la présence d'une molécule de 5'-désoxy-5'-adénosine-cobalamine qui joue un rôle similaire au radical tyrosyl retrouvé chez l'enzyme de classe I. L'activité enzymatique n'est pas affectée par l'hydroxyurée ce qui démontre qu'aucun radical tyrosyl libre n'est impliqué dans la réaction catalytique. L'enzyme est régulée allostériquement par des effecteurs et ses substrats qui se lient au niveau d'un site de régulation. Ce mécanisme de régulation est similaire à celui observé chez la classe I, à l'exception du dCTP, lequel module l'activité de l'enzyme en augmentant sa spécificité pour les molécules UTP.

14.3 Ribonucléotides réductases de classe III

Cette classe de RNR a été découverte chez des cellules de *E. coli* en croissance anaérobie. Cette enzyme est composée d'un homodimère de sous-unités semblables de 80 kDa lesquelles accommodent à la fois le rôle de la R1 et de la R2 que l'on retrouve chez la classe I. Ainsi, chacune porte un site allostérique (tel R1), un noyau de fer et une glycine, laquelle remplace le radical tyrosyl de la R2. Elle utilise les ribonucléotides triphosphates comme substrats et requiert la présence de NADPH, de dithiothréitol et d'une molécule de S- adénosylméthionine pour son activité. Cette enzyme est également soumise à une régulation de type allostérique, dont le mécanisme est cependant mal compris.

14.4 Réaction enzymatique

Toutes les ribonucléotides réductases catalysent la substitution du groupement hydroxyle à la position 2' du ribose par un hydrogène (Thelander et Reichard, 1979) selon un mécanisme similaire. Le point en commun est la présence au niveau de leur site actif d'un radical libre qui interagit avec le substrat. Ainsi, nous retrouvons les radicaux tyrosyle, 5'-désoxy-5'-adénosyle cobalamine et glycyloxy pour la classe I, II, III respectivement (Reichard, 1993). La réaction enzymatique (Fig. 4C) est initiée lorsqu'un atome d'hydrogène (H) en 3' du ribonucléotide interagit avec le radical libre de l'enzyme au niveau de son site actif, facilitant ainsi le départ du groupement hydroxyle en position 2' qui est ensuite réduit par les groupements thiols (2) de l'enzyme (Reichard, 1993). Pour être de nouveau active, l'enzyme doit être réduite à son tour. Cette réaction s'effectue selon l'organisme via l'une des chaînes de transfert

d'hydrogène illustrées à la figure 4B et où les derniers intermédiaires sont la glutaredoxine ou la thioredoxine (Holmgren, 1989).

14.5 Ribonucléotides réductases des virus herpès

Il a été démontré par des méthodes biochimiques, sérologiques et moléculaires que les virus herpès codent une RNR de classe I (Averett *et al.*, 1983; Bacchetti *et al.*, 1984; Bacchetti *et al.*, 1986; Cohen, 1972; Cohen *et al.*, 1974; Cohen *et al.*, 1977; Cohen *et al.*, 1987; Dutia, 1983; Frame *et al.*, 1985; Gibson *et al.*, 1984; Henry *et al.*, 1978; Lankinen *et al.*, 1982; Simard *et al.*, 1992 et 1995). Ainsi, leur holoenzyme se compose de grosses et de petites sous-unités lesquelles sont présentent sous la forme d'homodimère stable (Ingemarson et Lankinen, 1987). L'enzyme utilise comme substrats les ribonucléotides diphosphates (NDP; Averett *et al.*, 1983). Cependant, contrairement à celles d'*E. coli* et des eucaryotes, les RNR virales ne requièrent pas la présence d'ATP et sont résistantes à l'inhibition par le dTTP et dATP (Ponce de Leon *et al.*, 1977; Lankinen *et al.*, 1982; Averett *et al.*, 1983). De plus, l'association des sous-unités ne nécessite pas la présence de Mg^{2+} (Huszar et Bacchetti, 1981; Lankinen *et al.*, 1982; Averett *et al.*, 1983). La nature des interactions existantes entre les sous-unités est donc qualifiée de forte.

Les gènes codant les deux sous-unités virales ont été caractérisés entre autres chez les virus HSV-1 (McGeoch *et al.*, 1988), HSV-2 (Swain et Galloway, 1986), Epstein-Barr (Baer *et al.*, 1984; Gibson *et al.*, 1984), VZV (Davison et Scott, 1986), PRV (Kaliman *et al.*, 1994), EHV-1 (Telford *et al.*, 1992) et BHV-1 (Simard *et al.*, 1992, 1995). Fait intéressant, chez tous les herpesviridae les transcrits des petites et grosses sous-unités sont 3' co-terminaux, ce qui implique qu'ils

utilisent le même signal de polyadénylation. Chaque gène possède cependant son propre promoteur. Les sous-unités sont exprimées durant la phase précoce du cycle répliatif, période qui correspond avec celle de la synthèse de l'ADN viral (Huszar et Bacchetti, 1981).

Il existe une controverse quant au rôle de la RNR virale dans la réplication des virus herpès. En effet, des études comparatives d'un mutant RNR⁻ du HSV-1 et du virus sauvage ont montré que l'enzyme peut être requise (Yamada *et al.*, 1991) ou non à la réplication *in vivo* (Turk *et al.*, 1989), selon le modèle animal utilisé. Par contre, l'étude d'un mutant déficient en RNR du PRV chez son hôte naturel (le porc) indique que l'enzyme est essentielle à la pathogénicité (de Wind *et al.*, 1993). L'enzyme n'est cependant pas requise pour la multiplication *in vitro* dans des cellules en phase exponentielle, l'enzyme cellulaire pouvant à elle seule fournir les désoxyribonucléotides requis au virus (Preston *et al.*, 1984; Goldstein et Weller, 1988; Idowu *et al.*, 1992). L'élucidation de cette controverse pourrait ouvrir la voie à une avenue thérapeutique intéressante puisqu'il a été rapporté que des peptides correspondant aux 9 derniers acides aminés des petites sous-unités des virus HSV-1, EHV et PRV inhibent spécifiquement l'enzyme respective en empêchant l'association des petites et des grosses sous-unités (Cohen *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 1987; Dutia *et al.*, 1986; Gaudreau *et al.*, 1987; Paradis *et al.*, 1988, Telford *et al.*, 1990).

Jusqu'à ce jour, les gènes de la RNR du BHV-1 ont été séquencés (Simard *et al.*, 1992, 1995) et les transcrits identifiés. Les petites et grosses sous-unités sont respectivement codées par des transcrits de 1,3 kb et de 3,7 kb. La cinétique d'apparition des transcrits a aussi été étudiée (Simard *et al.*, 1992). Tous deux

sont exprimés à partir de 3 heures post-infection (hres p.i.) et sont présents jusqu'à 24 hres p.i (Fig. 5). Curieusement, le rapport existant entre chacun des transcrits n'est pas stœchiométrique. En effet, le transcrit codant la petite sous-unité est toujours plus abondant que celui codant la grosse sous-unité. En sachant que chez toutes les RNR eucaryotiques examinées jusqu'à ce jour, l'holoenzyme est constituée de petites et de grosses sous-unités présentes en quantités stœchiométriques (Reichard, 1993; Ingemarson et Lankinen, 1987), nous nous sommes intéressées à déterminer dans le cadre de ce projet, si le rapport observé entre les deux transcrits RNR du BHV-1 était corrélée au niveau protéique. Pour ce faire, nous avons entrepris une étude cinétique de l'expression des deux sous-unités de la RNR virale à l'aide de sérums monospécifiques développés suite à l'expression individuelle des polypeptides chez *E. coli*. De plus, nous avons caractérisé la région promotrice de la grosse sous-unités ainsi que sa région 5' non-traduite puis les résultats ont été comparés à celles de la petite dans le but d'élaborer des hypothèses qui expliquerait les rapports observés tant au niveau transcriptionnel que protéique.

Figure 5: Cinétique d'apparition des transcrits de la RNR du BHV-1. Une analyse de type Northern a été effectuée avec les ARN totaux (A) et les ARNm (B) isolés de cellules infectées durant 0, 3, 6, 9, 12, 18, 20 ou 24 hres p.i. avec le BHV-1. Ceux-ci ont été hybridés à un fragment d'ADN représentant la région codante de la R2 du BHV-1. La position des marqueurs de poids moléculaires (kb) est indiquée à gauche (reproduit de Simard *et al.*, 1992).

A

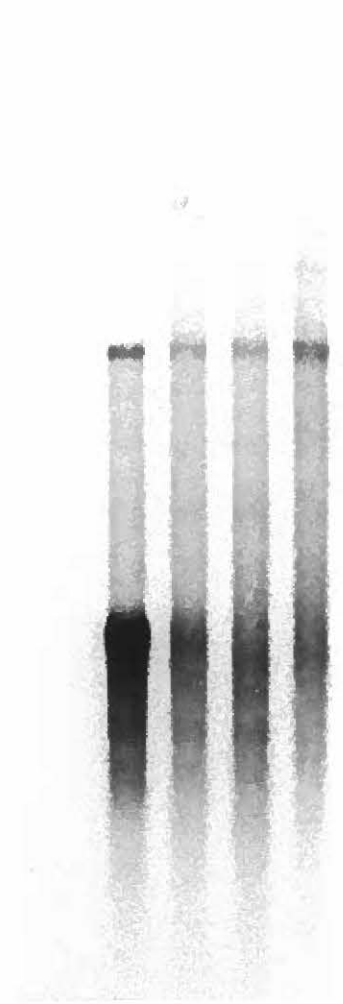
m-i
0 3 6 9 12 20
| | | | | |

9.5 -
7.5 -
4.4 -
2.4 -
1.4 -
0.24 -



B

m-i
6 6 12 18 24
| | | | |



MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Virus, cellules et ARNs

L'isolat du BHV-1 #34 apparenté à la souche Colorado a été utilisé dans cette étude. Le BHV-1 a été propagé sur feuillettes de cellules de reins de boeuf (MDBK, "Madin-Darby bovine kidney"; ATCC CCL22). Les cellules avaient été préalablement cultivées à 37°C dans un milieu constitué à parts égales de milieu 199 (Hanks; Gibco Canada, Burlington, ON) et de milieu MEM (Earle; Gibco), en présence de 5% (V/V) de sérum foetal de veau (Gibco) et de 50 µg/mL de gentamycine (antibiotique à large spectre; Schering Canada, Pointe-Claire, QC).

Les ARN totaux de cellules MDBK infectées (m.o.i. de 2) ou non par le BHV-1 ont été isolés tel que décrit par Simard et collaborateurs (1990).

2. Souches d'*Escherichia coli*

Les souches commerciales *E. coli* XL1 blue (Stratagene, La Jolla, CA, É-U) et BL21 (Novagen, Madison, WI, É-U) ont été utilisées pour les clonages visant respectivement à la production d'ADN et à l'expression des protéines recombinantes. La souche d'*E. coli* BL21 contient le gène codant l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle du promoteur Lac UV5. Lorsque induite en présence d'isopropyl-β-D thiogalactoside (IPTG), l'enzyme permet l'expression des gènes exogènes insérés dans le vecteur d'expression pET-21b.

2.1 Culture de *E. coli*

Les souches de *E. coli* ont été cultivées à 37°C avec une agitation constante dans du milieu LB constitué de 1% (P/V) de bacto-tryptone, de 0,5% (P/V)

d'extrait de levure et de 1% (P/V) NaCl. Le milieu était additionné de 15 µg/mL de tétracycline (Boehringer Mannheim Canada Lté, Laval, QC) pour la croissance de la souche XL1 blue. Les souches contenant des plasmides recombinants étaient maintenues dans du milieu LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline (Boehringer Mannheim). Les clones ont été sélectionnés sur milieu solide constitué de milieu LB additionné d'ampicilline et de 1,5% (P/V) de bacto-agar.

3. Vecteurs de clonage

3.1 pBluescript KS

Le vecteur pBluescript^{MD} I KS (pKS; Stratagene) est dérivé de pUC19 et comporte le gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide contient plusieurs sites uniques de clonage situés au niveau de l'opéron Lac de *E. coli* permettant ainsi la sélection phénotypique des clones recombinants en présence d'un substrat chromogène de la β-galactosidase.

3.2 pET-21b

Le vecteur d'expression pET-21b (Novagen) a été utilisé pour l'expression des protéines recombinantes. Le vecteur contient le promoteur T7, un promoteur fort, placé sous le contrôle du répresseur Lac lequel, en absence de l'inducteur (lactose ou IPTG), se fixe au niveau de l'opérateur Lac empêchant ainsi l'attachement de l'ARN polymérase de T7 au promoteur. La plupart des sites de clonage sont situés en aval d'un codon d'initiation de la traduction et d'une séquence codant un court peptide désigné T7 Tag et pour lequel un anticorps monoclonal spécifique est disponible commercialement. En aval des sites d'insertion se trouve une séquence codant 6 résidus histidines consécutifs pou-

vant être utilisés, s'il y a lieu, pour la purification des protéines recombinantes. Enfin, le vecteur contient aussi le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des recombinants.

4. Manipulation de l'ADN

Dans cette section, nous traiterons et décrirons les différentes techniques utilisées lors des étapes de clonage et de manipulation de l'ADN. Elles proviennent pour la plupart de l'ouvrage "Molecular cloning: a laboratory manual" de Sambrook et collaborateurs (1989).

4.1 Préparation de l'ADN plasmidique et digestion

Durant cette étude, les minipréparations d'ADN plasmidique ont été isolées selon la méthode de Birnboim et Doly (1979). Lorsque de plus grandes quantités d'ADN étaient nécessaires, la méthode de médi-préparation décrite par Sambrook et collaborateurs (1989) a été utilisée.

Les enzymes de restriction ont été obtenues soit de Pharmacia ou de Gibco/BRL. Les préparations d'ADN ont été digérées en suivant les recommandations du fournisseur.

4.2 Électrophorèse sur gel d'agarose

Les motifs de restriction d'ADN ont été analysés par électrophorèse en gels d'agarose 1% (grade électrophorèse; ICN Biomedicals Canada, St-Laurent, QC) préparés dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate pH 7,8, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA) contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium. Les échantillons ont été déposés en présence de tampon de chargement 1X (0,02% (P/V) bleu de

bromophénol, 5 mM EDTA pH 8,0, 0,2% (P/V) SDS, 5% (V/V) glycérol). Les grandeurs relatives des fragments de restriction ont été déterminées en comparant leur mobilité avec celles de marqueurs de poids moléculaire constitués d'un mélange de l'ADN du phage λ digéré par *Hind* III (Gibco/BRL) et de l'ADN du phage ϕ X174 digéré par *Hae* III (Pharmacia, St-Anne-de-Bellevue, QC).

Suite au fractionnement, les fragments d'ADN désirés ont été récupérés du gel en découpant les bandes correspondantes à l'aide d'une lame de rasoir. L'ADN a ensuite été purifié avec la trousse GeneClean II (BIO/CAN Scientific Inc., Mississauga, ON) tel que spécifié dans les instructions du fabricant. La concentration des fragments purifiés d'ADN a été déterminée en comparant l'intensité relative des bandes sur gel d'agarose (sous UV) avec celle d'un standard d'ADN plasmidique linéarisé (pKS) de concentration connue. Il est à noter que la concentration du standard avait été préalablement déterminée par spectrophotométrie en utilisant la relation $D.O. 260 \text{ nm} = 50 \mu\text{g d'ADN/mL}$.

4.3 Déphosphorylation des extrémités 5' dépassantes

La déphosphorylation des vecteurs plasmidiques a été utilisée lors des clonages non-dirigés afin de réduire le bruit de fond généré par leur recircularisation suite à la transformation de *E. coli*. Cette procédure a aussi été requise avant le marquage des extrémités 5' lors des essais de protection à la nucléase S1 (section 9).

À la digestion d'ADN (100 μ L), 100 μ L de 100 mM Tris-HCl pH 8,0 et 1 μ L (100-150 U) de phosphatase alcaline bactérienne (BAP) (Gibco/BRL) ont été

ajoutés puis le mélange réactionnel a été incubé durant 1 heure (hre) à 37°C. La même quantité d'enzyme a ensuite été rajoutée puis le mélange incubé de nouveau. L'enzyme a finalement été extraite au phénol puis l'ADN précipité à l'éthanol.

4.4 Marquage radioactif des extrémités 5'-OH

Au fragment d'ADN à marquer (1 µg dans 7 µL) et préalablement déphosphorylé ont été ajoutés 10 µL de 20 mM Tris-HCl pH 9,5, 5 mM de spermidine, 5 µL de tampon kinase 10X (500 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM MgCl₂, 50 mM dithiothréitol, 30% glycérol), 25 µL de [γ -³²P]ATP (10 µCi/µL, 4000 Ci/mme; ICN) et 3 µL de polynucléotide kinase de T4 (10 U/µL; Gibco/BRL). Le mélange réactionnel a été incubé durant 1 hre à 37°C puis 200 µL de 2,5 M NH₄OAc contenant 2 µg d'ARNt ont été ajoutés. Suite à l'addition de 750 µL d'éthanol 95%, l'ADN marqué a été précipité durant 10 minutes dans un bain d'éthanol/glace sèche. Suite à une centrifugation à 11000 g de 8 minutes, le culot d'ADN a été dissous dans 250 µL de 0,3 M NaOAc pH 7,0. L'ADN a été de nouveau précipité, lavé à l'éthanol 70% puis séché à l'air. Finalement, l'ADN a été redissous dans de l'eau déionisée stérile.

4.5 Réparation des extrémités 5' dépassantes

Lorsque requis, les extrémités 5' dépassantes de fragments d'ADN à cloner ont été réparées par réaction avec le fragment Klenow de *E. coli*. Le fragment d'ADN préalablement dissous dans 40,5 µL d'eau déionisée stérile a été additionné de 5 µL de tampon Klenow 10X (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 1 mM dithiothréitol) et de 2,5 µL de dNTP 10 mM. Puis, 10 à

15 U de Klenow (Pharmacia) ont été ajoutées et le mélange réactionnel incubé à la température de la pièce durant 20 minutes. L'ADN a été précipité à l'éthanol, récupéré par centrifugation, lavé à l'éthanol 70%, séché à l'air et finalement dissous dans de l'eau déionisée stérile.

4.6 Ligation des fragments d'ADN au vecteur de clonage

Les fragments d'ADN à cloner ont été ligués au vecteur de clonage, en utilisant un rapport molaire insertion:vecteur de 3:1, dans un volume réactionnel final de 10 μ L contenant 1 μ L de tampon ligase 10X (500 mM Tris-HCl pH 8,0, 70 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothréitol, 20 mM ATP) et 1 U de ligase du phage T4 (Gibco/BRL). La réaction a été incubée à 4°C durant 16 hres puis directement utilisée pour la transformation de *E. coli*.

4.7 Transformation de *E. coli*

Les cellules compétentes de *E. coli* ont été préparées selon la méthode de Mandel et Higa (1970) et utilisées le jour même. Pour chacune des transformations, 100 μ L de cellules compétentes ont été incubées à 0°C durant 1 hre en présence de 5 μ L de réaction de ligation. Un choc thermique a ensuite été effectué à 42°C durant 90 secondes, puis 0,8 mL de milieu LB a été ajouté au mélange ADN:cellules. Les cultures ainsi obtenues ont été incubées à 37°C durant 45 minutes avec agitation. Les cellules (en général 50 μ L) ont finalement été étalées sur des géloses de LB-agar contenant 50 μ g/mL d'ampicilline. Après croissance durant 16 hres à 37°C, 48 transformants ont été individuellement cultivés dans 2 mL de LB contenant 50 μ g/mL d'ampicilline afin de purifier leur ADN plasmidique. Les transformants ont été sélectionnés en effectuant

des analyses des motifs de restriction des ADN plasmidiques purifiés. Lorsque requis, les jonctions insertion/vecteur ont été séquencées.

4.8 Séquençage d'ADN par la méthode enzymatique

L'ADN plasmidique double brin (1 à 2 µg) a été dénaturé en présence de 150 mM NaOH et 0,15 mM EDTA durant 30 minutes à 37°C. L'ADN a ensuite été précipité à -20°C durant 2 hres suite à l'addition de 0,1 volume de 3 M NaOAc pH 5,0 et de 2 volumes d'éthanol 95%. L'ADN a été récupéré par centrifugation puis redissous dans 10 µL d'eau. Les réactions de séquençage ont été effectuées en utilisant la trousse "T7 sequencing™" de Pharmacia. Les réactions de séquençage traitées ou non à la transférase terminale (ANNEXE 1; Simard et Langlois, 1995) ont été analysées en gels de polyacrylamide 8% contenant une concentration de 7 M d'urée.

5. Manipulation des protéines

5.1 Analyse électrophorétique (SDS-PAGE)

Les échantillons protéiques à analyser (lysats de cellules, corps d'inclusion de *E. coli*) ont été additionnés de 0,25 volume de tampon dénaturant réducteur 5X (200 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (P/V) SDS, 1,4 M β-mercaptoéthanol, 50% (V/V) glycérol, 0,05% (P/V) bleu de bromophénol). Avant d'être déposés sur les gels de polyacrylamide 10% (Laemmli, 1970), les échantillons ont été bouillis durant 3 minutes à 100°C. Les appareils d'électrophorèse utilisés étaient soit le Miniprotean II (gels de dimension 8,5 X 10,5 cm; Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON) ou le Protean II (gels de 16 X 20 cm; Bio-Rad). L'électrophorèse a été effectuée à la température ambiante dans du tampon d'électrode Tris-

glycine pH 8,3 (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0,1% (P/V) SDS) à 60 mA durant 1,5 hre (Miniprotean II) ou à 100 mA pour 4 hres (Protean II). Les protéines fractionnées ont été visualisées par coloration au bleu de Coomassie (Harlow et Lane, 1988).

5.2 Transfert de type Western et immunoempreinte

Lorsque requis, les protéines fractionnées en gel de polyacrylamide ont été électrotransférées sur une membrane de PVDF (Bio-Rad) en utilisant l'appareil «trans blot cell» de Bio-Rad. Le transfert a été effectué à 55 volts, dans du tampon d'électrophorèse Tris-glycine contenant 20% (V/V) de méthanol, durant 2 ou 4 hres selon qu'il s'agisse d'un gel d'une épaisseur de 0,75 mm ou de 1.5 mm respectivement.

Les membranes ont été individuellement placées dans des sacs hermétiques contenant 10 mL de solution de blocage (TBS/BSA: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,01% (P/V) merthiolate, 1,5% (P/V) BSA) et incubées durant 16 hres à la température de la pièce avec agitation. Les membranes ont été lavées brièvement dans 10 mL de TBS-T (TBS contenant 0,05% (V/V) de Tween-20) puis réincubées durant 16 hres dans 10 mL de TBS-T contenant le sérum de détection (à une dilution appropriée) et 0,15% (P/V) de BSA. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois durant 10 minutes dans 10 mL de TBS-T puis incubées durant 90 minutes avec de la protéine A couplée à la peroxydase (Mandel Scientific Co., Rockwood, ON) diluée 1/2000 dans du TBS-T. Les membranes ont enfin été lavées trois fois dans du TBS-T puis révélées dans 10 mL de solution révélatrice constituée de TBS contenant 0,05% (P/V) de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) (Sigma, St-Louis, MO,

É-U) et 0,03% (V/V) de peroxyde d'hydrogène. La réaction chromogène a été arrêtée par un simple lavage dans l'eau déionisée.

5.3 Analyses en dot

Les protéines retrouvées dans les corps d'inclusion de *E. coli* ont été diluées en série (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320) dans une solution TEN (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) contenant 1% de NP-40. Les dilutions ont été préparées dans un plateau à 96 puits puis déposées dans le support Bio-dot de Bio-Rad contenant une membrane de nitrocellulose (Hybond-C; Amersham Canada Lté, Oakville, ON). L'adsorption des protéines a été effectuée à 20 psi à l'aide d'une pompe à vide (VacuGen de Pharmacia). La membrane a été récupérée, lavée brièvement dans du TBS puis découpée en languettes. Les protéines fixées ont été soit colorées au bleu de Coomassie ou révélées par immunodétection (section précédente).

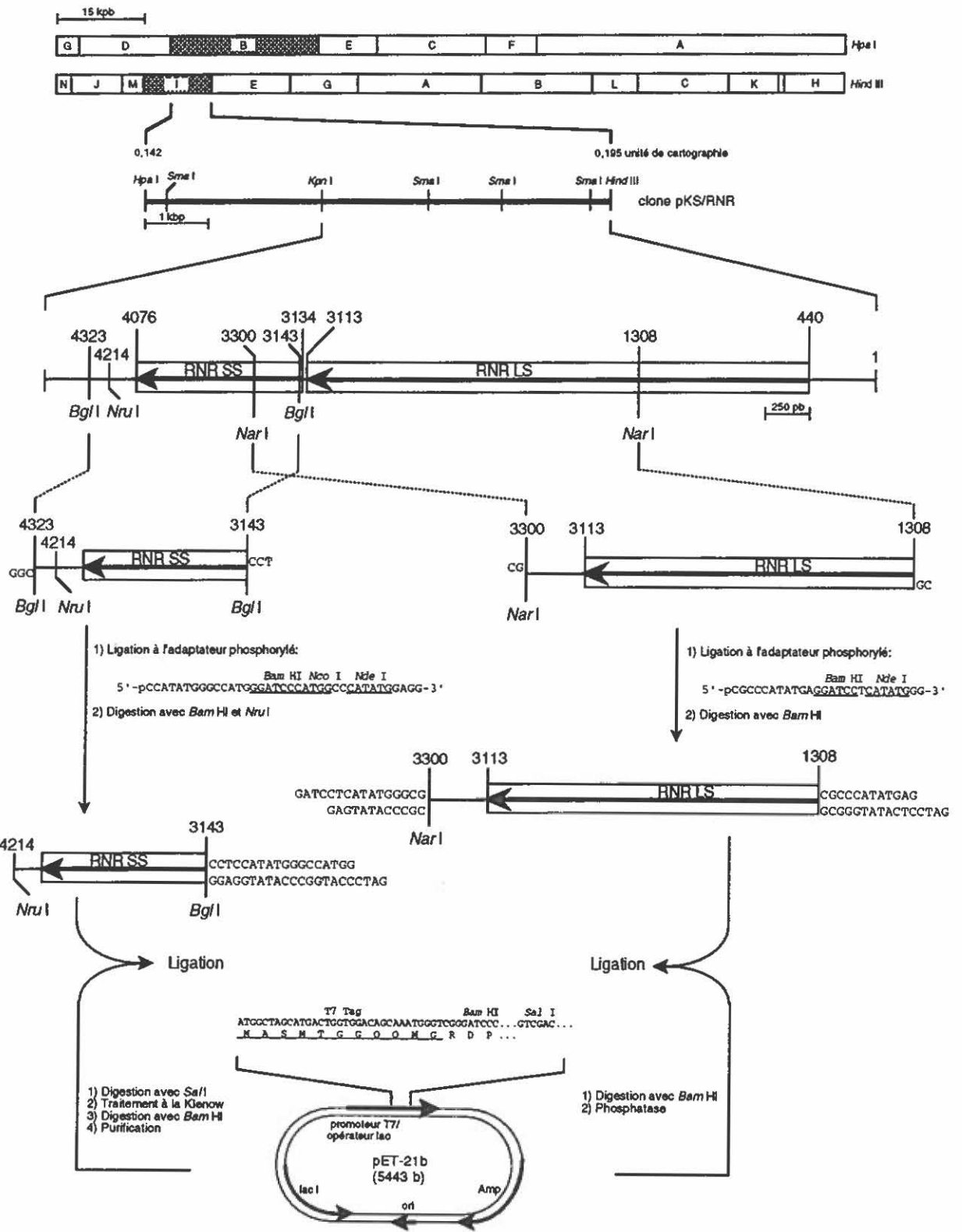
6. Expression des sous-unités de la RNR du BHV-1 chez *E. coli*

Les sous-unités de la RNR du BHV-1 ont été individuellement exprimées chez *E. coli* en utilisant le système d'expression pET dans le but de développer des sérums monospécifiques.

6.1 Clonage des gènes dans le vecteur pET-21b

Les stratégies de clonage utilisées sont illustrées à la Figure 6. Pour cloner le gène de la petite sous-unité (R2), un fragment *Bgl* I de 1180 pb représentant toute la région codante à l'exception des deux premiers codons, a été purifié du sous-clone dénommé pKS/RNR-2 (Simard *et al.*, 1992). Le fragment a ensuite

Figure 6: Stratégies de clonage des gènes de la petite (R2; à gauche) et de la grosse sous-unités (R1; à droite). Pour chacune des stratégies, les étapes de préparation du vecteur (pET21b; en bas) et de l'insertion (en haut) sont indiquées tel que décrit dans le texte. Dans cette figure, LS et SS représentent respectivement la grosse (R1) et la petite (R2) sous-unités de la RNR du BHV-1. Il est à noter que les positions nucléotidiques, les sites de restriction utilisés ainsi que la séquence codante (flèche) de chacun des gènes sont indiqués.



été ligué à l'adaptateur phosphorylé 5'P-CCATATGGGCCATGGGATCCCA-TGCCCATATATGGAGG-3' comportant un site de restriction *Bam* HI (souligné). L'adaptateur, en s'auto-appariant, génère une extrémité cohésive *Bgl* I qui est compatible avec celle générée à l'extrémité 5' du gène et permet de fusionner le cadre de lecture de la R2 avec celle du peptide T7 Tag du vecteur pET-21b. Le fragment obtenu a été par la suite digéré par *Bam* HI et *Nru* I, purifié en gel d'agarose puis inséré dans les sites *Bam* HI et *Sal* I (préalablement traité avec le fragment Klenow) de pET-21b. Suite à la transformation de *E. coli* XL1 blue, un clone contenant un ADN plasmidique générant une insertion *Bam* HI/*Hind* III de 1200 pb a été sélectionné et identifié pET/R2.

Pour cloner le gène de la grosse sous-unité (R1), un fragment *Nar* I de 1992 pb codant les 602 derniers acides aminés de la protéine a été purifié du plasmide pKS/RNR (Simard *et al.*, 1992). Le fragment d'ADN a été ligué à l'adaptateur phosphorylé 5'P-CGCCCATATGAGGATCCTCATATGGG-3', digéré par *Bam* HI puis inséré dans le site *Bam* HI du vecteur pET-21b. L'orientation des insertions dans les ADN plasmidiques recombinants a été déterminée par digestion avec *Xho* I. Un clone ayant son insertion orientée 5'→3' par rapport au promoteur T7 du vecteur a été identifié pET/R1.

Les jonctions insertion/vecteur des plasmides recombinants pET/R1 et pET/R2 ont été séquencées afin de s'assurer du respect des cadres de lecture des gènes fusionnés.

6.2 Expression des protéines recombinantes chez *E. coli*

Les plasmides recombinants pET/R1 et pET/R2 ont été utilisés pour

transformer *E. coli* BL21. Un transformant de chaque plasmide a été soumis à un test de stabilité et d'inductibilité (Studier *et al.*, 1990). Ce test consiste à inoculer des géloses de compositions différentes avec une pré-culture en phase stationnaire des transformants. Pour ce faire, quatre géloses LB-agar et quatre autres contenant 50 µg/mL d'ampicilline ont été préparées. Sur deux des quatre pétris ont été étalés 250 µL d'une solution d'IPTG 100 mM. Les géloses avec et sans ampicilline ont été inoculées avec 50 µL de pré-culture diluées 10^{-6} et 10^{-5} respectivement. La croissance de chaque transformant a ensuite été évaluée. Les transformants ont été jugés inductibles lorsqu'aucune croissance n'était observée sur les géloses contenant l'IPTG. En effet, l'induction de l'expression des gènes exogènes est si forte qu'elle monopolise la machinerie cellulaire empêchant ainsi la synthèse des protéines requises à la croissance bactérienne. De plus, les transformants ont été considérés stables lorsque leur croissance en présence et en absence d'ampicilline était similaire (en tenant compte du facteur de dilution).

Les deux transformants sélectionnés s'étant avérés stables et inductibles, une cinétique d'induction a été effectuée afin de déterminer le temps d'induction optimal pour l'expression des protéines recombinantes. Pour ce faire, 20 mL de milieu LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline ont été inoculés avec 0,2 mL d'une pré-culture en phase stationnaire. Ces cultures ont été incubées à 37°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,6 à 600 nm. Les cellules ont ensuite été induites par addition de 0,4 mM d'IPTG. Des aliquotes de un mL ont été prélevées stérilement aux temps 0, 1, 2, 3 et 4 hres post-induction et congelées à -20°C. La congélation des cellules provoque l'arrêt de l'induction et permet d'affaiblir leur membrane suite à la formation

de cristaux de glace. Les aliquotes ont été décongelées et les cellules récoltées par centrifugation à 3450 g durant 5 minutes à 4°C. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 100 µL de TEN contenant 1 mg/mL de lysozyme (Boehringer Mannheim). Les cellules ont été lysées par ultrasons (Braun Sonic 2000; Braun Instruments, Burlingame, CA, É-U) en exécutant 6 cycles de 30 secondes au niveau maximal. Les lysats obtenus ont été centrifugés à 1760 g durant 8 minutes à 4°C afin de séparer les protéines solubles (surnageants) de celles insolubles (culots). Aux surnageants obtenus ont été ajoutés 25 µL de tampon dénaturant réducteur 5X (section 5.1). Les culots protéiques ont été resuspendus dans 100 µL de TEN puis 25 µL de tampon dénaturant 5X ont été ajoutés. Tous les échantillons ont été bouillis 3 minutes puis 10 µL ont été analysés en gel de polyacrylamide 10% (Miniprotean II). Les protéines ont été soit visualisées par coloration (section 5.1) ou immunodétectées (section 5.2) avec l'anticorps monoclonal anti-T7 Tag (Novagen; dilution 1/5000).

7. Production des sérums monospécifiques

7.1 Préparation des antigènes

Une extraction préparative de corps d'inclusion a été effectuée sur des cultures de 100 mL de cellules induites durant 4 hres, temps optimal de synthèse des protéines R1 et R2 recombinantes. Les cultures ont été congelées (-20°C) et décongelées (25°C) trois fois, les cellules récoltées par centrifugation (5 minutes à 11100 g à 4°C) puis resuspendues dans 10 mL de TEN/lysozyme. Après une incubation d'une hre à 25°C, les échantillons ont été traités aux ultrasons. Les débris cellulaires ainsi qu'une bonne partie de l'ADN génomique ont été éliminés par centrifugation à 3500 g durant 12 minutes. Les surnageants

ont été recentrifugés à 7750 g durant 10 minutes et les culots (corps d'inclusion) obtenus resuspendus dans 5 mL de TEN contenant 0,1% (P/V) de déoxycholate. Afin de diminuer leur viscosité due à la présence d'ADN, les préparations ont été incubées durant 1 hre à 37°C suite à l'ajout de 80 µL de MgCl₂ 1 M et de 225 µg/mL de DNase I (Boehringer Mannheim).

Les corps d'inclusion ont été resédimentés par centrifugation à 13800 g durant 15 minutes puis resuspendus dans 5 mL de TEN contenant 1% de NP40. Ce détergent non dénaturant facilite la dissociation des amas de protéines. Les préparations ont été vortexées jusqu'à homogénéité puis recentrifugées à 13800 g durant 15 minutes. Les corps d'inclusion ont finalement été resuspendus dans 5 mL de TEN, aliquotés et conservés à -20°C. Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford en utilisant la trousse "Dye reagent concentrate kit" (Bio-Rad). Afin de se débarrasser des protéines contaminantes de *E. coli*, les protéines recombinantes R1 et R2 ont été purifiées en gels de polyacrylamide préparatif (Protean II; 800 µL d'échantillon/gel). Les bandes correspondant aux protéines de fusion ont été broyées dans du PBS stérile (Gibco) par passages successifs dans des seringues de 5 mL reliées à des aiguilles de calibre de plus en plus petit (18 à 21 G). La pureté et la concentration de protéines ont été évaluées empiriquement sur gel.

7.2 Protocole d'immunisation

Trois cobayes ont été immunisés trois fois à 2 semaines d'intervalle par injection intrapéritonéale avec environ 25 µg de chacune des protéines recombinantes. Des saignées ont été effectuées au jour 0, 14, 28 et 32. Les animaux ont été sacrifiés au jour 39 et le sang collecté. Les sérums (identifiés

anti-R2-1, anti-R2-2, anti-R2-5, anti-R1-3, anti-R1-4 et anti-R1-6) ont été aliquotés et conservés à -20°C. Un sérum spécifique contre chaque antigène a été sélectionné. Ces deux sérums ont été calibrés l'un par rapport à l'autre par transfert de type Western ou en dot, en utilisant comme standard interne l'anticorps monoclonal anti-T7 Tag (voir résultats).

8. Cinétique d'expression de la RNR du BHV-1

Des feuillettes de cellules MDBK (18×10^6 cellules/plateau) ont été infectés avec le BHV-1 (m.o.i de 2) durant 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 et 24 hres. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS stérile (Gibco) puis lysées dans 500 µL de tampon dénaturant réducteur 1X (voir section 5.1). Les lysats ont été aliquotés et conservés à -20°C. Les protéines (40 µL de lysat/puits) ont été fractionnées sur gel de polyacrylamide 10% (Protean II), transférées sur membrane PVDF puis immunodétectées avec les sérums anti-R2-1 ou anti-R1-6 en utilisant les dilutions appropriées. Notons que les temps de révélation utilisés ont été identiques (10 minutes) pour les deux antisérums.

9. Localisation de l'extrémité 5' du transcrit codant la R1

La localisation du site d'initiation de la transcription du gène de la grosse sous-unité de la RNR du BHV-1 a été déterminée par un test de protection à la nucléase S1. Auparavant, un fragment *Sal* I de 1720 pb codant la région N-terminale du polypeptide et les régions en amont (Fig. 11) a été isolé de pKS/RNR (Simard *et al.*, 1992) et inséré dans le site *Sal* I (déphosphorylé) de pKS. L'ADN plasmidique des transformants obtenus a été isolé, digéré par *Sal* I puis analysé en gel d'agarose afin d'identifier ceux contenant l'insertion

désirée. Une deuxième analyse de restriction avec *Sac* I a été effectuée pour déterminer l'orientation des insertions. Un clone dont l'insertion était orientée 5'→3' a été sélectionné et identifié pKS-1.7Hd/S.

Le plasmide pKS-1.7Hd/S a été digéré par *Mlu* I, déphosphorylé puis marqué au ^{32}P (section 4.5). L'ADN a été digéré à nouveau par *Hind* III puis fractionné en gel d'agarose. Le fragment de 760 pb a finalement été purifié et utilisé pour le test de protection. L'ADN marqué (90,000 CPM) a été ajouté à 150 μg d'ARN totaux isolés de cellules infectées avec le BHV-1 (9 hres p.i.) ou de cellules non infectées (témoin négatif). Les acides nucléiques ont été précipités par addition de 0,1 volume de 3 M NaOAc pH 5,0 et de 2,5 volumes d'éthanol 95%, incubés dans un bain d'éthanol/glace sèche durant 15 minutes et récoltés par centrifugation à 11000 g durant 8 minutes. Les culots ADN/ARN ont été lavés à l'éthanol 70%, séchés à l'air et dissous dans 30 μL de solution d'hybridation (40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA, 0,4 M NaCl et 80% formamide). Après dénaturation des acides nucléiques à 85°C pour 10 minutes, les tubes ont été incubés à 60°C pour 16 hres. Les tubes ont été congelés quelques minutes dans un bain éthanol/glace sèche, placés sur glace puis 360 μL de tampon S1 ont été ajoutés (280 mM NaCl, 50 mM NaOAc pH 5,0, 4,5 mM ZnSO_4 , 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ADN non marqué, 800 U/mL de nucléase S1; Pharmacia). Cette enzyme est spécifique pour l'ADN ou l'ARN simple brin de sorte que les hybrides ARN/ADN seront protégés de la digestion. Les tubes ont été incubés à 37°C durant 30 minutes puis 80 μL de tampon d'arrêt (4,8 M NH_4OAc , 60 mM EDTA pH 8,0, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ARNt) ont été ajoutés. Les milieux réactionnels ont été extraits au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (24:24:1), les phases aqueuses recueillies et les acides nucléiques précipités à l'éthanol. Les culots ont

finalement été dissous dans 5 μ L de tampon formamide (80% formamide, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,1% xylène cyanol, 0,1% bleu de bromophénol) et les échantillons analysés (1 μ L) sur un gel de séquence en parallèle avec un standard de poids moléculaires.

10. Séquençage de la région 3' du gène de la R1

Durant ce projet, le séquençage de quelques 400 nucléotides représentant la région en 3' du fragment *Hind* III I du génome viral a été réalisé. Ce fragment porte les gènes codant la RNR virale. Les résultats de ces travaux ne sont pas présentés dans ce mémoire mais ont été rapportés (ANNEXE 2; Simard *et al.*, 1995).

RÉSULTATS

Dans le cadre de ce projet, une étude cinétique de l'expression des deux sous-unités de la RNR virale a été réalisée à l'aide de sérums monospécifiques développés suite à leur expression individuelle chez *E. coli*. Les deux polypeptides ont été exprimés sous forme de fusion avec le peptide T7 Tag du vecteur pET-21b pour lequel un anticorps monoclonal spécifique est disponible commercialement. Cette région commune entre les deux protéines recombinantes a pu ainsi être utilisée pour calibrer les sérums l'un par rapport à l'autre et ainsi pallier aux différences d'immunogénicité "naturelle" des antigènes utilisés.

1. Expression des protéines recombinantes chez *E. coli*

Les vecteurs d'expression pET/R1 et pET/R2 représentant respectivement les séquences codant les 602 derniers acides aminés de la R1 et la R2 complète du BHV-1 (à l'exception des deux premiers résidus), ont été construits tel que décrit dans les matériels et méthodes. Les stratégies utilisées permettaient de conserver les codons d'arrêt de la traduction de chacun des gènes. Le séquençage des jonctions vecteur/insertion en 5' a permis de démontrer que les cadres de lecture des gènes étaient fusionnés à celui codant le peptide T7 Tag du vecteur (résultats non montrés). Les plasmides ont été utilisés pour transformer *E. coli* BL21, souche requise pour l'expression des protéines recombinantes. Une cinétique d'expression des polypeptides de fusion, suite à l'induction des cellules transformées en présence d'IPTG, a été réalisée pour déterminer le temps d'induction optimal et localiser les protéines dans les lysats cellulaires.

1.1 Expression de la petite sous-unité

Par comparaison avec les lysats de cellules non-induites (Fig. 7, puits 0) l'induction du transformant pET/R2 a permis la synthèse d'un polypeptide abondant de 36 kDa (puits 1-4) qui était retrouvé dans les fractions protéiques solubles (Fig. 7A) et insolubles (corps d'inclusion; Fig. 7B). La grosseur du polypeptide correspondait parfaitement avec celle déduite à partir de sa séquence primaire (36,9 kDa). Le polypeptide de 36 kDa apparaissait après une heure d'induction (puits 1) et son abondance augmentait jusqu'à 3 heures (puits 3) pour se stabiliser à 4 heures (puits 4).

Une analyse de type Western avec l'anticorps monoclonal anti-T7 Tag a permis de confirmer l'identité de la protéine de fusion (Fig. 7C et D). Curieusement, l'anticorps détectait aussi un polypeptide de 29 kDa qui était présent dans les corps d'inclusion. Ce résultat pourrait suggérer que la bande de 29 kDa correspond à un produit de clivage du polypeptide de 36 kDa. Le polypeptide de 36 kDa a été dénommé R2-T7 Tag.

1.2 Expression de la grosse sous-unité

L'induction à l'IPTG du transformant BL21 contenant le plasmide pET/R1 a permis la synthèse d'un polypeptide abondant de 67 kDa présent dans les fractions protéiques insolubles (Fig. 8A, puits 1-3). Aucun polypeptide de cette taille n'était présent dans les lysats de cellules non-induites (puits 0) ni dans les fractions protéiques solubles (Fig. 8B). La grosseur du polypeptide correspondait à celle attendue (67,6 kDa). L'accumulation du polypeptide augmentait de 1 à 3 heures post-induction (puits 1-3) et se stabilisait après 4 heures

Figure 7: Analyse de l'expression du polypeptide de fusion R2-T7 Tag chez *E. coli*. Le transformant pET/R2 a été induit en présence d'IPTG durant 0, 1, 2, 3 et 4 hres (puits 0-4 respectivement). Les protéines de la fraction insoluble (corps d'inclusion; A, C) et soluble (B, D) ont été isolées tel que décrit dans le texte puis un échantillon (10 µL) analysé sur un gel de polyacrylamide 10%. La protéine R2-T7 Tag a été visualisée soit par coloration au bleu de Coomassie (A, B) ou par immunoempreinte de type Western (C, D) avec l'anticorps monoclonal anti-T7 Tag (Novagen; dilution 1/5000). La position des marqueurs de poids moléculaires (kDa) est indiquée à gauche; fm et SS représentent respectivement le front de migration et la petite sous-unité recombinante de la RNR du BHV-1 (R2-T7 Tag).

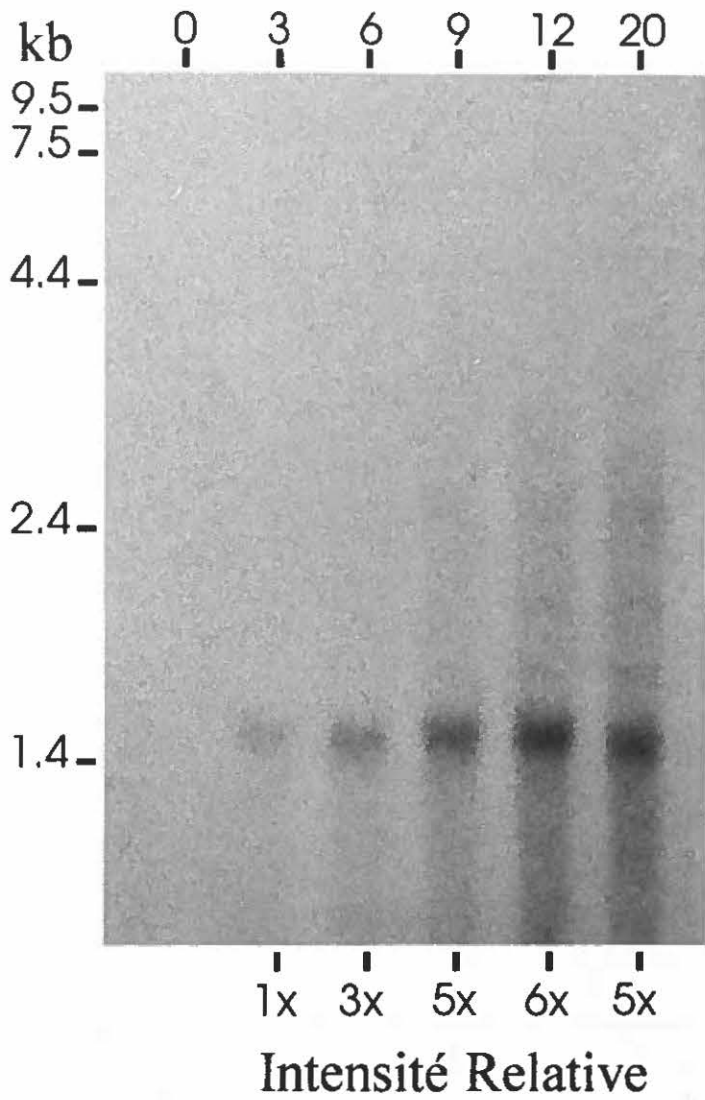
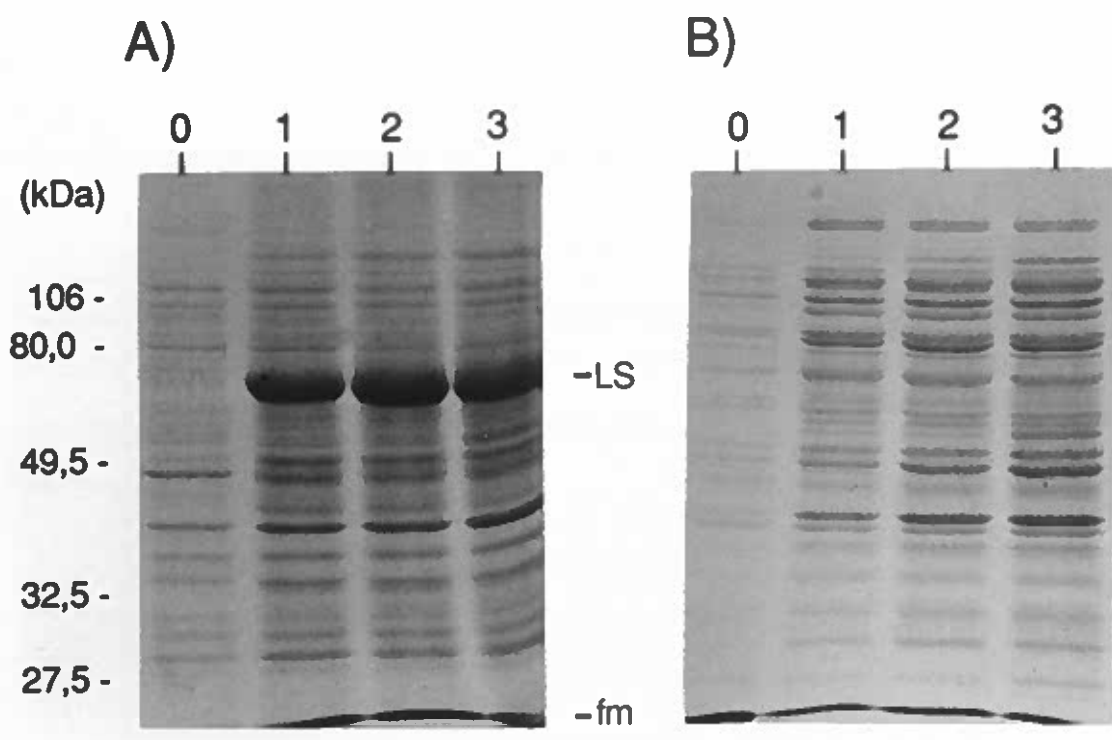


Figure 8: Analyse de l'expression du polypeptide de fusion R1-T7 Tag chez *E. coli*. Le transformant pET/R1 a été induit en présence d'IPTG durant 0, 1, 2 et 3 hres (puits 0-3 respectivement). Les protéines de la fraction insoluble (corps d'inclusion; A) et soluble (B) ont été isolées tel que décrit dans le texte puis un échantillon (10 µL) analysé sur un gel de polyacrylamide 10%. La protéine R1-T7 Tag a été visualisée par coloration au bleu de Coomassie. La position des marqueurs de poids moléculaires (kDa) est indiquée à gauche; fm et LS représentent respectivement le front de migration et la grosse sous-unité recombinante de la RNR du BHV-1 (R1-T7 Tag).



(non montré). Enfin, le polypeptide était détectable par l'anticorps anti-T7 Tag (résultat non montré) ce qui confirmait son identité. Ce polypeptide a été dénommé R1-T7 Tag.

2. Production et calibration des sérums monospécifiques

En se basant sur les résultats obtenus lors de la cinétique d'expression des polypeptides R1-T7 Tag et R2-T7 Tag, une extraction préparative de corps d'inclusion a été effectuée à partir des transformants BL21 induits durant 4 hres, soit au moment où l'expression des protéines recombinantes apparaissait maximale. Afin de réduire au minimum le bruit de fond des sérums immuns, les protéines recombinantes ont été préalablement purifiées en gel de polyacrylamide avant d'être utilisées pour les immunisations. Les sérums immuns obtenus ont été testés en analyses de type Western sur des lysats cellulaires provenant des transformants de *E. coli*, de cellules MDBK de même que de cellules MDBK infectées par le BHV-1 (12 hres p.i.). Ces essais ont permis de choisir les meilleurs sérums sur la base de leur réactivité tout en recherchant un bruit de fond minimal (résultats non montrés). Les sérums anti-R2-1 et anti-R1-6 se sont avérés être ceux répondant le mieux à nos critères. Ces deux sérums ont été calibrés l'un par rapport à l'autre afin de pallier aux différences d'immunogénicité "naturelle" des deux protéines virales. Ceci était en effet requis pour évaluer adéquatement leur accumulation relative dans les cellules MDBK infectées par le BHV-1.

Pour calibrer les sérums, nous avons pris avantage des séquences T7 Tag présentes chez les deux protéines recombinantes exprimées chez *E. coli*.

L'anticorps monoclonal anti-T7 Tag a en effet été utilisé pour quantifier empiriquement les polypeptides R2-T7 Tag et R1-T7 Tag. Les dilutions des sérums monospécifiques anti-R2-1 et anti-R1-6 ont été ajustées de façon à obtenir une différence dans les signaux de détection des protéines R2-T7 Tag et R1-T7 Tag qui était équivalente à celle observée avec l'anticorps anti-T7 Tag. Ces essais ont été tout d'abord réalisés en immunoempreinte de type Western puis confirmés en immunoempreinte ponctuelle ("dot blot"). Nos résultats indiquent que des dilutions 1/300 et 1/500 respectivement pour les sérums anti-R2-1 et anti-R1-6 étaient appropriées (Fig. 9).

3. Cinétique d'expression des sous-unités de la RNR du BHV-1

L'expression des petite et grosse sous-unités de la RNR virale en fonction du temps a été évaluée par immunoempreinte de type Western sur des lysats de cellules MDBK préalablement infectées durant 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 et 24 hres avec le BHV-1.

Le sérum immun anti-R1-6 a spécifiquement reconnu un polypeptide de 85 kDa dans les lysats de cellules infectées (Fig. 10A, puits 3-24). Par contre, aucune bande de cette grosseur n'a été détectée dans le lysat de cellules non infectées (puits 0), ce qui confirme l'appartenance du polypeptide au BHV-1. De plus, le poids moléculaire du polypeptide viral correspond parfaitement avec celui prédit à partir de la structure primaire de la R1 du BHV-1 (86 kDa; ANNEXE 2; Simard *et al.*, 1995), ce qui en confirme l'identité. Le polypeptide de 85 kDa est détecté à partir de 6 hres p.i., son abondance augmente significativement jusqu'à 9 hres p.i. puis se maintient jusqu'à 24 hres p.i. Les bandes de 33, 34 et 45 kDa détectées par le sérum et communes à tous les puits représentent

Figure 9: Calibration des sérums anti-R2-1 et anti-R1-6 par immunoe empreintes de type Western ou dot. Un transfert de type Western (A-C) a été réalisé à partir d'un mélange égal de corps d'inclusion de *E. coli* BL21 isolés des transformants pET/R1 et pET/R2 (puits 2) ou du transformant pET-21b (puits 1). Les protéines recombinantes ont été détectées avec les sérums anti-R2-1 (A) et anti-R1-6 (C) ou avec l'anticorps monoclonal anti-T7 Tag (B) respectivement dilués 1/300, 1/500 et 1/5000. SS et LS représentent respectivement les petites (R2-T7 Tag) et grosses (R1-T7 Tag) sous-unités recombinantes de la RNR du BHV-1. La position des marqueurs de poids moléculaires (kDa) est indiquée à gauche. Pour l'immunodétection en dot (D, E, F, G), les corps d'inclusion isolés des transformants pET-21b (rangée 1), pET/R2 (rangée 2) et pET/R1 (rangée 3) ont été dilués tel qu'indiqué et adsorbés sur une membrane de nitrocellulose. Une solution de BSA 2% a aussi été utilisée pour témoin négatif. Les protéines adsorbées ont été soit colorées au bleu de Coomassie (D) ou immunodétectées avec les sérums anti-R2-1 (E) et anti-R1-6 (G) ou avec l'anticorps monoclonal anti-T7 Tag (F) respectivement dilués 1/300, 1/500 et 1/5000.

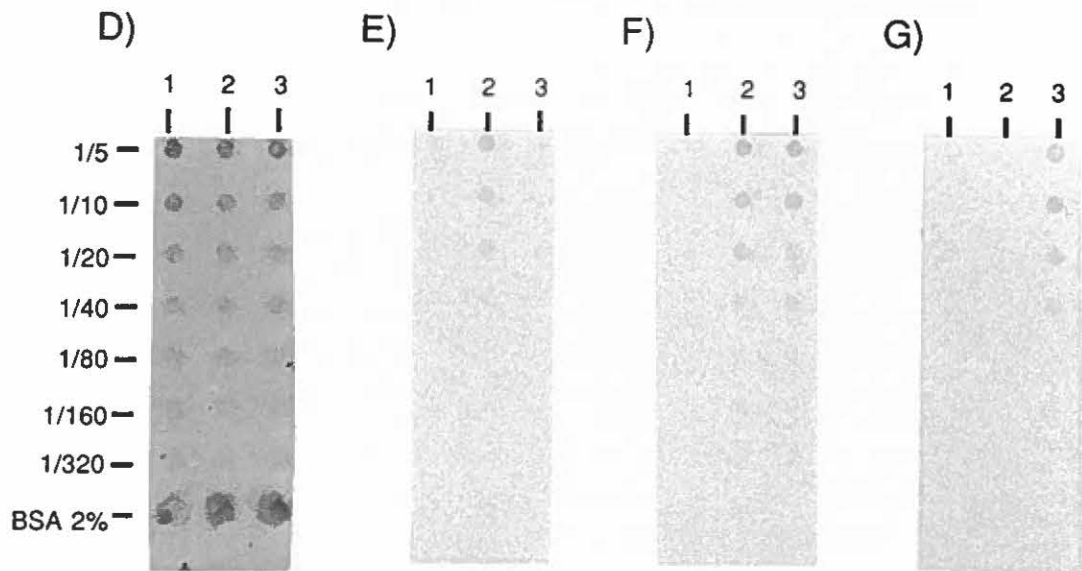
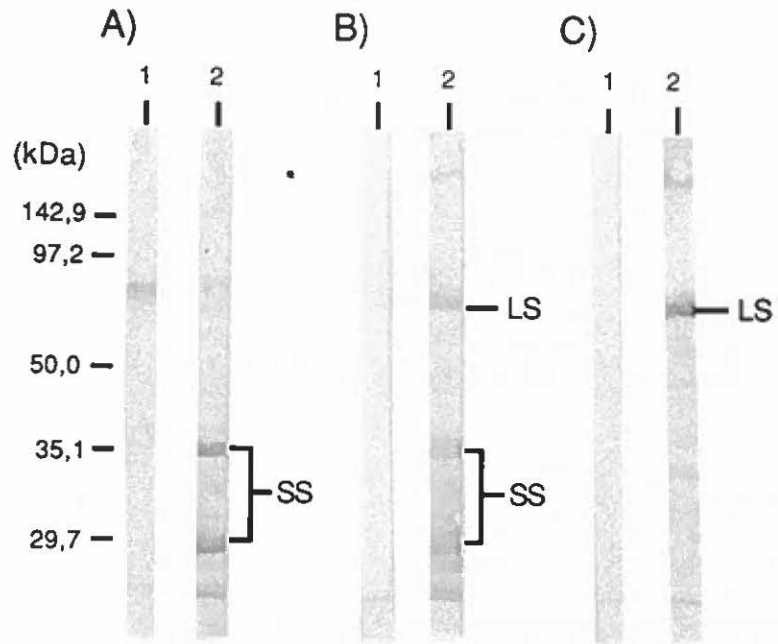
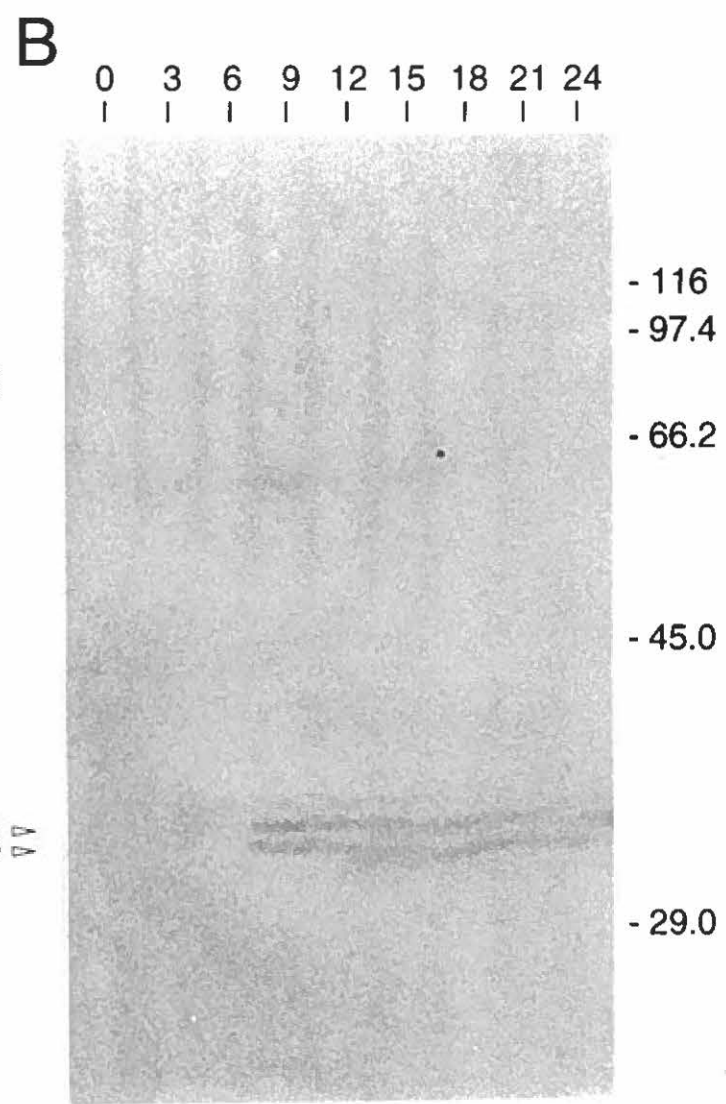
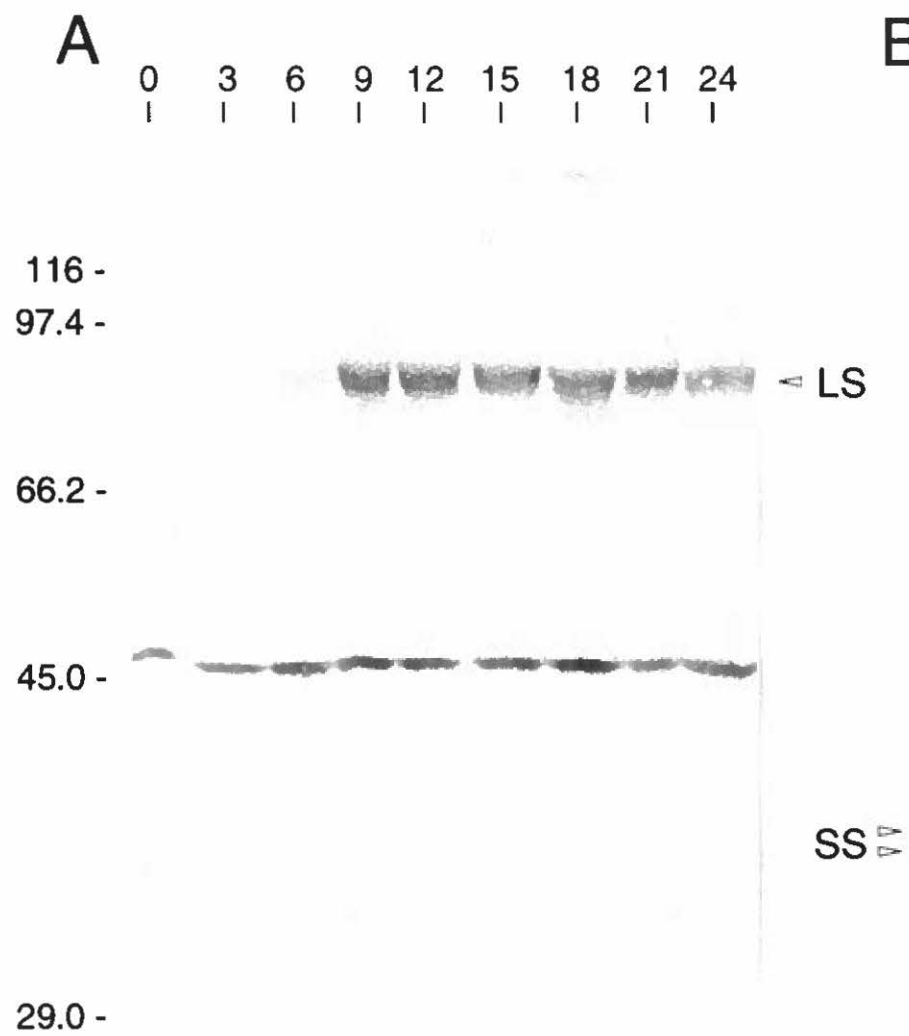


Figure 10: Cinétique d'expression des sous-unités de la RNR virale. Des lysats (40 μ L) de cellules MDBK infectées durant 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 et 24 hres avec le BHV-1 (m.o.i de 2) ont été fractionnés sur un gel de polyacrylamide 10% puis électrotransférés sur une membrane de PVDF. Les protéines ont été détectées avec les sérums anti-R1-6 (A) et anti-R2-1 (B) dilués 1/500 et 1/300 respectivement. SS et LS représentent respectivement les petites (R2) et grosses (R1) sous-unités de la RNR du BHV-1. La position des marqueurs de poids moléculaires (kDa) est indiquée à gauche.



indubitablement des protéines cellulaires.

Pour sa part, le sérum anti-R2-1 a réagi spécifiquement avec deux polypeptides de 33 et 34 kDa présents dans les lysats de cellules infectées (Fig. 10B, puits 3-24) et absents dans le lysat de cellules non-infectées (puits 0). Ceci confirme donc l'appartenance des deux polypeptides au BHV-1. La grosseur des deux bandes correspond au poids théorique de la R2 (35 kDa; Simard *et al.*, 1992). L'apparition de la R2 sous la forme d'une double bande pourrait s'expliquer de plusieurs manières. Ainsi, la bande de 33 kDa pourrait soit représenter un produit de dégradation de celle de 34 kDa ou bien une deuxième forme de la R2 virale. Il pourrait aussi s'agir d'un artefact de migration. Les deux polypeptides sont détectables à partir de 9 hres p.i. et s'accumulent en quantités similaires jusqu'à 24 hres p.i. L'intensité relative des bandes protéiques représentant la R1 et la R2 nous suggère que la R1 s'accumule en plus grande abondance que la R2. Par ailleurs, nos résultats montrent que l'accumulation de la R1 précède celle de la R2.

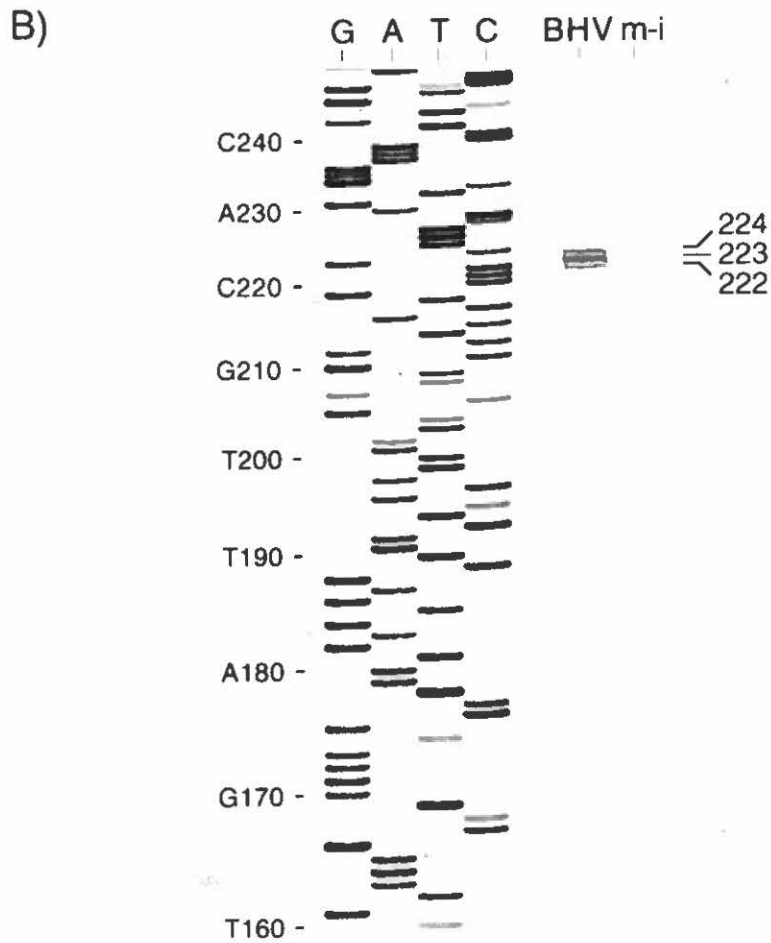
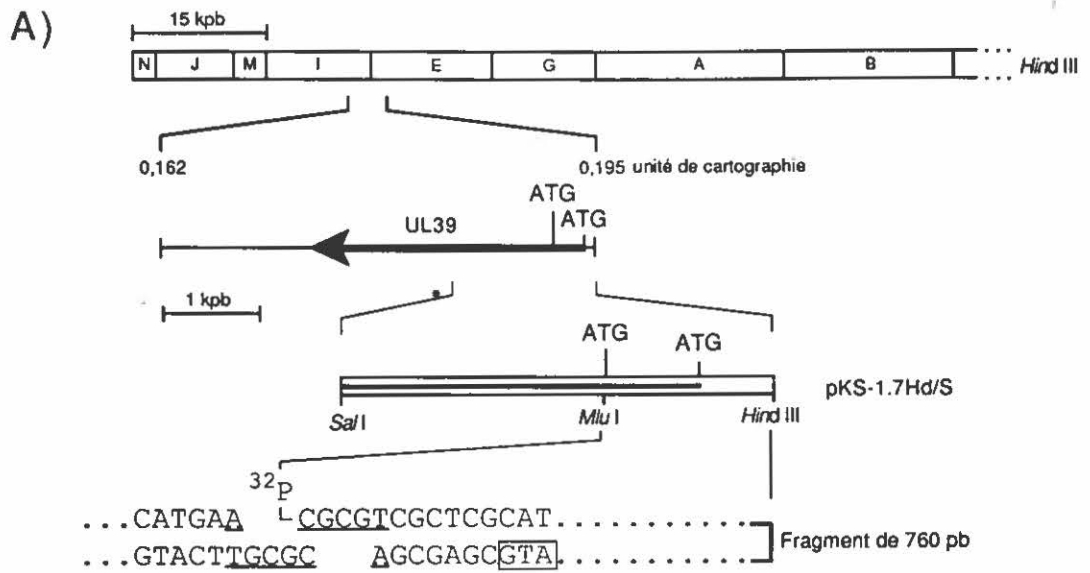
4. Localisation de l'extrémité 5' du transcrit codant la R1

La localisation fine du site d'initiation de la transcription du gène codant la R1 a été réalisée pour trois raisons principales. D'abord, ces travaux visaient à discriminer lequel des deux sites potentiels d'initiation de la traduction de la R1 était fonctionnel (ANNEXE 2; Simard *et al.*, 1995). L'étude visait aussi à déterminer la longueur de la région 5' non traduite du transcrit, ce qui pourrait contribuer à expliquer pourquoi la R1 est exprimée en plus grande abondance que la R2, même si son transcrit s'accumule en quantités beaucoup moins

importantes. Enfin, cela permettait aussi de mieux situer les régions promotrices potentielles du gène.

L'extrémité 5' du transcrit de la R1 a été localisée dans un test de protection à la nucléase S1. Pour ce faire, un fragment d'ADN marqué à 15 nucléotides du codon ATG le plus en aval du cadre de lecture et complémentaire à l'ARNm de la R1 (Fig. 11A) a été hybridé avec les ARN totaux isolés de cellules infectées ou non par le BHV-1. Après digestion par la nucléase S1, l'ADN protégé obtenu a été analysé sur un gel de séquence en parallèle avec une réaction de séquençage de M13mp18, utilisée comme marqueurs de poids moléculaires (Fig. 11B). Trois fragments d'ADN de 222, 223 et 224 b étaient protégés de la digestion S1 dans l'échantillon contenant les ARNs provenant des cellules infectées (puits BHV-1). Par contre, aucun fragment n'était protégé dans l'échantillon témoin (puits m-i). La bande médiane étant plus intense que les deux autres, ceci nous permet de suggérer qu'elle représente le site majeur d'initiation de la transcription qui serait donc situé 209 nucléotides en amont du codon ATG situé le plus près du site de marquage. Les deux autres bandes pourraient soit représenter deux sites mineurs de la transcription ou des produits de digestion partielle par la S1. La localisation fine de l'initiation de la transcription et celle préalablement rapportée du site de terminaison (Simard *et al.*, 1992) a permis de déterminer la longueur précise du transcrit à 3623 b. Ce résultat correspond très bien avec la longueur préalablement estimée du transcrit par transfert de type Northern (3,7 kb; Simard *et al.*, 1992).

Figure 11: Localisation du site d'initiation de la transcription du gène de la R1. A) Un fragment d'ADN de 760 pb marqué 15 nucléotides en aval du deuxième codon potentiel d'initiation de la traduction de la R1 a été isolé du sous-clone pKS-1.7 Hd/S. Le fragment a été hybridé avec les ARN totaux isolés de cellules non-infectées (puits m-i) ou infectées par le BHV-1 (puits BHV-1) puis traité à la nucléase S1. Les échantillons ont été analysés sur un gel polyacrylamide en parallèle avec une réaction de séquençage enzymatique de M13mp18 comme standards de poids moléculaires (puits G, A, T et C). Tous les 10 nucléotides de la séquence de M13mp18 sont indiqués à gauche avec la longueur correspondante des fragments. La longueur des fragments d'ADN protégés de la digestion par la nucléase S1 est indiquée à droite.



DISCUSSION

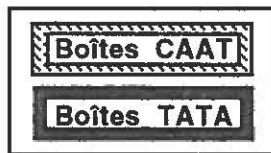
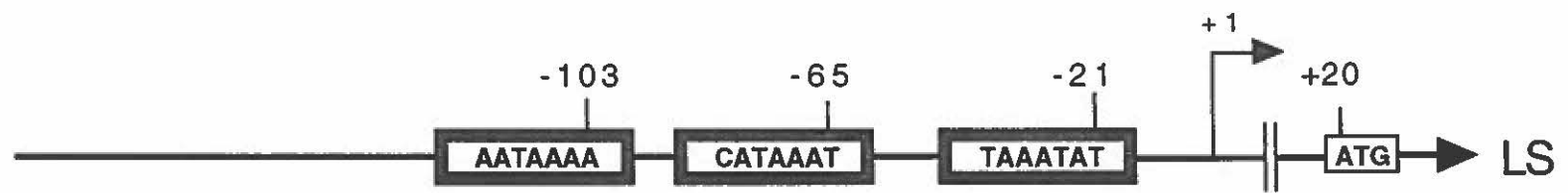
Les virus herpès codent plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des nucléotides, dont la ribonucléotide réductase (RNR). Les RNR virales examinées à ce jour sont constituées d'homodimères de petites (R2) et de grosses sous-unités (R1) (Ingemarson et Lankinen, 1987; Thelander et Reichard, 1979). Récemment, Simard et collaborateurs (1992) ont rapporté que la stœchiométrie des sous-unités R1 et R2 chez le virus BHV-1 ne peut pas être liée à une abondance comparable de leurs transcrits respectifs. En effet, l'étude montrait que le transcrit codant la R2 s'accumule toujours en plus grande abondance (plus de 5 fois) que celui codant la R1 (Fig. 5). Les auteurs ont postulé que l'accumulation non-stœchiométrique des transcrits était due soit à des différences au niveau de leurs promoteurs respectifs, soit à des différences dans la vitesse de renouvellement ("turnover") de leurs transcrits. Cependant, nous ne pouvons exclure qu'une dégradation des ARN, ou une différence d'efficacité dans le transfert des deux transcrits ou encore que la présence d'ARN ribosomique à proximité de l'un des transcrits ait masqué ou influencé leur quantification relative. Mentionnons qu'une expérience de protection à la RNase aurait permis de confirmer leurs observations. Dans ce chapitre, nous allons d'abord examiner si des différences dans les promoteurs respectifs des deux gènes pourraient corroborer la différence dans l'abondance des transcrits observée par Simard et collaborateurs (1992).

Nous avons récemment rapporté la séquence complète du gène codant la sous-unité R1 du BHV-1 (ANNEXE 2; Simard *et al.*, 1995). Ces travaux avaient permis d'identifier deux sites potentiels d'initiation de la traduction distancés de 312 nucléotides et qui pouvaient conduire à la synthèse de protéines de

grosseurs suffisantes (96,7 versus 86,0 kDa) pour représenter un polypeptide fonctionnel. Pour déterminer lequel des deux ATGs était utilisé pour initier la traduction, nous avons procédé à la localisation du site d'initiation de la transcription du gène. Nos résultats ont montré que la transcription était initiée 209 nucléotides en amont du deuxième codon ATG. Cela excluait donc la possibilité que le premier ATG puisse être utilisé pour initier la traduction, la transcription débutant en aval de ce codon. Ainsi, la grosseur prédite de la R1 était de 86,0 kDa et non pas 96,7.

La localisation du site d'initiation de la transcription nous a en outre permis de mieux identifier les régions promotrices potentielles du gène afin de les comparer à celles du gène codant la R2. La figure 12 présente un schéma comparatif des éléments pouvant représenter les promoteurs des deux gènes RNR. Les séquences en amont du site d'initiation de la transcription du gène de la R1 contiennent trois boîtes consensus TATA situées aux positions -21, -65 et -103 ainsi qu'une boîte CAAT à la position -1100. Cependant, sur la base des positions de référence des éléments de promoteurs eucaryotiques, il est plus que probable que la transcription du gène ne soit régulé que par la première des trois boîtes TATA, les autres séquences consensus étant vraisemblablement trop éloignées pour y contribuer. Par comparaison, la région en amont du site d'initiation de la transcription du gène de la R2 révèle la présence d'une boîte TATA et de deux boîtes CAAT situées respectivement aux positions -24, -104 et -189. Dans ce cas-ci, la boîte TATA et la première boîte CAAT sont situées à des positions appropriées pour être fonctionnelles, ce qui suggère que ces deux éléments participent à la régulation transcriptionnelle. La présence additionnelle d'une boîte CAAT dans le promoteur du gène de la R2 pourrait expliquer que

Figure 12 Schéma comparatif des régions promotrices potentielles des gènes de la RNR du BHV-1. Sur cette figure, LS et SS représentent respectivement les gènes de la grosse (R1) et la petite (R2) sous-unités. Pour chaque gène, la position de chacune des boîtes consensus TATA et CAAT, ainsi que les sites d'initiation de la transcription et de la traduction sont indiqués.



son transcrit s'accumule en plus grande abondance que celui de la R1 puisque ce type d'élément favorise la fréquence d'initiation de la transcription. Ces observations semblent donc appuyer l'hypothèse de Simard et collaborateurs (1992) à l'effet que des différences dans les promoteurs des gènes de la R1 et de la R2 puissent être responsables d'une accumulation différentielle des transcrits. Cependant, cela n'exclut pas que des différences dans les temps de demi-vie des transcrits puissent aussi être impliquées.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise visait à vérifier si l'abondance non-stœchiométrique des transcrits des gènes RNR du BHV-1 se reflétait au niveau protéique. Pour ce faire, les deux polypeptides viraux ont été individuellement produits dans un système d'expression procaryotique afin de permettre le développement de sérums monospécifiques. Cependant, il nous était apparu évident que des différences dans l'immunogénicité des polypeptides auraient influencé l'interprétation des résultats quant à l'évaluation de l'abondance relative des protéines dans les lysats de cellules infectées. Pour y pallier, la stratégie adoptée pour la production des protéines R1 et R2 chez *E. coli* a consisté à fusionner les séquences codantes avec celle codant le peptide T7 Tag du vecteur d'expression. Cette portion commune entre les deux protéines recombinantes a ainsi pu être utilisée, conjointement avec l'anticorps mono-clonal commercial anti-T7 Tag, pour calibrer les sérums générés.

La cinétique d'expression des sous-unités R1 et R2 de la RNR du BHV-1 en cours d'infection a été réalisée par transfert de type Western des lysats de cellules infectées pour différentes périodes avec le BHV-1. Le sérum anti-R1 a spécifiquement reconnu un polypeptide de 85 kDa dont la grosseur corres-

pondait parfaitement bien avec celle prédite de la structure primaire de la protéine débutant au deuxième ATG potentiel d'initiation de la traduction. Cette observation corrobore donc les résultats obtenus sur la localisation du site d'initiation de la transcription du gène. Il est intéressant de noter que la grosseur du polypeptide est similaire à celle des protéines homologues chez les virus de l'herpès équin (EHV-1; 86 kDa) et de la varicelle zona (VZV; 88 kDa). L'accumulation de la protéine chez le BHV-1 débute à 6 hres p.i., son abondance augmente significativement jusqu'à 9 hres puis se maintient jusqu'à 24 hres. Pour sa part, le sérum anti-R2 a spécifiquement détecté deux bandes protéiques de grosseurs similaires (33 et 34 kDa) et consistantes avec celle prédite (35 kDa; Simard *et al.*, 1992). La présence de deux et non pas d'une seule bande protéique est quelque peu intrigante. En effet, la bande de 33 kDa pourrait représenter un produit de dégradation de celle de 34 kDa ou bien un artefact de migration. Alternativement, les deux bandes pourraient représenter deux formes distinctes de la sous-unité R2. Présentement, nous ne sommes pas en mesure de préciser laquelle des trois possibilités est vraie. Cependant, étant donné qu'aucun résultat semblable n'a jamais été rapporté dans la littérature, nous postulons que l'artefact ou le produit de dégradation prévaut. La sous-unité R2 s'accumule en quantité constante à partir de 9 hres jusqu'à 24 hres post-infection. La cinétique d'expression des sous-unités R1 et R2 montre qu'il s'agit de polypeptides de la phase précoce (β) du cycle répliatif viral, ce qui est similaire à ce qui a été rapporté pour les protéines homologues chez les autres virus herpès.

La comparaison de l'intensité relative des bandes R1 et R2 nous suggère que la sous-unité R1 s'accumule en plus grande abondance que la R2,

contrairement à ce qui avait été démontré au niveau de leurs transcrits respectifs. Par ailleurs, même si le transcrit de la R2 est cinq fois plus abondant que celui de la R1 à 6 hres p.i., la sous-unité R2 n'était détectée qu'à partir de 9 hres p.i., alors que celle de la R1 était détectable aussi tôt qu'à 6 hres p.i. Ces observations suggèrent que l'accumulation non-stœchiométrique des sous-unités dans les cellules infectées serait attribuable à une différence d'efficacité de traduction de leurs transcrits. Cette hypothèse est appuyée par la présence de caractéristiques différentes dans les régions 5' non codantes des transcrits. En effet, les travaux de Kozak (1991) ont montré que les régions immédiates précédant le codon AUG initiateur des ARNm, de même que la longueur des séquences de tête influençaient grandement l'efficacité de leur traduction. En se basant sur ces travaux, la présence du résidu adénosine à la position -3 du codon AUG initiateur du transcrit R1 pourrait favoriser sa traduction comparativement au résidu guanosine retrouvé à la même position chez le transcrit R2. Par ailleurs, la longueur plus grande de la séquence de tête du transcrit R1 par rapport à celle du transcrit R2 (209 nucléotides versus 95 nucléotides) pourrait aussi constituer un avantage. Ces deux caractéristiques chez le transcrit de la R1 pourraient donc faciliter sa traduction et expliquer l'abondance du polypeptide. Toutefois, la plus grande abondance de la sous-unité R1 par rapport à celle de la R2 pourrait aussi être expliquée par des différences dans leurs temps de demi-vie respectifs. À cet égard, une expérience de "pulse" suivi de "chase" permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Enfin, étant donné que les petites et grosses sous-unités de toutes les ribonucléotides réductases de classe I caractérisées à ce jour présentent une stœchiométrie 1:1, nos résultats pourraient suggérer que des sous-unités R1 virales

libres, c'est-à-dire non complexées en holoenzyme, existent dans les cellules infectées par le BHV-1. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par immunodétection en transfert de type Western d'un lysat cellulaire infecté et préalablement fractionné en conditions non-dénaturantes par centrifugation en gradient de densité (*e.g.* gradient linéaire de saccharose ou de glycérol) ou par chromatographie d'exclusion de taille, de façon à séparer les complexes enzymatiques des sous-unités libres potentielles.

CONCLUSION

En conclusion, ce projet a permis d'évaluer l'abondance relative de chacune des sous-unités de la RNR du BHV-1 ainsi que leur période d'expression. Lors de l'expression de l'enzyme, le rapport existant entre la R1 et la R2 n'est pas stœchiométrique: la R1 est plus abondante que la R2, contrairement à ce qui a été observé au niveau de leurs transcrits respectifs. Nos résultats constituent donc un excellent exemple du fait que l'abondance des transcrits ne reflète pas nécessairement l'abondance des protéines correspondantes. La localisation du site d'initiation de la transcription de la R1 a permis de déterminer qu'elle débute 209 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction, délimitant par le fait même la région promotrice potentielle du gène de la R1. Les différences décelées lors de la comparaison des régions promotrices des gènes de la R1 et de la R2 et des séquences 5' non-traduites de leurs transcrits permettent toutefois d'expliquer les rapports observés entre l'abondance des transcrits et des protéines. La régulation de la synthèse de cette enzyme n'est donc pas une simple question mathématique, un homodimère de grosses plus un homodimère de petites sous-unités donnant une holoenzyme complète. Il est possible que les molécules en excès de la grosse sous-unité jouent un rôle dans la régulation de l'équilibre de l'assemblage de l'holoenzyme fonctionnelle, contrôlant ainsi l'activité enzymatique résultante. Une autre possibilité est que la petite sous-unité, en tant que facteur limitant, serve de régulateur de la production de l'enzyme. En perspective d'avenir, un mutant de délétion de la petite sous-unité est présentement en construction au laboratoire. Ce mutant devrait permettre d'identifier le rôle de la RNR dans la pathogenèse et la réplication du BHV-1. Les sérums produits dans le cadre du présent projet aideront à sa caractérisation.

REMERCIEMENTS

Je ne pourrais terminer sans remercier mon directeur de recherche le Dr Claire Simard et mon co-directeur, le Dr Michel Trudel de m'avoir accueilli au sein de leur équipe. Ils m'ont permis d'acquérir par leurs conseils et leur support, une formation, des connaissances et des habiletés qui me seront utiles dans la voie que j'ai choisie. J'ai également beaucoup apprécié évoluer dans le cadre de travail motivant et enrichissant qu'ils ont su créer. Je remercie également la Fondation Armand-Frappier pour le support financier dont j'ai bénéficié pendant un peu plus d'une année.

Je voudrais aussi remercier mesdames Nicole Gagnon, Francine Nadon et Cécile Séguin pour le support technique et l'expérience qu'elles ont généreusement sus partager. À Anick Chalifour et Sirinart Ananvoranich, je n'oublierai pas votre enthousiasme et votre support.

Je ne pourrais oublier Dr Johnny Basso pour ses conseils judicieux qui m'ont grandement aidée tout au long de ce projet. Avant de terminer, je remercie Benoit D'Amours pour l'encouragement et l'aide qu'il m'a apporté tout au long de mes études.

BIBLIOGRAPHIE

- ACKERMANN, M., E. PETERHANS et R. WYLER. 1982. DNA of bovine herpes virus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 43: 36-40.
- ACKERMANN, M. et R. WYLER. 1984. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 2: 53-63.
- AGUILAR-SETIÉN, A., P.-P. PASTORET et F. SCHOENAERS. 1980. L'immunité envers le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (bovid herpesvirus 1). *Ann. Méd. Vét.* 124: 103-122.
- AVERETT, D.R., C. LUBBERS, G.B. ELION et T. SPECTOR. 1983. Ribonucleotide reductase induced by herpes simplex type 1 virus. Characterization of a distinct enzyme. *J. Biol. Chem.* 258: 9831-9838.
- BABIUK, L.A., H. BIELEFELDT OHMANN, G. GIFFORD, C.W. CZARNIECKI, V.T. SCIALLI et E.B. HAMILTON. 1985. Effect of bovine α 1 interferon on bovine herpesvirus type 1-induced respiratory disease. *J. Gen. Virol.* 66: 2383-2394.
- BABIUK, L.A., J. L'ITALIEN, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, T. ZAMB, M.J.P. LAWMAN, G. HUGHES et G.A. GIFFORD. 1987. Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology* 159: 57-66.
- BABIUK, L.A., R.C. WARDLEY et B.T. ROUSE. 1975. Defense mechanisms against bovine herpesvirus: Relationship of virus-host cell events to susceptibility to antibody-complement cell lysis. *Infect. Immun.* 12: 958-963.
- BACCHETTI, S., M.J. EVELEGH et B. MUIRHEAD. 1986. Identification and separation of the two subunits of the herpes simplex virus ribonucleotide reductase. *J. Virol.* 57: 1177-1181.
- BACCHETTI, S., M.J. EVELEGH, B. MUIRHEAD, C.S. SARTORI et D. HUSZAR. 1984. Immunological characterization of herpes simplex virus type 1 and 2 polypeptide(s) involved in viral ribonucleotide reductase activity. *J. Virol.* 49: 591-593.
- BAER, R., A.T. BANKIER, M.D. BIGGIN, P.L. DEININGER, P.J. FARRELL, T.J. GIBSON, G. HATFULL, G.S. HUDSON, S.C. SATCHWELL, C. SEGUIN, P.S. TUFFNELL et B.G. BARRELL. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310: 207-211.
- BARTHA, A. 1974. Immunization of cattle with an attenuated IBR vaccine. *Dev. Biol. Stand.* 26: 5-7.
- BELLO, L.J., J.C. WHITBECK et W.C. LAWRENCE. 1992. Sequence and transcript analysis of the bovine herpesvirus 1 thymidine kinase locus. *Virology* 189: 407-414.

- BIRNBOIM, H.C. et J. DOLY. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- CARPENTER, D.E. et V. MISRA. 1991. The most abundant protein in bovine herpes 1 virions is a homologue of herpes simplex virus type 1 UL47. *J. Gen. Virol.* 72: 3077-3084.
- CARPENTER, D.E. et V. MISRA. 1992. Sequences of the bovine herpesvirus 1 homologue of herpes simplex virus type 1 α -trans-inducing factor (UL48). *Gene* 119: 259-263.
- COHEN, G.H. 1972. Ribonucleotide reductase activity of synchronized KB cells infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* 2: 408-418.
- COHEN, G.H., M.N. FACTOR et M. PONCE DE LEON. 1974. Inhibition of herpes simplex virus type 2 replication by thymidine. *J. Virol.* 14: 20-25.
- COHEN, E.A., P. GAUDREAU, P. BRAZEAU et Y. LANGELIER. 1986. Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by a nonapeptide derived from the carboxy terminus of subunit 2. *Nature* 321: 441-443.
- COHEN, G.H., B.E. HENRY, C.C. RANDALL et D.J. O'CALLAGHAN. 1977. Ribonucleotide reductase activity in hydroxyurea-resistant herpes virus replication. *Proc. Soc. Exp. Med.* 155: 395-399.
- COHEN, E.A., H. PARADIS, P. GAUDREAU, P. BRAZEAU et Y. LANGELIER. 1987. Identification of viral polypeptides involved in pseudorabies virus ribonucleotide reductase activity. *J. Virol.* 61: 2046-2049.
- COX, G.J.M., T.J. ZAMB et L.A. BABIUK. 1993. Bovine herpesvirus 1: Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* 67: 5664-5667.
- CURTIS, R.A. et A. ANGULO. 1974. A field trial to evaluate an intranasal infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. *Can. Vet. J.* 15: 327-330.
- DARCEL, C. LE Q. et W.J. DORWARD. 1975. Recovery of infectious bovine rhinotracheitis virus following corticosteroid treatment of vaccinated animals. *Can. Vet. J.* 16: 87-88.
- DAVISON, A.J. et J.E. SCOTT. 1986. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J. Gen. Virol.* 67: 1759-1816.
- DENIS, M., M. SLAOUI, G. KEIL, L.A. BABIUK, E. ERNST, P.-P. PASTORET et E. THIRY. 1993. Identification of different target glycoproteins for bovine herpesvirus type 1-specific cytotoxic lymphocytes T depending on the method of in vitro stimulation. *Immunology* 78: 7-13.
- DE WIND, N., A. BERNIS, A. GIELKENS et T. KIMMAN. 1993. Ribonucleotide reductase-deficient mutants of pseudorabies virus are avirulent for pigs and induce partial protective immunity. *J. Gen. Virol.* 74: 351-359.

- DUQUE, H., R.L. MARSHALL, B. ISRAEL et G.J. LETCHWORTH. 1989. Effects of formalin inactivation on bovine herpesvirus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine* **7**: 13-20.
- DUTIA, B.M. 1983. Ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus has a virus-specific constituent. *J. Gen. Virol.* **64**: 513-521.
- DUTIA, B.M., M.C. FRAME, J.H. SUBAK-SHARPE, W.N. CLARK et H.S. MARSDEN. 1986. Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by synthetic peptides. *Nature* **321**: 439-441.
- ENGELS, M., C. GIULIANI, P. WILD, T.M. BECK, E. LOEPFE et R. WYLER. 1986. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res.* **6**: 57-73.
- FEHLER, F., J.M. HERRMANN, A. SAALMULLER, T.C. METTENLEITER et G.M. KEIL. 1992. Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1-expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant. *J. Virol.* **66**: 831-839.
- FITZPATRICK, D.R., L.A. BABIUK et T.J. ZAMB. 1989. Nucleotide sequence of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gIII, a structural model for gIII as a new member of the immunoglobulin superfamily, and implications for the homologous glycoproteins of other herpesviruses. *Virology* **173**: 46-57.
- FITZPATRICK, D.R., T.J. ZAMB et L.A. BABIUK. 1990. Expression of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gI in transfected bovine cells induces spontaneous cell fusion. *J. Gen. Virol.* **71**: 1215-1219.
- FRAEFEL, C., M. ACKERMANN et M. SCHWYZER. 1994. Identification of the bovine herpesvirus 1 CIRC protein, a myristylated and virion-associated polypeptide which is not essential for virus replication in cell culture. *J. Virol.* **68**: 8082-8088.
- FRAEFEL, C., U.V. WIRTH, B. VOGT et M. SCHWYZER. 1993. Immediate-early transcription over covalently joined genome ends of bovine herpesvirus 1: the CIRC gene. *J. Virol.* **67**: 1328-1333.
- FRAME, M.C., H.S. MARSDEN et B.M. DUTIA. 1985. The ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus type 1 involves minimally a complex of two polypeptides (136K and 38K). *J. Gen. Virol.* **85**: 1581-1587.
- GAUDREAU, P., J. MICHAUD, E.A. COHEN, Y. LANGELIER et P. BRAZEAU. 1987. Structure-activity studies on synthetic peptides inhibiting herpes simplex virus ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **262**: 12413-12416.
- GIBSON, T., P. STOCKWELL, M. GINSBURG et B. BARRELL. 1984. Homology between two EBV early genes and HSV ribonucleotide reductase and 38K genes. *Nucleic Acids Res.* **12**: 5087-5099.

- GOLDSTEIN, D.J. et S.K. WELLER. 1988. Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 *lacZ* insertion mutant. *J. Virol.* 62: 196-205.
- GRAHAM B.J., H. LUDWIG, D.L. BRONSON, M. BENYESH-MELNICK et N. BISWAL. 1972. Physicochemical properties of the DNA of herpes viruses. *Biochem. Biophys. Acta* 259: 13-23.
- HARLOW, E. et D. LANE. 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New-York. pp 649.
- HAYES, M.K. et D.L. ROCK. 1990. Identification of a novel bovine herpesvirus type 1 immediate-early infected cell protein. *Arch. Virol.* 112: 291-300.
- HENRY, B.E., R. GLASER, J. HEWETSON et D.J. O'CALLAGHAN. 1978. Expression of altered ribonucleotide reductase activity associated with the replication of Epstein-Barr virus. *Virology* 89: 262-271.
- HOLMGREN, A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264: 13963-13966.
- HUSZAR, D. et S. BACCHETTI. 1981. Partial purification and characterization of the ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus infection of mammalian cells. *J. Virol.* 37: 580-588.
- HUTCHINGS, D.L., S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et L.A. BABIUK. 1990. Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. *J. Virol.* 64: 5114-5122.
- IDOWU, A.D., E.B. FRASER-SMITH, K.L. POFFENBERGER et R.C. HERMAN. 1992. Deletion of the herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase gene alters virulence and latency *in vivo*. *Antiviral Res.* 17: 145-156.
- INGEMARSON, R. et H. LANKINEN. 1987. The herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase is a tight complex of the type $\alpha 2\beta 2$ composed of 40K and 140K proteins of which the latter shows multiple forms due to proteolysis. *Virology* 156: 417-422.
- JENSEN, R., R.E. PIERSON et P.M. BRADDY. 1976. Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 169: 500-506.
- KAHRS, R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171: 1055-1064.
- KALIMAN, A.V., Z. BOLDOGKOI, et I. FODOR. 1994. Large and small subunits of the Aujeszky's disease virus ribonucleotide reductase: Nucleotide sequence and putative structure. *Biochem. Biophys. Acta-Genes Structure and Expression* 1219: 151-156.

- KIT, S. et H. QAVI. 1983. Thymidine kinase (TK) induction after infection of TK⁻ deficient rabbit cell mutants with bovine herpesvirus type 1 (BHV-1). Isolation of TK⁻ BHV-1 mutants. *Virology* 130: 381-389.
- KIT, S., M. KIT, et S. MCCONNELL. 1986. Intramuscular and intravaginal vaccination of pregnant cows with thymidine kinase-negative, temperature resistant infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpes virus 1). *Vaccine* 4: 55-61.
- KOPP, A., E. BLEWETT, V. MISRA et T.C. METTENLEITER. 1994. Proteolytic cleavage of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein gB is not necessary for its function in BHV-1 or pseudorabies virus. *J. Virol.* 68: 1667-1674.
- KOZAK, M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870.
- LABOISSIÈRE, S., M. TRUDEL et C. SIMARD. 1992. Characterization and transcript mapping of a bovine herpesvirus type 1 gene encoding a polypeptide homologous to the herpes simplex virus type 1 major tegument proteins VP13/14. *J. Gen. Virol.* 73: 2941-2947.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LANKINEN, H., A. GRASLUND et L. THELANDER. 1982. Induction of a new ribonucleotide reductase after infection of mouse L cells with pseudorabies virus. *J. Virol.* 41: 893-900.
- LEUNG-TACK, P., J.-C. AUDONNET et M. RIVIERE. 1994. The complete DNA sequence and the genetic organization of the short unique region (Us) of the bovine herpesvirus type 1 (ST strain). *Virology* 199: 409-421.
- LEVINGS, R.L., M.L. KAEBERLE et D.E. REED. 1984. The effect of some common inactivation procedures on the antigens of bovine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* 9: 313-328.
- LIANG, X.P., L.A. BABIUK et T.J. ZAMB. 1992. An *in vivo* study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing β -galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology* 189: 629-639.
- LIANG, X.P., L.A. BABIUK, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, D.R. FITZPATRICK et T.J. ZAMB. 1991. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoprotein gI, gIII and gIV. *J. Virol.* 65: 1124-1132.
- LIANG, X.P., M. TANG, B. MANNS, L.A. BABIUK et T.J. ZAMB. 1993. Identification and deletion mutagenesis of the bovine herpesvirus 1 dUTPase gene and a gene homologous to herpes simplex virus UL49.5. *Virology* 195: 42-50.

- LUPTON, H.W. et D.E. REED. 1980. Evaluation of experimental subunit vaccines for infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Res.* 41: 383-389.
- MAYFIELD, J.E., P.J. GOOD, H.J. VANOORT, A.R. CAMPBELL et D.E. REED. 1983. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J. Virol.* 47: 259-264.
- MANDEL, M. et A. HIGA. 1970. Calcium-dependent DNA infection. *J. Mol. Biol* 53: 159-162.
- MCGEOCH, D.J., M.A. DALRYMPLE, A.J. DAVISON, A. DOLAN, M.C. FRAME, D. MCNAB, L.J. PERRY, J.E. SCOTT et P. TAYLOR. 1988. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of the herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 69: 1531-1574.
- MCKERCHER, D.G. et G.L. CRENSHAW. 1971. Comparative efficacy of intranasally and parentally administered infectious bovine tracheitis vaccine. *J. Am. Med. Assoc.* 159: 1362-1369.
- MCKERCHER, D.G., O.C. STRAUB, J.K. SAITO et E.M. WADA. 1959. Comparative studies of the etiological agent of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. *Can. J. Comp. Med.* 23: 320-328.
- MEYER, A.L., E.A. PETROVSKIS, W.P.H. DUFFUS, D.R. THOMSEN et L.E. POST. 1991. Cloning and sequencing of an infectious bovine rhinotracheitis virus (BHV-1) gene homologous to glycoprotein H of herpes simplex virus. *Biochem. Biophys. Acta* 1090: 267-269.
- MISRA, V., L.A. BABIUK et C. LE Q. DARCEL. 1983. Analysis of bovine herpesvirus type-1 isolates by restriction endonuclease finger-printing. *Arch. Virol.* 73: 193-198.
- MISRA, V., R.M. BLUMENTHAL et L.A. BABIUK. 1981. Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). *J. Virol.* 40: 367-378.
- MISRA, V., A.C. BRATANICH, D. CARPENTER et P. O'HARE. 1994. Protein and DNA elements involved in transactivation of the promoter of the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) IE-1 transcription unit by the BHV α gene trans-inducing factor. *J. Virol.* 68: 4898-4909.
- MISRA, V., R. NELSON et M. SMITH. 1988. Sequence of a bovine herpesvirus type-1 glycoprotein gene that is homologous to the herpes simplex gene for glycoprotein gB, *Virology* 166: 542-549.
- MITCHELL, D. 1974. An outbreak of abortion in a dairy herd following inoculation with an intramuscular infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *Can. Vet. J.* 15: 148-150.

- MOHANTY, S.B., M.G. LILLI, N.P. CORSELIUS et J.D. BECK. 1972. Natural infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 160: 879-880.
- NELSON, D.R., C.J. MARE et R.D. GLOCK. 1972. Infectious rhinotracheitis (*Herpesvirus bovis*) in swine. *Am. J. Vet. Res.* 33: 1209-1215.
- NELSON, R., A-M. ADACHI, H. CHISHOLM et V. MISRA. 1989. Temperature-sensitive mutants of bovine herpesvirus type 1: mutants which make unaltered levels of early glycoproteins but fail to synthesize a late glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 70: 125-132.
- NETTLETON, P.J., J.M. SHARP et A. HERRING. 1984. Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination, challenge and immunosuppression. Dans: "Latent Herpesvirus infection in veterinary medicine". Whittman G., Gaskill R.M. et Rhiza H.J. (Éd.), Martinus Nijhoff, Boston, pp. 191-209.
- NORDLUND, P., B.-M. SJOBERG et H. EKLUND. 1990. Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature* 345: 593-598.
- OKASAKI, K., T. MATSUZAKI, Y. SUGAHARA, J. OKADA, M. HASEBE, Y. IWAMURA, M. OHNISHI, T. KANNO, M. SHIMIZU, E. HONDA et Y. KONO. 1991. BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparin like moiety on the cell surface. *Virology* 181: 666-670.
- OWEN, L.J. et H.J. FIELD. 1988. Genomic localization and sequence analysis of the putative bovine herpesvirus-1 DNA polymerase gene. *Arch. Virol.* 98: 27-38.
- PALMER, L.D., T.P. LEARY, D.M. WILSON et G.A. SPLITTER. 1990. Bovine natural killer-like cell responses against cell lines expressing recombinant bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *J. Immunol.* 145: 1009-1014.
- PARADIS, H., P. GAUDREAU, P. BRAZEAU et Y. LANGELIER. 1988. Mechanism of inhibition of herpes simplex virus (HSV) ribonucleotide reductase by a nonapeptide corresponding to the carboxyl terminus of its subunit 2. *J. Biol. Chem.* 263: 16045-16050.
- PONCE DE LEON, M., R.J. EISENBERG et G.H. COHEN. 1977. Ribonucleotide reductase from herpes simplex virus (type 1 and 2) infected and uninfected KB cells: properties of the partially purified enzymes. *J. Gen. Virol.* 36: 163-173.
- PRESTON, V.G., J.W. PALFREYMAN et B.M. DUTIA. 1984. Identification of a herpes simplex virus type 1 polypeptide which is a component of the virus-induced ribonucleotide reductase. *J. Gen. Virol.* 65: 1457-1466.

- REICHARD, P. 1993. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* 260: 1773-1777.
- RIXON, F.J. 1993. Structure and assembly of herpesviruses. *Sem. Virol.* 4: 135-144.
- ROIZMANN, B. 1993. The human herpesviruses. Dans: "The family *Herpesviridae*". Roizmann, B., Whitley R.J. et Lopez C. (Éd.), Raven press Ltd, New York, pp. 1-10.
- ROIZMANN, B., R.C. DESROSIERS, B. FLECKENSTEIN, C. LOPEZ, A.C. MINSON et M.J. STUDDERT. 1992. The family *Herpesviridae*: an update. *Arch. Virol.* 123: 425-449.
- ROSNER, S.F. 1968. Infectious bovine rhinotracheitis clinical review, immunity, and control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 153: 1631-1638.
- ROUSE, B.T. et L.A. BABIUK. 1978. Mechanism of recovery from herpesvirus infections-a review. *Can. J. Comp. Med.* 42: 412-427.
- ROUSE, B.T., A.S. GREWAL et L.A. BABIUK. 1977a. Complement enhances antiviral antibody dependent cell toxicity. *Nature* 266: 456-458.
- ROUSE, B.T., A.S. GREWAL, L.A. BABIUK et Y. FUJIMIYA. 1977b. Enhancement of antibody dependent cell toxicity of herpesvirus infected cells by complement. *Infect. Immun.* 18: 660-665.
- ROUSE, B.T., R.C. WARDLEY et L.A. BABIUK. 1976a. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity in cows: comparison of effector cell activity against heterologous erythrocytes and herpesvirus-infected bovine target cells. *Infect. Immun.* 13: 1433-1441.
- ROUSE, B.T., R.C. WARDLEY et L.A. BABIUK. 1976b. The role of antibody dependent cytotoxicity in recovery from herpesvirus infections. *Cell. Immunol.* 22: 182-186.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New-York.
- SANDRI-GOLDIN, R.M. 1991. Analysis of the regulatory activities of the HSV-1 α protein ICP27. Dans: "Herpesvirus transcription and its regulation". Wagner E. K (Éd), CRC press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, pp. 77-103.
- SAXEGAARD, F. 1970. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in cattle with particular reference to genital infections. *Vet. Bull.* 40: 605-611.
- SCHIPPER, I.A. et C.L. KELLING. 1975. Evaluation of inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Can. J. Comp. Med.* 39: 402-405.

- SCHWARTZ, A.J.F., C.J. YORK, L.M. ZIRBEL et L.A. ESTEDA. 1957. Modification of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus in tissue culture and development of vaccine. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 96: 453-458.
- SCHWARTZ, A.J.F., L.M. ZIRBEL, L.A. ESTEDA et C.J. YORK. 1958. Propagation and modification of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus in porcine kidney tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 97: 680-683.
- SCHWYZER, M., C. VLECK, O. MENEKSE, C. FRAEFEL et V. PACES. 1993. Promoter, spliced leader, and coding sequence for BICP4, the largest of the immediate-early proteins of bovine herpesvirus 1. *Virology* 197: 349-357.
- SCHWYZER, M., U.V. WIRTH, B. VOGT et C. FRAEFEL. 1994. BICP22 of bovine herpesvirus 1 is encoded by spliced 1.7kb RNA which exhibits immediate early and late transcription kinetics. *J. Virol.* 75: 1703-1711.
- SEAL, B.S., J.M. IRVING et C.A. WHETSTONE. 1991. Transcriptional analysis of the bovine herpesvirus 1 Cooper isolate. *Arch. Virol.* 121: 55-73.
- SEAL, B.S., C.A. WHETSTONE, T.J. ZAMB, L.J. BELLO et W.C. LAWRENCE. 1992. Relationship of bovine herpesvirus 1 immediate-early, early, and late gene expression to host cellular gene transcription. *Virology* 188: 152-153.
- SIMARD, C. et I. LANGLOIS. 1995. Chasing dideoxy-mediated sequencing reactions with terminal deoxynucleotidyl transferase may result in nucleotide inversions in sequencing gels. *Nucleic Acids Research* 23: 2341.
- SIMARD, C., N. BASTIEN et M. TRUDEL. 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., I. LANGLOIS, D. STYGER, B. VOGT, C. VLCEK, A. CHALIFOUR, M. TRUDEL et M. SCHWYZER. 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., F. NADON, C. SÉGUIN, S. LABOISSIÈRE et M. TRUDEL. 1990. Gene mapping of infectious bovine rhinotracheitis viral DNA genome. *Arch. Virol.* 110: 63-75.
- STUDIER, W., A.H. ROSENBERG, J.J. DUNN et J.W. DUBENDORFF. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology* 185: 60-89.
- SUTTON, M.L. 1980. Rapid onset of immunity in cattle after intramuscular injection of modified-live-virus IBR vaccine. *Vet. Med.* 75: 1447-1456.

- SWAIN, M.A. et D.A. GALLOWAY. 1986. Herpes simplex virus specifies two subunits of ribonucleotide reductase encoded by 3'-coterminally transcripts. *J. Virol.* 57: 802-808.
- TELFORD, E., H. LANKINEN et H. MARSDEN. 1990. Inhibition of equine herpesvirus type-1 subtype-1 induced ribonucleotide reductase by nonapeptide YAGAVVNDL. *J. Gen. Virol.* 71: 1373-1378.
- TELFORD, E., M.S. WATSON, K. MCBRIDE et A.J. DAVISON. 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189: 304-316.
- THELANDER, L. et P. REICHARD. 1979. Reduction of ribonucleotides. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 133-158.
- TIKOO, S.K., M. CAMPOS et L.A. BABIUK. 1995. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. *Advanced Virus Research* 45: 191-223.
- TIKOO, S.K., D.R. FITZPATRICK, L.A. BABIUK et T.J. ZAMB. 1990. Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. *J. Virol.* 64: 5132-5142.
- TODD, J.D. 1974. Development of intranasal vaccination for immunization of cattle against infectious bovine rhinotracheitis. *Can. Vet. J.* 15: 257-259.
- TODD, J.D., F.J. VOLCEN et I.M. PATON. 1972. Interferon in nasal secretions and sera of calves after intranasal administration of avirulent infectious bovine rhinotracheitis virus: association of interferon in nasal secretion with early resistance to challenge with virulent virus. *Infect. Immun.* 5: 699-706.
- TODD, J.D., F.J. VOLCEN et I.M. PATON. 1971. Intranasal vaccination against infectious bovine rhinotracheitis: Studies on early on set of protection and use of the pregnant cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 159: 1370-1374.
- TURK, S.R., N.A. KIK, G.M. BIRCH, D.J. CHIEGO et L. SHIPMAN. 1989. Herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase null mutants induce lesions in guinea pigs. *Virology* 173: 733-735.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et L.A. BABIUK. 1986. Synthesis and processing of bovine herpesvirus-1 glycoproteins. *J. Virol.* 59: 401-410.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., S.K. TIKOO, X.P. LIANG et L.A. BABIUK. 1993. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunol. Cell Biol.* 71: 405-420.
- WATRACH, A.M. et H. BAHNEMANN. 1966. The structure of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Arch. Ges. Virusforsch.* 18: 1-7.

- WEINHEIMER, S.P. et S.L. MCKNIGHT. 1987. Transcriptional and post-transcriptional controls establish the cascade of Herpes Simplex Virus protein synthesis. *Mol. Biol.* 195: 819-833.
- WHETSONE, C., J. MILLER, D. BORTNER et M. VAN DER MAATEN. 1989. Changes in the restriction endonuclease patterns of four modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus (IBR) vaccines after one passage in host animal. *Vaccine* 7: 527-532.
- WHITBECK, L.J. BELLO et W.C. LAWRENCE. 1988. Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and the herpes simplex virus type 1 gB gene. *J. Virol.* 62: 3319-3327.
- WHITE, M.B. et W.A. SNOWDON. 1973. The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with IBR virus. *Aust. Vet. J.* 49: 501-506.
- WIRTH, U.V., C. FRAEFEL, B. VOGT, C. VLECK, V. PACES et M. SCHWYZER. 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., B. VOGT et M. SCHWYZER. 1991. The three major immediate-early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J. Virol.* 65: 195-205.
- WYLER, R., M. ENGELS and M. SCHWYZER. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). Dans: "Herpesvirus diseases of cattle, horse, and pigs". Wittmann G. (Éd.), Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrech/London, pp. 1-72.
- YAMADA, Y., H. KIMURA, T. MORISHIMA, T. DAIKOKU, K. MAENO et Y. NISHIYAMA. 1991. The pathogenicity of ribonucleotide reductase-null mutants of herpes simplex virus type 1 in mice. *J. Infect. Dis.* 164: 1091-1097.
- 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.
- ZUSCHEK, F. et T.L. CHOW. 1961. Immunogenicity of 2 infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 139: 236-237.
- ZYGRAICH, N., M. LOBMANN, E. VASCOBOINIC, E. BERGE et C. HUYGELEN. 1974. In vivo properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.* 16: 328-335.

ANNEXES

ANNEXE 1: SIMARD, C. et I. LANGLOIS. 1995. Chasing dideoxy-mediated sequencing reactions with terminal deoxynucleotidyl transferase may result in nucleotide inversions in sequencing gels. *Nucleic Acids Research* 23: 2341.

Chasing dideoxy-mediated sequencing reactions with terminal deoxynucleotidyl transferase may result in nucleotide inversions in sequencing gels

Claire Simard* and Isabelle Langlois

Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval des Rapides, Ville de Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Received March 28, 1995; Revised and Accepted May 2, 1995

Secondary structures within DNA templates may severely impede the progress of the DNA polymerase in dideoxy-mediated chain termination sequencing. Moreover, the enzyme may be unable to extend the chain in GC-rich regions and as a result, artifactual bands which appear at the same position in all four G, A, T and C lanes are observed in sequencing gels. It was recently reported that band ambiguities resulting from non-specific termination of polymerization can be efficiently eliminated by post-treating sequencing reactions with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) in the presence of excess dNTPs (1,2). This treatment allows random addition of long stretches of nucleotides to fragments containing free 3'-OH ends, thus increasing their size to such a point that they remain at the top of the gel. Our group is actively involved in the molecular characterization of the GC-rich (72%) DNA genome of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), a major pathogen of cattle. Although most of our sequencing work was performed by the chemical degradation method of Maxam and Gilbert, the dideoxy-chain termination method of Sanger was occasionally used. On those occasions, sequencing reactions were carried out with and without TdT, using the conditions previously described (2), and analyzed in parallel. Even though the TdT post-treatment significantly reduced the level of band artifacts, major discrepancies between TdT-treated and untreated samples were occasionally observed. The example given in Figure 1 shows that the DNA sequence generated following TdT treatment (lanes +) presented nucleotide inversions as compared to that obtained in untreated samples (lanes -), the latter being the right one as determined by the chemical method (not shown). Most intriguingly, the quality of the anomalous migration pattern observed was excellent, giving no indication of the possible presence of sequencing artifacts. In addition, the DNA fragments, which represent the base inversions observed, were previously terminated specifically with ddNTPs, as can be seen in the control lanes. This suggests that the size of the fragments giving rise to inversions was altered during the reaction with TdT in such a manner that the smaller one became the larger one and vice versa. The anomalous pattern shown in Figure 1 occurred in one out of four independent assays; in the other three experiments the bands were not resolved, appearing as artifacts. Furthermore, even though the TdT post-treatment procedure was only used to sequence ~500 bp of the BHV-1 genome, nucleotide inversions were observed at three

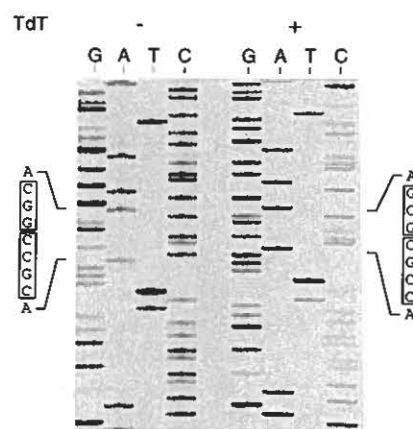


Figure 1. Gel analysis of dideoxy-mediated sequencing reactions carried out with (+) or without (-) terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) post-treatment. Recombinant plasmid DNA (5500 bp) was purified with the Qiagen-tip 20 plasmid kit using the procedure recommended by the supplier (Qiagen Inc., Chatsworth, USA). DNA (1.6 µg) was denatured for 30 min at 37°C in 75 µl 135 mM NaOH, 0.135 mM EDTA, precipitated by the addition of 7.5 µl 3 M NaOAc pH 5 and 200 µl of ethanol. DNA was annealed with the reverse primer in the conditions previously described (2). Sequencing reactions were performed in duplicates with the T7 sequencing kit in conjunction with Deaza G/A T7 sequencing mixes purchased from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). A set of reactions was then treated with TdT (Gibco) as described (2). Reactions were finally analyzed on 8% sequencing gels.

different positions. At present, we cannot provide any explanations for this phenomenon. However, our observations strongly emphasize the requirement, when using the TdT post-treatment, to run control samples in parallel.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr Johnny Basso for proofreading the manuscript. This work was funded by NSERC OGP0006211.

REFERENCES

- 1 Kho, C.-J. and Zarbl, H. (1992) *BioTechniques* 12, 228-230.
- 2 Li, M. and Schweizer, H.P. (1993) *Focus* 15, 19-20.

* To whom correspondence should be addressed

ANNEXE 2: SIMARD, C., I. LANGLOIS, D. STYGER, B. VOGT, C. VLCEK, A. CHALIFOUR, M. TRUDEL et M. SCHWYZER. 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.