UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

ANICK CHALIFOUR

LA PROTÉINE BICP27 DU VIRUS DE L'HERPÈS BOVIN DE TYPE 1 : CINÉTIQUE D'EXPRESSION AU COURS DU CYCLE INFECTIEUX ET DÉVELOPPEMENT D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE BICP27^{+}

OCTOBRE 1996

J'aimerais dédier ce mémoire à ma famille (parents, soeur, frères et Jean-Patrick) qui m'a toujours appuyée et encouragée et où j'ai appris des valeurs qui me guideront toute ma vie.

Je m'en voudrais de ne pas mentionner le nom de Valérie Parsons, qui a été et demeure encore aujourd'hui, pour moi un rayon de soleil. Ceux qui l'ont connue ont d'ailleurs tous ce mot aux lèvres lorsqu'ils parlent d'elle; soleil ... Valérie, on ne peut t'oublier et tu évoqueras toujours pour moi l'inspiration et la sagesse.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ANNEXES vi
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ix
SOMMAIRE xii

INTRODUCTION 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4
1. L'AGENT ÉTIOLOGIQUE: LE VIRUS DE L'HERPÈS BOVIN DE TYPE 1 5
1.1 Historique 5
1.2 Taxonomie 6
1.3 Épidémiologie 10
1.3.1 Distribution géographique et prévalence 10
1.3.2 Transmission 10
1.3.3 Importance économique 12
1.4 Morphologie 12
1.5 Organisation génomique 15
1.6 Protéines et enzymes 18
1.6.1 Les glycoprotéines 19
1.6.2 Les enzymes 20
1.6.3 Les autres protéines 20
1.6.4 La protéine BICP27 21
1.7 Réplication virale 24
1.8 Cytopathogénicité 28
2. LA PATHOLOGIE : LA RHINOTRACHÉITE BOVINE INFECTIEUSE/L'EXANTHÈME COÏTAL 28
2.1 Pathogenèse 28
2.2 Infections du système respiratoire 30
2.3 Infections du système reproducteur 30
2.4 Infection latente 30
2.5 Infections moins fréquentes 32
2.6 Synergie virus-bactérie 33
3. PRÉVENTION ET CONTRÔLE 34
3.1 Diagnostic clinique 34
3.2 Diagnostic en laboratoire 34
3.3 La vaccination 36
3.3.1 Vaccins conventionnels 37
3.3.2 Nouvelles générations de vaccins 39
3.4 Drogues antivirales et traitements 41
3.5 Contrôle et prévention 42

MATÉRIELS ET MÉTHODES 44
1. SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES 45
1.1 Souches d'Escherichia coli 45
1.2 Milieux de croissance 45
1.3 Vecteurs de clonage et d'expression 46
1.4 Transformation bactérienne 47
2. CELLULES EUCARYOTIQUES 48
2.1 Origine des cellules 48
2.2 Cultures cellulaires et milieux de croissance 48
2.3 Vecteurs de clonage et d'expression 49
2.4 Transfection cellulaire 49
3. VIRUS 50
3.1 Origine du virus 50
3.2 Production virale 51
3.3 Mesure du titre viral 51
3.4 Cinétiques d'infection 52
4. PRÉPARATION ET MANIPULATION DE L'ADN 53
4.1 Purification de l'ADN plasmidique 53
4.2 Purification de l'ADN viral 55
4.3 Électrophorèse sur gel d'agarose 56
4.4 Hybridation de type Southern 57
4.4.1 Transfert 57
4.4.2 Préparation de la sonde moléculaire radio-marquée 57
4.4.3 Hybridation 58
5. CONSTRUCTION DES VECTEURS RECOMBINANTS 59
5.1 Clonage du fragment G Hpa I du génome viral 59
5.2 Clonage du gène bicp27 dans pET-21b et pcDNA3 64
6. MANIPULATION DES PROTÉINES 66
6.1 Purification des protéines 66
6.2 Électrophorèse en gel de polyacrylamide 68
6.3 Transfert de type Western et immunoempreinte 69
7. DÉVELOPPEMENT D'UN SÉRUM POLYCLONAL ANTI-BICP27 70
7.1 Titrage du sérum en ELISA 71
8. MANIPULATION DES ARNS ET TRANSFERT DE TYPE NORTHERN 72

RÉSULTATS 75
1. CLONAGE DU GÈNE CODANT LA BICP27 ET EXPRESSION PROTÉIQUE 76
2. PRODUCTION D'UN SÉRUM POLYCLONAL ANTI-BICP27 80
2.1 Titrage et caractérisation du sérum anti-BICP27 80
3. CINÉTIQUES D'EXPRESSION DE LA BICP27 81
3.1 Analyse de la cinétique traductionnelle 81
3.2 Analyse de la cinétique transcriptionnelle 82

4. CONSTRUCTION ET CARACTÉRISATION D'UNE LIGNÉE MDBK/BICP27$^+$ 85
4.1 Immunodétection de la protéine BICP27 chez les lignées cellulaires MDBK/BICP27$^+$ #A4, #6 et #14 88
4.2 Hybridation de type Northern des trois lignées cellulaires MDBK/BICP27$^+$ #4,#6 et #14 afin de détecter le transcrit bicp27 91

DISCUSSION 93
1. IDENTIFICATION DE LA PROTÉINE BICP27 ET DE SON TRANSCRIT 94
2. COMPARAISON DES PROFILS D'EXPRESSION DES GÈNES ICP27 ET BICP27 96
3. DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION DE LA LIGNÉE MDBK/BICP27$^+$ 101

CONCLUSION 104

REMERCIEMENTS 107
BIBLIOGRAPHIE 109
ANNEXE I 128
ANNEXE II 133
ANNEXE III 141

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : Transcriptional and translational expression kinetics of the early gene encoding the BICP27 protein of bovine herpesvirus type 1

ANNEXE II : 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

ANNEXE III : Liste des communications

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1:	Subdivision des virus herpès selon leurs propriétés biologiques	p.8
Figure 1:	La particule virale du BHV-1	p.14
Figure 2:	Génome du BHV-1	p.17
Figure 3:	Schématisation du cycle réplicatif du BHV-1	p.26

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Figure 4:	Stratégies de clonage du gène codant la BICP27	p.61

RÉSULTATS

Figure 5:	**A)** Immunodétection de la BICP27 dans les corps d'inclusion avec l'anticorps monoclonal anti-T7-Tag, comparativement au sérum polyclonal anti-BICP27 de souris	
	B) Cinétique d'expression de la BICP27 au cours du cycle infectieux du BHV-1	p.79
Figure 6:	Cinétique d'expression du transcrit de la BICP27 au cours du cycle infectieux du BHV-1	p.84

Figure 7: Expression transitoire de la BICP27 chez les cellules COS-7 p.87

Figure 8: **A)** Analyse de type Northern des lignées cellulaires résistantes à la néomycine afin de détecter le transcrit *bicp27*

B) Immunodétection de la protéine BICP27 chez la lignée cellulaire MDBK/BICP27^{+} #A4 p.90

DISCUSSION

Figure 9: Représentations graphiques des profils cinétiques de l'ICP27 et de la BICP27 p.98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNss	ADN de sperme de saumon
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ATCC	«American Type Culture Collection»
BHV-1	virus de l'herpès bovin de type 1
BICP	préfixe : «bovine infectious cell protein»
BICP27	«bovine infectious cell protein» 27
BSA	albumine sérique bovine
BTIF	«bovine transinducing factor»
$CaCl_2$	dichlorure de calcium
CMV	cytomégalovirus
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
DICT	dose infectieuse en culture de tissu
D-MEM	milieu essentiel minimal de Dulbecco
DMSO	sulfoxyde de diméthyle
D.O.	densité optique
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EHV-1	virus de l'herpès équin de type 1

ELISA	«enzyme-linked immuno sorbent assay»
G-418	néomycine
h	heure(s)
HSV-1	virus de l'herpès simplex de type 1
IBR	rhinotrachéite infectieuse bovine
ICP	préfixe : «infectious cell protein»
ICP27	«infectious cell protein» 27
IFN	interféron
IPTG	isopropylthio-ß-galactoside
IPV	exanthème coïtal
kDa	kiloDalton
KOAc	acétate de potassium
kpb	kilo paires de bases
LB	«Luria Broth»
MDBK	«Madin Darby bovine kidney cells»
MDBK/BICP27$^+$	cellules MDBK exprimant la BICP27
min	minute(s)
MOI	multiplicité d'infection
NaOAc	acétate de sodium
ORF	cadre de lecture ouvert

PBS	tampon salin phosphaté
p.i.	post-infection
PVDF	difluorure de polyvilidène
PRV	«pseudorabies virus»; virus de la pseudorage porcine
rpm	rotation par minute
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (conditions dénaturantes)
snRNPs	«small nuclear ribonucleoprotein particles»
SVF	sérum de veau fœtal
SV40	virus simien 40
TB	«Terrific Broth»
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
T7-Tag	peptide de 11 acides aminés reconnu par un anticorps monoclonal disponible commercialement
U	unité
uL	1×10^{-6} Litre
VZV	virus de la varicelle-zona

SOMMAIRE

Le virus de l'herpès bovin de type 1 (BHV-1) cause des affections majeures des systèmes respiratoires et génitaux des bovins. Malgré l'utilisation de différents types de vaccins conventionnels, l'infection causée par le BHV-1 est en nette progression. L'identification de gènes viraux essentiels à la réplication virale permettrait d'ouvrir la voie au développement de vaccins beaucoup plus efficaces et plus sécuritaires par la création de virus vivants (efficacité), mais complètement déficients dans leur réplication (inocuité). L'un des gènes potentiels pouvant mener au développement d'un tel vaccin est celui codant la protéine BICP27, car il a été démontré que le gène homologue *icp27* chez l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) est essentiel à la réplication virale. Dans le but d'obtenir des évidences préliminaires sur la similarité fonctionnelle des deux gènes viraux, nous avons entrepris d'étudier la cinétique d'expression transcriptionnelle et traductionnelle du gène *bicp27*. Pour réaliser ces travaux, le polypeptide viral complet a été exprimé chez *Escherichia coli* puis utilisé pour générer un sérum monospécifique. Le sérum immun obtenu a permis la détection d'une protéine virale spécifique de 49 kiloDalton dans les lysats de cellules MDBK infectées par le BHV-1, dont la masse corrélait bien avec celle attendue de 45,4 kiloDalton. L'accumulation du polypeptide dans les cellules infectées débutait 3 heures suite à l'infection, son abondance était maximale à 15 heures post-infection, puis décroissait graduellement jusqu'à 24 heures post-infection. Une analyse de type Northern des ARNs totaux isolés de cellules infectées pour différentes périodes a permis la détection d'un transcrit viral spécifique de 1,7 kb. Le profil d'expression du

transcrit était similaire à celui de la protéine. Les résultats obtenus indiquent que le gène *bicp27* appartient à la classe cinétique β et non pas α comme il avait été démontré pour l'*icp27* du HSV-1. Par ailleurs, alors que l'*icp27* s'exprime de façon brève dans le cycle réplicatif du HSV-1, son homologue présente une expression continue. Nos travaux suggèrent donc que la fonction du gène *bicp27* est différente de celle de l'*icp27*.

En parallèle à ces travaux, nous avons développé une lignée MDBK exprimant de façon constitutive la protéine BICP27 du BHV-1. Ce type de lignée pourrait éventuellement être utilisé pour maintenir la croissance d'un mutant de délétion BICP27$^-$ du BHV-1, mutant qui permettrait d'identifier le rôle de la BICP27 dans la réplication virale *in vitro* et *in vivo*.

INTRODUCTION

Le virus de l'herpès bovin de type 1 (BHV-1) est membre de la famille des *Alphaherpesvirinae*. Ce virus affecte le cheptel bovin car il est associé à deux syndrômes cliniques majeurs soit la rhinotrachéite infectieuse bovine («infectious bovine rhinotracheitis»; IBR) et l'exanthème coïtal («infectious pustular vulvovaginitis»; IPV). Il est aussi la cause de certains cas d'avortements et d'encéphalites mortelles. Les vaccins disponibles étant incapables d'enrayer l'infection, la maladie est donc en croissante effervescence. Par conséquent, sa distribution internationale en fait un pathogène d'une importance économique majeure.

Récemment, une collaboration internationale a été entreprise afin de compléter la séquence du génome du BHV-1. Ces travaux ont mené à l'identification de plusieurs cadres de lecture ouverts (ORFs) dont certains correspondent à des gènes déjà identifiés de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1). Parmi ceux-ci, le gène *bicp27* («bovine infectious cell protein» 27*)* représentant l'homologue de l'*icp27* du HSV-1, un gène précoce-immédiat essentiel à la réplication virale, a été identifié. Dans le but d'obtenir des évidences préliminaires relatives à la similarité des fonctions des protéines BICP27 et ICP27, nous avons entrepris l'étude de la cinétique de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle du gène *bicp27*. Nous avons en effet postulé que si les deux gènes possédaient des profils d'expression similaires, cela suggérerait qu'ils possèdent aussi des fonctions semblables dans le cycle réplicatif de leur virus respectif.

Pour initier nos travaux, nous avons dû développer un sérum monospécifique dirigé contre la protéine BICP27. Pour ce faire, le polypeptide complet a été exprimé chez

Escherichia coli (*E. coli*) via un vecteur d'expression procaryotique (pET-21b), puis purifié et utilisé comme antigène pour immuniser des souris. Le sérum obtenu a été utilisé pour définir la cinétique d'expression traductionnelle de la protéine, par transfert de type Western de lysats de cellules infectées pour différentes périodes avec le BHV-1. La cinétique d'expression transcriptionnelle a, quant à elle, été réalisée par hybridation de type Northern d'ARNs totaux isolés de cellules infectées par le BHV-1, en utilisant une sonde spécifique au gène *bicp27*. De façon inattendue, les profils d'expression obtenus différaient significativement de ceux rapportés pour l'*icp27* du HSV-1, suggérant que les gènes pourraient avoir des fonctions différentes.

Parallèlement à ces travaux, nous avons généré une lignée cellulaire exprimant de façon constitutive la protéine BICP27 du BHV-1 (MDBK/BICP27^{+}), via la transfection de cellules hôtes avec un vecteur d'expression eucaryotique (pcDNA3/BICP27) recombinant. Malheureusement, les niveaux d'expression de la BICP27 étaient bien inférieurs à ceux observés suite à l'infection des cellules avec le BHV-1, suggérant ainsi que la lignée ne pourrait pas maintenir la croissance d'un mutant de délétion du gène *bicp27*.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. L'agent étiologique: le virus de l'herpès bovin de type 1

1.1 Historique

L'exanthème coïtal et ses symptômes (Zwick et Gminder, 1913) observés chez les bovins furent décrits pour la première fois en 1841, par un vétérinaire Suisse nommé Rychner. Ce fut seulement en 1928 (Reisinger et Reimann), grâce à un processus de filtration, qu'une équipe prouva que l'agent responsable de la maladie était de nature virale et donc transmissible; cependant, ce n'est que trente ans plus tard que ce dernier a pu être isolé (Greig *et al.*, 1958; Kendrick *et al.*, 1958).

La rhinotrachéite infectieuse bovine a été observée pour la première fois en 1950 au Colorado par l'équipe de McKercher (1954). Elle fut décrite quatre ans plus tard par Schroeder et Moys (1954) comme étant une nouvelle maladie du système respiratoire dans le cheptel bovin de l'ouest des États-Unis (épidémie de Californie en 1953). La maladie était alors connue sous les appellations de : «red nose», «dust pneumonia» ou encore «infectious necrotic rhinotracheitis». C'est en 1955 qu'un consensus fut établi et que le terme «infectious bovine rhinotracheitis» ou rhinotrachéite infectieuse bovine, apparu (McKercher et *al.*, 1959a). L'isolement de son agent étiologique, le virus de l'herpès bovin de type 1, a été effectué en 1956 (Madin *et al.*, 1956). Puis, à l'aide de techniques immunologiques, l'équipe de McKercher (1957) a démontré que les deux maladies observées au Colorado et en Californie constituaient en réalité une seule et unique infection. On croit que l'introduction du BHV-1 en Amérique s'est effectuée lors d'un

embargo Allemagne/Amérique du Nord, vers 1930 (Gillespie *et al.*, 1957). La rhinotrachéite infectieuse bovine fut, quelques années plus tard, associée à l'exanthème coïtal (Kendrick *et al.*, 1958; McKercher, 1963) et à l'avortement fréquent alors observé chez le bétail (Owen *et al.*, 1964; McKercher et Crenshaw, 1971; Wilson, 1974). L'identité du virus commun causant l'IBR et l'IPV a été pour la première fois établie par les équipes de Gillepsie (1959) et de McKercher (1959b) à l'aide de tests sérologiques. Le BHV-1 fut le premier agent étiologique identifié causant une maladie respiratoire chez les bovins. De plus, il s'avérerait le pathogène viral majeur impliqué dans le développement de la maladie du transport ou «shipping fever» (Yates, 1982).

1.2 Taxonomie

L'évolution virale et la diversification engendrée rendent obligatoire le système taxonomique actuel. Ce dernier est établi selon les propriétés antigéniques et biologiques du virion ainsi que d'après sa composition, sa taille et son arrangement génomique. Le BHV-1 se trouve sous la classification des *Herpesviridae* (Armstrong *et al.*, 1961). La classification des virus dans cette famille origine principalement de l'architecture générale du virion (Roizman *et al.*, 1992), conformément au «Herpesvirus Study Group of the International Committee on the Taxonomy of Virus». Cette famille compte jusqu'à ce jour près de cent virus, dont la variété et la dissémination sont frappantes puisque la majorité des espèces animales sont affectées par au moins un virus herpès (Roizman, 1993). Les virus herpès sont divisés en trois sous-familles soit *Alpha-*, *Beta-* et *Gammaherpesvirinae* selon leurs propriétés biologiques (voir le Tableau 1).

Tableau 1: Subdivision des virus herpès selon leurs propriétés biologiques.

Caractéristiques des différentes sous-familles des virus herpès et quelques exemples d'espèces leur appartenant.

Tableau I: Subdivision des virus herpès selon leurs propriétés biologiques

Sous-famille	exemples d'espèce
Alphaherpesvirinae	Herpès simplex de type 1
Restriction d'hôtes: *in vivo* variable, de très large à très restreinte; *in vitro* variable aussi.	Herpès simplex de type 2
Durée du cycle de réplication: courte.	Herpès bovin de type 1
Cytopathologie: rapide dissémination de l'infection en culture et destruction des cellules infectées.	Herpès bovin de type 2
Infection latente: fréquemment dans les ganglions.	Herpès porcin de type 1
Betaherpesvirinae	
Restriction d'hôtes: *in vivo* étroite; *in vitro* se répliquent généralement le mieux dans des fibroblastes.	Herpès humain de type 5
Durée du cycle de réplication: relativement longue.	Herpès murin de type 1
Cytopathologie: les cellules infectées augmentent de taille (cytomégalie) *in vivo* et *in vitro*.	Herpès porcin de type 2
Infection latente: possiblement dans les glandes sécrétoires, dans les cellules lymphoréticulaires, dans les reins et autres tissus.	
Gammaherpesvirinae	
Restriction d'hôtes: *in vivo* habituellement limitée à la famille ou l'ordre auquel l'hôte naturel appartient; *in vitro* dans les cellules lymphoblastoïdes et dans certains types de cellules épithéliales.	Herpès humain de type 4
Durée du cycle de réplication: variable.	
Cytopathologie: variable.	
Infection latente: fréquemment observée dans le tissu lymphoïde.	

Tiré de la thèse de doctorat de la Dre Sylvie La Boissière, 1995

Des études ultérieures sur les propriétés de croissance du BHV-1 ainsi que sur sa structure génomique, ont permis de le classer justement dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* (Roizman, 1982). Les virus de cette sous-famille démontrent un spectre d'hôtes variable, un cycle réplicatif d'une courte durée, une dissémination rapide de l'infection en culture cellulaire, une destruction efficace des cellules infectées ainsi qu'une capacité à établir une infection latente et ce, préférentiellement chez les ganglions sensoriels (Roizman *et al.*, 1981). De plus, le BHV-1 appartient au genre *Varicellovirus* (Brown, 1989) selon l'organisation de son génome qui est analogue à celle du virus de la varicelle-zona (VZV), du virus de la pseudorage porcine (PRV) et du virus de l'herpès équin de type 1 (EHV-1; Ben-Porat *et al.*, 1979; Roizman *et al.*, 1992). Cette classification en genre regroupe des virus plus homologues au niveau de leurs séquences en acides nucléiques et en protéines.

Les différentes souches du BHV-1 sont indifférenciées par analyses sérologiques conventionnelles (sérotypes identiques), mais présentent tout de même des variations génomiques significatives, lorsque comparées par leurs profils de restriction. Trois différents sous-types ont alors été identifiés selon les patrons d'analyses génomiques et les patrons de polypeptides viraux (Studdert, 1989; Bulach et Studdert, 1990). Le sous-type 1 représente la rhinotrachéite infectieuse bovine et les sous-types 2A et 2B l'exanthème coïtal (Metzler *et al.*, 1986; Engels *et al.*, 1986). Ces différents sous-types ne représentent pas de façon exclusive une corrélation entre l'origine clinique de l'isolat et le sous-type moléculaire.

1.3 Épidémiologie

1.3.1 Distribution géographique et prévalence

Le virus de l'herpès bovin de type 1 s'est disséminé à la grandeur de la planète (McKercher, 1973; Straub, 1978). Sa distribution géographique est sporadique, c'est-à-dire non-uniforme à l'intérieur d'un même pays et sa manifestation n'est pas saisonnière; il est par conséquent difficile d'obtenir des statistiques précises pour chacun des pays (Wyler *et al.*, 1989). Au Québec, on croit que 60 à 65% des bovins sont séropositifs dont 30% présentent des symptômes respiratoires.

La propagation du BHV-1 serait attribuable à deux faits majeurs : premièrement la transmission facile du virus d'un animal à l'autre soit par contact direct via les sécrétions nasales, oculaires ou génitales et deuxièmement, l'absence sur le marché d'un vaccin efficace.

1.3.2 Transmission

Les virus herpès sont considérés parmi les virus ancestraux. En effet, la propagation de ces virus s'étend des mammifères, aux oiseaux, poissons osseux, amphibiens et reptiles (Roizman, 1993).

Le mode de transmission privilégié du BHV-1 s'effectue par contact direct entre les animaux par le biais des sécrétions nasales, oculaires et génitales (sperme), où le virus est essentiellement relargué lors d'une infection, et cela vaut autant pour les infections

primaires que celles dues à la réactivation d'un état latent, même si dans le dernier cas, l'abondance du virus sécrété est moindre (Pastoret *et al.*, 1979). Notons que la facilité de transmission du BHV-1 entre les différents individus est sans contredit ce qui occasionne actuellement de sérieux problèmes au niveau de l'importation et de l'exportation des bovins. Aussi, la contamination possible des semences utilisées pour l'insémination artificielle nécessite un contrôle constant des animaux (Meyer *et al.*, 1988); la même chose s'applique au lait maternel (Probst *et al.*, 1985).

Malgré que le bovin demeure l'hôte privilégié du BHV-1, ce virus peut infecter d'autres espèces animales de façon naturelle ou expérimentale (Gibbs et Rweyemamu, 1977). Entre autres, les furets, les visons (Porter *et al.*, 1975) et les lapins (Lupton *et al.*, 1980a) peuvent servir de modèles expérimentaux. Le porc, le mouton (Trueblood *et al.*, 1978), la chèvre (Whetstone et Evermann, 1988) et les ruminants sauvages comme le caribou, le buffle, le cerf et le renne (Inglis *et al.*, 1983; Reid *et al.*, 1986) peuvent tous être infectés par le BHV-1 de façon naturelle. Le BHV-1 peut aussi être transmis par les tiques (*Ornithodorus coriaceus*) chez les chevreuils (*Odocoileus lemionus*) (Taylor *et al.*, 1982) qui se retrouvent souvent au voisinage des pâturages bovins. À noter que les animaux séropositifs en captivité (zoos) ne représentent aucun problème particulier dans l'épidémiologie du BHV-1. Ce qui n'est peut être pas le cas pour les moutons chez qui on note une incidence de 22 pour-cent pour le BHV-1 au Québec et dont l'implication dans l'épidémiologie du BHV-1 n'est pas encore connue (Elzhary *et al.*, 1984). De même, les ruminants sauvages avoisinant les pâturages bovins présentent une incidence élevée pour le BHV-1 (revue par Wyler *et al.*, 1989).

1.3.3 Importance économique

Les pertes annuelles associées à l'IBR sont évaluées entre 12 et 25 millions de dollars aux États-Unis (Morzaria *et al.*, 1979; Kit, 1989). Il en coûte de 3 000 à 20 000 dollars par troupeau pour les avortements associés au BHV-1. Les conséquences économiques directes du BHV-1 sont attribuables dans un premier temps, à la dépression générale provoquée chez l'animal causant ainsi une diminution drastique dans la production de lait, une perte de poids, et dans un deuxième temps, l'avortement. D'autre part, il y a les différents traitements des animaux et dans certains cas le décès. L'éradication du BHV-1 en Suisse a coûté environ 135 millions de dollars (pour 52 000 bovins) et s'est échelonnée sur 10 ans; il en coûte encore 5 million de dollars par année pour maintenir cet état d'éradication.

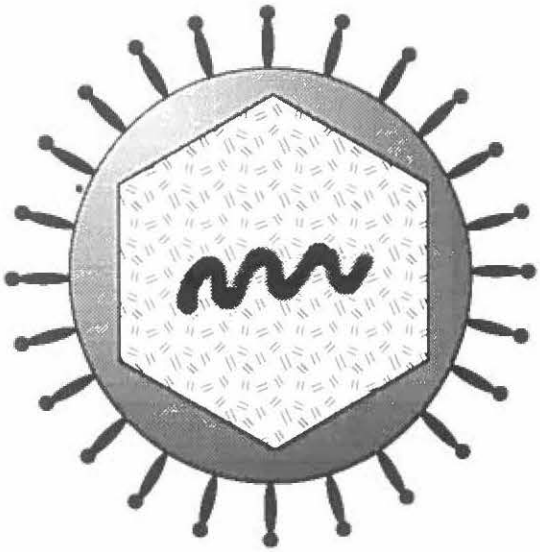
1.4 Morphologie

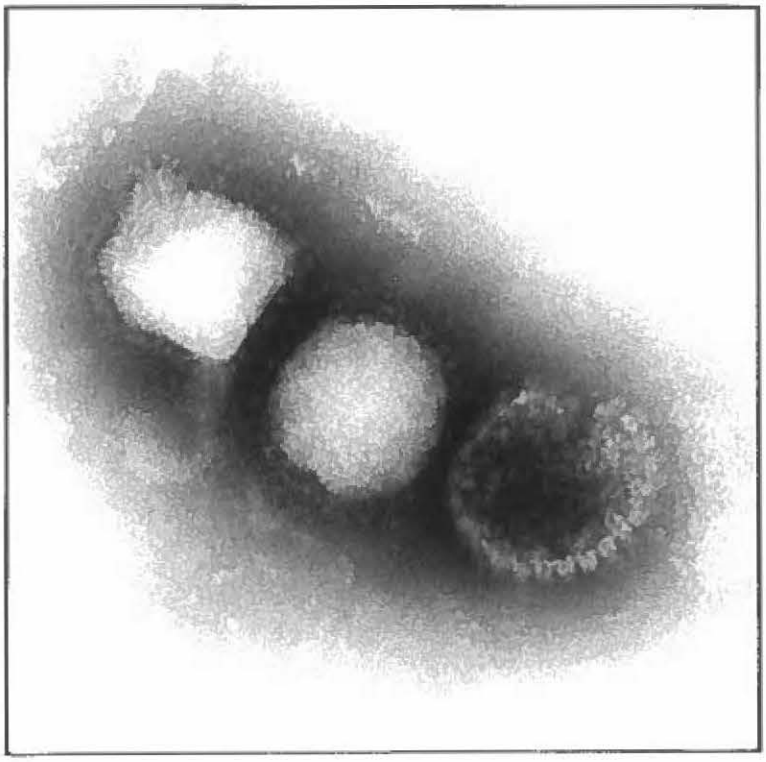
Le BHV-1 présente les composantes morphologiques communes à tous les virus herpès (Figure 1) : une capside, une nucléocapside, un tégument et une enveloppe. En voici les caractéristiques détaillées :

- la capside contient le génome d'ADN bicaténaire linéaire torsadé sous forme de fuseau (Furlong *et al.*, 1972). Le génome viral, d'environ 135 à 140 kilo paires de bases (kpb), a un contenu G+C de 72% selon sa densité sur CsCl (1.730 g/mL) et coderait plus de 70 polypeptides (Metzler *et al.*, 1985; Misra *et al.*, 1981).

Figure 1: La particule virale du BHV-1.

En haut : représentation schématique du BHV-1. **En bas** : visualisation en microscopie électronique du BHV-1, après imprégnation négative avec de l'acide phosphotungstique (3%, pH 6) à un grossissement de 225 000 X.





- la nucléocapside de symétrie icosaédrale a un diamètre d'environ 95 à 110 nm (Armstrong *et al.*, 1961; Cruickshank et Berry, 1965). Elle comprend 162 capsomères (12 pentamériques et 150 hexamériques), chacun de 12 nm de longueur par 11,5 nm de largeur avec un trou axial de 3,5 nm.

- le tégument se retrouve entre la nucléocapside et l'enveloppe externe du virion et se présente sous une structure amorphe de nature fibreuse et asymétrique (Valicek et Smid, 1976).

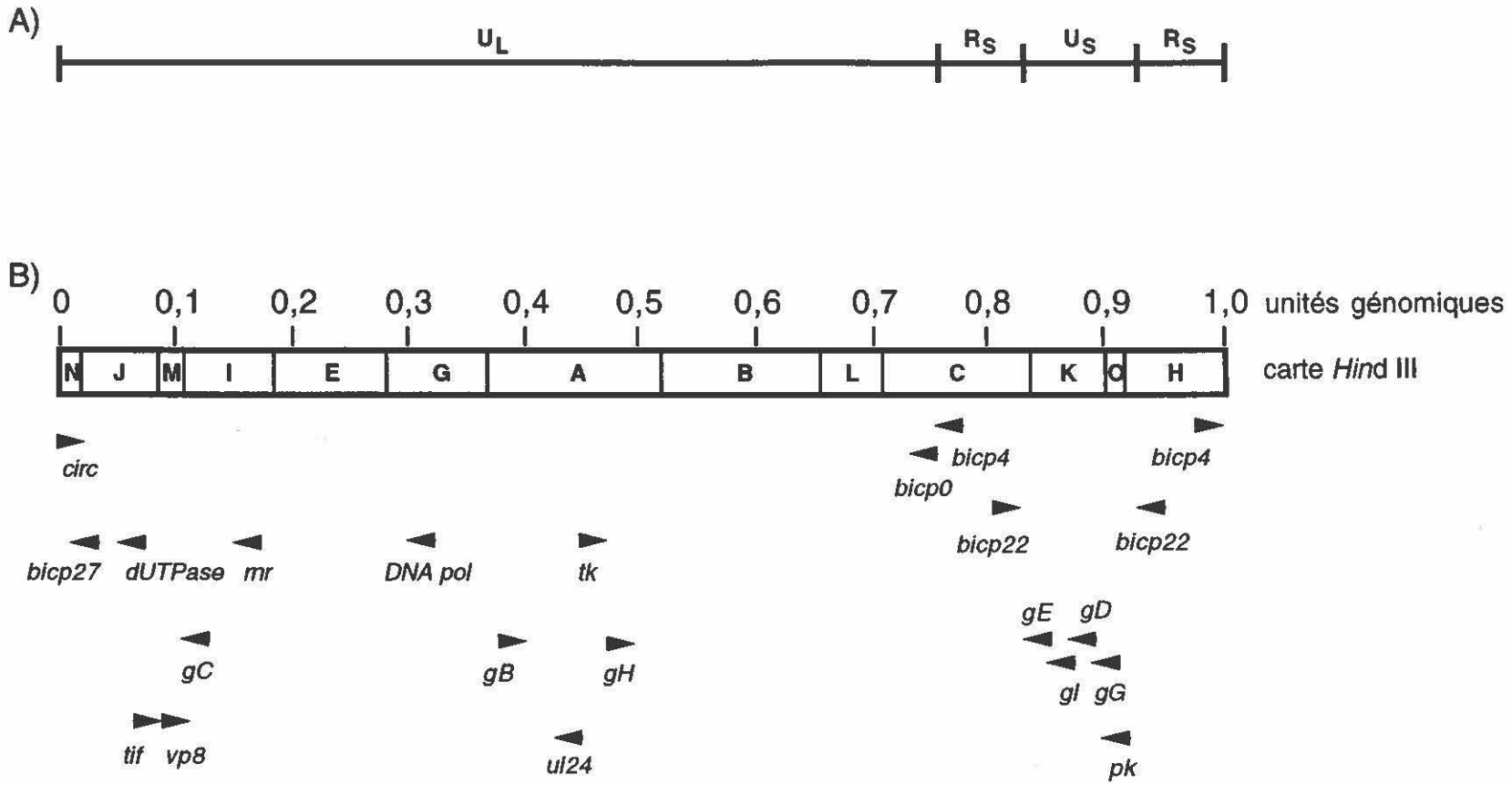
- l'enveloppe externe consiste en une bicouche lipidique exposant à sa surface des projections glycoprotéiques (Armstrong *et al.*, 1961), les virions pléomorphiques ont de 150 à 200 nm de diamètre (Watrach et Bahnemann, 1966).

1.5 Organisation génomique

L'organisation du génome viral du BHV-1 est très caractéristique de celle des *Herpesviridae*. Comme illustré à la Figure 2A, le BHV-1 se compose d'un court segment unique (US; «unique short segment», 10.5 à 11 kpb) délimité de séquences répétitives inversées (RS; «repetitive segment», 24 kpb) internes et terminales et d'un long segment unique (UL; «unique long segment», 102 à 104 kpb) (Mayfield *et al.*, 1983; Wyler *et al.*, 1989). Le caractère distinctif de ce motif réside en la faculté que possède le court segment d'inverser son orientation par rapport au segment long UL, ce qui confère deux formes isomériques au génome (Farley *et al.*, 1981; Mayfield *et al.*, 1983). Cet arrangement de

Figure 2: Le génome du BHV-1.

A) Organisation du génome viral du BHV-1 (Schwyzer, 1993). Voir la description complète dans le texte. **B)** Carte des sites *Hin*d III du prototype du génome du BHV-1 (Mayfield *et al.*, 1983) et localisation des gènes viraux dont la séquence a été publiée. Les unités génomiques sont indiquées en haut de la carte des sites *Hin*d III. Le sens des flèches indique l'orientation des séquences codantes.


A)
U_L
R_S
U_S
R_S
B)
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
unités génomiques
N
J
M
I
E
G
A
B
L
C
K
O
H
carte Hind III
circ
bicp4
bicp0
bicp4
bicp22
bicp22
bicp27
dUTPase
mr
DNA pol
tk
gE
gD
gC
gB
gH
gI
gG
tif
vp8
ul24
pk

séquences est typique des virus herpès du groupe «D» comprenant le BHV-1, le virus de l'herpès humain de type 3 (VZV) et le virus porcin de la pseudorage.

1.6 Protéines et enzymes

Le génome du BHV-1 coderait plus de 70 protéines dont 54 transcrits ont été identifiés jusqu'à ce jour par hybridation de type Northern (Wirth *et al.*, 1989). La Figure 2B illustre la localisation des gènes viraux dont la séquence a été publiée. Mentionnons que les gènes viraux ont été classés selon le moment d'apparition de leur transcrit, d'après des expériences d'inhibition de synthèse de protéines et d'ADN à l'aide d'inhibiteurs spécifiques (Seal *et al.*, 1991). Ainsi, les protéines appartenant à la classe dite précoce-immédiate ou α proviennent de gènes qui sont transcrits en absence de toute synthèse protéique virale *de novo*. Les protéines précoces ou ß sont synthétisées avant même le début de la réplication virale, ce qui est à l'encontre des protéines tardives ou γ qui elles nécessitent la réplication virale pour leur synthèse. Des 54 transcrits connus, 4 s'avèrent précoces-immédiats, 21 immédiats et 12 tardifs. De tous ces transcrits, 33 codent des protéines structurales dont 13 sont associées à l'enveloppe, 14 à la nucléocapside et 6 autres ne sont pas encore localisées (Misra *et al.*, 1981; Bolton *et al.*, 1983). De plus, 15 autres transcrits codent des protéines non-structurales (Misra *et al.*, 1981). Le contrôle temporel de la cascade de synthèse protéique chez le BHV-1 (protéines précoces-immédiates, immédiates et tardives) permet de le classer dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* (Roizman et Sears, 1990). Mentionnons que la désignation des

protéines du BHV-1 repose sur leur homologie de séquences avec les protéines du HSV-1, tel qu'il a été proposé lors du congrès annuel sur les virus herpès bovins, en 1993.

1.6.1 Les glycoprotéines

Le BHV-1 code 13 glycoprotéines, dont 10 dérivent de 6 glycoprotéines précurseurs nommées gB, gH, gC, gD, gp93 et gp42 (van Drunen Littel-van den Hurk et Babiuk, 1986; Marshall *et al.*, 1986; Baranowski *et al.*, 1993). Trois autres glycoprotéines ont été identifiées soit : gE, gG, gI (Leung-Tack *et al.*, 1994). Les glycoprotéines du BHV-1 possèdent toutes une homologue chez l'herpès simplex de type 1 (l'homologue humain du BHV-1) et ce autant du côté structurel que fonctionnel. Mentionnons que gB, gC, gD, gE, gG, gH et gI sont des glycoprotéines trans-membranaires (Whitbeck *et al.*, 1988; Misra *et al.*, 1988; Fitzpatrick *et al.*, 1989; Tikoo *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1991; Leung-Tack *et al.*, 1994). La gB serait impliquée au niveau de l'interaction virus/cellule, plus spécifiquement au niveau de l'attachement (Liang *et al.*, 1991), de la pénétration, de la fusion cellulaire (Fitzpatrick *et al.*, 1990) et de la dissémination virale de cellule à cellule (Kopp *et al.*, 1994). La gH serait essentielle pour la pénétration cellulaire du virus et pour sa dissémination entre les différentes cellules (Baranowski *et al.*, 1993). La gC serait la protéine majeure impliquée dans l'attachement du virus à la cellule via des récepteurs «de type héparine» (Okazaki *et al.*, 1991; Liang *et al.*, 1993). La gD serait, elle aussi, essentielle pour l'attachement, la pénétration et la fusion cellulaire; aussi, le fait qu'elle induise des anticorps neutralisants et des cellules T cytotoxiques (CD8+) et auxiliaire (CD4+) en fait une candidate de choix pour un éventuel vaccin sous-unitaire (Babiuk *et al.*,

1987; Hutchings *et al.*, 1990a, 1990b; Denis *et al.*, 1993). La gp93 et gp42 n'ont été jusqu'à présent qu'identifiées par des anticorps monoclonaux sur des lysats cellulaires infectés par le BHV-1 (Baranowski *et al.*, 1993), mais leurs fonctions ne sont pas encore connues. La gE serait impliquée dans la propagation virale entre cellules. De plus, cette protéine forme un complexe lié de façon non-covalente avec la gI (Rijsewijk *et al.*, 1994). Les gènes des glycoprotéines gG et gI ont quant à eux été localisés sur le génome viral et ont été séquencés (Meyer *et al.*, 1991; Leung-Tack *et al.*, 1994).

1.6.2 Les enzymes

Plusieurs enzymes codées par le BHV-1 lui-même ont été identifiées, telles la thymidine kinase, la triphosphatase déoxyuridine, la ribonucléotide réductase et l'ADN polymérase. Ces enzymes qui sont impliquées dans le métabolisme de l'ADN voient leurs gènes exprimés lors de la phase précoce de l'infection. Souvent non-essentielles à la réplication virale, elles constituent généralement des facteurs de virulence dans la pathogenèse du virus.

1.6.3 Les autres protéines

La VP8 est la protéine majeure du tégument et du virion du BHV-1 (Misra *et al.*, 1981; Marshall *et al.*, 1986). Son gène est localisé entre les unités 0,088 et 0,108 de la carte du génome, près de l'ORF du gène codant la BTIF («bovine transinducing factor») a été retrouvé. Cette dernière joue un rôle clé dans l'infection lytique du BHV-1 (Carpenter et Misra, 1992). Elle est synthétisée au terme de la phase précoce et fait partie du virion.

De plus elle serait impliquée dans la formation de complexes avec certains facteurs cellulaires et la trans-activation nécessiterait la présence d'un motif spécifique retrouvé dans le promoteur des gènes précoces-immédiats (Misra *et al.*, 1994).

Les BICP4, BICP0 et BICP22 sont des protéines précoces-immédiates (Misra *et al.*, 1981) impliquées dans la trans-activation et la trans-répression des gènes codant les protéines nécessaires à la poursuite de la cascade réplicative du virus (Schwyzer *et al.*, 1993; Wirth *et al.*, 1992). Aussi, la protéine majeure liant l'ADN a été identifiée comme pouvant jouer un rôle régulateur et stabilisateur du complexe réplicatif viral (Bandyopadhyay *et al.*, 1990).

1.6.4 La protéine BICP27

À l'époque à laquelle les travaux présentés dans ce mémoire ont été entrepris, pratiquement aucune information n'était disponible au sujet de la protéine BICP27. Nous connaissions que le gène *bicp27* qui la code était situé dans le long segment unique du génome du BHV-1 à l'extrémité 5', entre les coordonnées 0 et 0,1 (Figure 2). Ce gène a été séquencé (Fraefel, 1993; Singh *et al.*, 1996) et il code pour une protéine de 400 acides aminés. Le gène *bicp27* a été identifié comme étant l'homologue du gène *icp27* du HSV-1 (Fraefel, 1993), avec qui il partage un haut taux d'homologie (61%; Singh *et al.*, 1996). Cette homologie entre le *bicp27* et l'*icp27* pourrait indiquer que les protéines qu'ils codent, possèdent des caractéristiques ou des fonctions communes au cours du cycle infectieux de leur virus respectif.

Le gène *icp27* est lui aussi localisé dans le long segment unique du génome du HSV-1. Il code pour un transcrit de 1,8 Kb (Anderson *et al.*, 1980; Whitton *et al.*, 1983) et une protéine de 512 acides aminés. Le gène a été séquencé par l'équipe de McGeoch (1988) et sa région régulatrice caractérisée par Mackem et Roizman (1982). La protéine ICP27 est phosphorylée (Wilcox *et al.*, 1980) ce qui résulte en un poids moléculaire apparent de 63 kiloDalton (kDa) en SDS-PAGE (Pereira *et al.*, 1977; Ackermann et Wyler, 1984) supérieur à celui estimé (d'après sa séquence) de 55 kDa (McGeoch *et al.*, 1988).

Des expériences effectuées à l'aide de mutants thermo-sensibles dont les lésions se situaient au niveau du gène *icp27*, ont démontrés que le taux de virions relâchés par l'infection de tels mutants à température non-permissive est significativement inférieur à celui observé à température permissive ou par l'infection du type sauvage (Sandri-Goldin *et al.*, 1981; Sacks *et al.*, 1985). Puisque ces mutants peuvent, en présence d'une lignée de complémentation pour l'*icp27*, se propager de façon similaire au type sauvage, ceci prouve que la protéine ICP27 joue un rôle essentiel dans le cycle infectieux du HSV-1 (McCarthy *et al.*, 1989). Par contre, les mutants ne montrant pas de variation significative dans le taux d'ADN synthétisé à température non-permissive par rapport au type sauvage, l'ICP27 ne semble donc pas requise pour la réplication d'ADN viral (Sacks *et al.*, 1985). Aussi, il a été observé que chez l'infection causée par ces mutants à température non-permissive, les protéines α et β sont sur-exprimées comparativement au type sauvage, contrairement aux protéines γ qui se retrouvent à des niveaux drastiquement diminués. Donc, l'ensemble de ces résultats indique que l'ICP27 est impliquée dans la transition de l'expression des gènes de classe α à la classe γ lors de la cascade réplicative du HSV-1 (Sandri-Goldin *et al.*,

1981; Sacks *et al.*, 1985). Au cours d'expériences similaires, ces mutants se sont avérés inaptes à effectuer l'arrêt de la synthèse protéique cellulaire (à température non-permissive; McCarthy *et al.*, 1989), ce qui suggère que l'ICP27 aurait un rôle à jouer à ce niveau aussi.

L'utilisation de mutants de délétions (pour des régions du gène *icp27* connues) a permis l'identification de domaines importants pour certaines fonctions de l'ICP27. Les expériences consistaient à co-transfecter le plasmide contenant l'*icp27* muté avec l'ICP0 et l'ICP4 (sans lesquelles l'ICP27 n'a aucune action; Sekulovich *et al.*, 1988), ainsi que certains plasmides arborant des marqueurs. Ainsi, le domaine carboxylique de l'ICP27 est impliqué dans la fonction de trans-activation et le domaine amino, à la fois dans les fonctions de trans-activation et de trans-répression. (McCarthy *et al.*, 1989; Sacks *et al.*, 1985; Rice et Knipe, 1988). Il a aussi été démontré que le domaine amino détermine la localisation intranucléaire de l'ICP27 lors de l'infection (Fenwick *et al.*, 1978; Knipe et Smith, 1986). De plus, l'ICP27 joue un rôle au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel auprès de différents gènes, que ce soit en régulant de façon positive ou négative, la quantité ou la stabilité des protéines ou des ARM messagers (ARNm; McLauchlan *et al.*, 1992; Hardwicke et Sandri-Goldin, 1994; Brown *et al.*, 1995). Fait important, l'utilisation d'un mutant de délétion HSV-1/ICP27$^-$ a permit de démontrer qu'il est avirulent et confère une protection complète auprès des animaux immunisés, suite à une épreuve virale (Nguyen *et al.*, 1992).

Des expériences de co-transfection de l'ICP27 et de différentes protéines ont permis de découvrir que l'ICP27 est capable de réguler l'activité (Samaniego *et al.*, 1995) et la localisation intracellulaire d'autres protéines virales régulatrices comme l'ICP0 et l'ICP4 (Zhu *et al.*, 1994; Zhu et Schaffer, 1995) et même des petites particules ribonucléiques nucléaires («small nuclear ribonucleoprotein particles» ou snRNPs; Phelan *et al.*, 1993), qui sont des composantes essentielles de la machinerie d'épissage eucaryote (Luhrmann *et al.*, 1990). Aussi, l'ICP27 interagirait avec les snRNPs lors de l'infection entraînant directement ou indirectement la phosphorylation d'au moins deux protéines, ce qui pourrait s'avérer être un moyen de régulation (Sandri-Goldin et Hibbard, 1996).

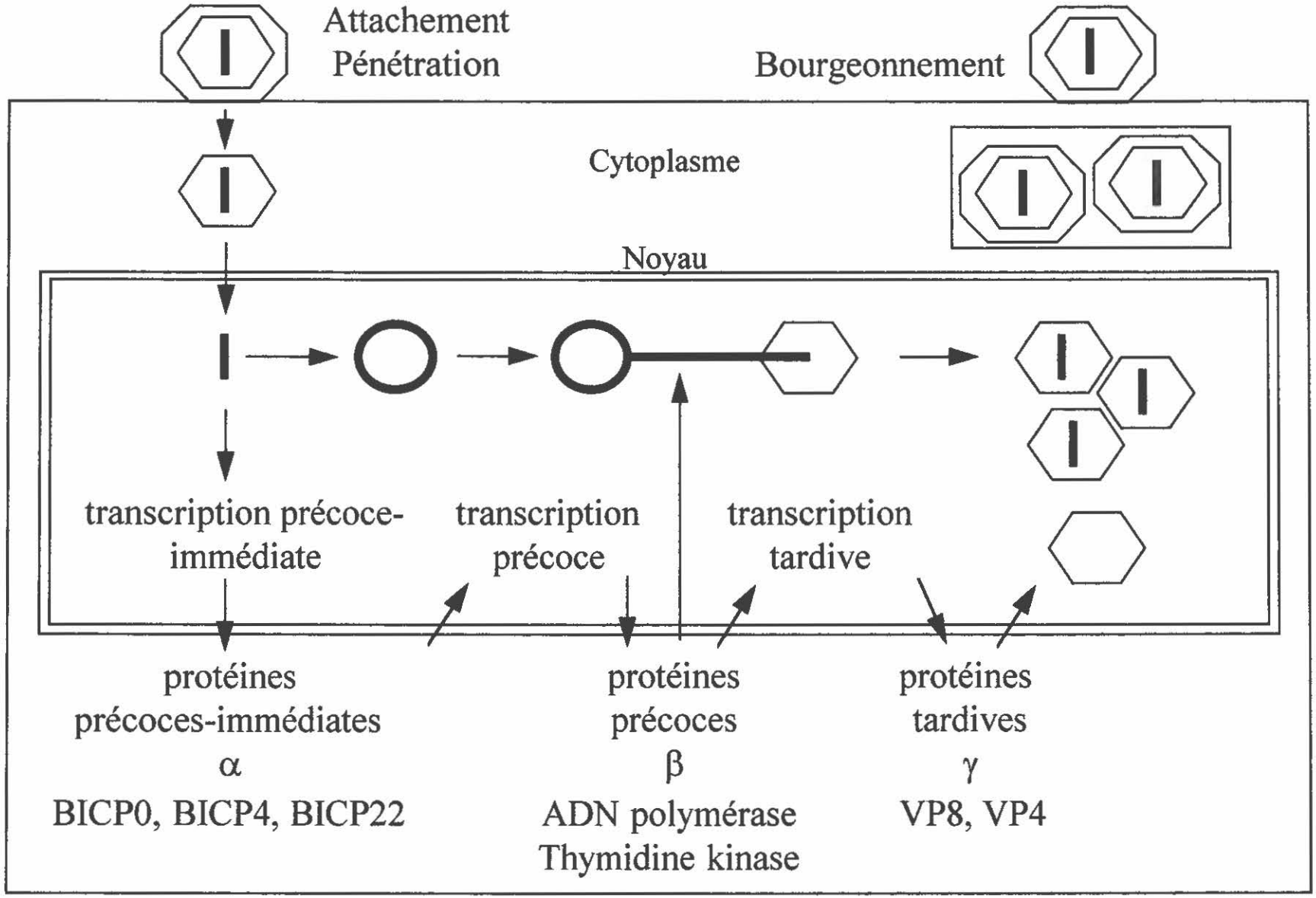
Les caractéristiques actuellement connues de l'ICP27 démontrant bien à la fois son rôle essentiel dans le cycle infectieux du HSV-1 et son mérite comme cible dans la construction d'un mutant de délétion, il est d'autant plus pertinent d'étudier la similarité fonctionnelle que pourrait partager la BICP27 avec cette protéine.

1.7 Réplication virale

La représentation schématique du cycle de réplication du BHV-1 se retrouve à la Figure 3. Le virus initie son infection par l'attachement de ses glycoprotéines aux récepteurs de surface «de type héparine» de la membrane plasmique de la cellule cible (Okazaki *et al.*, 1987; Liang *et al.*, 1991, 1993). La fusion résultante entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire permet la libération dans le cytoplasme de la nucléocapside, du tégument ainsi que des protéines virales VP8 et BTIF. Ces deux protéines sont ensuite transportées dans le noyau cellulaire. La capside est acheminée aux

Figure 3: Schématisation du cycle réplicatif du BHV-1.

La description complète des étapes est faite dans le texte. Quelques exemples de protéines précoces-immédiates, précoces et tardives sont mentionnés.



Adapté d'après Roizman et Sears, 1990

pores nucléaires à travers lesquels l'ADN viral est relaché dans le noyau où il se circularise immédiatement. La transcription des gènes α induite par la BTIF et la VP8, est effectuée à l'aide de protéines régulatrices cellulaires (Misra *et al.*, 1981). Les ARNm α correspondants sont ensuite transportés vers le cytoplasme, où ils seront traduits. Les protéines α résultantes, soient les BICP0, BICP4 et BICP22 (Schwyzer *et al.*, 1993; Wirth *et al.*, 1992), sont transportées vers le noyau. Un nouveau cycle de transcription permet la synthèse des protéines β comme la thymidine kinase et l'ADN polymérase (Misra *et al.*, 1981). Le rôle majeur de ces protéines s'effectue au niveau de la réplication du génome viral et de l'induction de la synthèse des protéines γ. À ce stade de l'infection, la chromatine est complètement dégradée et dispersée à travers la membrane nucléaire et la nucléole est désagrégée. L'ADN viral entre alors en phase de réplication par le mécanisme du cercle roulant, ce qui génère une suite répétitive d'unités d'ADN viral nommés concatémères.

De concert avec cette réplication, les protéines γ sont synthétisées. Ces protéines (VP4, VP8 et glycoprotéine gC) constituent majoritairement les capsides virales qui se forment au niveau de la couche interne de la membrane nucléaire ou encore de la membrane cytoplasmique (Hammerschmidt *et al.*, 1988; Ludwig, 1983). Chacune des capsides nouvellement formées sera remplie par un concatémère d'ADN viral. Les nucléocapsides acquièrent ensuite leur tégument et sont transportées à la membrane cytoplasmique par le biais du réticulum endoplasmique. C'est en bourgeonnant à travers cette dernière membrane que les virions acquièrent leur enveloppe (Rixon, 1993). Les

virions matures sont finalement relargués de la cellule infectée soit par sa lyse ou par sa fusion à une nouvelle cellule cible.

1.8 Cytopathogénicité

Le virus cause un effet cytopathique focal visible au microscope, avec arrondissement et lyse des cellules. Les types de cellules permissives au BHV-1 sont : les cultures primaires de cellules fœtales (reins, testicules ou poumons), lignées cellulaires établies telles «Madin Darby Bovine Kidney» (MDBK) ou «Georgia Bovine Kidney», «Bovine Turbinate», RT-13 (lapin), MPK (cochon d'Inde) et «Mink Lung» (ML).

2. La pathologie : la rhinotrachéite bovine infectieuse/l'exanthème coïtal

2.1 Pathogenèse

De manifestations cliniques diverses, le BHV-1 cause majoritairement des affections sévères du système respiratoire (IBR) et reproductif (IPV). L'infection causée par le BHV-1 a aussi été associée à la conjonctivite, l'encéphalite, l'entérite, la dermatite et l'avortement (Gibbs et Rweyemamu, 1977).

L'infection naturelle se produirait par le biais des membranes mucosales. La voie d'entrée du virus dans le système respiratoire se ferait principalement par les aérosols ou par contacts directs entre le virus et la membrane mucosale via les sécrétions nasales par exemple, où le virus subsisterait. Suivant le contact initial avec le virus, 2 à 10 jours

passent avant que les tous premiers symptômes de l'infection apparaissent (Yates, 1982; Probst *et al.*, 1985); ceux-ci se caractérisent par la fièvre, l'augmentation du rythme respiratoire, l'inappétence et la chute drastique de la production laitière. La nécrose produite suite à l'infection au niveau des aires focales de la muqueuse nasale produisent une décharge à la fois nasale et oculaire ainsi qu'une conjonctivite.

Le mécanisme par lequel le virus réussit à envahir de façon systémique l'animal demeure inconnu. Plusieurs éléments sont tout de même disponibles à l'élucidation de ce mécanisme. Entre autres, il est connu que le BHV-1 peut infecter les monocytes (Forman et Babiuk, 1982; Nyaga et McKercher, 1980; Peter *et al.*, 1966). Par contre, il s'avère encore impossible d'isoler le virus des leucocytes circulants. La dissémination de l'infection systémique pourrait se faire par le biais d'une virémie, par voie neuronale ou encore par le biais des ponts intercellulaires (Pastoret *et al.*, 1982). Après infection primaire, le BHV-1 se multiplie aux portes d'entrées, soit les muqueuses du système respiratoire ou reproducteur. Le virus pourrait être ensuite transporté par les monocytes et probablement d'autres composantes sanguines vers des organes cibles tels : le système nerveux central, le système digestif, les glandes mammaires et le fœtus (Nyaga et McKercher, 1980). Lorsque l'infection est confinée aux surfaces mucosales du système respiratoire, le rétablissement s'effectue dans les 10 à 12 jours suivants. Par contre, s'il y a établissement d'une infection bactérienne secondaire, l'interaction synergique entre le virus et la bactérie résulte en une pneumonie sévère et la mort peut s'ensuivre si un traitement antibiotique n'est pas entamé à temps.

2.2 Infections du système respiratoire

Le BHV-1 cause la pyrexie, l'augmentation du rythme respiratoire, la toux, l'anorexie, la dépression générale, la diminution drastique de la production laitière ainsi qu'une hyperémie nasale d'où l'appellation de «red nose» (Gibbs et Rweyemamu, 1977). Il s'attaque premièrement au niveau des cornets nasaux et trachéaux supérieurs, d'où le nom rhinotrachéite infectieuse. Lors de complications subséquentes d'infections bactériennes ou virales secondaires (paramyxovirus, virus respiratoire syncytial, adénovirus), les symptômes cliniques peuvent dégénérer en broncho-pneumonie, méningo-encéphalite, conjonctivite, mastite, entérite pour conduire finalement à la mort. D'autre part, le BHV-1 peut causer l'avortement chez les vaches gestantes.

2.3 Infections du système reproducteur

L'exanthème coïtal peut causer des lésions pustuleuses du tractus génital à la fois chez les mâles et les femelles. L'exanthème coïtal et la balanite se manifestent de 1 à 3 jours suivant le contact. Les symptômes sont les suivants : mictions fréquentes, position anormale de la queue, œdème et vulve congestive. Les infections secondaires y jouent un rôle encore une fois prédominant.

2.4 Infection latente

La latence est décrite comme étant une persistance silencieuse du virus chez l'animal, non-détectable par des méthodes virologiques conventionnelles et présentant des épisodes de réexcrétion intermittents (Pastoret *et al.*, 1982). Après sa multiplication au site

d'infection, le virus entrerait dans le système nerveux périphérique et serait ensuite acheminé jusqu'aux sites de prédilection de latence, soit les ganglions trijumeaux et sacraux et ce, de façon rétrograde par le biais des axones (Narita *et al.*, 1976, 1981; Sheffy et Davies, 1972; Ackermann et Wyler, 1984). D'autres sites de latence doivent êtres considérés : macrophages (Forman *et al.*, 1982; Geder *et al.*, 1981), cellules épithéliales (Pastoret *et al.*, 1986), bulbe olfactif et *medulla oblongata* (Rziha *et al.*, 1986). À l'encontre d'une infection lytique, l'infection latente ne présente qu'un très faible taux de transcription. En effet, une petite région du génome nommée «domaine relié à la latence» est transcriptionnellement active lors de l'état de latence observé dans les neurones (Rock *et al.*, 1987; Kutish *et al.*, 1990). Deux transcrits codant la protéine BICP0 s'y retrouvent, (Kutish *et al.*, 1990) et ont été détectés. Encore aucune protéine fonctionnelle n'en a été rapportée et le rôle des transcrits dans le processus de latence n'est pas encore connu. Par contre, l'analyse du promoteur indique que la régulation de l'expression de l'ARN lié à la latence serait exercée par des facteurs cellulaires présents dans les neurones ainsi que par les produits de certains gènes précoces-immédiats (Bratanich *et al.*, 1992).

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer le maintien de l'état de latence chez un hôte en présence d'un système de surveillance immunitaire (Babiuk et Rouse, 1979). Les propriétés de la cellule hôte pourraient par différenciation ou état physiologique caractéristique, permettre la latence virale (facteurs spécifiques des cellules neuronales inhibant directement ou compétitivement ceux du virus). Encore, une multiplication limitée programmée pourrait expliquer cette persistance virale (Roizman et Sears, 1987). La simple non-disponibilité (absence, inactivation, dégradation, compétition) des protéines

activant la transcription des gènes précoces-immédiats dans les neurones n'étant pas en division pourrait expliquer le phénomène de latence. La latence pourrait également être le fruit de l'interaction de l'ensemble de ces composantes.

La réactivation de l'état latent du virus peut s'effectuer de façon spontanée ou induite par un stimuli naturel ou artificiellement imposé. Voici toute une panoplie des différents stimulus possibles : le stress durant le transport (Thiry *et al.*, 1987), le traitement aux glucocorticoïdes qui sont immunosuppressifs (Böttcher et Mahler, 1970), la surinfection avec un autre virus (Mensik *et al.*, 1976a, 1976b), l'infection par d'autres micro-organismes (Msolla *et al.*, 1983), la parturition (Thiry *et al.*, 1984 et 1985), le traitement au 3-méthyl-indole (Espinasse *et al.*, 1983), etc.. Le virus alors réexcrété par l'hôte ne semble aucunement modifié, que ce soit au niveau moléculaire ou biologique (Castrucci *et al.*, 1984; Nettleton *et al.*, 1984). Quant aux symptômes, ils sont pratiquement inexistants (Lupton *et al.*, 1980b), ce qui est à la base des problèmes de diagnostic des individus séropositifs porteurs. Fait majeur, aucun des vaccins actuellement disponibles sur le marché ne permet de prévenir l'établissement d'une infection latente. Certains peuvent tout au plus réduire l'incidence d'une infection latente ou encore le taux de virus réexcrété (Rossi et Kiesel, 1982; Kit *et al.*, 1986).

2.5 Infections moins fréquentes

Les attaques du BHV-1 au système nerveux central peuvent engendrer l'incoordination, des tremblements musculaires, l'ataxie, l'aveuglement et la mort éventuelle de l'animal (Friedli et Metzler, 1987). L'encéphalite se retrouve surtout en

Australie et en Argentine et l'agent serait le BHV-1 type 3 (Hill *et al.*, 1984). Sur le système digestif, le BHV-1 aura comme conséquence soit une entérite ou encore une diarrhée mortelle. Au niveau de l'épiderme, c'est la dermatite que le BHV-1 peut laisser comme trace. Mentionnons que ces affections conséquentes à l'infection par le BHV-1 sont rarement observées.

2.6 Synergie virus-bactérie

L'infection par le BHV-1 cause une destruction sérieuse des cellules épithéliales du système respiratoire. L'activité ciliaire protectrice éliminant tout pathogène, étant alors compromise, les infections bactériennes profitent alors d'une situation permissive (Babiuk *et al.*, 1988). De plus, l'activité antivirale alors induite par le virus chez l'hôte peut alors, lors d'une infection bactérienne secondaire, aider en augmentant la perméabilité vasculaire ou les dommages tissulaires par exemple (Matzner *et al.*, 1979). Aussi, il a été prouvé que le BHV-1 inhibe les macrophages alvéolaires qui sont la première ligne de défense contre les micro-organismes au niveau des poumons, de même que les neutrophiles polymorphonucléaires et les lymphocytes (Forman et Babiuk, 1982; Bielefeldt Ohmann et Babiuk, 1985; McGuire et Babiuk, 1984). Les fonctions de ces acteurs immunitaires étant altérées, la synergie virus-bactérie devient alors possible et cause une pathologie beaucoup plus importante que celle initialement engendrée par le BHV-1 seul.

Le BHV-1 est considéré comme étant un des pathogènes majeurs de la maladie des transports ou «Shipping fever». C'est une maladie à étiologie multifactorielle où deux bactéries pathogènes *Pasteurella haemolytica* et *Pasteurella multocida* auraient un rôle

majeur à jouer. La pathologie consiste en une pneumonie caractérisée par la transudation, de distribution lobaire et antéroventriculaire (Yates, 1982). La sévérité de la maladie semble être directement reliée à la souche virale infectieuse, à l'âge de l'animal, à son statut immunologique ainsi qu'aux stress environnementaux qu'a pu subir l'animal.

3. Prévention et contrôle

3.1 Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique s'effectue à partir de signes pathologiques ou histopathologiques visibles. Malheureusement, le BHV-1 présente une multitude de maladies ou symptômes atypiques (revus en détails par Kahrs, 1977; Gibbs et Rweyemamu, 1977). Il faut donc se rapporter au diagnostic en laboratoire afin de pouvoir confirmer la présence de l'infection par le BHV-1 chez l'animal.

3.2 Diagnostic en laboratoire

Dans un premier temps, la technique d'isolement viral sur culture demeure encore aujourd'hui la méthode de référence dans tous les laboratoires. L'isolement viral, malgré qu'il soit très sensible, nécessite une culture cellulaire fiable, ce qui est un inconvénient certain. La microscopie électronique est rapide, mais elle exige une confirmation par la microscopie immunoélectronique. D'autre part, la détection du virus par technique immunofluorescente s'accomplit promptement, ne nécessite aucune confirmation ultérieure, mais reste moins sensible que l'isolement viral. La détection de l'ADN viral

comme tel par amplification élective *in vitro* («PCR») est une nouvelle technique qui est en train de bouleverser le monde diagnostique.

Dans un deuxième temps, il y a les tests sérologiques. La neutralisation qui tente de détecter des anticorps spécifiques contre le BHV-1 demeure encore aujourd'hui la méthode de référence pour les programmes d'éradication. Par contre, ce test dépend encore une fois de la culture cellulaire. Ceci, comme il a été mentionné précédemment, présente un désavantage. Des techniques appelant du principe d'immunofluorescence tentent de contourner la nécessité de ces cultures. L'ELISA ou «enzyme-linked immunosorbent assay» demeure jusqu'à ce jour celle qui semble la plus prometteuse puisque qu'elle est sensible, reproductible, économique, rapide et peut se prêter à un large échantillonnage.

Il est important de mentionner que dans le cours d'un programme d'éradication, la rapidité, la sensibilité, la reproductibilité, l'économie et la possibilité de pouvoir tester un grand nombre d'échantillons sont des caractéristiques essentielles que doit posséder le test diagnostique (Stuker *et al.*, 1980; De Meuron, 1982). Au même titre, la possibilité de pouvoir tester des échantillons de toutes provenances comme par exemple, sang, lait, excréments, sécrétions nasales, oculaires ou génitales, etc., est de toute première importance.

Enfin, il apparaît primordial de continuer le développement de ces tests diagnostiques dans le but de parvenir à pouvoir identifier différentes situations : réactions croisées, animaux séronégatifs, évaluation rapide de l'état global d'un cheptel, distinction des

animaux sécrétant de façon sporadique ou active des anticorps, etc. (Straub, 1978; Mayr, 1986a).

3.3 La vaccination

La vaccination était et demeure encore aujourd'hui un excellent moyen de contrôle pour toute une panoplie d'infections virales et bactériennes et ce à la fois chez l'homme et l'animal. À cette fin, généralement trois types de réponses immunitaires doivent être enclenchées par l'agent vaccinal : 1) une réponse immunitaire non-spécifique (amène une production de cytokines et une activation de cellules telles les macrophages, les neutrophiles et les cellules «natural killer»), 2) une réponse immunitaire cellulaire spécifique qui va ralentir et délimiter l'infection plutôt que l'enrayer (comprend les lymphocytes T) et 3) une réponse immunitaire constituée des anticorps neutralisants qui ont la fonction de prévenir l'infection (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1993). Le modèle d'infection par le BHV-1 nous donne des indices certains sur le ou les types de réponses immunitaires essentielles à être modulées afin que le type de vaccin employé soit efficace. Les deux types de réponses immunitaires, spécifique et non-spécifique, sont nécessaires à l'animal afin de se prémunir contre une infection secondaire ou une réactivation de l'état de latence du virus (Ohmann et Babiuk., 1985). Par exemple, le BHV-1 initie son infection au niveau des surfaces mucosales : une réponse immunitaire locale est donc de toute première importance. Aussi, le BHV-1 pouvant établir une infection latente, la présence d'anticorps neutralisants sera par conséquent essentielle.

Le choix d'un vaccin est judicieusement effectué selon ses capacités à induire le système immunitaire, protéger contre l'agent infectieux sauvage ciblé, réduire les signes cliniques ayant comme conséquences directes des pertes économiques importantes, protéger l'animal la vie durant contre le virus ciblé, offrir la possibilité de discriminer entre les animaux vaccinés et ceux infectés naturellement par le virus, présenter de faibles coûts de production, etc. Les programmes de vaccination doivent donc être compatibles avec leur but premier qui est d'éliminer ou de contrôler l'infection (Straub, 1978) et doivent aussi correspondre à la situation épidémiologique courante (revu par Tikoo *et al.*, 1995).

3.3.1 Vaccins conventionnels

Les vaccins conventionnels comprennent ceux inactivés ou vivants atténués. Malgré leur utilisation depuis plus de trente ans, le BHV-1 est toujours en effervescence. Le problème majeur de ces types de vaccins, est qu'en plus du manque de sécurité des vaccins vivants atténués et du manque d'efficacité des vaccins inactivés, ils ne permettent pas de différencier les bêtes vaccinées de celles qui sont infectées naturellement de façon latente. Ces inconvénients font de ces vaccins des sujets inaptes à être introduits solitairement au sein de tout projet de vaccination, d'éradication ou de prévention chez les boeufs utilisés pour fin d'insémination artificielle. Par contre, ils ont la capacité de réduire les signes cliniques associés à une infection par le BHV-1 et donc, permettent de diminuer les pertes économiques conséquentes (Wyler *et al.*, 1989; Kit, 1989), surtout lorsque conjointement ils sont introduits à un programme d'isolement et d'éradication (voir la section 3.5). Les

vaccins conventionnels ont été revus par Lupton et Reed (1980) et Wyler et collaborateurs (1989).

3.3.1.1 Vivant atténué

Ce type de vaccin est produit par passages cellulaires successifs du virus *in vitro* afin de l'atténuer par génération de mutation(s) spontanée(s). Une autre technique consiste à produire par mutagénèse, des mutants viraux sensibles à la température. La voie d'inoculation de ces vaccins s'est tout d'abord effectuée par voie intramusculaire pour les vaccins de niveau d'atténuation moyen puis, par voie intranasale pour les vaccins de niveau d'atténuation supérieur permettant ainsi une immunité locale et non la dispersion systémique du virus. L'avantage certain de la voie intranasale est d'induire une immunité cellulaire locale rapide et efficace ainsi qu'une immunité humorale (Todd *et al.*, 1971). Aussi, cette voie d'inoculation permet l'administration de ce type de vaccin chez les vaches en gestation (pour induire une protection rapide par le biais de la production d'interférons et d'anticorps sécrétoires au niveau des muqueuses), et ce contrairement à la voie d'inoculation intramusculaire (Todd *et al.*, 1971 et 1972).

3.3.1.2 Inactivé

Un vaccin dit «inactivé» consiste en un virus rendu non-vivant par un processus chimique ou physique quelconque : comme la formaline (Zuschek et Chow, 1961), l'éthanol (Haralambiev, 1976), le ß-propriolactone (Levings *et al.*, 1984), la chaleur ou les rayons ultraviolets (Hristov et Karadjov, 1975). Ces vaccins nécessitent d'être conjugués à

un adjuvant (saponine (Haralambiev, 1976), huile (Hristov *et al.*, 1976), Freud complet et incomplet (Zuschek et Chow, 1961), gel d'hydroxyde d'aluminium (Juhasz *et al.*, 1974) ou encore à l'alginate de sodium (Lupton et Reed, 1980) pour être efficaces à induire une réponse immunitaire protectrice (Schipper et Kelling, 1975). Mentionnons que les équipes de Levings (1984) ainsi que de Duque (1989), ont rapporté que les processus d'inactivation du virus causent la perte de certains épitopes antigéniques importants du BHV-1. Malgré que cette destruction puisse rendre le vaccin moins efficace, ceci permettrait de pouvoir utiliser ce phénomène comme marqueur afin de distinguer les animaux vaccinés de ceux qui sont infectés de façon latente par le BHV-1.

3.3.2 Nouvelles générations de vaccins

Comme mentionné précédemment, les vaccins conventionnels ne répondent pas aux critères de protection, de sécurité, d'efficacité, de stabilité, de présence de marqueur pouvant différencier les animaux vaccinés de ceux naturellement infectés, d'économie, de protection contre l'établissement d'une infection latente, etc. Comme l'affirmaient Wyler et collaborateurs (1989) au sujet de ces types de vaccins : «Bref, la vaccination peut à un certain degré diminuer les pertes économiques et l'étendue de l'infection, mais elle ne peut pas protéger complètement l'animal d'une infection». Cette affirmation pourrait bien ne plus prévaloir dans un avenir rapproché, puisque les nouvelles générations de vaccins semblent prometteuses et permettraient de répondre à toutes les exigences. Les nouvelles générations de vaccins ont été revues l'an dernier par l'équipe de Tikoo (1995).

3.3.2.1 Vivant modifié par ingénierie

Il existe plusieurs autres types de virus modifiés. Le principe général de la construction d'un virus mutant modifié par ingénierie consiste à atténuer un gène codant pour une protéine que l'on croit essentielle à un quelconque niveau de la propagation virale, de sorte que le mutant ne puisse se propager chez l'hôte (mutant rep$^-$) tout en induisant une réponse immunitaire maximale. Par exemple, un mutant de délétion d'un gène codant une protéine essentielle à la réplication de l'ADN viral ou à l'assemblage du virion empêchera le virus de produire une infection, mais donnera le temps à plusieurs protéines d'être synthétisées ce qui stimulera le système immunitaire de façon à développer une réponse protectrice. L'atténuation peut aussi se faire, par exemple, par l'introduction d'un codon d'arrêt à l'intérieur du gène ciblé. Aussi, il est possible de créer des virus chimériques où le gène supprimé se trouve remplacé par un gène reconnu pour induire une immunité efficace contre un autre pathogène, afin de produire un vaccin bivalent. Encore, un gène codant une cytokine (interleukine-2, interféron ou IFN, facteur nécrosant des tumeurs) peut être intégré afin de moduler davantage l'immunité.

3.3.2.2 Autres nouveaux types de vaccins

Un vaccin sous-unitaire est constitué d'une composante protéique virale pouvant induire une immunité protectrice (Lupton et Reed, 1980). Toutefois, la nature et la présentation de l'antigène ainsi que l'adjuvant utilisé peuvent significativement affecter la réponse immunitaire induite (Rouse, 1985). Il existe plusieurs procédés permettant d'obtenir un vaccin sous-unitaire soit : la purification de la protéine cible à partir d'une

préparation virale, son expression par le biais d'un vecteur ou encore la synthèse de peptides synthétiques représentant les domaines immunogéniques de cette protéine, etc. La qualité de la réponse immunitaire obtenue, suite à la vaccination, dépend de celle de la préparation injectée.

Pour ce qui est des vaccins d'ADN, les premiers consistaient en l'injection d'un vecteur rétroviral, permettant l'intégration directe du gène d'intérêt cloné dans le chromosome de l'hôte, suivit de son expression. L'utilisation de vecteurs infectieux s'avère maintenant possible (Wolff *et al.*, 1990). Aussi, mentionnons que tout mutant viral non-réplicatif peut servir d'excellent vecteur.

3.4 Drogues antivirales et traitements

Lorsque le symptôme respiratoire causé par le BHV-1 se manifeste, le traitement par antibiotiques, comme thérapie complémentaire, peut aider à enrayer les complications secondaires bactériennes. Pour le symptôme génital, un traitement local à l'aide d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine) peut être administré (Saxegaard, 1970).

Le seul inhibiteur biologique efficace jusqu'à ce jour dans le cas d'une infection par le BHV-1, demeure l'IFN. En effet, il réduit de façon hautement significative les taux d'infection en prévenant les infections secondaires, mais il s'avère très coûteux (Mayr, 1986b; Babiuk *et al.*, 1985, 1987b; Ohmann et Babiuk, 1985). Comme alternative, des inducteurs biologiques d'IFN préparés à partir des avi- et paramyxovirus, des bactéries ou du BHV-1 atténué, sont utilisés à la fois en thérapie et en prophylaxie (Mayr, 1986a).

Quant aux drogues existantes pour les virus herpès (comme l'acyclovir par exemple), elles ont été testées contre le BHV-1, mais sans aucun succès (Rollinson, 1992; Rollinson et White, 1983).

3.5 Contrôle et prévention

La propagation du virus et sa dissémination géographique tant sous les formes actives et latentes limitent l'efficacité des mesures d'hygiène, d'isolement et de gestion des animaux atteints (Epstein, 1972; Shimizu *et al.*, 1972; St-George et Philpott, 1972). De plus, la gravité de l'infection et la prévalence du BHV-1 variant entre 10 et 96% ont des impacts majeurs sur l'établissement de programmes de contrôle ou d'éradication. Il est primordial de s'assurer que les animaux destinés à la reproduction sont surveillés et immunitairement stimulés de façon périodique, par le biais des vaccins (Kahrs, 1974). Le choix du type de vaccination dépend de multiples facteurs : vaccin comme tel, voie d'immunisation, fréquence de rappel vaccinal, état du troupeau, coût, etc. La situation est telle que seuls les animaux ou les échantillons d'animaux (sperme ou embryons) séronégatifs pour le BHV-1 sont admissibles à l'exportation (Forschner *et al.*, 1987).

L'éradication (élimination de tout animal séropositif pour le BHV-1) est une méthode quelque peu drastique et coûteuse, cependant déjà plusieurs pays suivent ce programme sévère. Le Danemark et la Suisse ont réussi et ce très probablement grâce au faible nombre de bovins et de déplacements de ces derniers à travers le pays. Le meilleur moyen afin de parvenir à éradiquer le BHV-1 dans les pays où la surface, le nombre de bovins et de déplacements des cheptels sont énormes, serait de procéder à une vaccination systémique

de tous les nouveaux-nés. Ceci à l'aide de vaccin sous-unitaire ou virus vivant-modifié permettant de différencier les individus vaccinés de ceux qui sont infectés de façon latente, et d'éliminer ces derniers.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes et plasmides

1.1 Souches d'*Escherichia coli*

Voici le génotype des différentes souches bactériennes qui ont été utilisées;

XLI-Blue : *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17, *sup*E44, *rel*A1, lac^-, F'[*pro*AB^+. *lac*I^q, *lac*ZΔM15, Tn10(*tet*^{r})]. Cette souche a servi pour les clonages effectués avec les vecteurs pET-21b et pKS(+).

BL-21 : F^-, *omp*T, r_B^-, m_B^-,dcm^-. Cette souche a été utilisée pour l'expression de la protéine BICP27, car elle contient le gène codant l'ARN polymérase du phage T7.

1.2 Milieux de croissance

Le milieu de culture «Luria Broth» ou LB (1% (p/v) de bacto-tryptone, 0,5% (p/v) d'extraits de levures et 1% (p/v) NaCl; Sambrook *et al.*, 1989), a été utilisé pour la croissance des bactéries. Lorsque la croissance était effectuée sur un milieu solide en pétris, 1,5% (p/v) de bacto-agar était ajouté au LB. Cependant, l'expression de la protéine BICP27 chez *E. coli* a nécessité l'utilisation du milieu riche «Terrific Broth» (TB; 1,2% (p/v) bacto-tryptone, 2,4% (p/v) extraits de levures, 0,4% (v/v) glycérol, 0,017 M KH_2PO_4 et 0,072 M K_2HPO_4; Sambrook *et al.*, 1989), auquel un supplément d'arginine (200 µg/mL) a été ajouté.

Pour la croissance de la souche XLI-Blue, 15 µg/mL de tétracycline (Boehringer Mannheim Canada Lté, Laval, Qc) ont été additionnés au milieu de culture et les transformants bactériens ont été sélectionnés dans du milieu LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline (Boehringer Mannheim).

1.3 Vecteurs de clonage et d'expression

pET-21b (5442 paires de bases (pb), Novagen, Madison, WI, É-U) est un plasmide d'expression procaryotique où les gènes sont clonés sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7. L'expression du gène cloné est induite par l'ajout d'IPTG (isopropylthio-ß-galactoside; ICN, Biomedicals Canada Inc., St-Laurent, Qc) qui active le gène *lac*UV5 contrôlant le gène de l'ARN polymérase de T7 contenu chez l'hôte. Ce vecteur porte aussi un gène de résistance à l'ampicilline. Une séquence nommée T7-Tag, située en amont des sites de clonage, code un peptide de onze acides aminés qui est reconnu par un anticorps monoclonal disponible commercialement. Le clonage du gène d'intérêt dans un des sites de clonage pré-déterminés, suivi de son expression, permet d'obtenir une protéine de fusion avec le peptide T7-Tag facilement immunodétectable grâce à l'anticorps monoclonal anti-T7-Tag. Le vecteur pET-21b a servi au clonage et à l'expression de la protéine BICP27.

pBluescript^{MD} KS (+) (2961 pb, Stratagene, La Jolla, CA, É-U) est un phagemide dérivé de pUC19 (Vieira et Messing, 1982; Yanisch-Perron *et al.*, 1985), où le gène de résistance à l'ampicilline a été introduit. Des sites de clonage multiples ont été ajoutés

dans la portion de l'opéron *Lac* de *E. coli* du vecteur. Ce vecteur a été utilisé lors du sous-clonage du gène *bicp27*.

1.4 Transformation bactérienne

Le protocole qui a été utilisé pour la préparation des bactéries compétentes et leur transformation par choc thermique en présence de dichlorure de calcium ($CaCl_2$, Sigma, MO, É-U) était celui de Mandel et Higa (1970). Les souches *E. coli* XL1-Blue ou BL-21 ont été d'abord ensemencées dans 10 mL de LB (pré-culture), puis incubées toute la nuit à 37°C. Puis 100 mL de LB ont été ensemencés avec 1 mL de la pré-culture et incubés à 37°C, à 250 rpm (rotation par minute), jusqu'à ce qu'une densité optique (D.O.) de 0,2 à 0,4 à 600 nm soit atteinte. Après avoir arrêté la croissance bactérienne par une incubation sur glace de 10 minutes (min), la culture a été centrifugée à 4500 rpm pendant 6 min. Le culot bactérien a été resuspendu dans 50 mL de 100 mM $CaCl_2$ et incubé sur glace pendant 30 min. Les bactéries ont été à nouveau récoltées et resuspendues dans 1 mL de 100 mM $CaCl_2$ et conservées à 0°C.

La transformation consistait à incuber 5 µL (10 ng) d'ADN avec 100 µL de cellules compétentes durant une heure (h) sur glace. Après un choc thermique de 90 secondes à 42°C, 1 mL de LB a été ajouté et la culture a été incubée une heure à 37°C avec agitation. Ensuite différents volumes de culture étaient étalés sur des pétris de LB contenant de l'ampicilline. Après incubation des pétris à 37°C toute une nuit, les transformants étaient visibles et pouvaient être ré-ensemencés en milieu liquide afin de les amplifier pour en extraire l'ADN pour fin d'analyse (voir la section 4.1).

2. Cellules eucaryotiques

2.1 Origine des cellules

La lignée cellulaire MDBK a été obtenue à partir d'un rein de boeuf par Madin et Darby (1958) et demeure disponible au près de l'«American Type Culture Collection» (ATCC, Rockville, MD, É-U). Cette lignée (ATCC CCL 22) a été utilisée pour la propagation du BHV-1, l'évaluation du titre viral, la préparation de l'antigène ELISA et les transfections menant à la construction de la lignée MDBK/BICP27^{+}.

La lignée cellulaire COS-7 (ATCC CRL 1651) a été établie à partir de cellules CV-1 transformées avec un mutant de délétion de l'origine de réplication du SV40 (virus simien 40), mais codant l'antigène T du virus (ATCC). COS-7 est donc une lignée permissive aux vecteurs portant l'origine de réplication du SV40 car l'expression de l'antigène T permettra leur réplication épisomale (comme pcDNA3, voir section 2.3). Cette lignée a été utilisée pour les essais d'expression transitoire de la BICP27.

2.2 Cultures cellulaires et milieux de croissance

Les cellules MDBK ont été cultivées dans le milieu de croissance D-MEM («Dulbecco's modified eagle media; Gibco/BRL, Canadian Life Technologies Inc., Grand Island, NY, É-U) enrichi de 10% de sérum de veau fœtal (SVF; Gibco/BRL). La culture des cellules a été effectuée en flacons ou plateaux dans une étuve à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO_2.

Pour les différentes expériences ou pour simplement maintenir les lignées, les feuillets cellulaires, d'abord lavés au PBS (tampon salin phosphaté; 2,68 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,47 mM KH_2PO_4, 8,1 mM Na_2HPO_4), ont été dissociés dans une solution de 0,5% de trypsine (Worthington Biochemical Corporation, Freeshold, NJ, É-U) préparée dans du PBS 0,02%. Le comptage des cellules a été effectué au microscope à l'aide d'un hématimètre, en utilisant la méthode de coloration au bleu de Trypan 0,5% (p/v) préparé dans du PBS sans calcium ni magnésium, selon Payment et Pavilanis (1980).

2.3 Vecteurs de clonage et d'expression

pcDNA3 (5440 pb, Invitrogen, San Diego, CA, É-U) est un vecteur d'expression eucaryotique que nous avons utilisé pour la construction de la lignée cellulaire MDBK/BICP27$^+$. C'est un plasmide dérivant de pRc/CMV (CMV : cytomégalovirus; Boshart *et al.*, 1985) et il en diffère seulement par les sites de clonage multiples. C'est un vecteur qui peut se répliquer de façon épisomique lorsqu'il est introduit dans une lignée cellulaire exprimant l'antigène T du SV40 (par exemple les COS-7). De plus, ce vecteur contient le gène de résistance à la néomycine (G-418; Gibco/BRL) permettant la sélection des transfectants.

2.4 Transfection cellulaire

Le protocole de transfection de cellules eucaryotiques a été effectué chez les cellules MDBK et COS-7. Des feuillets confluents à 60-90% de cellules ont été trypsinés la veille de l'expérience, puis un million de cellules ont été étalées dans des pétris de 60 mm dans

un milieu D-MEM contenant 10% de SVF. Le volume contenant 10 µg d'ADN plasmidique a été complété à 379 µL avec du tampon HEBS 1X (140 mM NaCl, 0,75 mM Na_2HPO_4, 5 mM KCl, 6 mM glucose, 25 mM HEPES (acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique; Gibco/BRL) pH 7,1). Après avoir mélangé, l'ADN a été par l'ajout de 21 µL de 2,5 M $CaCl_2$. On a ensuite mélangé et laissé reposer 15 min en agitant occasionnellement. Pour la transfection elle-même, le milieu de culture a été retiré des pétris et l'ADN précipité a été ajouté directement sur les cellules. Suite à une incubation de 30 min dans l'étuve à CO_2 à 37°C, 4 mL de D-MEM contenant 10% de SVF ont été ajoutés et les pétris ont été incubés pendant 5 h dans les mêmes conditions. Puis, un lavage a été effectué et 2 mL de sulfoxyde de diméthyle (DMSO) 30% (v/v) préparés dans du HEBS ont été ajoutés pour une incubation de 4 min. Finalement, 4 mL de D-MEM contenant 10% de SVF et 800 ug/mL G-418 (permettant la sélection des transfectants) ont été ajoutés. Les cellules ont ensuite été incubées dans l'étuve jusqu'à la croissance de colonies isolées, qui ont alors été amplifiées individuellement par la technique des cylindres de clonage (Ausubel *et al.*, 1990) et ce toujours en présence de la drogue sélective (800 ug/mL G-418).

3. Virus

3.1 Origine du virus

La souche #34 du BHV-1, un isolat provenant du champ gracieusement fourni par le Dr Mitchell (Gouvernement du Canada, Lethbridge, Alberta), a été utilisée dans ces

expériences (Simard *et al.*, 1991). Selon les patrons de restriction et les analyses sérologiques, cet isolat est apparenté à la souche Colorado.

3.2 Production virale

Des feuillets confluents de cellules MDBK ont été infectés avec une semence du BHV-1 en utilisant un indice de multiplicité d'infection (MOI) de 2. Après une adsorption de 1 h 30 min à 37°C dans un volume minimal de milieu, l'inoculum viral a été remplacé par du D-MEM sans SVF. Un effet cytopathique complet était observé 48 h plus tard et le milieu était recueilli et centrifugé 10 min à 1000 x g à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Puis, le virus a été concentré par ultracentrifugation (85 000 x g à 4°C pendant 2 h) sur un coussin de 40% (p/v) saccharose préparé dans du tampon TEN (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), 150 mM NaCl). Le culot a été resuspendu, titré et conservé à -70°C.

3.3 Mesure du titre viral

La dose infectieuse en culture de tissu (DICT) du virus BHV-1 a été évaluée sur des cellules MDBK. Pour ce faire, les cellules ont été cultivées en plateaux de 96 puits (Flow Laboratories). Des dilutions décimales du virus effectuées dans du milieu D-MEM sans SVF, ont été distribuées dans 8 cupules, à raison de 25 µL chacune. Les plateaux ont ensuite été incubés à 37°C en présence de CO_2 pendant 5 jours. Le titre infectieux ($DICT_{50}$) a été déterminé par la méthode de Kärber. Le $DICT_{50}$ représente l'inverse de la

dilution de l'échantillon permettant d'infecter 50% des cultures (ou puits) inoculés (Hawkes, 1979).

3.4 Cinétiques d'infection

Des feuillets confluents de cellules MDBK (10 F75 contenant 16 millions de cellules) ont été infectés avec le BHV-1 à une MOI de 1. Une incubation de 1 h a été effectuée à 3°C et ensuite 10 mL de D-MEM ont été ajoutés. À différents temps post-infection (p.i.; 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 h), les feuillets ont été lavés au PBS, puis lysés avec 500 µL de tampon de protéines 1X (5X = 40 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (p/v) dodécyl sulfate de sodium (SDS), 280 mM β-mercaptoéthanol, 10% (v/v) glycérol et 0,01% (p/v) bleu de bromophénol). Après une incubation de 10 min sur un agitateur, les lysats ont été récoltés à l'aide d'un grattoir et conservés à -20°C. Les lysats protéiques totaux ont ensuite été directement chargés sur gel de polyacrylamide. Lorsque des échantillons de la cinétique d'infection étaient utilisés comme antigènes en ELISA pour le titrage des sérums (voir la section 7.1), les feuillets infectés étaient lavés, puis récoltés par grattage dans du PBS sans calcium ni magnésium. Le dosage protéique de ces lysats totaux a été fait par la méthode de Bradford (1976) avec la trousse de dosage de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, É-U).

4. Préparation et manipulation de l'ADN

4.1 Purification de l'ADN plasmidique

La méthode qui a été utilisée pour purifier l'ADN plasmidique était celle de Birnboim et Doly (1979). La purification a été effectuée à partir 2 mL de la culture bactérienne ensemencée de la section 1.4. Après une incubation de 16 h, les cultures ont été centrifugées à 2400 rpm pendant 15 min. Les surnageants comprenant les débris cellulaires ont été retirés et 1 mL de STE-glycérol (10% (v/v) glycérol, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,01 M Tris-HCl pH 8,0) a été ajouté aux culots afin de les resuspendre et de les transférer dans des eppendorfs. Après avoir recentrifugé à 7000 rpm pendant 1 min et retiré les surnageants, 100 µL de PEB (0,02 M Tris-HCl pH 8,0, 8 mM EDTA pH 8,0, 0,04 M glucose) ont été ajoutés aux culots. Ceux-ci ont été resuspendus et incubés 5 min à 0°C. Puis, 200 µL de 0,2 M (v/v) NaOH, 1% (p/v) SDS ont été additionnés et après avoir mélangé, une incubation à température ambiante a été effectuée pendant 10 min. Ensuite, 150 µL de 3 M acétate de potassium (KOAc) pH 5,0 ont été ajoutés et une incubation de 20 min à 0°C a été effectuée. Après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 8 min, les surnageants ont été transférés dans de nouveaux eppendorfs et additionnés de 350 µL de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1) et l'ADN extrait par agitation pendant 5 min. Suite à une centrifugation à 12 000 rpm pendant 4 min, l'ADN des phases aqueuses a été extrait à nouveau avec 350 µL de chloroforme : alcool isoamylique (24:1). Après centrifugation, l'ADN contenu dans 340 µL des phases aqueuses a été précipité avec 0,8 mL d'éthanol 95%. Après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 8 min, les culots ont

été lavés avec l'éthanol 70%, séchés et finalement redissous dans 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0).

Après une incubation à 37°C avec agitation pendant 16 h, les cultures bactériennes de 50 mL ont été centrifugées à 4 000 rpm pendant 15 min. Une fois les surnageants éliminés, les culots ont été lavés avec 10 mL de STE-glycérol et recentrifugés. Les culots ont été resuspendus dans 2 mL de PEB et incubés à 0°C pendant 5 min. Puis, on a ajouté 4 mL de 0,2 M (v/v) NaOH, 1% (p/v) SDS et incubé à température ambiante pendant 10 min. Par la suite, 2 mL de 3 M KOAc pH 5,0 ont été ajoutés et une incubation de 10 min à 0°C suivit d'une centrifugation à 12 000 rpm pendant 15 min, ont été effectuées. Les culots ont été lavés avec l'éthanol 70%, séchés, dissous dans 300 µL de TE et transférés dans des eppendorfs. Puis, 300 µL de LiCl 5 M y ont été ajoutés, on a mélangé, centrifugé à 12 000 rpm pendant 8 min et transféré les surnageants dans de nouveaux eppendorfs. L'ADN a ensuite été précipité par l'ajout de 600 µL d'isopropanol. Après centrifugation, le culot a été lavé avec l'éthanol 70%, séché, dissous dans 50 µL de TE et traité avec 2 µL de RNAse A (Boehringer Mannheim; 10 mg/mL) à température ambiante pendant 30 min. Ensuite, l'ADN en a été extrait tel que décrit précédemment à la section 4.1. L'ADN présent dans les phases aqueuses réunies, a été précipité par l'addition de 0,1 volume de 3 M acétate de sodium (NaOAc) pH 5,0 et 2 volumes d'éthanol 95%. Après une centrifugation, le culot a été lavé à l'éthanol 70%, séché et dissous dans 100 µL de TE.

La concentration de l'ADN purifié a été évaluée par visualisation sur un appareil à illumination ultraviolette (Fotodyne Inc., New Berlin, NY, É-U) d'un gel d'agarose où, notre échantillon et une aliquote d'un ADN plasmidique dont nous connaissions la concentration (80 ng/µL; étalon), ont été analysés électrophorétiquement en parallèle (électrophorèse comparative). Mentionnons que l'ADN destiné au séquençage a été purifié à l'aide de la trousse commerciale de purification «Quiagen Plasmid Maxi Kit» (Quiagen Inc., Chatsworth, CA, É-U). Pour ce qui est des productions massives d'ADN, le protocole alors utilisé était celui de Nicolas (1993).

4.2 Purification de l'ADN viral

La purification de l'ADN génomique viral a été effectuée à partir de surnageants infectieux préalablement concentrés par ultracentrifugation sur un coussin de 40% (p/v) saccharose préparé dans du tampon TEN à 85 000 x g à 4°C pendant 2 h. Le culot viral a été resuspendu dans du TEN et traité avec 100 µg/mL de DNase I (Boehringer Mannheim), 100 µg/mL de RNAse A en présence de 10 mM $MgCl_2$ pendant 2 h à 37°C. Puis, 0,02 volume de 500 mM EDTA pH 8 a été ajouté pour inactiver la DNase I. Les virus ont ensuite été lysés avec 1% (p/v) de SDS et les protéines ont été digérées avec 400 µg/mL de protéinase K (Gibco/BRL) pendant 2 h à 37°C. Les protéines résiduelles ont été extraites au phénol (1 volume) par agitation douce suivit d'une centrifugation à 12 000 x g pendant 5 min. Deux autres extractions ont été effectuées avec 0,5 volume de phénol et 0,5 volume de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). L'ADN présent dans les phases aqueuses a été précipité par l'addition d'un dixième de volume de 3 M NaOAc pH 5 et de 2 volumes

d'éthanol 95% (v/v) froid, à -70°C pendant 30 min. Après centrifugation à 12 000 x g 10 min, le culot d'ADN a été dissous dans du tampon TE. La concentration de l'ADN génomique viral purifié a été mesurée par spectrométrie à 260 nm en utilisant la relation : 1 $D.O._{260\ nm}$ = 50 µg/mL d'ADN (Sambrook *et al.*, 1989).

4.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

Les gels d'agarose utilisés pour les électrophorèses ont permis le fractionnement de fragments d'ADN. Le tampon d'électrophorèse employé était du TAE 1X (50X = 40 mM Tris-acétate pH 7,8, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA) contenant 0,05 µg/mL de bromure d'éthidium. Le tampon de chargement 5X (0,1% (p/v) bleu de bromophénol, 25 mM EDTA pH 8, 1% (p/v) SDS, 25% (v/v) glycérol) a été ajouté aux échantillons (1X final) avant leur dépôt sur gel. Des marqueurs de taille consistant en l'ADN du phage lamda digéré par *Hind* III (Gibco/BRL) et en l'ADN du phage ØX174 digéré par *Hae* III (Pharmacia Canada Inc., Baie d'Urfée, Qc) ont été analysés en parallèle. La visualisation des bandes fractionnées a été effectuée à l'aide d'un appareil à illumination ultra-violette.

Après l'électrophorèse, le ou les fragments d'intérêt pouvaient être prélevés du gel avec une lame de rasoir et l'ADN en être élué à l'aide de la trousse commerciale Geneclean *II*® (Bio 101 Inc., Vista, CA, É-U), en suivant les instructions du manufacturier. La concentration de l'ADN purifié a été évaluée par électrophorèse comparative comme précédemment mentionné à la section 4.1.

4.4 Hybridation de type Southern

4.4.1 Transfert

Suite à l'électrophorèse sur gel d'agarose, celui-ci a été placé sur un trans-illuminateur de rayons UV pour 5 min d'irradiation afin de fragmenter l'ADN alors plus facile à transférer. Le transfert a été effectué sur une membrane de nylon (Hybond-N, Amersham Canada Lté, Oakville, Ont.) avec l'appareil Vacugene (Pharmacia). Le transfert effectué sous vide (50 cm^3 d'eau) a débuté par l'application sur le gel de 50 mL d'une solution de dénaturation (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), pendant 20 min. Puis, celle-ci a été remplacée par 50 mL d'une solution de neutralisation (1,5 NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7,5), pour 20 min additionnelles. Finalement, la solution neutralisante a été remplacée par 300 mL de 20X SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrate de sodium pH 7,2) et le transfert a été poursuivi pendant 1 h. La membrane a été récupérée, séchée et exposée aux UV pendant 5 min afin d'y fixer l'ADN. La membrane a ensuite été hybridée avec une sonde spécifique au gène *bicp27* marquée au [α-^{32}P]dCTP (ICN).

4.4.2 Préparation de la sonde moléculaire radio-marquée

Le marquage de la sonde au [α-^{32}P]dCTP a été effectuée à l'aide de la trousse «Oligolabelling Kit» (Pharmacia). Le fragment d'ADN purifié dénaturé, a été incubé en présence du mélange réactionnel de la trousse, 50 µCi de [α-^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmole) et de 1 unité (U) de Klenow, à 37°C pendant 2 h. Les nucléotides radioactifs non incorporés ont ensuite été éliminés par précipitation de l'ADN en présence de 100 µg d'ADN de

sperme de saumon (ADNss) et de 1 mL d'acide trichloro-acétique 10% (v/v) froid. Le culot d'ADN a été dissous dans 100 µL de 1 N NaOH, puis 200 µL d'eau déionisée ont été ajoutés. Un centième du volume final d'ADN a été utilisé pour le comptage de la sonde en Cerenkov, au compteur à scintillation Packard (Instruments cie, modèle 2200CA, Downers Grove, IL, É-U) afin d'évaluer l'incorporation du [α-^{32}P]dCTP. La sonde a été soit congelée pour utilisation ultérieure ou neutralisée juste avant l'hybridation par l'ajout de 100 µL de 1 M Tris-HCl pH 8,0 et 100 µL de 1 N HCl.

4.4.3 Hybridation

Les conditions d'hybridation utilisées étaient celles décrites par Rochaix et van Dillewijn (1982). La membrane du Southern a été tout d'abord incubée à 65°C, 4 à 6 h, dans 100 mL d'une solution de préhybridation (6X SSC, 10X Denhardt's (0,2% (p/v) albumine sérique de boeuf (BSA), 0,2% (p/v) polyvinylpyrrolidone, 0,2% (p/v) Ficoll type 400), 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% (p/v) SDS et 50 µg/mL d'ADNss; Sigma). Puis, elle a été transférée dans 50 mL d'une solution d'hybridation (6X SSC, 10X Denhardt's, 1mM EDTA pH 8,0, 0,1% (p/v) SDS, 400 µg/mL d'ADNss et la sonde radio-marquée) et incubée pendant 16h à 65°C. Par la suite, la membrane a été lavée deux fois dans 100 mL de 2X SSC, 5 min à la température de la pièce, deux fois dans 100 mL de 2X SSC, 0,1% (p/v) SDS à 65°C pendant 1 h et une fois dans 50 mL d'une solution 0,1X SSC, à 65°C pendant 1 h. La membrane a été ensuite séchée et exposée sous un film rayon-X (Kodak X-Omat).

5. Construction des vecteurs recombinants

La Figure 4 illustre les principales étapes qui ont été effectuées pour le clonage du gène codant la protéine BICP27 dans le vecteur d'expression procaryotique pET-21b et le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3. La première portion (Figure 4A) de cette stratégie consistait à cloner le fragment G *Hpa* I du génome viral contenant le gène *bicp27*, dans le vecteur pKS(+). Cette construction a ensuite servi au clonage de la séquence codante de la BICP27 chez les vecteurs pET-21b et pcDNA3 (Figure 4B).

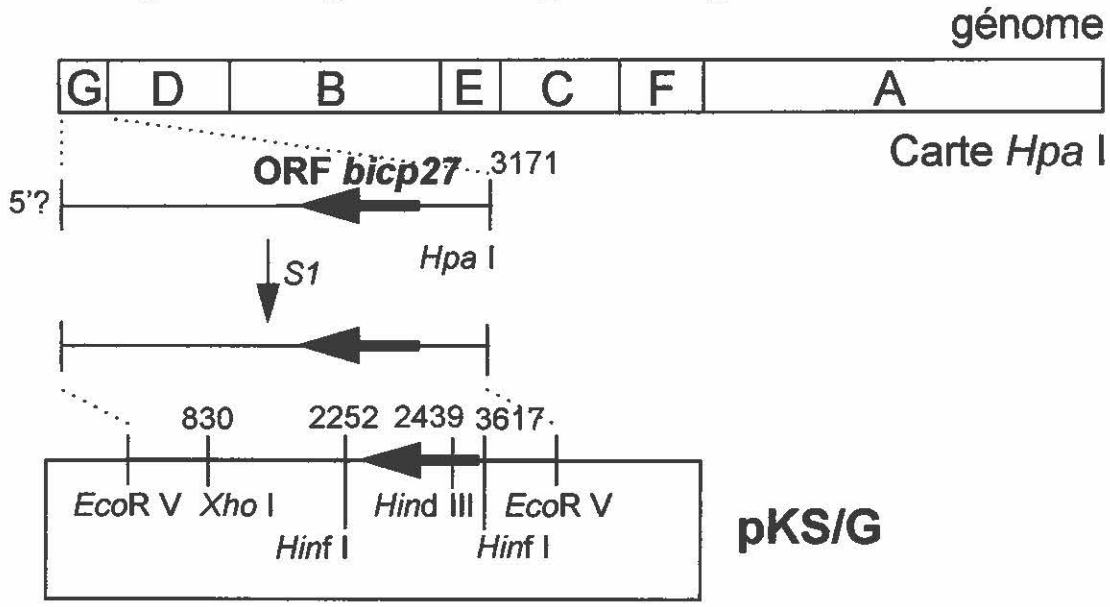
5.1 Clonage du fragment G *Hpa I* du génome viral

Le fragment *Hpa* I de 3,1 kpb (fragment G de l'extrémité 5' du génome du BHV-1, Figure 4A) contenant le gène *bicp27* a été excisé du génome viral. Le type d'extrémité au côté 5' du génome du BHV-1 n'étant pas connu, un traitement à l'endonucléase S1 (Gibco/BRL) a été effectué pour rendre cette extrémité franche. Des essais préalables ont été effectués pour calibrer l'enzyme de façon à ce qu'elle ne puisse digérer que l'ADN simple brin. Ainsi, 0,45 µg du fragment G a été incubé avec 0,25 U de SI (en présence de 280 mM NaCl, 50 mM NaOAc pH 5,0, 4,5 mM ZnSO4, 3% (v/v) glycérol), à 37°C pendant 30 min. La réaction a été arrêtée par l'addition de 0,05 volume de 200 mM EDTA, puis l'ADN a été extrait et précipité par la même méthode que celle décrite à la section 4.1.

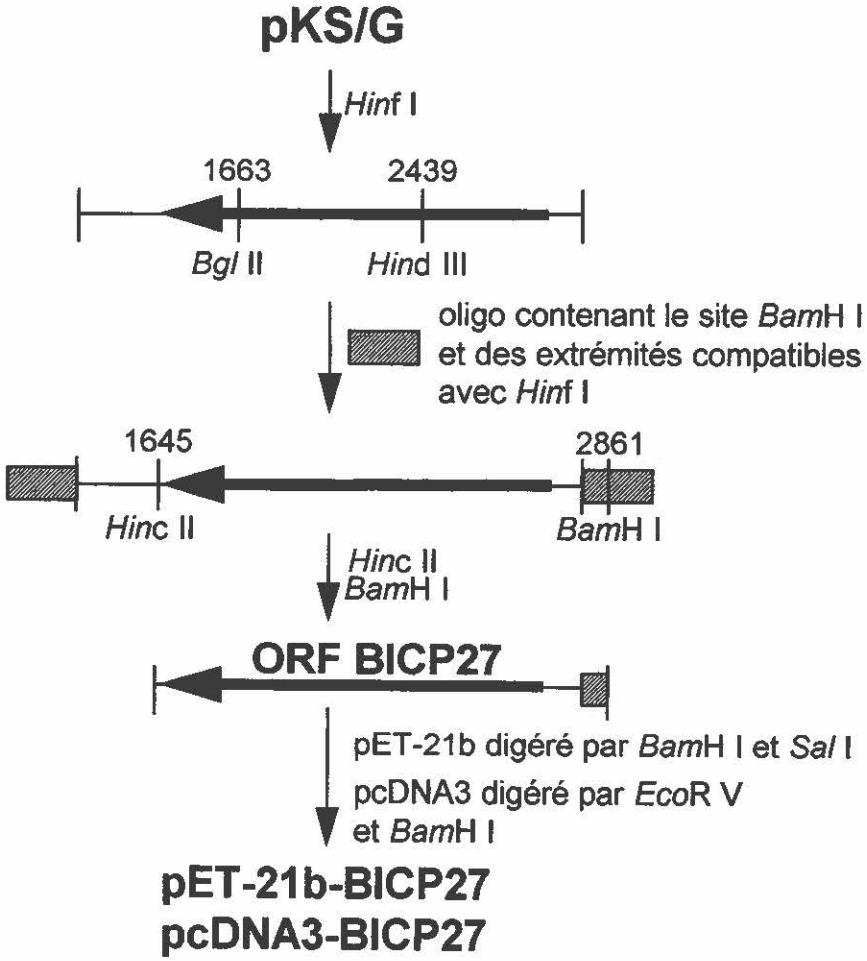
Figure 4: Stratégies de clonage du gène codant la BICP27.

A) Schématisation du clonage du fragment G *Hpa* I du génome viral dans pKS. La séquence complète du gène *bicp27* est contenue dans le fragment G (3,171 pb) *Hpa* I, situé à l'extrémité 5' du génome linéaire du BHV-1. **B)** Schématisation du clonage du gène *bicp27* dans pET-21b et pcDNA3. La description complète des manipulations effectuées se retrouve dans le texte.

A) Clonage du fragment G *Hpa* I du génome viral



B) Clonage du gène *bicp27* dans pET-21b et pcDNA3



Le fragment G devait ensuite être inséré entre les sites *Eco*R V prélablement déphosphorylés de pKS et ce, afin de réduire le bruit de fond lors de la transformation bactérienne ultérieure. La déphosphorylation a été effectuée comme suit. Après la digestion de pKS par *Eco*R V, un volume de 100 mM Tris-HCl pH 8,0 a été additionné au milieu réactionnel. L'ADN a été dénaturé à 95°C durant 3 min, puis rapidement refroidi dans l'eau glacée. Après l'addition de 50 U de la phosphatase alcaline bactérienne, le mélange a été incubé à 65°C pendant 1 h. Deux autres incubations ont été effectuées; une première à 37°C pendant 30 min, suivit d'une deuxième à 65°C pendant 30 min. Par la suite, l'ADN a été extrait comme mentionné précédemment (section 4.1) à l'exception que l'ADN pouvant se retrouver dans les phases organiques résultantes a été extrait avec 1 volume de TEN. La phase aqueuse obtenue de cette dernière extraction a été finalement additionnée aux précédentes et l'ADN précipité. Le fragment G a ensuite pu être inséré entre les sites *Eco*R V déphosphorylés (se trouvant dans la portion 5' du site de clonage multiple) du vecteur pKS. Les réactions de ligation entre deux fragments d'ADN (fragment/oligo ou insert/vecteur) ont été effectuées dans un tampon contenant; 1X OPA (10X = 100 mM Tris-acétate pH 7,5, 100 mM acétate de magnésium, 500 mM KOAc), 1 mM ATP et 10 U de ligase du phage T4 (Gibco/BRL), à 4°C pendant 16 h. Mentionnons que les rapports molaires utilisés étaient de 200 moles d'oligo/1 mole de fragment ou 2 moles d'insert/1 mole de vecteur.

Les différents clones obtenus après transformation des bactéries par le produit de ligation, ont été sélectionnés par hybridation de colonies (Sambrook *et al.*, 1989). Pour ce faire, les colonies préalablement cultivées sur pétris, ont été transférées sur la membrane de

nylon. La membrane a été ensuite trempée successivement pendant 3 min dans une solution de lyse (1% (p/v) SDS), une solution dénaturante (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), une solution neutralisante (0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) et finalement dans une solution de 2X SSC. Ensuite, la membrane a été séchée 1 h et irradiée pendant 5 min aux UV afin de permettre à l'ADN de se fixer à la membrane. Finalement, la membrane a été hybridée selon le protocole de la section 4.4.3, avec un fragment de 830 pb dont les 400 dernières pb de la portion 3' du gène *bicp27* étaient représentées. Ce fragment provient d'un clone détenu par le laboratoire, contenant le fragment N de la carte *Hin*d III du génome du BHV-1, qui comprend la portion 3' de *bicp27* (voir la Figure 2). L'ADN des clones positifs a été analysé par une digestion *Not* I afin de sélectionner un clone où le gène *bicp27* a été inséré dans la bonne orientation (5'-3') par rapport au promoteur *lac* Z, situé en amont du site de clonage multiple. En effet, la disposition des sites *Not* I chez le vecteur pKS et le fragment G faisait en sorte qu'après digestion, si l'insert s'était intégré dans le sens 5'-3', des fragments de 11, 689, 3086 et 3176 pb étaient obtenus, comparativement à des fragments de 11, 306, 3086 et 3559 pb si le contraire s'était produit (3'-5'). Ainsi, les clones où l'insert s'était intégré dans le sens 5'-3' pourront être différenciés des clones où l'insert se sera intégré dans l'orientation inverse par l'analyse électrophorétique comparative des digestions de différents clones positifs obtenus précédemment. Finalement, le clone obtenu a été nommé pKS/G.

5.2 Clonage du gène *bicp27* dans pET-21b et pcDNA3

Le fragment *Hinf* I de 1,4 kpb, contenant le gène *bicp27*, a été excisé de pKS/G et ligué à l'oligonucléotide 5'-pACTTCTAGACGGATCC-GTCTAGA-3' (contenant un site *Bam*H I (souligné) qui a permi de pouvoir cloner la séquence codante du gène *bicp27* en phase avec le codon d'initiation de la traduction du vecteur pET-21b; Figure 4B). Le produit de ligation a été digéré par *Hinc* II (situé 12 nucléotides en aval du codon d'arrêt) et *Bam*H I (situé 21 nucléotides en amont du codon d'initiation de traduction de la BICP27) et ensuite purifié avec la trousse Geneclean *II*® Kit. Le fragment *Hinc* II/*Bam*H I a été ensuite inséré dans les sites *Bam*H I et *Sal* I de pET-21b. Par contre, l'extrémité 5' dépassante du site *Sal* I pET-21b a été traitée avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli* (Pharmacia) afin de générer une extrémité franche compatible avec l'extrémité *Hinc* II du fragment. Pour ce faire, le tampon Klenow (10X = 500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothréitol) 1X final, 0,5 mM dNTP et 15 U de Klenow ont été ajoutés à pET-21b préalablement digéré par *Sal* I. Après 20 min d'incubation à la température de la pièce, la réaction a été arrêtée par précipitation (ajout d'un volume de 3 M NaOAc et 2 volumes d'éthanol 95%, -70°C pendant 30 min). L'ADN a ensuite été digéré par *Bam*H I, puis purifié sur gel d'agarose (comme mentionné précédemment). Le vecteur pET-21b digéré *Bam*H I et *Sal* I était alors prêt pour la ligation avec le fragment *Hinc* II/*Bam*H I.

Les recombinants bactériens ont été sélectionnés par hybridation de colonies en utilisant comme sonde le fragment *Hind* III/*Xho* I de 1600pb de G, spécifique pour le gène *bicp27* (Figure 4A). Un des clones positifs a été séquencé afin de vérifier la phase de

lecture au niveau de l'ATG (codon d'initiation). Le séquençage a été effectué par la méthode de la terminaison de chaînes (Sanger *et al.*, 1977) avec l'appareil A.L.F.™ de Pharmacia et la trousse «AutoRead™» (Pharmacia). Tous les séquençages ont été accomplis par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier. Le clone sélectionné a été nommé pET-21b/BICP27.

Une fois le clone pET-21b/BICP27^{+} obtenu, la souche *E. coli* BL-21 a été transformée et la souche recombinante résultante, a été soumise à des conditions permettant l'induction de l'expression de la protéine BICP27. Pour ce faire, 100 mL de LB inoculé à partir d'une colonie, ont été incubés à 37°C avec agitation jusqu'à ce qu'une D.O. de 0,6 à 1 à 600 nm soit atteinte. Un aliquot (1 mL) a été prélevé (temps 0; témoin négatif) et ensuite 1 mL de 100 mM d'IPTG a été ajouté à la culture afin d'induire l'expression protéique. Une cinétique d'expression a été effectuée en récoltant des aliquotes à une heure d'intervalle suivant l'induction et ce pendant 6 h. Ensuite, les aliquotes recueillies ont été additionnées de tampon de lyse 1X final (tampon de protéines 1X) et mélangées au Vortex. Les lysats totaux ont ensuite été bouillis 3 min, mélangés, centrifugés à 1000 x g pendant 2 min et directement déposés (phases supérieures protéiques) sur gel de polyacrylamide pour l'analyse de l'induction (voir la section 6.2).

Pour ce qui est du clonage du gène *bicp27* dans le pcDNA3, le fragment *Hin*c II/*Bam*H I contenant ce gène a été introduit dans les sites *Bam*H I et *Eco*R V (se trouvant en aval du promoteur CMV) du vecteur d'expression eucaryotique (Figure 4B). Les recombinants bactériens ont été sélectionnés par une analyse des patrons de restriction

engendrés par une digestion *Xba* I, qui générait un fragment de 1,2 kpb si l'insert (fragment *Hinc* II/*Bam*H I) était présent. Sinon, le vecteur n'était que linéarisé puisqu'il contient un site *Xba* I unique (le deuxième site étant dans l'insert). La phase de lecture au niveau de l'ATG a aussi été vérifiée par séquençage et le clone obtenu a été nommé pcDNA3/BICP27.

Une fois le clone pcDNA3/BICP27^{+} obtenu, nous avons évalué l'expression transitoire du gène *bicp27* chez les cellules eucaryotiques COS-7. À cette fin, des transfections cellulaires ont été effectuées selon le protocole décrit à la section 2.4, dans des plateaux de 6 puits (Linbro, Flow Laboratories), où des cellules COS-7 étaient confluentes à 60-90%. Suite à la transfection, les cellules ont été incubées dans l'étuve pendant 12, 24 ou 48 h, après quoi la cupule correspondante était soumise au protocole de lyse totale suivant. Après avoir retiré le milieu de culture, les cellules COS-7 transfectées ont été lysées par l'ajout de 90 µL par cupule de tampon de protéines 1X. Puis les lysats ont été bouillis 3 min, centrifugés à 1000 x g pendant 2 min et conservés à -20°C. L'analyse de l'expression transitoire de la BICP27 a été effectuée par SDS-PAGE (voir la section 6.2).

6. Manipulation des protéines

6.1 Purification des protéines

La purification des corps d'inclusion (où se retrouvait la BICP27) a été effectuée suite à l'induction de l'expression de la protéine BICP27 chez *E. coli*. Pour ce faire, la

culture de 100 mL de bactéries BL-21 pET-21b/BICP27^{+} induite (section 5.2) a été centrifugée à 5000 rpm pendant 10 min, afin de se débarrasser des débris cellulaires. Le culot obtenu a été congelé/décongelé à trois reprises. Puis, 15 mL d'une solution de 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, ont été ajoutés et le mélange a été incubé 2 h à la température de la pièce. Ensuite, le mélange a été traité par 4 à 6 cycles d'ultrasons (Braun-Sonic 2000, B-Braun; 20 kHertz) d'une période de 30 sec chacun et entrecoupés d'une incubation sur glace de 5 min. Après une centrifugation à 7500 rpm pendant 30 min, le culot (corps d'inclusion bactériens) a été traité avec 5 mL 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1% (p/v) désoxycholate de sodium, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 80 µL de 1 M $MgCl_2$ et 7 µL de DNAse I (7,5 mg/mL), à 37°C pendant 1 h. Une centrifigation à 10 000 rpm pendant 15 min a été effectuée, puis le culot a été dissous dans 5 mL d'une solution de 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% (v/v) de nonidet p-40 (ICN) et a été centrifugé à nouveau. Le culot obtenu a été finalement dissous dans une solution de 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0. Après avoir additionné du tampon de protéine (1X final), l'échantillon a été bouilli pendant 5 min, mélangé au Vortex et conservé à -20°C.

L'analyse de l'échantillon sur SDS-PAGE (section 6.2) nous a permis de constater que cette première purification avait éliminé les contaminants cellulaires majeurs. La technique de purification par électroélution a donc été nécessaire dans un deuxième temps, afin d'obtenir une protéine encore plus pure. Pour ce faire, la préparation de corps d'inclusion obtenue précédemment a été déposée sur un SDS-PAGE préparatif. La bande correspondante à la BICP27 a ensuite été découpée, broyée et introduite dans la colonne de

l'appareil d'électroélution en tubes (Hoefer Scientific Instruments, «GT series gel electrophoresis unit»). Le tampon d'électrode utilisé contenait 25 mM Tris, 192 mM glycine et 0,1% (p/v) SDS et le tampon de dialyse 25 mM Tris et 192 mM glycine. Les sacs à dialyse qui ont été utilisés étaient des Spectra/Por 2 (indice réfractaire: 12-14000 kDa, 10 mm de diamètre, Spectrum, Houston, TX, É-U). L'électroélution a été effectuée sous 130 V pendant 24 h, à 4°C. L'échantillon recueilli de la première électroélution, a été purifié par un deuxième cycle d'électroélution identique et ce, après avoir été déposé sur un deuxième SDS-PAGE préparatif. Finalement, l'échantillon à quantifier (obtenu après deux cycles d'électroélution et recueilli dans de l'eau) et une quantité connue de BSA (un étalon) ont été fractionnés en parallèle sur SDS-PAGE. Le gel coloré résultant a été analysé au densitomètre, ce qui a permis d'estimer la quantité de protéines obtenue du processus de purification par électroélution. En effet, le rapport entre les densités optiques obtenues et la concentration protéique de l'étalon a permis de doser notre échantillon, qui a ensuite servi d'antigène à l'immunisation de souris afin d'obtenir un sérum anti-BICP27 (section 7) et à l'ELISA pour titrer ce sérum (section 7.1).

6.2 Électrophorèse en gel de polyacrylamide

Le protocole d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) a été effectué selon la méthode de Laemmli (1970). La concentration en acrylamide (ICN) du gel de regroupement était de 2% (préparé dans un tampon de 125 mM Tris-HCl pH 6,8 contenant 0,1% (p/v) SDS, 0,05% (v/v) TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine) et 0,13% (p/v) persulfate d'ammonium) et celle du gel de

séparation a varié entre 7,5 et 12,5% (rapport acrylamide:bis-acrylamide 38:1, préparé dans un tampon 0,375 M Tris-HCl pH 8,4 contenant 5 mM EDTA, 0,1% (p/v) SDS, 0,3% (v/v) TEMED et 0,025% (p/v) persulfate d'ammonium). Les électrophorèses analytiques ont été effectués à un voltage constant de 100 à 200 V pour 1 ou 2 h, sur l'appareil «Mini-PROTEAN II Cell» (Bio-Rad), à la température de la pièce. Les électrophorèses préparatives ont été effectuées à 60 V toute la nuit, sur l'appareil «PROTEAN II» (Bio-Rad). Le tampon d'électrophorèse qui a été utilisé était constitué de 25 mM Tris, 0,192 M glycine et 0,1% (p/v) SDS. Suite à l'électrophorèse, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie R-250 (Hames, 1981). Pour ce faire, les gels ont été d'abord trempés dans une solution fixative (30% méthanol, 10% CH_3COOH) pendant 30 min, puis dans une solution de bleu de Coomassie 0,1% (p/v) (préparée dans la solution fixative) pendant 1 h et finalement décolorés dans la solution fixative 16 h. Les gels ont ensuite été séchés entre deux membranes poreuses (Rose Scientific LTD, Maryland, É-U) après avoir été incubés 1 h dans une solution composée d'éthanol 20% et de 10% (v/v) glycérol.

6.3 Transfert de type Western et immunoempreinte

Suite à l'électrophorèse des protéines, celles-ci ont été électro-transférées sur une membrane de difluorure de polyvilidène de 0,2 micron (PVDF; Bio-Rad) et ce avec l'appareil «Trans-Blot Cell» de Bio-Rad. Le transfert a été effectué à 50 V dans le tampon d'électrophorèse contenant 20% (v/v) de méthanol et ce pendant 45 min pour les gels analytiques de 0,75 mm d'épaisseur, 90 min pour les gels de 1,5 mm et pendant 3 h pour les gels de 1,5 mm d'épaisseur et 20 cm de longueur (gels préparatifs) . Après le transfert,

la membrane a été incubée 1 h dans une solution 1% (p/v) de BSA préparée dans du TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl et 0,01% (p/v) merthiolate de sodium) afin de bloquer les sites d'adsorption résiduels. De façon générale, les puits correspondants aux standards de masses moléculaires pré-colorés ont été retirés avant le blocage afin d'éviter que les bandes pâlissent. La membrane a été incubée 2 h avec le sérum ou l'anticorps de souris monoclonal anti-T7-Tag dilué 1/10 000 dans une solution de TBS-T (TBS contenant 0,1% (p/v) de Tween-20; ICN). Puis, la membrane a été lavée trois fois dans une solution de TBS-T, pendant 10 min et a été incubée 2 h avec un anticorps conjugué à la péroxydase reconnaissant le premier anticorps de souris (soit l'anti-IgG de souris produit chez le lapin; CAPPEL™ Research Products, Durham, NC, É-U); préalablement dilué 1/10 000) dans une solution de TBS-T. Après avoir lavé la membrane trois fois, celle-ci a été révélée par incubation dans une solution de développement constituée de 50 mg de 3-3' diamino-benzidine hypochloride (Sigma) dissous dans 100 mL de TBS (puis filtrée sur du papier Whatman 3M) et à laquelle a été ajouté 1 mL de 3% (v/v) H_2O_2. La réaction chimique a été arrêtée par lavage de la membrane dans de l'eau distillée.

7. Développement d'un sérum polyclonal anti-BICP27

La protéine de fusion T7-Tag/BICP27 purifiée par électroélution a été injectée chez des souris BALB/c afin de produire un sérum polyclonal. Pour ce faire, trois injections intrapéritonéales ont été effectuées à deux semaines d'intervalles. La première a été co-administrée avec de l'adjuvant de Freund complet (Sigma) et les deux suivantes avec l'adjuvant de Freund incomplet (Sigma). Chacune des immunisations a été effectuée avec

50 µg de protéine pure. Finalement, une quatrième injection par voie intraveineuse a été effectuée 3 jours avant la collecte du sang afin d'augmenter le titre du sérum.

7.1 Titrage du sérum en ELISA

Les anticorps spécifiques à la protéine BICP27 ont été titrés par ELISA indirect tel que décrit par Payment et collaborateurs (1979). L'antigène a été dilué à la concentration optimale préalablement établie, soit de 10 ng/puits pour la BICP27 pure (préparation décrite à la section 6.1) et de 0,5 µg/puits pour les lysats de cellules infectées (préparation décrite à la section 3.4) et ce dans du tampon PBS sans calcium ni magnésium (Gibco/BRL) de façon à ce qu'il y est 100 µL d'antigène par cupules d'un plateau Linbro de 96 puits. Après avoir incubé le plateau pendant 16 h à 4°C (afin que les antigènes soient adsorbés) et vidangé le plateau, les sites résiduels ont été bloqués durant 1 h avec 150 µL de diluant ELISA (PBS sans calcium ni magnésium contenant 10% (v/v) de SVF). Des dilutions sériées d'anticorps ont été effectuées dans le diluant ELISA contenant 0,2% (v/v) Tween-20, dans un volume final de 100 µL par puits. La réaction antigènes/anticorps a été incubée 2 h à température ambiante, puis les puits ont été lavés 5 fois avec une solution de lavage (PBS avec 0,1% (v/v) Tween-20) et ensuite vidés. La sélection des anticorps fixés a été réalisée à l'aide d'un antisérum dirigé contre les IgG de souris et conjuguées à la péroxydase. L'anticorps conjugué a été utilisé à une dilution 1/1000, effectuée dans le diluant ELISA contenant 0,05% (v/v) Tween-20, à raison de 100 µL par cupule. Le mélange a été incubé durant 1 h à température ambiante, puis les puits ont été lavés 5 fois avec la solution de lavage. La réaction a été révélée par une incubation de 30 min à

l'obscurité avec 100 µL de la solution substrat-chromogène (50 mM acide citrique, 0,1 M Na2HPO4 pH 5, 0,04% (p/v) O-phénylène diamine, 3% (v/v) H2O2). La réaction a été arrêtée par l'addition de 100 µL de 1 N HCl dans chaque puits. La réaction colorimétrique a été mesurée à une longueur d'ondes de 492 nm sur un lecteur EAR400AT (SLT-Labinstruments, Autriche). Le titre d'un antisérum est exprimé par la réciproque de la plus haute dilution donnant une densité optique supérieure à la moyenne des densités optiques d'un sérum témoin, à laquelle est ajoutée deux fois la valeur de l'écart type.

8. Manipulation des ARNs et transfert de type Northern

Les ARNs totaux des cellules de la lignée cellulaire MDBK/BICP27+ ou encore des cellules MDBK infectées par le BHV-1, ont été isolés à l'aide du TRIzolTM («Total RNA Isolation Reagent»; Gibco/BRL) selon les directives du manufacturier. Les ARNs totaux obtenus ont ensuite été dosés au spectrophotomètre à 260 nm en utilisant la relation : 1 D.O.260 nm = 40 µg/mL (Sambrook et al., 1989). Les ARNm présents dans la préparation de cellules infectées avec le BHV-1 ont été sélectionnés par chromatographie sur oligo(dT)-cellulose en utilisant les conditions décrites par l'équipe de Sambrook (1989). Les ARNm-polyA+ obtenus ont ensuite été dosés au spectrophotomètre à 260 nm.

Préalablement à l'électrophorèse, les ARNs ont été traités au glyoxal selon la méthode de Carmichael et McMaster (1980) : 10 µg d'ARNs totaux ont été dénaturés à 50°C pendant 1 h, dans 15 µL de 1 M glyoxal déionisé, 50% (v/v) DMSO et 10 mM Na H2PO4 pH 7. Après incubation, les échantillons ont immédiatement été déposés sur un gel

d'agarose 1,5% préparé dans un tampon 10 mM NaH2PO4 pH 7. Afin d'éviter la dégradation des ARNs, toutes les solutions ont préalablement été traitées au diéthyl pyrocarbonate (DEPC; Sigma) 0,05% (v/v) et autoclavées. La migration a été effectuée à 50 V pendant 3 h en utilisant comme tampon d'électrode une solution 10 mM Na H2PO4 pH 7 préparée dans de l'eau traitée au DEPC. Après la migration, le puits correspondant aux marqueurs a été découpée, colorée 30 min dans 30 µg/mL d'acridine orange préparé dans un tampon 10 mM Na H2PO4 pH 7, puis décolorée dans le tampon d'électrode toute la nuit à 4°C. Enfin, les marqueurs de taille ont été photographiés sur un trans-illuminateur UV. Les ARNs fractionnés dans la portion non-colorée du gel ont été immédiatement transférés sur une membrane de nylon (Hybond-N; Amersham). Le transfert de type Northern a été effectué par capillarité en utilisant comme solution de transfert du 20X SSC. La membrane a été récupérée, séchée, irradiée aux UV pendant 5 min et chauffée sous vide à 80°C pendant 2 h afin d'éliminer le glyoxal.

Par la suite, l'hybridation a été réalisée avec une sonde spécifique pour le gène bicp27. La sonde a été préparée de la même façon que décrite au point 4.4.2, par contre les conditions d'hybridation de la sonde d'ADN aux échantillons d'ARN ont été différentes. La membrane a été incubée dans 10 mL d'une solution de préhybridation (6X SSC, 10X Denhardt's, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,1% (p/v) SDS, 50% (p/v) de formamide et 50 µg/mL d'ADNss), à 42°C pendant 5h. Puis, la membrane a été transférée dans 10 mL d'une solution d'hybridation (identique à la précédente, mais contenant 400 µg/mL d'ADNss plutôt que 50 et la sonde moléculaire marquée au [a-32P]dCTP), à 42°C, pendant 16 h (Rochaix et van Dillewijn, 1982). La membrane a été lavée comme décrit en 4.4.3 à

l'exception que le tout a été effectué à 42°C et que le dernier lavage avec la solution 0,1X SSC, n'a pas été effectué. La membrane a été ensuite exposée comme décrit précédemment (section 4.4.3).

RÉSULTATS

1. Clonage du gène codant la BICP27 et expression protéique

La présente recherche visait, entre autres, à analyser la cinétique d'expression de la protéine BICP27 au cours du cycle infectieux du BHV-1. Nous avons donc cloné et exprimé le gène *bicp27*, puis purifié la protéine BICP27 afin de développer un sérum anti-BICP27 spécifique, nécessaire à l'analyse cinétique.

Tout d'abord, l'ORF complet codant la BICP27 a été exprimé chez *E. coli* sous forme de protéine de fusion avec le peptide T7-Tag codé par le vecteur d'expression procaryotique pET-21b. Lors des premières expériences, l'induction des bactéries recombinantes (pET-21b/BICP27) par l'IPTG n'a pas permis d'obtenir l'expression de la protéine de fusion de façon abondante. En effet, seule l'immunodétection des protéines solubilisées des corps d'inclusion des bactéries induites recombinantes pour pET-21b/BICP27 (fractionnées en SDS-PAGE, puis électro-transférées sur une membrane de PVDF) effectuée en utilisant l'anticorps monoclonal commercial reconnaissant le peptide T7-Tag, a permis de détecter une protéine de la masse moléculaire similaire (50 kDa) à celle attendue (45,4 kDa). Le niveau d'expression de la BICP27 était donc trop faible pour être détecté par la coloration au bleu de Coomassie d'un SDS-PAGE. Le postulat suivant a alors été émis : cette faible expression pourrait originer de la carence, chez *E. coli*, au niveau de la biosynthèse d'un acide aminé codé à un taux élevé par l'ORF du gène *bicp27*. En effet, l'analyse des codons de la séquence de *bicp27* révèle la présence d'un taux élevé de codons alanine (15,75%), arginine (11,5%) et leucine (10,5%). Nous avons aussi observé que la séquence présente une région extrèmement riche en arginines : soit la région

comprenant les codons 241 à 290 où 12 acides aminés sur 17 (70,6%) étaient des arginines (situation non-observée pour l'alanine et la leucine). Nous soupçonnions donc que la présence de cette région nécessitait, afin d'assister à une production massive de la BICP27, une quantité d'arginines que *E. coli* ne pouvait délivrer et qui aurait comme conséquence d'engendrer la synthèse de la protéine BICP27 soit sous une forme tronquée ou soit de la BICP27 en de très faibles quantités. Alors, afin de maximiser le taux d'expression de la protéine de fusion T7-Tag/BICP27, nous avons opté pour cultiver les bactéries recombinantes dans un milieu relativement riche (TB au lieu de LB) additionné d'argines, à la température de la pièce plutôt qu'à 37°C, et sans agitation. Sous ces conditions, une protéine de 50 kDa semblait apparaître après une coloration au bleu de Coomassie suivant un SDS-PAGE. Ce dernier résultat a été confirmé par une immunoempreinte effectuée à l'aide de l'anti-T7-Tag (Figure 5A). Cet anticorps a reconnu spécifiquement une protéine de 50 kDa des protéines solubilisées des corps d'inclusion des bactéries induites recombinantes pour pET-21b/BICP27 (puits 2), mais pas dans celui où les bactéries induites ne contenaient que le vecteur pET-21b (puits 1; témoin négatif). Finalement, la protéine exprimée de façon plus abondante (relativement à la première expérience), a donc pu être produite et purifiée pour servir d'antigène pour le développement d'un sérum anti-BICP27.

Figure 5: **A)** Immunodétection de la BICP27 dans les corps d'inclusion avec l'anticorps monoclonal anti-T7-Tag comparativement au sérum polyclonal anti-BICP27 de souris.

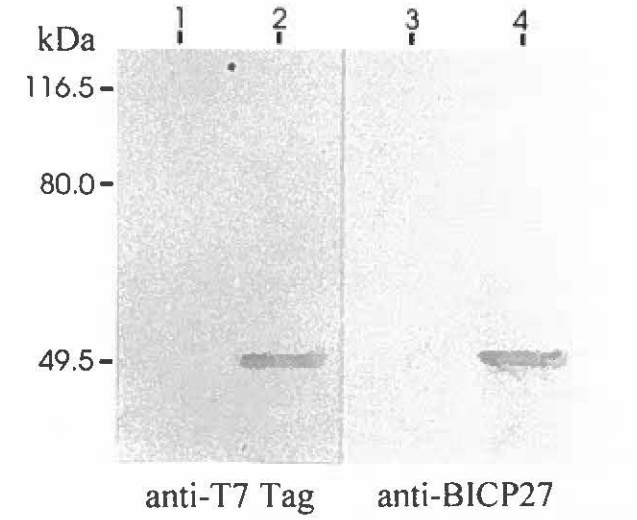
Les protéines solubilisées des corps d'inclusion des bactéries ne contenant que le vecteur pET-21b (puits 1 et 3; témoins négatifs) ou recombinantes pET-21b/BICP27 (puits 2 et 4) en conditions inductrices, ont été fractionnées en SDS-PAGE et transférées sur une membrane de PVDF. La membrane a ensuite été utilisée pour l'immunoempreinte à l'aide de : l'anticorps monoclonal anti-T7-Tag (à gauche; dilution de 1/10 000) et du sérum polyclonal anti-BICP27 (à droite; dilution de 1/10 000) de souris. Les masses moléculaires (kDa) des marqueurs de taille sont inscrites à gauche de la figure.

B) Cinétique d'expression de la BICP27 au cours du cycle infectieux du BHV-1.

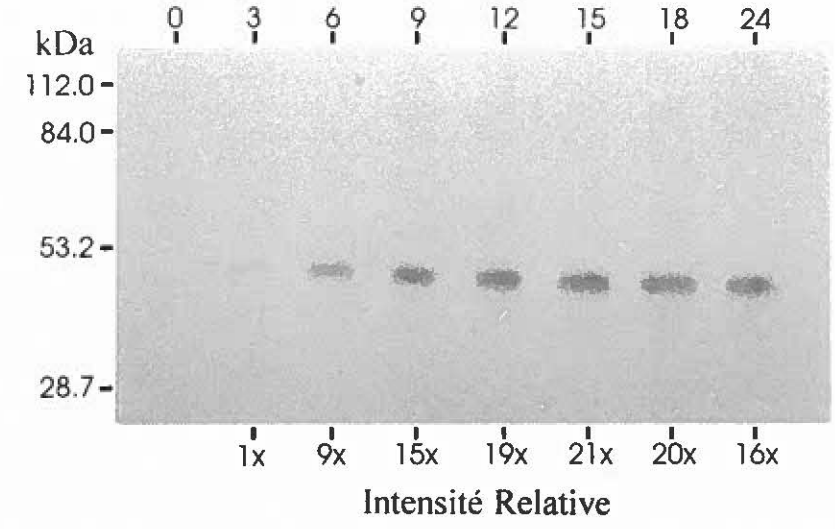
Les protéines des lysats de cellules MDBK infectées de 3 à 24 heures suivant l'infection par le BHV-1 (puits 3 à 24) ont été fractionnées en SDS-PAGE en parallèle avec un lysat de cellules MDBK non-infectées (puits 0; témoin négatif). Le sérum polyclonal anti-BICP27 de souris (dilution 1/10 000) a été utilisé pour l'immunodétection. Les masses moléculaires (kDa) des marqueurs de taille sont inscrites à gauche.

Une analyse utilisant un appareil semblable au densitomètre («scanner ScanJet IICX»; Hewlett Packard) nous a permis d'obtenir les intensités relatives (i.r.) correspondantes à chacune des bandes observées sur l'immunoempreinte. Les données ont été digitalisées à l'aide du programme informatique «Jandel Video Analysis Software» (Jadel Scientific, CA, É-U). L'intensité relative de chacune des bandes observées a été calibrée à partir de celle de la première bande visible (1x) et ce, pour chacune des cinétiques. Ainsi, l'intensité colorimétrique de chacune des bandes une fois digitalisée et calibrée permet d'extrapoler le tout comme étant des abondances relatives de protéines, qui sont indiquées au bas de la figure (x).

A


kDa
1
2
3
4
116.5
80.0
49.5
anti-T7 Tag
anti-BICP27

B


kDa
0
3
6
9
12
15
18
24
112.0
84.0
53.2
28.7
1x
9x
15x
19x
21x
20x
16x
Intensité Relative

2. Production d'un sérum polyclonal anti-BICP27

Le protocole de purification de la chimère T7-Tag/BICP27 qui a été employé consistait à l'utilisation d'un SDS-PAGE préparatif suivit d'une électroélution. L'utilisation de ce protocole à deux reprises consécutives nous a permis dans un premier temps, de purifier la protéine à homogénéité et dans un deuxième, de l'injecter chez quatre souris BALB/c à raison de 50 µg la dose, et ce afin de produire un sérum polyclonal reconnaissant spécifiquement la BICP27.

2.1 Titrage et caractérisation du sérum anti-BICP27

Le titrage du sérum obtenu en ELISA a été évalué à 1/25 600. Le sérum a détecté de façon spécifique la présence d'une protéine de 50 kDa dans les corps d'inclusion du recombinant bactérien pET-21b/BICP27 induit (Figure 5A; puits 4), mais pas dans ceux isolés des bactéries ne contenant que le vecteur pET-21b (puits 3; témoin négatif). Des résultats identiques ont été obtenus d'une immunoempreinte révélée, cette fois-ci, avec l'anticorps monoclonal anti-T7-Tag (Figure 5A; puits 1 et 2). De plus, le sérum a réagit spécifiquement avec une protéine de 49 kDa dans les extraits de cellules MDBK infectées avec le BHV-1 (Figure 5B). La différence de masse moléculaire entre la protéine observée chez les procaryotes comparativement à celle retrouvée chez les eucaryotes est liée à la présence du peptide T7-Tag (1 kDa) chez la première. Pour une démonstration plus exhaustive de cette différence au niveau des masses moléculaires de la BICP27 dépendemment qu'elle soit exprimée comme protéine de fusion avec le T7-Tag chez les

procaryotes ou soit au cours du cycle infectieux du BHV-1 chez les eucaryotes, voir plus loin la Figure 8B (puits c.i. : chimère T7-Tag/BICP27 chez *E. coli*; puits + : BICP27 virale). Rappelons que la masse moléculaire attendue était de 45,4 kDa selon les calculs informatiques effectués à partir de la séquence en acides aminés de la BICP27. Cette similarité entre les masses moléculaires attendues et observées ainsi que celles récemment publiées (Singh *et al.*, 1996), confirme l'identité de la protéine.

3. Cinétiques d'expression de la BICP27

3.1 Analyse de la cinétique traductionnelle

La cinétique d'expression de la protéine BICP27 dans les cellules MDBK infectées par le BHV-1 a été investiguée par une analyse en immunoempreinte des lysats protéiques totaux isolés à différents temps suivant l'infection. Dès 3 h p.i., une protéine de 49 kDa a été spécifiquement reconnue par le sérum anti-BICP27 (Figure 5B; puits 3). L'accumulation de la protéine était maximale vers les 15-18 h p.i. (puits 15 et 18), puis diminuait graduellement jusqu'à 24 h p.i. (puits 24). L'antisérum n'a détecté aucune protéine dans le lysat de cellules MDBK non-infectées (puits 0; témoin négatif) démontrant ainsi la spécificité de la réaction et confirmant, comme mentionné précédemment, l'identité de la protéine détectée comme étant la BICP27. Une analyse informatique des intensités relatives (obtenues par densitométrie) des bandes observées sur l'immunoempreinte a permis d'estimer les abondances relatives de la protéine BICP27 au cours du cycle infectieux du BHV-1. Ces analyses ont été effectuées à cinq reprises et la

variation entre les réplicats n'étant pas significative, les résultats présentés ici correspondent donc à ceux d'une expérience type. Ces résultats montrent que l'abondance de la BICP27 augmente de 21 fois entre 3 et 15 h p.i. (puits 3 et 15).

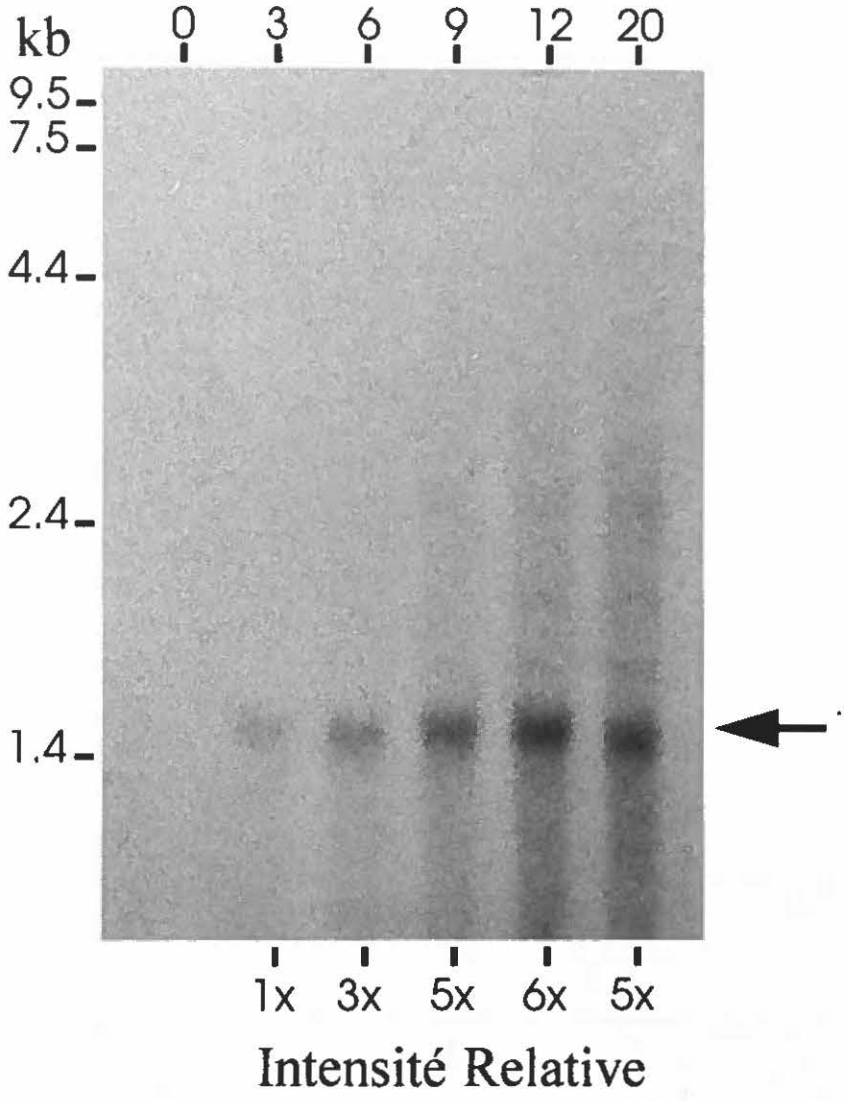
Nous avons aussi tenté de détecter la BICP27 dans les deux premières heures (1 et 2 h p.i.) de l'infection du BHV-1. Le sérum anti-BICP27 n'a détecté aucune protéine (résultats non-montrés) suggérant ainsi que la synthèse de la protéine BICP27 ne débute qu'aux environs de 3 h p.i. Cependant, il demeure possible que la limite de détection de l'immunoempreinte ait été trop faible. Enfin, mentionnons que l'immunodétection de la BICP27 chez le BHV-1 purifié ($DICT_{50}$: $10^{9,6}$/mL) s'est avérée impossible (résultats non-montrés), démontrant que la protéine BICP27 ne constitue pas une composante structurale de ce dernier.

3.2 Analyse de la cinétique transcriptionnelle

La cinétique transcriptionnelle de la BICP27 a été investiguée par une analyse de type Northern des ARN totaux isolés de cellules infectées pour différentes périodes par le BHV-1. Un fragment *Hinf* I de 1,4 kpb, représentant l'ORF complet du gène *bicp27* (Figure 4A), a été utilisé comme sonde pour l'hybridation. Cette sonde a détecté la présence d'un transcrit de 1,7 kb dans les ARNs isolés de cellules infectées avec le BHV-1 durant 3 h (Figure 6; puits 3). L'accumulation du transcrit était maximale à 12 h p.i., puis diminuait graduellement jusqu'à 20 h p.i. La sonde n'a détecté aucun transcrit dans le lysat de cellules MDBK non-infectées (puits 0; témoin négatif), démontrant la spécificité de l'hybridation et confirmant ainsi l'identité du transcrit *bicp27*.

Figure 6: Cinétique d'expression du transcrit de la BICP27 au cours du cycle infectieux du BHV-1.

Les ARNs totaux (10 µg) isolés de cellules MDBK infectées de 3 à 20 heures suivant l'infection par le BHV-1 (puits 3 à 20), ont été traités au glyoxal, fractionnés sur gel d'agarose 1,5%, transférés sur membrane de nylon puis hybridés avec une sonde spécifique au gène *bicp27*. Les ARNs totaux de cellules MDBK non-infectées correspondent au témoin négatif (puits 0). Les intensités relatives des bandes observées ont été obtenues tel que décrit à la Figure 5b et sont indiquées (x). La taille (kb) des marqueurs est inscrite à gauche. La flèche indique le transcrit *bicp27*.


kb
0
3
6
9
12
20
9.5
7.5
4.4
2.4
1.4
1x
3x
5x
6x
5x
Intensité Relative

L'analyse informatique des abondances relatives des bandes observées sur l'autoradiogramme (5 réplicats) montre que l'abondance du transcrit augmentait de six fois entre 3 et 12 h p.i. (puits 3 et 12) et diminuait légèrement vers 20 h p.i. (puits 20; expérience type). Des résultats similaires ont été obtenus avec des ARNs messagers polyA$^+$ isolés de cellules infectées avec le BHV-1 durant 6, 12, 18 et 24 h. Malheureusement, l'analyse informatique des abondances relatives des bandes observées de l'autoradiogramme obtenu s'est avérée impossible à cause d'un trop grand bruit de fond (résultats non-montrés). Par contre, cette expérience a permis de démontrer que le transcrit *bicp27* était toujours présent à 24 h p.i. Aussi, mentionnons que l'exposition prolongée des membranes (ARNs totaux et ARNs polyA$^+$) a révélée la présence d'une bande additionnelle mineure de 3,0 kb (de masse supérieure à celle du transcrit *bicp27* et visible à la Figure 6), qui représente probablement un transcrit 3' co-terminal provenant d'un gène adjacent à celui codant la BICP27 (Wirth *et al.*, 1989).

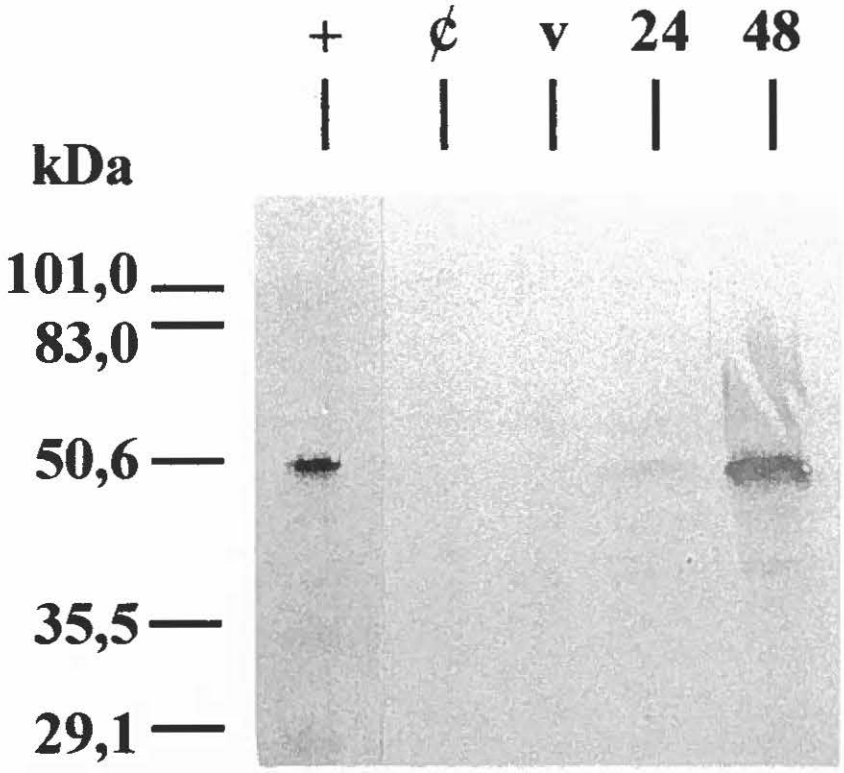
4. Construction et caractérisation d'une lignée MDBK/BICP27$^+$

La construction d'une lignée cellulaire MDBK exprimant de façon constitutive la BICP27 (MDBK/BICP27$^+$) a été effectuée par la transfection de cellules MDBK avec le vecteur d'expression eucaryotique recombinant pcDNA3/BICP27.

Préalablement, nous avions effectué une analyse dite d'expression transitoire afin de vérifier que le vecteur recombinant était apte à exprimer la protéine BICP27 (Figure 7). Ceci a été effectué par la transfection de cellules COS-7 (exprimant de façon constitutive l'antigène T du SV40) avec le vecteur d'intérêt (portant l'origine de réplication du SV40 et

Figure 7: Expression transitoire de la BICP27 chez les cellules COS-7.

Les lysats protéiques totaux des cellules COS-7 transfectées avec la construction pcDNA3/BICP27 (puits 24 et 48, selon le nombre d'heures post-transfection) ou avec le vecteur pcDNA3 (puits v), ont été fractionnés en SDS-PAGE. Un lysat de cellules COS-7 non-transfectées (puits ¢; témoin négatif) et un lysat de cellules MDBK récolté 15 heures p.i. avec le BHV-1 (puits +; témoin positif), ont été analysés en parallèle. Les protéines fractionnées ont été transférées sur une membrane de PVDF, puis immunodétectées avec le sérum polyclonal anti-BICP27 de souris (dilution de 1/10 000). Les masses moléculaires (kDa) des marqueurs de taille sont inscrites à gauche.


+
¢
v
24
48
kDa
101,0
83,0
50,6
35,5
29,1

complémentant ainsi la cellules COS-7 où elle est absente). Après avoir effectué les transfections et analysé les lysats cellulaires en SDS-PAGE, une immunoempreinte a été effectuée à l'aide du sérum anti-BICP27. Une protéine spécifique de 49 kDa a été détectée de façon abondante dans les lysats totaux de cellules COS-7 transfectées avec pcDNA3/BICP27 (puits 24 et 48; correspondant aux nombres d'heures post-transfection), mais pas chez les cellules COS-7 transfectées avec le vecteur pcDNA3 (puits v; témoin négatif) ou encore chez les cellules COS-7 non-transfectées (puits ∉; témoin négatif). De plus, la protéine était de masse moléculaire similaire à celle retrouvée dans le lysat cellulaire MDBK récolté 15 h p.i. avec le BHV-1 (puits +; témoin positif). Ces résultats démontraient que le vecteur recombinant pcDNA3/BICP27 était apte à exprimer la BICP27.

Il a donc été possible par la suite de procéder à la construction de la lignée cellulaire comme telle par la transfection de cellules MDBK avec le plasmide pcDNA3/BICP27. Une cinquantaine de lignées cellulaires résistantes à la drogue sélective (G-418) ont été isolées, clonées puis analysées par immunoempreinte à l'aide du sérum anti-BICP27.

4.1 Immunodétection de la protéine BICP27 chez les lignées cellulaires MDBK/BICP27$^+$ #A4, #6 et #14

Une analyse par immunoempreinte des lignées MDBK potentiellement BICP27$^+$ a été effectuée afin de déceler la présence de la protéine BICP27. L'immunodétection avec l'anti-BICP27 a révéler une protéine spécifique de 49 kDa dans les lysats protéiques totaux de trois lignées MDBK/BICP27$^+$ #4, #6 et #14 (Figure 8B; puits A4; seuls les résultats de la lignée #A4 présentant le plus haut niveau d'expression sont montrés). Aucune protéine de

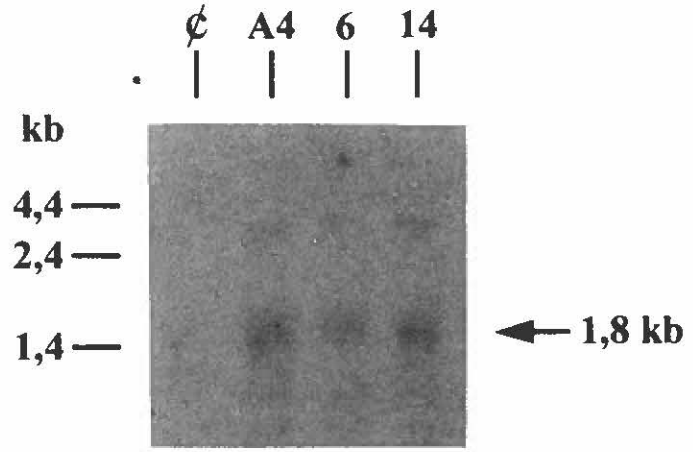
Figure 8: **A)** Analyse de type Northern des lignées cellulaires résistantes à la néomycine afin de détecter le transcrit de la BICP27.

Les ARNs totaux des lignées MDBK résistantes à la néomycine (puits A4, 6 et 14; correspondant aux numéros des lignées) et de cellules MDBK (puits ¢; témoin négatif) ont été purifiés, traités au glyoxal, fractionnés sur gel d'agarose 1,5%, transférés sur une membrane de nylon et hybridés avec une sonde spécifique au gène *bicp27*. La flèche indique où se retrouve le transcrit *bicp27* ainsi que sa taille. La taille des marqueurs (kb) est inscrite à gauche.

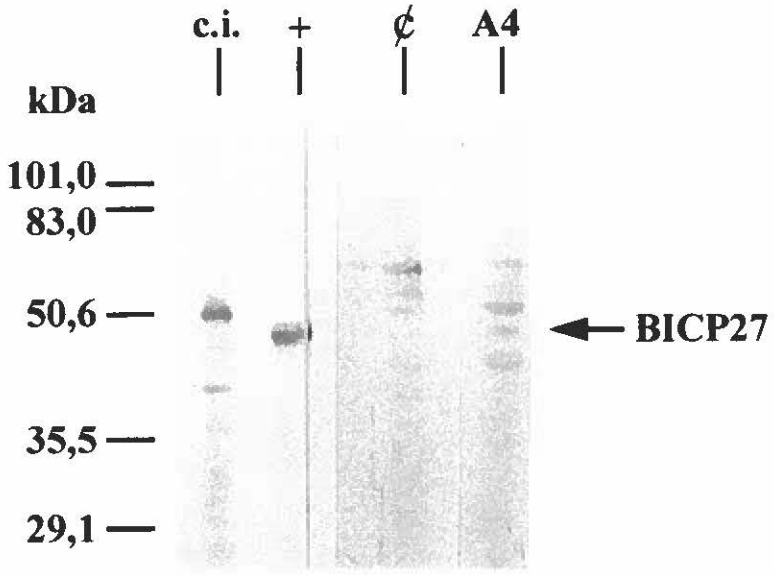
B) Immunodétection de la protéine BICP27 chez la lignée cellulaire MDBK/BICP27$^+$ #A4.

Le lysat protéique total de la lignée MDBK/BICP27$^+$ #4 (puits A4) a été fractionné en SDS-PAGE en parallèle avec un lysat de cellules MDBK (puits ¢; témoin négatif), un lysat de bactéries *E. coli* pET-21b/BICP27$^+$ (puits c.i.; témoin positif) et un lysat de cellules MDBK infectées 15 heures avec le BHV-1. (puits +; témoin positif). Les protéines fractionnées ont été électro-transférées sur une membrane de PVDF puis immunodétectées avec le sérum polyclonal anti-BICP27 de souris (dilution de 1/10 000). La flèche indique la BICP27. Les masses moléculaires (kDa) des marqueurs de taille sont inscrites à gauche de la figure.

A



B



cette grosseur n'a été détectée dans les lysats de cellules MDBK (puits ¢; témoin négatif), confirmant la spécificité de l'immunodétection. Curieusement, le sérum anti-BICP27 montrait des réactions croisées avec plusieurs protéines de la cellule hôte (puits ¢), alors qu'aucune réaction de ce type n'avait été révélée lors de l'analyse de la cinétique traductionnelle de la BICP27 (puits +).

4.2 Hybridation de type Northern des trois lignées cellulaires MDBK/BICP27$^+$ #4,#6 et #14 afin de détecter le transcrit *bicp27*

L'analyse par hybridation de type Northern des trois lignées exprimant la BICP27 a été effectuée afin de confirmer la présence d'un transcrit spécifique au gène *bicp27* chez ces dernières, étant donné le faible taux d'expression de la protéine. Un fragment interne de l'ORF du gène *bicp27* de 776 pb (fragment *Bgl* II/*Hin*d III de pKS/G; Figure 4B) utilisé comme sonde, a hybridé de façon spécifique un transcrit de taille attendue (1,8 kb; Figure 8A) chez les trois lignées (puits A4, 6 et 14; correspondant aux numéros des lignées). Aucun transcrit n'a été détecté dans le puits contenant les ARNs totaux de cellules MDBK non-transfectées (puits ¢; témoin négatif), confirmant la spécificité de l'hybridation et ainsi, l'identité des trois lignées cellulaires comme étant MDBK/BICP27$^+$.

Finalement, nous avons débuté la caractérisation de la lignée MDBK/BICP27$^+$ #A4 puisqu'elle présentait le plus haut taux d'expression des trois lignées. Cette caractérisation a été effectuée en investiguant la stabilité de l'expression de la protéine BICP27. L'analyse a été réalisée par des passages successifs de la lignée #A4 dans un milieu non-sélectif (sans G-418). La protéine BICP27 a été immunodétectée dans les lysats protéiques totaux de la lignée et ce, même à la suite de cinq passages successifs en absence de drogue sélective

(résultats non-montrés). Ces résultats montrent que l'expression de la BICP27 est stable et suggèrent que le plasmide recombinant s'est intégré dans l'ADN chromosomique cellulaire.

DISCUSSION

1. Identification de la protéine BICP27 et de son transcrit

L'analyse de la portion 5' de la séquence génomique du BHV-1 a permis l'identification du gène codant une protéine de 400 acides aminés qui a été désignée *bicp27* (Singh *et al.*, 1996), due à son homologie avec l'*icp27* de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1). La comparaison des séquences en acides aminés (Singh *et al.*, 1996) montre que la portion carboxylique de la protéine BICP27 possède une homologie plus marquée (60% de résidus identiques) que sa région aminée (25-35% de résidus identiques), envers les homologues de l'ICP27 de différents alphaherpèsvirus. Aussi, la portion aminée de la protéine contient une quantité significative de résidus arginines qui pourraient jouer un rôle dans la répartition intracellulaire uniforme de la protéine lors de l'infection (Singh *et al.*, 1996) et dans l'induction de l'expression des gènes tardifs du BHV-1 (Hibbard et Sandri-Goldin, 1995). L'analyse montre aussi que certains résidus sont conservés dans toute la famille des homologues de l'ICP27, dont les résidus histidine 367 et cystéine 371, 376 qui sont essentiels à la fonction de la protéine chez le VZV (Pereira *et al.*, 1994). De plus, la BICP27 contient un motif «doigt de zinc» (Singh *et al.*, 1996), caractéristique qui semble être essentielle chez plusieurs trans-activateurs comme l'ICP0 (Everett, 1987, 1988) et l'ICP27 du HSV-1 (Berg, 1986), la protéine 62 du VZV (Tyler et Everett, 1994) ou encore chez les ARNs 2,9 et 2,6 du BHV-1 (Wirth *et al.*, 1992).

L'ORF du gène *bicp27* est contenu dans le segment U_L du génome du BHV-1 et débute à la position 2860 (en nucléotide) pour se terminer à la position 1660. Cet ORF est donc porté sur le brin négatif du génome viral, dans le fragment G *Hpa* I. Le sérum

monospécifique anti-BICP27 généré suite à l'expression du polypeptide chez *E. coli* a permis la détection d'une protéine virale spécifique de 49 kDa. La masse apparente observée était similaire à celle rapportée (50 kDa) suite à une immunoempreinte effectuée avec un sérum immun généré par immunisation avec un peptide synthétique représentant les 14 premiers acides aminés de la séquence du polypeptide (Singh *et al.*, 1996). Cette observation confirme donc que le polypeptide identifié représente la BICP27. La différence entre la masse apparente observée et celle attendue (45,4 kDa) de la protéine est similaire à celle rapportée pour l'ICP27 (63 kDa versus 55,2 kDa; Pereira *et al.*, 1977; Ackerman *et al.*, 1984; McGeoch *et al.*, 1988).

Pour ce qui est des réactions croisées que le sérum anti-BICP27 démontrait envers certaines protéines cellulaires de la lignée MDBK transfectée par la construction pcDNA3/BICP27, réactions toutefois absentes chez celles de la lignée infectée par le BHV-1, elles pourraient s'expliquer par la présence d'un gène «d'arrêt de la synthèse protéique cellulaire» (Simard *et al.*, 1992) exprimé par le virus dans la cellule infectée. Ce gène ayant comme rôle de supprimer la synthèse de protéines cellulaires chez le HSV-1 (Kwong *et al.*, 1988), la cellules infectée devient alors essentiellement une fabrique pour les protéines virales, ce qui n'est pas le cas chez la cellules transfectée (où le virus est absent). Donc, selon cette hypothèse, la présence en quantités moindre de protéines cellulaires chez la cellules infectée par le BHV-1 et donc moins disponibles pour permettre une réaction croisée, aurait comme conséquence l'effet observé, soit d'une immunoempreinte plus propre comparativement à celle observée chez la cellule transfectée. Toutefois, mentionnons qu'une pré-absorption du sérum anti-BICP27 sur un extrait de cellules MDBK

non-infectées avant son utilisation pour l'immunodétection de la BICP27 chez les cellules transfectées, n'a pas permis d'éliminer ces réactions croisées.

Un transcrit viral de 1,7 kb a spécifiquement hybridé avec une sonde représentant la séquence codante de la BICP27. La grosseur du transcrit observé correspond bien avec celle rapportée dans une étude investiguant la distribution des transcrits viraux sur le génome du BHV-1 et où un transcrit de 1,7 kb originant du fragment *Hin*d III N (chevauchant le fragment G *Hpa* I; Figure 2) avait été identifié (Wirth *et al.*, 1989). Il en est de même par rapport aux résultats de l'équipe de Singh (1996).

2. Comparaison des profils d'expression des gènes *icp27* et *bicp27*

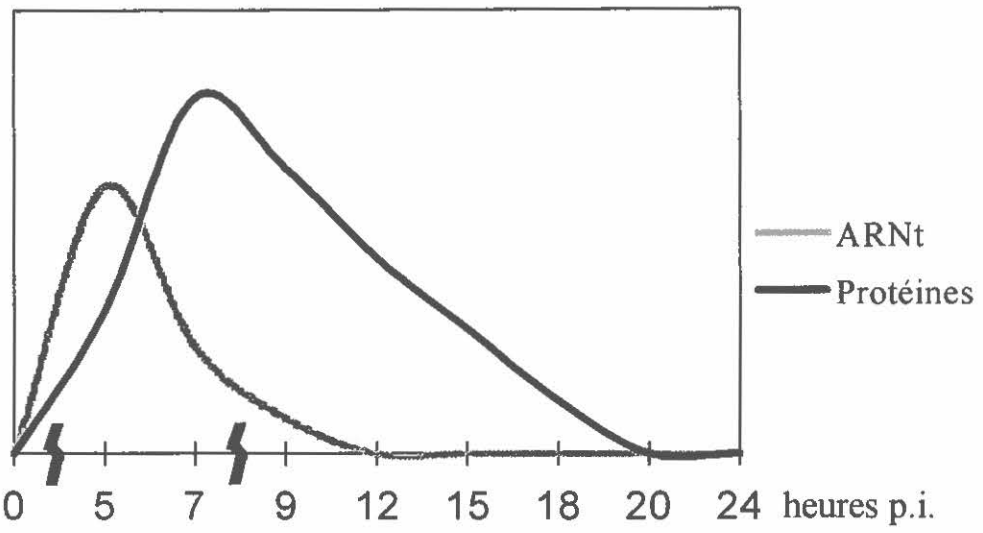
Les profils d'expression du gène *icp27* du HSV-1 comportent les caractéristiques suivantes : au niveau transcriptionnel, l'ARNm de 1,8 kb (Mackem et Roizman, 1982) est détectable dès 1 h p.i. Le niveau d'expression du transcrit augmente continuellement pour atteindre son maximum à 5 h p.i., puis diminue de façon drastique à 7 h p.i.; le transcrit n'est plus détectable à 12 h p.i. (Honess et Roizman, 1974, 1975; Sandri-Goldin, 1991). Ce type de profil est caractéristique des gènes classés précoce-immédiats (α). Le profil d'expression au niveau traductionnel suit essentiellement celui obtenu au niveau transcriptionnel, à l'exception que la protéine est encore faiblement détectable de 12 à 18 h p.i. (Honess et Roizman, 1975; voir les profils cinétiques de l'*icp27* à la Figure 9).

Figure 9: Représentations graphiques des profils cinétiques de l'ICP27 et de la BICP27.

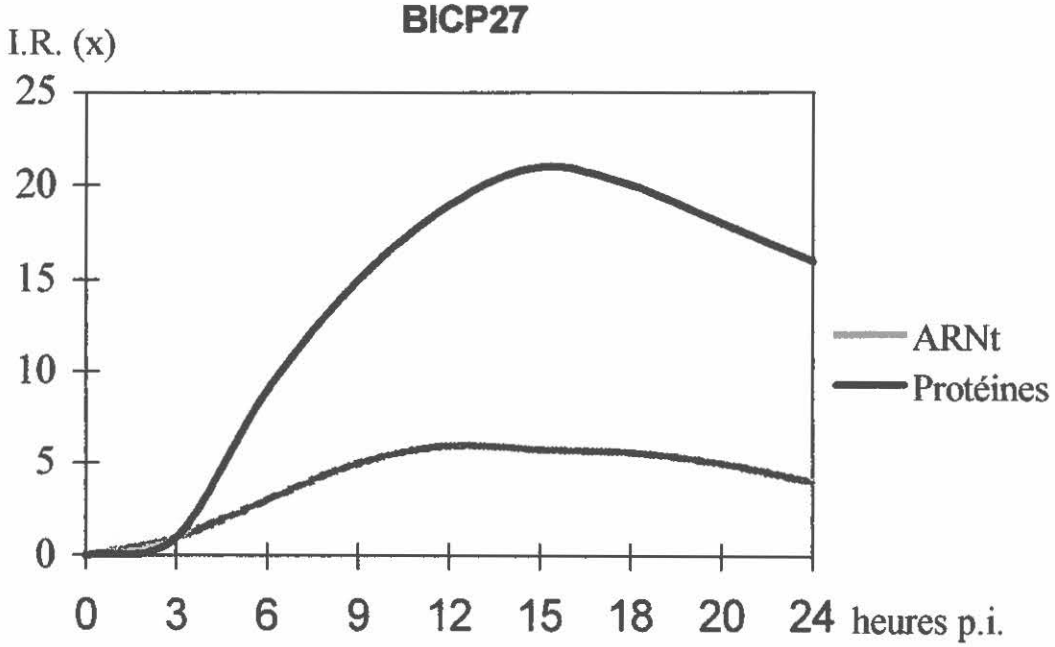
En haut : profils des cinétiques transcriptionnelle et traductionnelle de l'ICP27 au cours du cycle infectieux du HSV-1. Les profils des temps d'apparition du transcrit *icp27* et de la protéine ICP27 sont représentés à titre illustratif puisqu'aucune i.r. n'est disponible dans la littérature (aucune échelle à l'axe des x). Le nombre d'heures post-infection auquel les échantillons ont été récoltés est indiqué à l'axe des x (Honess et Roizman, 1974, 1975; Mackem et Roizman, 1982; Sandri-Goldin, 1991).

En bas : profils des cinétiques transcriptionnelle et traductionnelle de la BICP27 au cours du cycle infectieux du BHV-1. Les i.r. (x) des bandes observées aux Figures 5B (protéines) et 6 (transcrits) de ce mémoire sont représentées. Les i.r. sont inscrites à l'axe des y et le nombre d'heures post-infection auquel les échantillons ont été récoltés est indiqué à l'axe des x.

ICP27



BICP27



Par comparaison, les profils d'expression du gène codant la BICP27 du BHV-1 comportent plusieurs différences (Figure 9). En effet, le transcrit *bicp27* n'est détecté que 3 h p.i., son abondance maximale est atteinte à 12 h p.i., puis diminue graduellement jusqu'à 24 h p.i. Le profil d'expression traductionnelle suit essentiellement celui observé au niveau transcriptionnel. Ainsi les profils d'expression de la BICP27 fluctuent de manière distincte de ceux de l'ICP27, suggérant des différences dans la fonction des deux protéines. Les profils que nous avons observés correspondent au patron typique d'expression des gènes précoces (β) plutôt que précoce-immédiats (α), comme celui de l'ICP27 (cette étude et Singh *et al.*, 1996). Nos résultats corroborent ceux de l'équipe de Wirth (1989) rapportant la détection d'un transcrit β spécifique de 1,7 kb originant du fragment *Hind* III N ainsi que ceux de l'équipe de Koppel (1995). Mentionnons que d'autres homologues de l'ICP27, telles UL3 du EHV-1 (Zhao *et al.*, 1992) et UL69 du CMV (Winkler *et al.*, 1994) présentent des cinétiques β comparables à la BICP27. Toutefois, mentionnons qu'il serait intéressant de répéter les analyses cinétiques transcriptionnelles dans les toutes premières minutes de l'infection afin de déterminer si l'absence de la protéine BICP27 observée pour cette période est la conséquente d'une lacune au niveau de la transcription (transcrits et protéines absents) ou au niveau de la traduction (transcrits présents mais protéines absentes).

Aussi, les profils d'expression observés de la BICP27 suggèrent que le polypeptide est requis jusqu'à très tardivement (24 h p.i. comparativement à 12 h p.i. pour l'ICP27) dans le cycle réplicatif du BHV-1. Il est intéressant de noter que de 3 à 12 h p.i. le profil d'expression du polypeptide BICP27 progresse en parallèle avec celui de son transcrit,

mais que l'accumulation en protéines s'avère 3 fois plus élevée que celle des transcrits. En effet, à 12 h p.i. le niveau du transcrit *bicp27* est 6 fois plus élevé que celui observé à 3 h p.i., alors que celui de la protéine, est lui, 19 fois plus élevé. Cette observation indique que la BICP27 est sujette non seulement à un contrôle transcriptionnel, mais aussi à un contrôle traductionnel ou post-traductionnel. La diminution des niveaux d'expression de l'ICP27 et de la BICP27 pourrait refléter une baisse dans la nécessité de la protéine par le virus, aussi bien qu'une autorégulation de l'expression protéique une fois le niveau maximal atteint. L'hypothèse de ce mode de régulation, traductionnelle ou post-traductionnelle, est supportée par l'observation que le niveau d'expression de l'ICP27 d'un mutant thermosensible portant des lésions au niveau de l'*icp27* , est beaucoup plus élevé (accumulation) et pour une durée prolongée (stabilisation), comparativement au type sauvage (Sandri-Goldin *et al.*, 1981; Sacks *et al.*, 1985). L'absence de la régulation effectuée par l'ICP27 serait donc perceptible au niveau de sa propre accumulation et stabilisation (contrôles traductionnels ou post-traductionnels).

Enfin, mentionnons que l'équipe de Singh (1996) a récemment rapporté que la BICP27 joue un rôle dans la maturation des ARNs messagers viraux, tout comme l'ICP27 (Sandri-Goldin et Mendoza, 1992; McLauchlan *et al.*, 1992), augmentant ainsi l'efficacité de maturation des ARNm précurseurs contenant des signaux polyA$^+$ non-fonctionnels (exemple, le transcrit de la gB du BHV-1). Il semble donc que certaines fonctions de l'ICP27 soient préservées chez la BICP27, même si les deux protéines proviennent de gènes de classes cinétiques différentes.

3. Développement et caractérisation de la lignée MDBK/BICP27$^+$

En parallèle à ces travaux, nous avons développé une lignée MDBK exprimant de façon constitutive la protéine BICP27 (MDBK/BICP27$^+$) et ce, afin de pouvoir investiguer davantage le rôle de cette protéine dans la réplication et la pathogenèse du BHV-1 par la construction éventuelle d'un mutant de délétion du gène *bicp27* (BHV-1/BICP27$^-$). Dans le cas où la BICP27 serait requise à la réplication virale, une lignée BICP27$^+$ s'avérerait en effet essentielle à la maintenance du mutant *in vitro* en permettant de suppléer l'absence de la protéine chez le mutant.

L'approche qui a été privilégiée pour la construction de la lignée était l'expression constitutive de la protéine BICP27 dans les cellules MDBK permissives au BHV-1. Cette approche aurait permis d'infecter les cellules de cette lignée avec le mutant viral sans avoir à induire la synthèse de la protéine clonée. Le vecteur eucaryotique pcDNA3 qui a été utilisé possède entre autres, un promoteur fort d'induction de l'expression et des séquences favorisant l'intégration de l'ADN plasmidique dans le génome cellulaire. Selon la littérature, ces facteurs sont importants à l'établissement d'une lignée stable présentant un haut taux d'expression du gène cloné (Southern et Berg, 1982; Boshart *et al.*, 1985; DeBernardi *et al.*, 1991). Plusieurs colonies MDBK/BICP27$^+$ résistantes à la néomycine ont été isolées. Cependant, aucune n'a démontré un haut niveau d'expression de la BICP27.

Ce faible taux d'expression pourrait s'expliquer, entre autres, par la toxicité de la synthèse de la BICP27 pour les cellules recombinantes, ce qui aurait occasionné l'isolement de lignées recombinantes n'exprimant que très faiblement la BICP27, qui seraient alors les seules à pouvoir survivre. Une deuxième hypothèse serait que la BICP27 soit une trans-activatrice et qu'elle agisse au niveau des ARNm (maturation, stabilité, accumulation) de sa cellule hôte de façon à occasionner la mort de celle-ci. Troisièmement, l'intégration du gène *bicp27* en un petit nombre de copies dans le génome cellulaire hôte ou soit dans une région où le promoteur serait soit faible ou encore dans l'impossibilité de l'induire à un taux élevé, peut s'être produit et occasionner le faible taux observé. Quatrièmement, des structures secondaires pourraient s'être crées dans les ARNm à cause de la nature des séquences contenues dans le vecteur pcDNA3 (Boshart *et al.*, 1985) et ainsi en empêcher la traduction. Une des alternatives serait de reconstruire une lignée BICP27^{+} à l'aide d'un vecteur possédant un promoteur inductible et des signaux assurant une polyadénylation des ARNs messagers et une terminaison de la transcription qui soient plus efficaces. Toutefois, malgré que ce faible taux d'expression puisse suggérer l'inaptitude de ces lignées à maintenir la croissance d'un éventuel mutant BHV-1/BICP27^{-}, mentionnons que des mutants de délétion HSV-1/ICP27^{-} peuvent être trans-complémentés en présence d'ICP27 se retrouvant à un niveau non-détectable par immunoempreinte. Donc, de très faibles quantités de l'ICP27 sont nécessaires à ses différentes fonctions (Maclean et Brown, 1987; Spivack et Fraser, 1988).

Finalement, nous avons analysé la stabilité de la lignée MDBK/ BICP27^{+} #4. Les résultats obtenus démontrent que la lignée s'avère très stable et ce même après plusieurs passages (5) en absence de G-418. De plus, ces résultats suggèrent que le gène *bicp27* serait incorporé dans le chromosome cellulaire des lignées puisque le taux d'expression de la protéine ne diminue pas à travers les différents passages effectués.

CONCLUSION

Un sérum monospécifique dirigé contre la protéine BICP27 (49 kDa) du BHV-1 a été développé suite à l'immunisation de souris avec la protéine purifiée suivant son expression chez *E. coli*. Ce sérum a permis l'analyse de la cinétique d'expression de la BICP27 au cours du cycle infectieux du BHV-1 *in vitro*. Nos résultats montrent que l'expression de la protéine BICP27 est détectable dès 3 h p.i., que son accumulation atteint un niveau maximal à 15 h p.i. et diminue ensuite graduellement jusqu'à 24 h p.i. La fluctuation dans le niveau d'expression de la protéine est similaire à celle observée pour son transcrit (1,7 kb). Cependant, l'abondance relative de la protéine à son niveau maximal d'expression, par rapport à son niveau initial, s'est avérée trois fois plus élevée que celle de son transcrit. Cette observation suggère que l'expression de la BICP27 est contrôlée au niveau traductionnel ou post-traductionnel. D'autre part, les profils d'expression obtenus indiquent que le gène *bicp27* appartient à la classe cinétique précoce et non pas précoce-immédiate comme il avait été démontré pour son homologue humain, l'*icp27* du HSV-1. De plus, le gène *bicp27* s'exprime de façon continue au cours du cycle infectieux, soit jusqu'à 24 h p.i., comparativement à l'*icp27* dont l'expression est brève, soit de 12 h. Ces disparités majeures dans le mode d'expression de ces deux gènes suggèrent fortement qu'ils jouent des rôles différents dans la cascade réplicative de leur virus respectif. Il serait donc intéressant d'investiguer davantage les fonctions régulatrices de la BICP27, à savoir si elle est impliquée par exemple dans la transition de la classe cinétique β à la classe γ dans la cascade réplicative du BHV-1, rôle qui semble compatible avec sa cinétique β (cette étude et Singh *et al.*, 1996).

D'autre part, dans le but éventuel d'identifier le rôle du gène *bicp27* dans la réplication et la pathogenèse du BHV-1, par la construction d'un mutant de délétion spécifique BHV-1/BICP27$^-$, nous nous sommes intéressés à développer une lignée cellulaire exprimant de façon constitutive la protéine BICP27 (MDBK/BICP27$^+$). En effet, s'il s'avérait que la BICP27 est essentielle à la réplication virale, l'isolement du mutant désiré serait irréalisable en l'absence d'une lignée apte à suppléer la perte du gène chez le mutant. Une lignée exprimant de façon stable la BICP27 a pu être isolée. Malheureusement, les niveaux d'expression protéiques obtenus se sont révélés bien inférieurs à ceux observés lors des analyses cinétiques traductionnelles de la BICP27 du BHV-1, suggérant que cette lignée serait inapte à maintenir la croissance d'un éventuel mutant de délétion. Cependant, il n'est pas exclu que cette lignée puisse maintenir la croissance d'un mutant de délétion BHV-1/BICP27$^-$ et ainsi nous permettre d'effectuer une étude plus approfondie du rôle de la BICP27 dans la réplication et dans la pathogenèse du BHV-1. Aussi la lignée MDBK/BICP27$^+$ stable pourrait servir, entre autres, à étudier la similarité fonctionnelle entre la BICP27 et d'autres homologues en vérifiant si elle pourrait complémenter les mutants de délétion des virus respectifs.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier la Dre Claire Simard avec qui j'ai acquis énormément de connaissances et d'aptitudes. Je désire aussi lui témoigner ma gratitude pour son intérêt, ses conseils et sa disponibilité. Je voudrais aussi remercier le Dr Michel Trudel qui m'a offert la chance de faire mes tous premiers débuts dans le monde scientifique. Il a tout de suite cru en moi et c'est ce qui m'a permis d'entamer une carrière scientifique dans un environnement riche et stimulant.

Je ne pourrais oublier Sylvie La Boissière qui m'a initiée aux techniques de biologie moléculaire. Que dire de Nicole Gagnon qui m'a initiée à la culture cellulaire et qui a été beaucoup plus qu'une simple co-équipière. Je remercie aussi Nathalie Bastien qui a été une grande amie dès le début et qui a su m'apporter que du positivisme, autant sur le plan professionnel que personnel. J'aimerais remercier une personne très spéciale à mes yeux : Jean-Patrick. Celui-ci a su me guider, me réconforter et m'encourager tout au long de cette belle et grande aventure. Un clin d'oeil à Yannick pour la revision de ce document, les derniers jours d'une rédaction n'étant pas toujours les plus paisibles.

Je désire remercier tous les étudiants et membres du personnel de l'Institut Armand-Frappier avec qui j'ai été en contact. Plusieurs parmi ceux-ci m'ont donné de précieux conseils. Ces conseils m'ont aidée au cours de ce projet certes, mais ils me seront utiles dans un avenir rapproché.

Finalement, je tiens à remercier la Fondation Armand-Frappier et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada qui par le biais de leurs bourses d'étude ont permis la continuité de mes études.

BIBLIOGRAPHIE

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. **9**: 53-63.

ANDERSON, K.P., R.H. COSTA, L.E. HOLLAND et E.K. WAGNER. 1980. Characterization of herpes simplex virus type 1 RNA present in the absence of *de novo* protein synthesis. J. Virol. **34**: 9-27.

ARMSTRONG, J.A., H.G. PEREIRA et C.H. ANDREWS. 1961. Observations of the virus of infectious bovine rhinotracheitis, and its affinity with the herpesvirus group. Virology **14**: 276-285.

AUSUBEL, F., R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.G. SEIDMAN, J.A. SMITH et K. STRUHL. 1990. Current protocols *Dans: «Molecular biology»*, vol. 1., John Wiley & Sons, New-York.

BABIUK L.A., M.J. LAWMAN et H.B. OHMANN. 1988. Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease. Adv. V. Res. **35**: 219-49.

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. et B.T. ROUSE. 1979. Immune control of herpesvirus latency. Can. J. Microbiol. **25**: 267-274.

BABIUK, L.A., H. BIELEFELDT OHMANN, G. GIFFORD, C.W. CZARNIECKI, V.T. SCIALLI et E.B. HAMILTON. 1985. Effect of bovine α1 interferon on bovine herpesvirus type 1-induced respiratory disease. J. Gen. Virol. **66**: 2383-2394.

BANDYOPADHYAY, S.K., S.K. MITTAL et H.J. FIELD. 1990. Identification of the gene homologous to HSV major DNA binding protein in the BHV-1 genome. Vet. Microbiol. **22**: 203-212.

BARANOWSKI, E., J. DUBUISSON, P.P. PASTORET et E. THIRY 1993. Identification of 108K, 93K, and 42K glycoproteins of bovine herpesvirus-1 by monoclonal antibodies. Arch. Virol. **133**: 97-111.

BEN-PORAT, T., F.J. RIXON et M.L. BLANKENSHIP. 1979. Analysis of the structure of the genome of pseudorabies virus. Virology **95**: 285-294.

BERG, J.M. 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. Science **232**: 485-487.

BIELEFELDT OHMANN, H. et L.A. BABIUK. 1985. Viral-bacterial pneumonia in calves: effect of bovine herpesvirus-1 on immunologic functions. J. Infect. Dis. **151**: 937-947.

BIRNBOIM H.C. et J. DOLY. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1523.

BOLTON, D.C., Y.C. ZEE et A.A. ARDANS. 1983. Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Vet. Microbiol. **8**: 57-68.

BOSHART, M., F. WEBER, G. JAHN, K. DORSCH-HASLER, B. FLECKENSTEIN et W. SCHAFFNER. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell **41**: 521-530.

BÖTTCHER, R. et R. MAHLER. 1970. Studies on the persistence of the bovine IBR-IPV virus in the semen of normally infected bulls. Dtsch Tierärztl Wochenschr **77**: 421-444.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.

BRATANICH, A.C., N.D. HANSON et C.J. JONES. 1992. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits the activity of immediate-early transcription unit 1. Virology **191**: 988-991.

BROWN, C.R., M.S. NAKAMURA, J.D. MOSCA, G.S. HAYWARD, S.E. STRAUSS et L.P. PEREIRA. 1995. Herpes simplex virus trans-regulatory protein ICP27 stabilizes and binds to 3' ends of labile mRNA. J. Virol. **69**: 7187-7195.

BROWN, F. 1989. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canada 1987. Intervirology **30**: 181-186.

BULACH, D.M.et M.J. STUDDERT. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Arch. Virol. **113**: 17-34.

CARMICHAEL, G.G. et G.K. MCMASTER. 1980. The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. Methods Enzymol. **65**: 380-391.

CARPENTER, D.E. et V. MISRA. 1992. Sequences of the bovine herpesvirus 1 homologue of herpes simplex virus type-1 alpha-trans-inducing factor (UL48). Gene **119**: 259-263.

CASTRUCCI, G., F. FRIGERI, S. RANUCCI, M. FERRARRI, V. CILLI, P. PEDINI, P. NETTLETON, F. KALEFFI, V. ALDROVANDI et A.J. HERRING. 1984. Comparative studies of strains of bovine rhinotracheitis virus isolated from latency infected calves. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **7**: 1-10.

CRUICKSHANK, J.G. et D.M. BERRY. 1965. Morphology of infectious bovine rhinotracheitis virus. Virology **25**: 481-482.

DEBERNARDI, M.A., T. SEKI et G. BROOKER. 1991. Inhibition of cAMP accumulation by intracellular calcium mobilization in C6-2B cells stably transfected with substance K receptor cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 9257-9261.

DE MEURON P.A. 1982. Recherche d'anticorps IBR/IPV dans le lait. Schweizer Archiv fur Tierheilkunde **124**: 203-208.

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 herpes virus type1-specific cytotoxic lymphocytesT depending on the method of *in vitro* stimulation. Immunology **78**: 7-13.

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.

ELZHARY, M.A.S.Y., A. SILIM et S. DEA. 1984. Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhea virus, bovine herpesvirus-1, and bovine parainfluenza-3 virus in sheep and goats in Quebec. Am. J. Res. **45**: 1660-1662.

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.

EPSTEIN, B. 1972. Bovine herpes virus in ocular squamous cell carcinoma. An Sociedad Cientifica Argentina **193**: 209-219.

ESPINASSE, J., M. VISO, A. LAVAL, C. LE LAYEC et C. MONTPETIT. 1983. Reactivation and shedding of infectious bovine rhinotracheitis virus caused by 3-methylindole. Vet. Rec. **113**: 15-16.

EVERETT, R.D. 1987. The regulation of viral and cellular genes by herpesvirus immediate-early products. Anticancer Res. **7**: 589-604.

EVERETT, R.D. 1988. Analysis of the functional domains of the herpes simplex virus type 1 immediate-early polypeptide Vmw110. J. Mol. Biol. **202**: 87-96.

FARLEY, J.E., I.B. SKARE et J. SKARE. 1981. Inverted repeat sequences in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. *Dans: «The human herpes viruses: an interdisciplinary perspective»*. A.J. Nahmias, W.R. Dowdle, R.F. Schinazi (Ed.), Elsevier-North Holland, New York, p. 590.

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., M. SNIDER, L. MCDOUGALL, T. BESKORWAYNE, T.J.. ZAMB et H. BIELEFELDT OHMANN. 1990. Molecular mimicry: a herpesvirus glycoprotein antigenically related to a cell surface glycoprotein expressed by macrophages, polymorphonuclear leucocytes, and platelets. Immunology **70**: 504-512.

FORMAN, A.J. et L.A. BABIUK. 1982. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection on bovine alveolar macrophage function. Infect. Immun. **35**: 1041-1047.

FORMAN, A.J., L.A. BABIUK, V. MISRA et F. BALDWIN. 1982. Susceptibility of bovine macrophages to infectious bovine rhinotracheitis virus infection. Infect. Immun. **35**: 1048-1057.

FORSCHNER, E., I. BUNGER, M. SEIDLER, E. PETERS, E. RIENHOFF, R. VOGEL, G. HITZMANN, H. DIETZE, A. HAPPICH et W. KAHLER. 1987. BHV 1-Infektion der Rinder: Sanierung durch aktive Immunisierung seropositiver Tiere mit inaktiviertem Impfstoff--ein Feldversuch. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift **94**: 429-434.

FRAEFEL C. 1993. Immediate-early genes of bovine herpesvirus 1: a structural and functional analysis. Thèse de doctorat en sciences naturelles, Institut Fédéral Suisse de la Technologie de Zürich, 103 p.

FRIEDLI, K. et A.E. METZLER. 1987. Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. Arch. Virol. **94**: 109-122.

FURLONG, D., H. SWIFT et B. ROIZMAN. 1972. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. J. Virol. **10**: 1071-1074.

GEDER, L., K.J. LEE, M.S. DAWSON, R. ENGLE, R.M. MALINIAK et C.M. LANG 1981. Induction of persistent infection in mice and oncogenic transformation of mouse macrophages with infectious bovine rhinotracheitis virus. Amer. J. Vet. Res. **42**: 300-307.

GIBBS, E.P.J. et M.M. RWEYEMAMU. 1977. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. Vet. Bull. **47**: 317-343.

GILLESPIE, J.H., K. MCENTEE, J.W. KENDRICK et W.C. WAGNER. 1959. Comparison of infectious pustular vulvovaginitis virus with infectious bovine rhinotracheitis virus. Cornell Vet. **49** : 288-297.

GILLESPIE, J.H., K.M. LEE et J.B. BAKER. 1957. Infectious bovine rhinotracheitis. Am. J. Vet. Res. **18**: 530-535.

GREIG, A.S., G.L. BANNISTER, D. MITCHELL et C.A.V. BARKER. 1958. Cultivation in tissus culture of an infectious agent from coital exanthema of cattle. Can. J. Comp. Med. **22**: 119-122.

HAMES, B.D. 1981. «An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis», *In: «Gel electrophoresis of proteins: a practical approach»*. Hames, B.D. et D. Rickwood (ed.), IRL Press, Oxford, pp. 1-91.

HAMMERSCHMIDT, W., H. LUDWIG et H.J. BUHK. 1988. Specificity of cleavage in replicative-form DNA of bovine herpesvirus 1. J. Virol. **62**: 1355-1363.

HARALAMBIEV, H. 1976. Immunogenicity studies on an inactivated IBR vaccine administrated into the nasal mucosa. Acta **26**: 215-217.

HARDWICKE, M.A. et R.M. SANDRI-GOLDIN. 1994. The herpes simplex virus regulatory protein ICP27 can cause a decrease in cellular mRNA levels during infection. J. Virol. **68**: 4797-4810.

HAWKES, R.A. 1979. General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. *Dans: "Diagnostic procedures of viral, rickettsial and chlamydial infections"*. Lennette, E.H. et Schmidt, N.J. (Ed.), American Health Association, Washington DC, pp. 34-35.

HIBBARD, M.K. et R.M. SANDRI-GOLDIN. 1995. Arginine-rich regions succeeding the nuclear localization region of the herpes simplex virus 1 regulatory protein ICP27 are required for efficient nuclear localization and late gene expression. J. Virol. **69**: 4656-4667.

HILL, B.D., M.W.M. HILL, Y.S. CHUNG et R.J. WHITLE. 1984. Meningoencephalitis in calves due to bovine herpesvirus type 1 infection. Aust. Vet. J. **61**: 242-243.

HONESS, R.W. et B. ROIZMAN. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. 1. Cascade of the synthesis of three groups of viral proteins. J. Virol. **14**: 8-19.

HONESS, R.W. et B. ROIZMAN. 1975. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **72**: 1276-1280.

HRISTOV, S. et I. KARADJOV. 1975. Study on the immunogenic properties of inactived vaccines produced with the virus of the infectious bovine rhinotracheitis. Vet. Med. Nauki. **13**: 8-13.

HRISTOV, S., I. KARADJOV et A. IGNATOV. 1976. On the immunogenic properties of a polyvalent inactived vaccine from respiratory viruses. Vet. Med. Nauki. **13**: 36-44.

HUTCHINGS, D.L., M. CAMPOS, L. QUALTIERE et L.A. BABIUK. 1990a. Inhibition of antigen-induced and interleukin 2-induced proliferation of bovine peripheral blood leukocytes by inactivated bovine herpesvirus 1. J. Virol. **64**: 4146-4151.

HUTCHINGS, D.L., S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et L.A. BABIUK. 1990b. Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. J. Virol. **64**: 5114-5122.

INGLIS D.M., J.M. BOWIE, M.J. ALLAN et P.F. NETTLETON. 1983. Ocular disease in red deer calves associated with a herpesvirus infection. Vet. Rec. **113**: 182-183.

JUHASZ, M., Z. PALATKA, B. TOTH. 1974. Experiment on the effectiveness of inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccine. Dev. Biol. Stand. **26**: 1-4.

KAHRS, R.F. 1974. Rational basis for an immunization program against the common diseases of the bovine respiratory tract. Can Vet. J. **15**: 251-256.

KAHRS, R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. J. Am. Vet. Med. Assoc. **171**: 1055-1064.

KENDRICK, J.W., J.H. GILLESPIE et K. MCENTEE. 1958. Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. Cornell Vet. **48**: 458-495.

KIT, S. 1989. Recombinant-derived modified-live herpesvirus vaccines. Adv. Exp. Med. Biol. **251**: 219-236.

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.

KOPPEL, R.., M.. SINGH, C. FRAEFEL, M. ACKERMAN, M. et SCHWYZER. 1995. Characterization of bovine herpesvirus 1 immediate-early protein BICP0, BICP4, BICP22, circ, and early protein BICP27. *Dans: «Immunobiology of Viral Infections»*. M. Schwyzer and others, Proceedings of the 3rd Congress of the European Society of Veterinary Virology, pp. 126-131.

KUTISH, G., T. MAINPRIZE et D. ROCK. 1990. Characterization of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. J. Virol. **64**: 5730-5737.

KWONG, A.D., J.A. KRUPER et N. FRENKEL. 1988. Herpes simplex virion host shutoff function. J. Virol. **62**: 912-921.

LA BOISSIERE, S. 1995. Caractérisation moléculaire du gène codant la protéine majeure du tégument du virus de l'herpès bovin de type 1 et rôle immunobiologique de la protéine. Thèse de doctorat en virologie et immunologie, Institut Armand-Frappier, 187 p.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.

LEUNG-TACK, P., J.-C. AUDONNET et M. RIVIERE. 1994. The complete DNA sequence and the genetic organization of the short unique region (U_S) 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. 1993. Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. Virology **194**: 233-243.

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.

LUDWIG, H. 1983. Bovine herpesvirus. *Dans: "The herpesviruses"*, vol. 2, Roizman, B. (Ed.), Plenum Publishing Corp., New York, pp. 135-214.

LUHRMANN, R., B. KASTNER et M. BACH. 1990. Structure of splicesomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. Biochim. Biophys. Acta **1087**: 265-292.

LUPTON, H.W et D.E. REED. 1980. Clearance and shedding of infectious bovine rhinotracheitis virus from the nasal mucosa of immune and nonimmune calves. Am. J. Vet. Res. **41**: 117-119.

LUPTON, H.W., H.J. BARNES et D.E. REED. 1980a. Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. Cornell Vet. **70**: 77-95.

LUPTON H.W., R.D. JORGENSON et D.E. REED 1980b. Experimental infection of neonatal striped skunks (Mephitis mephitis) with infectious bovine rhinotracheitis virus. J. Wild Dis. **16**: 117-123.

MACKEM, S. et B. ROIZMAN. 1982. Structural features of the herpes simplex virus α genes 4, 0 and 7 promoter-regulatory sequences which confer a regulation on chimeric thymidine kinase genes. J. Virol. **44**: 939-949.

MACLEAN, A.R. et S.M. BROWN. 1987. A herpes simplex virus type 1 variant which fails to synthesis immediate early polypeptide V_{mw} IE63. J. Gen. Virol. **68**: 1339-1350.

MADIN, S.H. et N.B.JR. DARBY. 1958. Established kidney cells lines of normal adult bovine and ovine origin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **98**: 574-576.

MADIN, S.H., C.J. YORK et D.G. MCKERCHER. 1956. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus. Science **124**: 721-722.

MANDEL, M. et A. HIGA. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. **53**: 159-162.

MARSHALL, R.L., L.L. RODRIGUEZ et G.J. LETCHWORTH III. 1986. Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. J. Virol. **57**: 745-753.

MATZNER, Y., C. HERSHKO, A. POLLIACK, A.M. KONIJN et G. IZAK. 1979. Suppressive effect of ferritin on in vitro lymphocyte function. Br. J. Hematol. **42**: 345-355.

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.

MAYR, A. 1986a. Herpesvirus infections in animals. Hautarzt **37**: 255-258.

MAYR, A. 1986b. Pathogenesis and control of infectious diseases caused by factors in animal production. Zentralblatt Fur Veterinarmedizin - Reihe B **33**: 637-649.

MCCARTHY, A.M., L. MCMAHAN et P.A. SCHAFFER. 1989. Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. J. Virol. **63**: 18-67.

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 herpes simplex virus type 1. J. Gen. Virol. **69**: 1531-1574.

MCGUIRE, R.L. et L.A. BABIUK. 1984. Evidence for defective neutrophil function in lungs of calves exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus. Vet Immunol Immunopathol **5**: 259-271.

MCKERCHER, D.G. 1963. Studies of the etiologic agents of infectious bovine rhinotracheitis and Bläschenausschlag coital vesicular exanthema. Am. J. Vet. Res. **24**: 508-510.

MCKERCHER, D.G. 1973 *Dans*: «The Herperviruses». (Ed. A.S. Kaplan); Academic Press, New-York, London, pp. 427-493.

MCKERCHER, D.G. et G.L. CRENSHAW 1971. Comparative efficacity of intranasally and parenterally administered infectious bovine rhinotracheitis vaccines. J. Am. Vet. Med. Assoc. **159**: 1362-1369.

MCKERCHER, D.G., J.E. MOULTON et D.E. JASPER. 1954. Virus and virus-like cattle disease new entities to California. Proc. Annu. Meet. US. Anim. Health Assoc. **58**: 260-269.

MCKERCHER, D.G., J.E. MOULTON, S.H. MADIN, J.W. KENDRICK. 1957. Infectious bovine rhinotracheitis. A newly recognized virus disease of cattle. Am. J. Vet. Res. **18**: 246-256.

MCKERCHER, D.G., J.K. SAITO, E.M. WADA et O. STRAUB. 1959a. Current status of the newer virus diseases of cattle. Proc. U.S. Livestock Sanit. Ass. **62**: 136-158.

MCKERCHER, D.G., O.C. STRAUB, J.K. SAITO et E.M. WADA. 1959b. Comparative studies of the etiological agent of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. Can. J. Comp. Med. **23**: 320-328.

MCLAUCHLAN, J., A. PHELAN, C. LONEY, R.M. SANDRI-GOLDIN et J.B. CLEMENT. 1992. Herpes simplex virus IE63 acts at the posttranscriptional level to stimulate viral mRNA 3' processing. J. Virol. **66**: 6939-6945.

MENSIK J., Z. POSPISIL, M. MACHATKOVA, B. TUMOVA, J. FRANZ et A. STUMPA. 1976a. Adaptation of human influenza A/Hong Kong/68 (H3N2) virus to colostrum-deprived, specific-pathogen free piglets. Zentralblatt Fur Veterinarmedizin - Reihe B **23**: 638-651.

MENSIK, J., Z. POSPISIL, A. SUCHANKOVA, A. CEPICA, V. ROZOSNY et M. MACHATKOVA. 1976b. Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis after experimental infection with parainluenza 3 virus in young calves. Zbl Vet Medb **23**: 854-864.

METZLER, A.E., A.A. SCUDEL et M. ENGELS. 1986. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. Arch. Virol. **87**: 205-217.

METZLER, A.E., H. MATILE, U. GASSMAN, M. ENGELS et R. WYLER. 1985. European isolates of bovine herpesvirus-1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. Arch. Virol. **85**: 57-69.

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. Biochim. Biophys. Acta **1090**: 267-269.

MEYER, H., A. MAYR, G. WITTKOWSKI, G. SCHÖLL et J. GOBGER. 1988. *Dans*: «Vetemecum IFFA Mérieux». Laupheim FRG, Nr. 12, pp. 4-11.

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 (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 the glycoprotein gB. Virology **166**: 542-549.

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.

MORZARIA S.P., M.S. RICHARDS, J.W. HARKNESS et B.A. MAUND. 1979. A field trial with a multicomponent inactivated respiratory viral vaccine. Veterinary Record **105**: 410-414.

MSOLLA, P.M., E.M. ALLAN, I.E. SELMAN et A. WISEMAN. 1983. - Reactivation and shedding of bovine herpesvirus 1 following Dictyocaulus viviparus infection. J. Comp. Pathol. **93**: 271-274.

NARITA, M., S. INUI, K. NANBA et Y. SHIMIZU. 1976.Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. J. Comp. Path. **86**: 93-100.

NARITA, M., S. INUI, K. NANBA et Y. SHIMIZU. 1981. Recrudescence of infectious bovine rhinotracheitis virus and associated neural changes in calves treated with dexamethasone. Am. J. Vet. Res. **42**: 1192-1197.

NETTLETON, P.F., J.M. SHARP, A.J. HERRING et J.A. HERRING. 1984. Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination, challenge and immunosuppression. *Dans*: «Latent herpesvirus infections in veterinary medecine». (Eds. G. Wittmann, R.M. Gaskell, H.-J. Rziha) Martinus Nijhoff Publishers, Boston, The Hague, Dordrecht, Lancaster, pp. 191-209.

NGUYEN, L.H., D.M. KNIPE et R.W. FINBERG. 1992. Replication-defective mutants of herpes simplex virus (HSV) induce cellular immunity and protect against lethal HSV infection. J. Virol. **66**: 7067-7072.

NICOLAS, O. 1993. Caractérisation moléculaire du virus de la mosaïque du navet. Thèse de doctorat en virologie, Institut Armand-Frappier, 160 p.

NYAGA, P.N. et D.G. MCKERCHER. 1980. Pathogenesis of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infections : interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **2**: 587-602.

OHMANN, H.B. et L.A. BABIUK. 1985. In vitro and systemic effects of recombinant bovine interferons on natural cell-mediated cytotoxicity in healthy and bovine herpesvirus-1-infected cattle. J. Interf. Res. **5**: 551-564.

OKAZAKI, K., E. HONDA, T. MINETOMA et T. KUMAGAI. 1987. Bovine herpesvirus type 1 gp87 mediates both attachment of virions to susceptible cells and hemagglutination. Arch Virol **97**: 297-307.

OKAZAKI, 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 heparinlike moiety on the cell surface. Virology **181**: 666-670.

OWEN, N.V., T.L. CHOW et J.A. MOLELLO. 1964. Bovine fetal lesions experimentally produced by infectious bovine rhinotracheitis virus. Am. J. Vet. Res. **25**: 1617-1625.

PASTORET P.P., E. THIRY et R. THOMAS. 1986. Logical description of bovine herpesvirus type 1 latent infection. J. Gen. Virol. **67**: 885-897.

PASTORET P.P., E. THIRY, B. BROCHIER et G. DERBOVEN. 1982. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. Ann. Rec. Vet. **13**: 221-35.

PASTORET, P.-P., A. AGUILAR-SETIEN, G. BURTONBOY, J. MAGER, P. JETTEUR et F. SCHOENAERS. 1979. Effect of repeated treatment with dexamathasone on the re-excretion pattern of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response. Vet. Microbiol. **4**: 149-155.

PAYMENT, P. et V. PAVILANIS. 1980. *Dans : Techniques virologiques.* Les Presses de l'Université du Québec, Québec, 222 p.

PAYMENT, P., R. ASSAF, M. TRUDEL et P. MAROIS. 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay for serology of infectious bovine rhinotracheitis virus infection. J. Clin. Microbiol. **10**: 633-636.

PEREIRA, L.P., S. KAUSHAL, P.R. KINCHINGTON, J.D. MOSCA, G.S. HAYWARD et S.E. STRAUSS. 1994. Varicella-zoster virus open reading frame 4 encodes a transcriptional activator that is functionaly distinct from that of herpes simplex virus homolog ICP27. J. Virol. **68**: 2468-2477.

PEREIRA, L.P, M. WOLFF, M. FENWICK et B. ROIZMAN. 1977. Regulation of herpesvirus synthesis. V. Properties of a polypeptides specified by HSV-1 and HSV-2. Virology **77**: 733-749.

PETER, C.P., J.B. GRATZEK et F.K. RAMSEY. 1966. Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus associated with enteritis in cattle: pathogenisis studies by fluorescent antibody tracing. Am. J. Vet. Res. **27**: 1583-1590.

PHELAN, A., M. CARMO-FONSECA, J. MCLAUGLAN, A.I. LAMOND et J.B. CLEMENT. 1993. A herpes simplex virus type 1 immediate-early gene product, IE63, regulates small nuclear ribonucleoprotein distribution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 9056-9060.

PORTER, D.D., A.E. LARSEN et N.A. COX. 1975. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from mustelidae. J. Clin. Microbiol. **1**: 112-113.

PROBST, U., R. WYLER, U. KIHM, M. ACKERMANN, L. BRUCKNER, H.K. MULLER et F. EHRENSPERGER. 1985. Excretion of IBR virus, especially in milk, in experimentally infected cows. Schweiz Arch Tierheilk **127**: 723-733.

REID, H.W., P.F. NETTLETON, I. POW et J.A. SINCLAIR. 1986. Experimental infection of red deer (*Cervus elaphus*) and cattle with a herpesvirus isolated from red deer. Vet. Rec. **118**: 156-158.

REISINGER, L. et H. REIMANN. 1928. Wien. Beitrag zur aetiologie des bläschehausschlages des rinder. Tierärztl. Monatsschr **15**: 249-261.

RIJSEWIJK, F., M. KAASHOEK, G. KEIL, H. PAAL, R. RUULS, F. VAN ENGELENBURG et J. VAN OIRSCHOT. 1994. *In vitro* and *in vivo* phenotypes and immunogenic properties of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI or gE gene. Proceedings of the 19th International Herpesvirus Workshop, Vancouver, résumé 419.

RIXON, F.J. 1993. Structure and assembly of herpesviruses. Sem. Virol. **4**: 135-144.

ROCHAIX, J.-D. et J. VAN DILLEWIJN. 1982. Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. Nature **296**: 70-72.

ROCK, D.L., S.L. BEAM et J.E. MAYFIELD 1987. Mapping bovine herpesvirus type 1 latency-related RNA in trigeminal ganglia of latency infected rabbits. J. Virol. **61**: 3827-3831.

ROIZMAN, B. 1982. The family *Herpesviridae*: general description, taxonomy, and classification. *Dans: "The herpesviruses"*, vol. 1, Roizman, B. (Ed.), Plenum Publishing Corp., New York, pp. 1-23.

ROIZMAN, B. 1993. The family *Herpesviridae*: a brief introduction. *Dans: "The human herpesviruses"*. Roizman, B., Whitley, R.J., Lopez, C. (Ed.), Raven Press Ltd, New York, pp. 1-9.

ROIZMAN, B. et A.E. SEARS. 1987. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. Ann. Rev. Microbiol. **41**: 543-571.

ROIZMAN, B. et A.E. SEARS. 1990. Herpes simplex viruses and their replication. *dans: "Virology"*. Fields, B.N., D.M. Knipe, R.M. Chanock, M.S. Hirsch, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman, (Ed.), Raven Press Ltd, New York, pp. 1795-1894.

ROIZMAN, B., L.E. CARMICHAEL, F. DENHARDT, G. DE-THE, A.J. NAHMIAS, W. PLOWRIGHT, F. RAPP, P. SHELDRICK, M. TAKAHASHI et K. WOLF. 1981. *Herpesviridae*: definition, provisional nomenclature, and taxonomy. Intervirology **16**: 201-217.

ROIZMAN, 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.

ROLLINSON, E.A.. 1992. Prospects for antiviral chemotherapy in veterinary medicine: 2. Avian, piscine, canine, porcine, bovine and equine virus diseases. Ant. Chem. & Chem. **3**: 311-326.

ROLLINSON, E.A. et G. WHITE. 1983. Relative activities of acyclovir and BW759 against Aujesky's disease and equine rhinopneumonitis viruses. Ant. Agents Chem. **2**: 221-226.

ROSSI, C.R. et G.K. KIESEL. 1982. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus immunization on viral shedding in challenge-exposed calves treated with dexamethasone. Amer. J. Vet. Res. **43**: 1576-1579.

ROUSE, B.T. 1985. *Dans: «Immunity to herpesvirus infections of domestic animals»*. P.-P. Pastoret, E. Thiry et J.Saliki (eds.), CEC Report EUR 9737, pp. 11-24.

RYCHNER, J.J. 1841. Bujatrik oder systematisches handbuch derausserlichen und innerlichen krankheiten des rindviehs, 2. Aufl. Chr. Fischer Verlag Bern 514-517.

RZIHA, H.J., T.C. METTENLEITER, V. OHLINGER et G. WITTMANN. 1986. Herpesvirus (pseudorabies virus) latency in swine: occurrence and physical state of viral DNA in neural tissues. Virology **155**: 600-613.

SACKS, W.R., C.C. GREEN, D.P. ASCHMAN et P.A. SCHAFFER 1985. Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. J. Virol. **55**: 796-805.

SAMANIEGO, L.A., A.L. WEBB et N.A. DELUCA. 1995. Functional interactions between herpes simplex virus immediate-early proteins during infection: gene expression as a consequence of ICP27 and different domains of ICP4. J. Virol. **69**: 5705-5715.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SANDRI-GOLDIN, R. M., M. LEVINE et J.C. GLORIOSO. 1981. Method for induction of mutations in physically defined regions of the herpes simplex virus genome. J. Virol **38**: 41.

SANDRI-GOLDIN, R. M. 1991. Analysis of the regulatory activities of the HSV-1 α protein ICP27. *Dans: «Herpesvirus Transcription and its Regulation»*, chap. 5, Ed. Edward K. Wagner, CRC Press, NW, Florida, pp. 77-103.

SANDRI-GOLDIN, R.M. et M.K. HIBBARD. 1996. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 co-immunoprecipitates with anti-Sm antiserum, and the C terminus appears to be required for this interaction. J. Virol. **70**: 108-118.

SANDRI-GOLDIN, R.M. et G.E. MENDOZA. 1992. A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing. Gen. Dev. **6**: 848-863.

SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.

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.

SCHROEDER, R.J. et M.D. MOYS. 1954. An acute upper respiratory infection of dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. **125**: 471-472.

SCHWYZER, M., C. VLCEK, 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.

SEAL, B.S., J.M. IRVING et C.A. WHETSTONE. 1991. Transcriptional analysis of the bovine herpesvirus1 Cooper isolate - temporal analysis and characterization of immediate-early, early, and late RNA. Arch. Virol. **121**: 55-73.

SEKULOVICH, R.E., K. LEARY et R.M. SANDRI-GOLDIN. 1988. The herpes simplex virus type 1 α protein ICP27 can act as a trans-repressor or a trans-activator in combination with ICP4 and ICP0. J. Virol. **62**: 4510-4522.

SHEFFY, B.E. et D.H. DAVIES. 1972. Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **140**: 974-976.

SHIMIZU, Y., K. NAKANO, S. INUI et N. MURASE. 1972. Isolation of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus from aborted fetuses in Japan. Natl. Inst. Anim. Health Quarterly **12**: 110-111.

SIMARD, C., S. LABOISSIÈRE et M. TRUDEL. 1991. Genomic heterogeneities in bovine herpesvirus type 1 viral isolates: a major variant selected from a field isolate. Intervirology **32**: 117-126.

SIMARD, C., N. BASTIEN et M. TRUDEL. 1992. Sequencing and 5'- and 3'-transcript mapping of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from bovine herpesvirus type-1. Virology **190**: 689-701.

SINGH M., C. FRAEFEL, L.J. BELLO, W.C. LAWRENCE et M. SCHWYZER. 1996. Identification and characterization of BICP27, an early protein of bovine herpesvirus 1 which may stimulate mRNA 3' processing. J. Gen.Virol. **77**: 615-625.

SOUTHERN, P.J. et P. BERG. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. J. Mol. Applied Gen. **1**: 327-41.

SPIVACK, J.G. et N.W. FRASER. 1988. Expression of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia of mice during acute infection and reactivation of latent infection. J. Virol. **62**: 1479-85.

ST-GEORGE, T.D. et M. PHILPOTT. 1972. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. Aust. Vet. J. **48**: 126.

STRAUB, O.C. 1978. Vorkommen der durch IBR-IPV-viren hervorgerufenen Krankheiten und mögliche differentialdiagnostische probleme in den verschiedenen Kontinenten und deren Ländern. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **85**: 84-90.

STUDDERT, M.J. 1989. Bovine encephalitis herpesvirus. Vet Record **125**: 584.

STUKER, G., P. HAAB et T. GIGER. 1980. Nachweis von IBR/IPV-antikörpern aus der Milch. Schweis. Arch. Tierheilk. **122**: 707-710.

TAYLOR, R.E.L., B.S. SEAL et S. ST. JEOR. 1982. Isolation of bovine rhinotracheitis virus from the soft-shelled tick, Ornithodoros coriaceus. Science **216**: 300-301.

THIRY, E., J. SALIKI, A. SCHWERS et P.P. PASTORET. 1985. Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation. Vet. Rec. **116**: 599-600.

THIRY, E., J. SALIKI, M. BUBLOT et P.P. PASTORET. 1987. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **10**: 59-63.

THIRY, E., J. SALIKI, P.P. PASTORET, A.F. LAMBERT et J. LIGOT. 1984. Failure to demonstrate infectious bovine rhinotracheitis virus reactivation in parturient cows. J. Vet. Rec. **115**: 248-249.

TIKOO, S. K., M. CAMPOS et L.A. BABIUK 1995. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. Adv. Virus Res. **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., F.J. VOLENEC et I.M. PATON. 1971. Intranasal vaccination against infectious bovine rhinotracheitis: studies on early onset of protection and use of the vaccine in pregnant cattle. J. Am. Vet. Med. Ass. **159**: 1370-1374.

TODD, J.D., F.J. VOLENEC 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 secretions with early resistance to challenge with virulent virus. Infect. Immun. **5**: 699-706.

TRUEBLOOD, B., B.A. SWIFT et L. MCHOLLAND-RAYMOND. 1978. A bovine herpesvirus isolated from sheep. Can. J. Comp. Med. **42**: 97-99.

TYLER, J.K. et R.D. EVERETT. 1994. The DNA binding domains of the varicella-zoster virus gene 62 and herpes simplex virus type 1 ICP4 transactivator proteins heterodimerize and bind to DNA. Nucleic Acids Res. **22**: 711-721.

VALICEK, L. et B. SMID. 1976. Envelopment and the envelopes of infectious bovine rhinotracheitis virus in ultrathin sections. Arch. Virol. **51**: 131-140.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. 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.

VIEIRA J. et J. MESSING. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19**: 259-2268.

WATRACH, A.M. et H. BAHNEMANN. 1966. The structure of infectious bovine rhinotracheitis virus. Arch. Ges. Virusforsch. **18**: 1-7.

WHETSTONE, C.A. et J.F. EVERMANN. 1988. Characterization of bovine herpesviruses isolated from six sheep and four goats by restriction endonuclease analysis and radioimmunoprecipitation. Amer. J. Vet. Res. **49**: 781-785.

WHITBECK, J.C., 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.

WHITTON, J.L., F.J. RIXON, A.J. EASTON et J.B. CLEMENTS. 1983. Immediate-early mRNA-2 of herpes simplex viruses type 1 and 2 is unpliced: conserved sequences around the 5' and 3' termini correspond to transcription regulatory signals. Nuc. Acid. Res. **11**: 6271-6287.

WILCOX, K.W., A. KOHN, E. SKLYANSKAYA et B. ROIZMAN. 1980. Herpes simplex virus phosphoproteins. I. Phosphate cycles on and off some viral polypeptides and can alter their affinity for DNA. J. Virol. **33**:167-182.

WILSON, T.E. 1974. Observations and comments on two outbreaks of abortion associated with IBR virus infection. Can. Vet. J. **15**: 227-229.

WINKLER, M., S.A. RICE et T. STAMMINGER. 1994. UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. J. Virol. **68**: 3943-3954.

WIRTH, U.V., C. FRAEFEL, B. VOGT, C. VLCEK, 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., K. GUNKEL, M. ENGELS et M. SCHWYZER. 1989. Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. J. Virol. **63**: 4882-4889.

WOLFF, J.A., R.W. MALONE, P. WILLIAMS, W. CHONG, G. ACSADI, A. JANI et P.L. FELGNER. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science **247**: 1465-1468.

WYLER, R., M. ENGEL et M. SCHWYZER. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). *Dans: "Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs"*. Developments in veterinary virology, Wittmann, G. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 1-72.

YANISCH-PERRON, G., J. VIEIRA et J. MESSING. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**: 103-119.

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.

ZHAO, Y., R. HOLDEN, R.N. HARTY et D.J. O'CALLAGHAN. 1992. Identification and transcriptional analyses of the UL3 and UL4 of equine herpesvirus 1, homologs of the ICP27 and glycoprotein K genes of herpes simplex virus. J. Virol. **66**: 5363-5372.

ZHU, Z. et P.A. SCHAFFER. 1995. Intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 major transcriptional regulatory protein, ICP4, is affected by ICP27. J. Virol. **69**: 49-59.

ZHU, Z., W. CAI et P.A. SCHAFFER. 1994. Cooperative among herpes simplex virus type 1 immediate-early regulatory proteins: ICP4 and ICP27 affect the intracellular localization of ICP0. J. Virol. **68**: 3027-3040.

ZUSCHEK, F. et T.L. CHOW. 1961. Immunogenicity of 2 infectious bovine rhinotracheitis vaccines. J. Am. Vet. Med. Ass. **139**: 236-237.

ZWICK, W. et J.G. GMINDER. 1913. Untersuchungen über den Bläschenausschlag (exanthema vesiculosum coitale) der Rinder. Berl. Tieraerztl. Wochenschr. **29**: 637-640.

ANNEXE I

Chalifour, A., J. Basso, N. Gagnon, M. Trudel et C. Simard. 1996. Transcriptional and translational expression kinetics of the early gene encoding the BICP27 protein of bovine herpesvirus type 1. Virology **224**.

VIROLOGY 224, 000–000 (1996)
ARTICLE NO. 0000

SHORT COMMUNICATION

Transcriptional and Translational Expression Kinetics of the Early Gene Encoding the BICP27 Protein of Bovine Herpesvirus Type 1

ANICK CHALIFOUR, JOHNNY BASSO,[1] NICOLE GAGNON, MICHEL TRUDEL, and CLAIRE SIMARD[2]

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 July 3, 1996; accepted July 25, 1996

The expression kinetics of an essential *trans*-regulatory protein, ICP27, from herpes simplex virus type 1 correspond to that of an immediate-early gene whose expression increases rapidly upon infection and then decreases as of 7 hr postinfection. In contrast, here we report that the bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) homolog BICP27, a 50-kDa protein, is expressed as an early gene. Both the transcript and protein accumulated gradually reaching peak levels at approximately 12 hr postinfection, after which point steady state levels were maintained up to 24 hr. Thus the expression profiles of ICP27 and BICP27 are significantly different, suggesting that they may possess different functions. © 1996 Academic Press, Inc.

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1), a member of the *Alphaherpesvirinæ*, is an economically important pathogen of cattle. BHV-1 is primarily associated with two major clinical syndromes of cattle, namely infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and infectious pustular vulvovaginitis (IPV; *1, 2*). The BHV-1 genome, a 136-kbp linear double-stranded DNA molecule, is composed of a long (U_L) and a short (U_S) unique segment, the latter being flanked by inverted repeat sequences (*3*). Two isomeric forms of the genome occur naturally as the U_S region has the ability of inverting its orientation (*4, 5*). The viral DNA is believed to encode at least 70 polypeptides of which 25–33 are structural components of the virion (*6*). It also encodes transcriptional regulatory proteins and enzymes involved in DNA metabolism (*7*).

An international collaboration coordinated by Dr. Schwyzer (Switzerland) was undertaken to complete the sequencing of the BHV-1 genome (*7*). This allowed the identification of numerous open reading frames (ORFs) corresponding to previously identified proteins of herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Among these the homolog BICP27 of HSV-1-infected cell polypeptide 27 (ICP27), an essential immediate-early protein (*8, 9*) was identified. We investigated the transcriptional and translational expression kinetics of BICP27 in order to obtain preliminary evidence permitting us to postulate as to whether the BHV-1 and HSV-1 proteins have similar functions. The 1200-bp-long BICP27 ORF was located within the *Hpa*I G restriction fragment of the BHV-1 genome (Fig. 1A), and its corresponding amino acid sequence showed 61 and 69% similarity with that of HSV-1 ICP27 and equine herpesvirus type 1 UL3 counterparts, respectively (*10*). A 1224-bp *Hin*fI–*Hin*cII DNA fragment, representing the complete ORF (Fig. 1A), specifically hybridized to a transcript of 1.7 kb on Northern blots containing total RNA (Fig. 1B) isolated at different times post BHV-1 infection of MDBK cells. Longer exposure of the blots (not shown) revealed the presence of a minor band of 3.0 kb, which most probably represents a 3′ coterminal transcript from the adjacent gene (*10*). The BICP27 1.7-kb-specific transcript was detected at 3 hr postinfection (p.i.; lane 3), its abundance increased sixfold 12 hr p.i. (lane 12), and then slightly decreased at 20 hr p.i. (lane 20). A similar profile was observed with a blot representing poly(A)$^+$ RNA extracted at 6, 12, 18, and 24 hr p.i. (data not shown); this blot permitted us to ascertain that the BICP27 message was still present at 24 hr p.i. The expression profile observed represents that of a gene whose expression is early following BHV-1 infection. Our results are consistent with those of a previous study investigating the spatial and temporal distribution of BHV-1 transcripts and where an early transcript of 1.7 kb originating from the *Hin*dIII fragment N of the viral genome was identified (*11*). Interestingly, the size and kinetic class of the BICP27 transcript are similar to those of the transcript from the EHV-1 homologous gene (UL3; *12*).

To analyze the expression kinetics of the BICP27 pro-

[1] Present address: Eastern Virginia Medical School, Department of Microbiology and Immunology, P.O. Box 1980, Norfolk, Virginia 23501. Fax: (804) 624-2255.

[2] To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: (514) 686-5626. E-mail: Claire_Simard@IAF.UQUEBEC.CA.

0042-6822/96 $18.00
Copyright © 1996 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

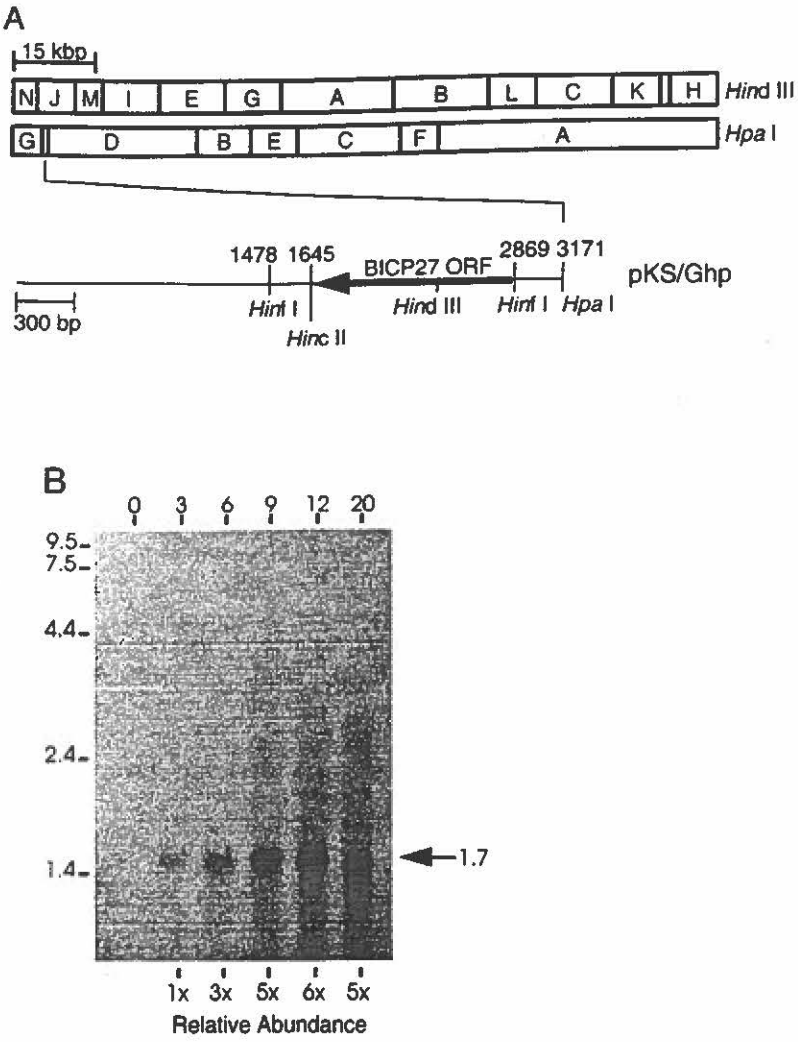


FIG. 1. Transcriptional kinetics of BICP27. (A) Schematic representations of the *Hind*III and *Hpa*I restriction maps of the BHV-1 genome illustrating an expanded view of the *Hpa*I G fragment which includes the BICP27 ORF initiating at position 2860 and ending at base 1660. To generate pKS/Ghp, purified BHV-1 DNA (IBR-like isolate 34; *23*) was digested with *Hpa*I, treated with 2 U of S1 nuclease (*24*) and fractionated by agarose gel electrophoresis. The 3.1-kbp fragment was then purified and ligated to the *Eco*RV cloning site of the pKS Bluescript vector (Stratagene) generating pKS/Ghp. Recombinants were identified by hybridization to the *Hind*III fragment N of the viral genome. (B) Expression kinetics of the BICP27 transcript. A Northern blot of total RNA extracted from BHV-1-infected cells collected at different hours postinfection (as indicated at the top of the autoradiogram) was performed as previously described (*25*). The blot was hybridized with a 1224-bp *Hinf*I/*Hinc*II-labeled fragment generated from pKS/Ghp and representing the complete BICP27 coding sequence. The numbers to the left correspond to molecular weight sizes in kb. At the bottom of the autoradiogram is indicated the relative abundance of the 1.7-kb transcript. This was evaluated by scanning the autoradiogram using the scanner ScanJet IICX (Hewlett-Packard), and then by analyzing the digitalized data using the Jandel Video Analysis Software (Jadel Scientific, CA).

tein in BHV-1-infected cells, we set out to generate a BICP27-specific antiserum. For this purpose the complete BICP27 protein was expressed in *Escherichia coli* using the pET21b translation vector (Novagen, Inc.) to serve as an antigen. To generate the recombinant vector pET/BICP27, a 1396-bp *Hinf*I fragment encoding BICP27 was isolated from pKS/Ghp (Fig. 1A) and ligated to a phosphorylated *Bam*HI adaptor (5′-pACTTCTAGACG-GATCCGTCTAGA-3′) generating cohesive ends which are compatible with the gene's 5′-end *Hinf*I site and which allowed the in-frame insertion of the coding sequence to that of the T7-Tag coding region of pET21b. The resulting DNA fragment was digested with *Bam*HI and *Hinc*II generating a 1244-bp fragment which was ligated to the filled in *Sal*I and cohesive *Bam*HI ends of pET21b. The resulting recombinant plasmid, pET/BICP27, thus contains the complete BICP27 coding sequence in addition to four codons upstream of the ATG fused in frame to the T7-Tag region. To ascertain proper reading frames, the vector/insert junctions were sequenced, then the recombinant plasmid was used to transform *E. coli* BL21. Lysates of cells induced with IPTG were analyzed by Western blotting using a commercially available anti-T7-Tag monoclonal antibody (MAb). The

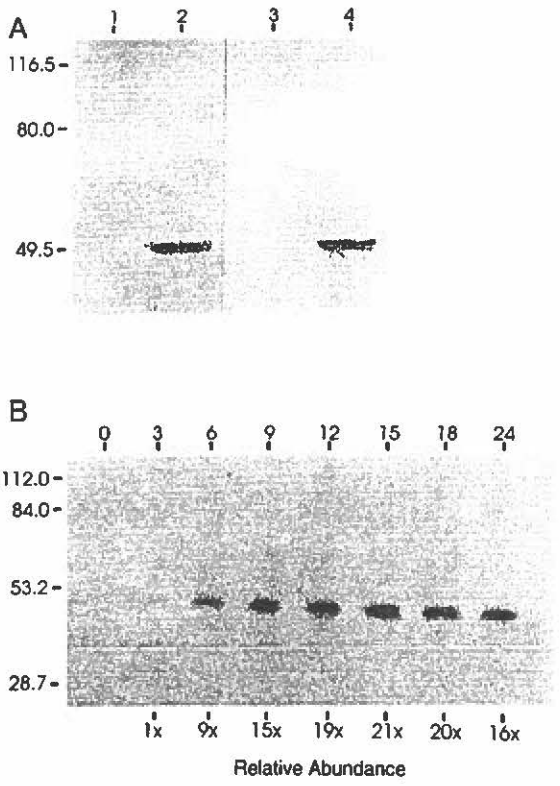


FIG. 2. Expression kinetics of the BICP27 protein. (A) Western blot analyses of *E. coli* extracts derived from cells harboring either pET21b (lanes 1 and 3) or pET/BICP27 (lanes 2 and 4). Recombinant *E. coli* BL21 cells were cultured to an $O.D._{600nm}$ of 0.6 at room temperature without agitation in terrific broth (*24*) containing 50 μg/ml ampicillin and 200 μg/ml arginine and then induced with 0.4 m*M* IPTG for 2 days. Cells were collected, resuspended in 0.1 vol of TEN (10 m*M* Tris–HCl, pH 7.5, 1 m*M* EDTA, 100 m*M* NaCl), containing 1 mg/ml lysozyme, and sonicated. After centrifugation, proteins contained in inclusion bodies were fractionated by SDS–PAGE and then electrotransferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad). Western blots were performed as described (*26*) using a commercially available anti-T7-Tag MAb (lanes 1 and 2) or an antiserum raised against the T7-Tag/BICP27 fusion protein expressed in *E. coli* (lanes 3 and 4). The numbers to the left correspond to molecular masses of standards in kDa. (B) Western blot analysis of total proteins from BHV-1-infected cells. Confluent monolayers of MDBK cells (18×10^6 total cells) were infected with BHV-1 at an m.o.i. of 2 for 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 24 hr. Cell lysate aliquots of 40 μl, prepared as previously described (*27*), were fractionated by SDS–PAGE. Proteins were electrotransferred onto a PVDF membrane and then reacted with the BICP27-specific antiserum. The numbers to the left correspond to molecular masses of standards in kDa. At the bottom of the blot is indicated the relative abundance of the BICP27 protein. This was evaluated as described in the legend of Fig. 1.

antibody specifically reacted with a protein of 50 kDa found within *E. coli* extracts harboring the recombinant plasmid (Fig. 2A, lane 2) but not in that derived from cells harboring only the vector (lane 1). The observed molecular mass of the polypeptide was within the size range expected (45.4 kDa) for the T7-Tag/BICP27 construct, confirming its identity. The T7-Tag/BICP27 fusion protein was purified twice by electroelution following preparative SDS–PAGE and then used to immunize mice for the production of a BICP27-specific antiserum. In this manner an antiserum which specifically recognized a 50-kDa protein within *E. coli* extracts harboring pET/BICP27 (Fig. 2A, lane 4) but not pET21b (lane 3) was obtained. This antiserum also specifically reacted with a protein of 49 kDa within extracts of COS cells transfected with a eukaryotic expression vector (pcDNA3/BICP27) containing the BICP27 coding sequence but not in that from cells transfected with only the vector (results not shown). The difference in the molecular masses of the protein observed following expression in *E. coli* as compared to that in COS cells is ascribed to the absence of the T7-Tag protein domain in the latter case.

The expression kinetics of the BICP27 protein in BHV-1-infected cells were investigated by Western blot analyses of total proteins extracted at different times postinfection (Fig. 2B). The BICP27-specific antiserum did not react with any protein before 3 hr p.i. (results not shown). As of 3 hr p.i., a 49-kDa protein whose abundance increased 21-fold 15 hr p.i. was detected. After this time point a progressive decrease in the levels of this protein was observed up to 24 hr following infection. The observed molecular mass of the BICP27 protein correlates well with that reported (50 kDa; *13*) using an antiserum directed against a synthetic peptide derived from the deduced amino acid sequence of the BICP27 ORF. The expression profile observed is consistent with that obtained at the transcript level and correlates with that of a protein expressed early following BHV-1 infection. Worthwhile to mention, the BICP27 antiserum did not react with any protein from purified BHV-1 (not shown), indicating that BICP27 does not constitute a structural component of the virion.

Thus in contrast to HSV-1, the transcription and protein expression profiles of BICP27 correlate with that of an early (β) rather than that of an immediate-early (α) gene. Furthermore, the expression profiles of the BICP27 protein and of its specific transcript fluctuate in a manner which is distinct from that reported for ICP27 (*14–16*). In contrast to the expression profiles which are observed with ICP27, those of BICP27 extend over a longer period of time. At the transcriptional level, ICP27's peak abundance is reached approximately 5 hr postinfection (*16*), whereas that of BICP27 is attained 12 hr following infection. Subsequent to peak expression, a detectable decrease in the levels of both the ICP27- and BICP27-specific transcripts is observed 7 and 20 hr, respectively, following viral infection. The expression profiles of the proteins essentially follow that of their transcripts (this study, *14, 15*). The difference in the broadness of the two profiles suggests differences in the function of the two proteins.

The expression profile of BICP27 suggests that it is needed until fairly late in the infectious cycle. Interestingly, from 3 to 12 hr p.i. the expression profile at the level of the protein parallels that of the transcript but

the protein's accumulation was three times that of its transcript. For instance at 12 hr p.i., the BICP27 transcript level was sixfold higher than that observed at 3 hr, whereas the protein level was 19-fold. This observation indicates that BICP27 is subject not only to transcriptional control but also to either translational or posttranslational control. The decreased expression level of ICP27 and BICP27, at the transcript and protein level, respectively, may reflect a reduced requirement as well as autogenous regulation of the protein's expression once peak levels are attained. This mode of regulation is supported by the observation that the transcript level of a temperature-sensitive ICP27 structural mutant of HSV-1 accumulates to a much higher level and for a longer duration than that of the wild type (*16*).

The present study will enable us to address the question as to whether the BICP27 protein possesses regulatory activities similar to its counterparts in other alphaherpesviruses. In HSV-1 for instance, ICP27 influences viral gene expression (*17, 18*), mRNA processing (*19, 20*), and intracellular localization of other regulatory proteins (*21, 22*).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Claude Guertin for his help with the digitalization of results and Dr. Jit Arora for their help with the electroelution procedure. This work was funded by NSERC Grants STR0167587 and 0GP0106053.

REFERENCES

1. Kit, S., *Adv. Exp. Med. Biol.* **251**, 219–236 (1989).
2. Wyler, R., Engels, M., and Schwyzer, M., *In* "Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses, and Pigs" (G. Wittmann, Ed.), pp. 1–72. Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, 1989.
3. Mayfield, J. E., Good, P. J., Vanoort, V. H., Campbell, A. R., and Reed, D. E., *J. Virol.* **47**, 259–264 (1983).
4. Farley, I., Skare, B., and Skare, J., *In* "The Human Herpes Viruses: An Interdisciplinary Perspective" (A. J. Nahmias, W. R. Dowdle, and R. F. Schinazi, Eds.), p. 590. Elsevier/North-Holland Publishing Co., New York, 1981.
5. Engels, M., Giuliani, C., Wild, P., Beck, T. M., Loepfe, E., and Wyler, R., *Virus Res.* **6**, 57–73 (1986).
6. Misra, V., Blumenthal, R. M., and Babiuk, L. A., *J. Virol.* **40**, 367–378 (1981).
7. Schwyzer, M., *In* "Immunobiology of Viral Infections" (M. Schwyzer, *et al.*, Eds.), pp. 108–113. Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol., 1995.
8. Sacks, W. R., Greene, C. C., Aschman, D. P., and Schaffer, P. A., *J. Virol.* **55**, 796–805 (1985).
9. McCarthy, A. M., McMahan, L., and Schaffer, P. A., *J. Virol.* **63**, 18–27 (1989).
10. Schwyzer, M., Styger, D., Vogt, B., Lowery, D. E., Simard, C., LaBoissière, S., Misra, V., Vlcek, C., and Paces, V., Submitted.
11. Wirth, U. V., Gunkel, K., Engels, M., and Schwyzer, M., *J. Virol.* **63**, 4882–4889 (1989).
12. Zhao, Y., Holden, V. R., Harty, R. N., and O'Callaghan, D. J., *J. Virol.* **66**, 5363–5372 (1992).
13. Köppel, R., Singh, M., Fraefel, C., Ackermann, M., and Schwyzer, M., *In* "Immunobiology of Viral Infections" (M. Schwyzer *et al.*, Eds.), pp. 126–131. Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol., 1995.
14. Honess, R. W., and Roizman, B., *J. Virol.* **14**, 8–19 (1974).
15. Honess, R. W., and Roizman, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1276–1280 (1975).
16. Sandri-Goldin, R. M., *In* "Herpesvirus Transcription and Its Regulation" (E. K. Wagner, Ed.), pp. 77–103. CRC Press, 1991.
17. Sekulovich, R. E., Leary, K., and Sandri-Goldin, R. M., *J. Virol.* **62**, 4510–4522 (1988).
18. Samaniego, L. A., Webb, A. L., and Deluca, N. A., *J. Virol.* **69**, 5705–5715 (1995).
19. McLauchlan, J., Phelan, A., Loney, C., Sandri-Goldin, R. M., and Clements, J. B., *J. Virol.* **66**, 6939–6945 (1992).
20. Hardwicke, M. A., and Sandri-Goldin, R. M., *J. Virol.* **68**, 4797–4810 (1994).
21. Zhu, Z. M., and Schaffer, P. A., *J. Virol.* **69**, 49–59 (1995).
22. Zhu, Z. M., Cai, W. Z., and Schaffer, P. A., *J. Virol.* **68**, 3027–3040 (1994).
23. Simard, C., LaBoissière, S., Séguin, C., and Trudel, M., *Intervirology* **32**, 117–126 (1991).
24. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
25. Simard, C., Bastien, N., and Trudel, M., *Virology* **190**, 689–701 (1992).
26. Trudel, M., Nadon, F., Séguin, C., Boulay, G., and Lussier, G., *Vaccine* **5**, 239–243 (1987).
27. Simard, C., Langlois, I., Styger, D., Vogt, B., Vlcek, C., Chalifour, A., Trudel, M., and Schwyzer, M., *Virology* **212**, 734–740 (1995).

ANNEXE II

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.

Ma contribution à cette publication s'est effectuée au niveau de la production d'un sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase.

VIROLOGY 212, 734–740 (1995)

SHORT COMMUNICATION

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

CLAIRE SIMARD,*,[1] ISABELLE LANGLOIS,* DOMINIK STYGER,† BERND VOGT,† CESTMIR VLCEK,‡ ANICK CHALIFOUR,* MICHEL TRUDEL,* and MARTIN SCHWYZER†

*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; †Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 266a, CH-8057 Zürich, Switzerland; and ‡Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, Flemingovo Nam. 2, CZ-16637 Prague 6, Czech Republic

Received May 5, 1995; accepted July 13, 1995

We sequenced the region of the bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) genome corresponding to map units 0.172–0.230 (7964 bp), representing the UL39, UL38, and UL37 homologues of herpes simplex virus which encode the large subunit of ribonucleotide reductase (RR) and components of the viral capsid and the tegument, respectively. To discriminate between two potential initiator AUGs of the UL39 gene, the 5′ end of the mRNA was mapped by S1 nuclease protection assays. Comparison of the amino acid sequences of the three BHV-1 proteins with analogous polypeptides from several other herpesviruses revealed significant levels of homology. We also compared the expression kinetics of the large (R1, UL39) versus the small (R2, UL40) RR subunits during the course of *in vitro* BHV-1 infection by Western blotting using specifically developed and calibrated antisera. Our results show that the R1 protein was synthesized earlier than its R2 counterpart. Moreover, the R1 protein accumulated to a higher level than the R2 protein even though the R2 transcript was in greater abundance than the R1 mRNA. This is discussed with regard to the translational efficiency of their transcripts.
© 1995 Academic Press, Inc.

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1), a member of the *Alphaherpesvirinae*, is an economically important pathogen of cattle. BHV-1 is primarily associated with two major clinical syndromes of cattle, namely infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and infectious pustular vulvovaginitis. The viral genome is a 137-kb linear double-stranded DNA which is believed to encode at least 70 polypeptides from which 25–33 are structural components of the virion. It also encodes transcriptional regulatory proteins and enzymes involved in DNA metabolism (*1*), such as ribonucleotide reductase (RR). This enzyme catalyzes the reduction of ribonucleoside diphosphates to their corresponding 2′-deoxy forms which are precursors for DNA synthesis. In herpes simplex virus type 1 (HSV-1), the holoenzyme is constituted of two large (R1) and two small (R2) subunits (*2*).

Presently, an international collaboration is under way to sequence the complete BHV-1 genome. As a contribution to this collaborative effort, our laboratories have sequenced the region from 0.172 to 0.230 map units (mu) from IBR-like isolates 34 (*3*) or Cooper (*4*). Together with the previously sequenced 0.162–0.172 mu region (*5*), it constitutes a 9.4-kb *Kpn*I–*Eco*RI fragment spanning the *Hin*dIII fragments I and E of the genome (Fig. 1). Computer analysis revealed that this 9.4-kb fragment encoded the BHV-1 homologues of the HSV-1 UL40, UL39, UL38, and UL37 gene products, with the first three genes in leftward orientation and the last one running toward the right. The four coding sequences are thus directed in the same orientation as in HSV-1 (*6*), considering that the HSV-1 prototype genome is conventionally inverted relative to the one from BHV-1 (*7*). A fifth ORF of significant length was found inside the UL39 ORF with a frameshift of +2, potentially encoding 317 amino acid residues. However, codon usage analysis and a comparison with the corresponding regions of other alphaherpesviruses, all of which were found to carry stop codons in the +2 frame, made it unlikely that this frame encodes a protein. The 7964-bp sequence presented in Fig. 2 begins nine codons from the N-terminus of the previously reported sequence of the gene encoding the small subunit (R2) of the BHV-1 RR (*5*).

An ORF initiating at position 2721 and ending at base 49 was identified and its corresponding amino acid sequence was found to be homologous to the R1 of other viral RR. This ORF would encode a polypeptide with a calculated molecular weight of 96,750 Da. However, translation could initiate at a second Met codon (position 2409), still producing a protein large enough (86,004 Da)

[1] To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: (514) 686-5626.

0042-6822/95 $12.00
Copyright © 1995 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

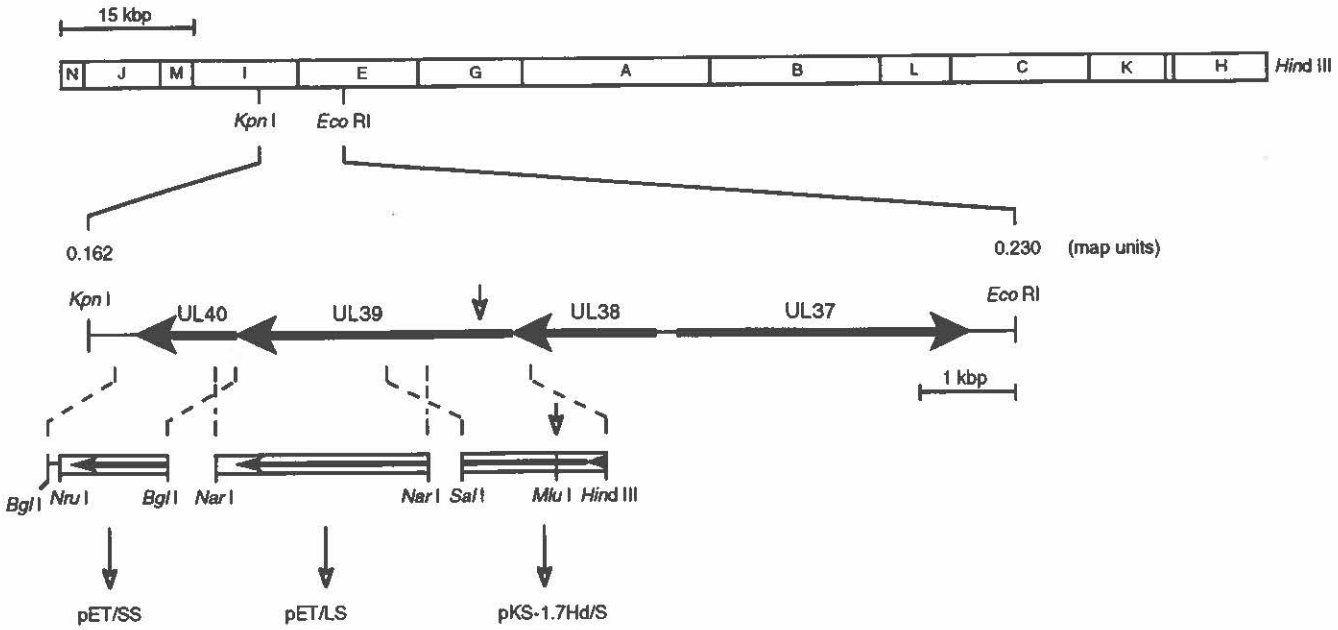


FIG. 1. Location and orientation of the UL40–UL37 homologues on the BHV-1 genome. The *Hin*dIII restriction map of the 137-kb genome of BHV-1 (*4*) is illustrated at the top. The 9.4-kb *Kpn*I/*Eco*RI fragment corresponding to map units 0.162–0.230 is shown in an expanded form. Arrows indicate the location and orientation of open reading frames homologous to UL40, UL39, UL38, and UL37 HSV-1 genes. The complete DNA and amino acid sequences of the three latter genes are given in Fig. 2; those for the UL40 were reported previously (*5*). The small arrow above the UL39 ORF identifies the translation start site of the corresponding polypeptide (see text). The R2 (UL40) and R1 (UL39) proteins of viral RR were individually expressed in *Escherichia coli* using the pET21b translation vector (Novagen, Inc.) to serve as antigens for the production of monospecific sera. To express the R2 polypeptide, the 1180-bp *Bgl*I fragment representing its complete coding sequence with the exception of the first 2 amino acid residues was ligated to a *Bam*HI adaptor, digested with *Bam*HI and *Nru*I, then inserted in frame with the T7-Tag coding region of pET21b to generate pET/SS. To express the R1 protein, the 1992-bp *Nar*I fragment encoding its last 602 amino acid residues was ligated to a *Bam*HI adaptor, digested with *Bam*HI, and inserted in frame with the T7-Tag region of pET21b, generating pET/LS. In order to ascertain proper reading frames, the vector/insert junctions of both pET/SS and pET/LS clones were sequenced. The subclone pKS-1.7 Hd/S was used to map the 5′ end of the UL39 transcript. Diagrams are drawn to scale as indicated.

to represent the R1 of RR. To determine at which AUG translation initiates, the 5′ end of the R1-specific transcript was mapped by S1 nuclease protection assays (Fig. 3). For this purpose, the 760-bp *Mlu*I–*Hin*dIII fragment which was end-labeled 15 nucleotides downstream from the first base of the AUG_{2409} (see Fig. 2) was hybridized with total RNA extracted either from BHV-1-infected (9 hr postinfection) or mock-infected MDBK cells. Following S1 nuclease digestion, three DNA fragments of 222, 223, and 224 bases long were protected in the reaction mixture containing BHV-1 mRNA (Fig. 3, lane BHV), whereas no fragments were protected in the control (lane m-i). The S1-resistant DNA band of 223 bases was twice as intense as the other two, suggesting that it corresponds to the major transcription start site which is located 209 bases upstream from the translation initiator codon AUG_{2409} (position 2618 in Fig. 2). The other two bands may either represent partially digested DNA fragments or minor transcription start sites at 208 and 210 nucleotides from the AUG_{2409}. These findings excluded the possibility that the AUG_{2721} was used as the initiator codon since transcription was initiated downstream from it. We previously reported that the transcript encoding the R1 is 3′-coterminal with the one encoding the

FIG. 2. Nucleic acid and deduced amino acid sequences of the UL39, UL38, and UL37 homologues of BHV-1. DNA sequencing was performed either by the dideoxynucleotide chain termination (*18*) or by the Maxam and Gilbert (*19*) method. The DNA sequence is shown as the rightward 5′ to 3′ strand and its nucleotides are numbered on the right. Encoded protein sequences are shown below the DNA sequence and the corresponding amino acid residues are numbered in bold. The direction of translation of the corresponding genes is identified with arrows. The UL39 ORF extends from nucleotide 2721 to 49; however, the actual translation start site of the polypeptide is at position 2409. The transcriptional start site of UL39 and its direction are indicated with a vertical bar and an arrow at position 2618. The coding sequences of the UL38 and UL37 homologues are located within the regions 4175–2754 and 4391–7462, respectively. Putative TATA and CAAT boxes upstream from each coding sequence are underlined with a double line. The putative polyadenylation signal of UL38 is identified with a single line above the nucleotide residues. Restriction sites which are pertinent to this study are underlined and identified. Every 10th base in a line is denoted with a dot over the corresponding residue. The nucleotide sequence data have been submitted to the EMBL nucleotide sequence database and have been assigned Accession No. Z49078. The sequence will become available to the scientific community during the course of 1995 when the sequencing of the BHV-1 genome will be completed.

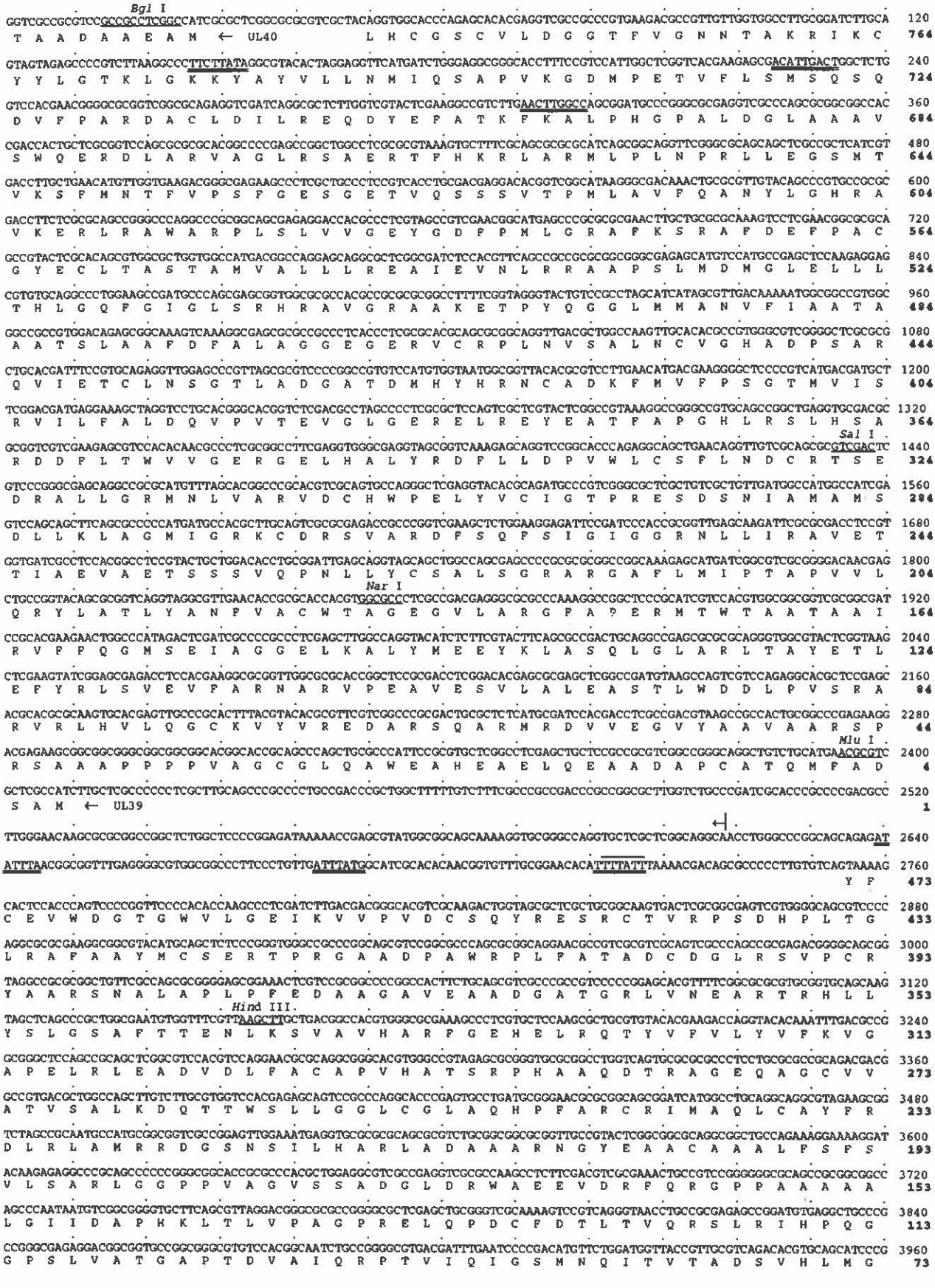

Bgl I
T A A D A A E A M ← UL40
L H C G S C V L D G G T F V G N N T A K R I K C
Y Y L G T K L G K K Y A Y V L L N M I Q S A P V K G D M P E T V F L S M S Q S Q
D V F P A R D A C L D I L R E Q D Y E F A T K F K A L P H G P A L D G L A A A V
S W Q E R D L A R V A G L R S A E R T F H K R L A R M L P L N P R L L E G S M T
V K S F M N T F V P S F G E S G E T V Q S S S V T P M L A V F Q A N Y L G H R A
V K E R L R A W A R P L S L V V G E Y G D F P M L G R A F K S R A F D E F P A C
G Y E C L T A S T A M V A L L L R E A I E V N L R R A A P S L M D M G L E L L L
T H L G Q F G I G L S R H R A V G R A A K E T P Y Y Q G G L M M A N V F I A A T A
A A T S L A A F D F A L A G G E G E R V C R P L N V S A L N C V G H A D P S A R
Q V I E T C L N S G T L A D G A T D M H Y H R N C A D K F M V F P S G T M V I S
R V I L F A L D Q V P V T E V G L G E R E L R E Y E A T F A P G H L R S L H S A
Sal I
R D D F L T W V V G E R G E L H A L Y R D F L L D P V W L C S F L N D C R T S E
D R A L L G R M N L V A R V D C H W P E L Y V C I G T P R E S D S N I A M A M S
D L L K L A G M I G R K C D R S V A R D F S Q F S I G I G G R N L L I R A V E T
T I A E V A E T S S S V Q P N L L Y C S A L S G R A R G A F L M I P T A P V V L
Nar I
Q R Y L A T L Y A N F V A C W T A G E G V L A R G F A P E R M T W T A A T A A I
R V F P Q G M S E I A G G E L K A L Y M E E Y K L A S Q L G L A R L T A Y E T L
E F Y R L S V E V F A R N A R V P E A V E S V L A L E A S T L W D D L P V S R A
R V R L H V L Q G C K V Y V R E D A R S Q A R M R D V V E G V Y A A V A A R S P
Mlu I
R S A A A P P P P V A G C G L Q A W E A H E A E L Q E A A D A P C A T Q M F A D
S A M ← UL39
Hind III
Y A A R S N A L A P L P F E D A A G A V E A A D G A T G R L V N E A R T R H L L
Y S L G S A F T T E N L K S V A V H A R F G E H E L R Q T Y V F V L Y V F K V G
A P E L R L E A D V D L F A C A P V H A T S R P H A A Q D T R A G E Q A G C V V
A T V S A L K D Q T T W S L L G G L C G L A Q H P F A R C R I M A Q L C A Y F R
D L R L A M R R D G S N S I L H A R L A D A A A R N G Y E A A C A A A L F S F S
V L S A R L G G P P V A G V S S A D G L D R W A E E V D R F Q R G P P A A A A A
L G I I D A P H K L T L V P A G P R E L Q P D C F D T L T V Q R S L R I H P Q G
G P S L V A T G A P T D V A I Q R P T V I Q I G S M N Q I T V T A D S V H L M G

FIG. 2

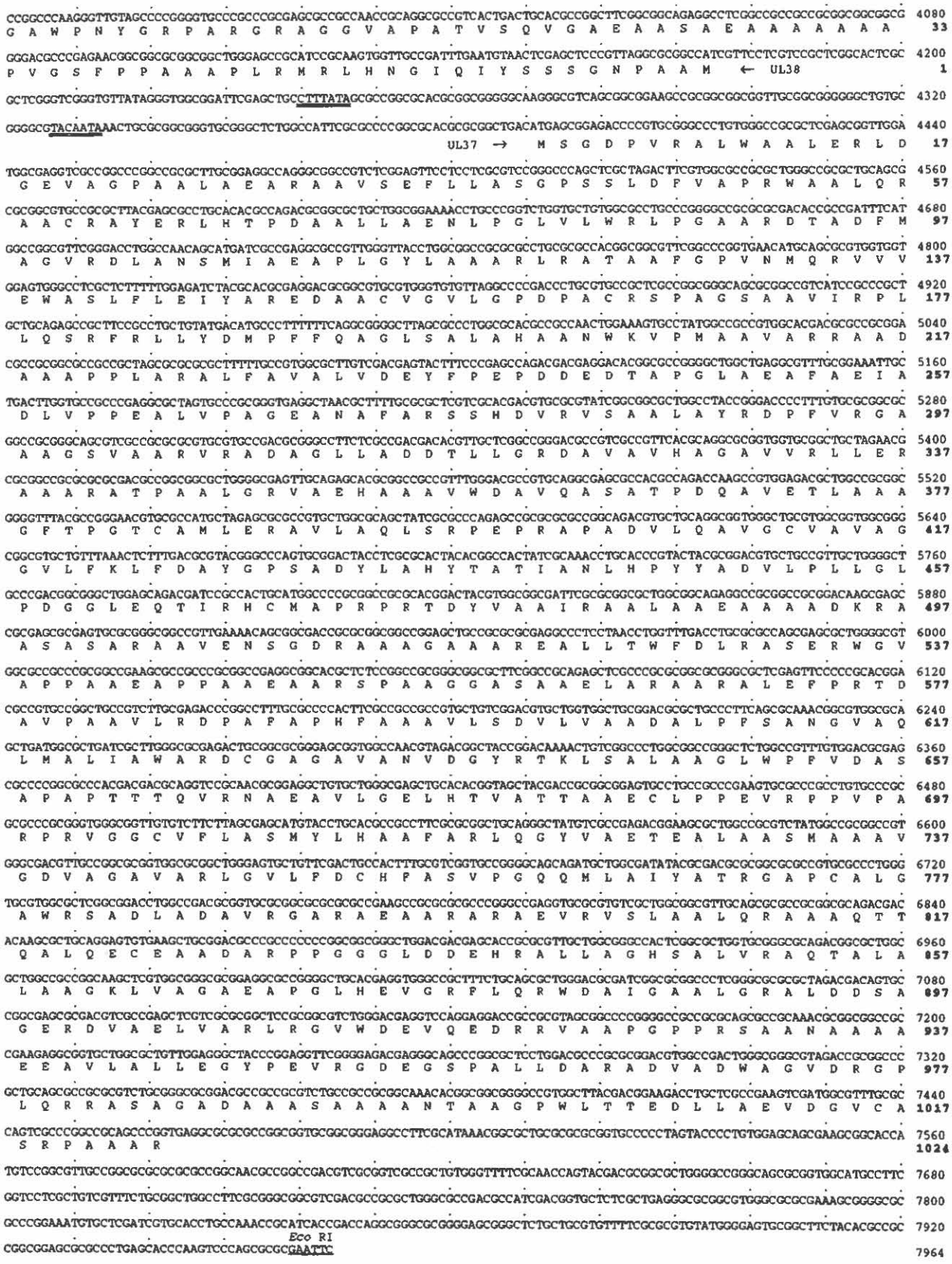


FIG. 2—*Continued*

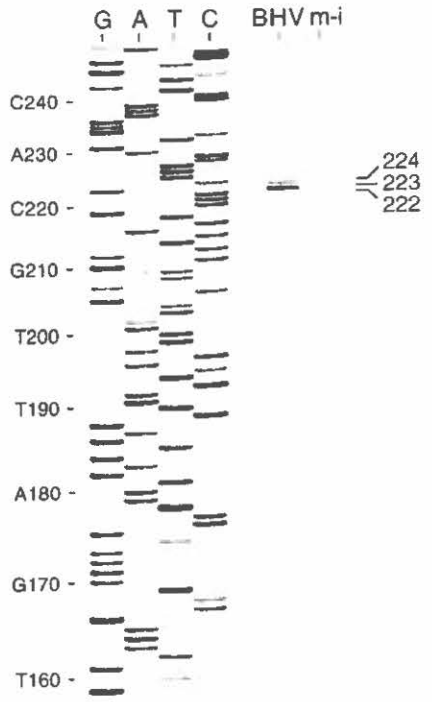


FIG. 3. 5′ end mapping of the transcript encoding the large subunit of BHV-1 RR. The S1 nuclease protection assays were performed as previously described (*5*). The 760-bp *Mlu*I–*Hin*dIII fragment end-labeled at the *Mlu*I site (position 2394, see Fig. 2) was isolated from pKS-1.7Hd/S (Fig. 1) and hybridized to RNAs isolated as previously described (*20*) from BHV-1- or mock-infected cells. DNA from the BHV-1 (lane BHV) or mock-infected (lane m-i) mixture which was resistant to S1 nuclease digestion was analyzed on sequencing gels in parallel with dideoxy sequencing reactions of M13mp18 (lanes G, A, T, C). Every 10th nucleotide of the M13mp18 sequence is identified on the left with the size of the corresponding fragment. The sizes of S1-resistant DNAs in the BHV-1 sample are identified on the right.

enzyme's R2 and that its 3′ end site is located 18 bases downstream from a shared polyadenylation signal (*5*). This places the site 1050 bases downstream from the stop codon of the gene. Adding the sizes of the 5′ and 3′ noncoding regions of the transcript to that of its coding sequence would result in a transcript of 3623 nucleotides long. This correlates well with the observed transcript's size (3.7 kb) following Northern blot analysis (*5*).

The R1 transcript is presumably regulated by a TATA box located 21 nucleotides upstream from the transcription start site. Two additional TATA boxes located at 65 and 103 nucleotides and a CAAT box motif 1100 bases upstream are probably too distant to serve as promoter elements. By comparison, the putative promoter of the transcript encoding R2 is composed of a single TATA and two CAAT boxes (Fig. 2). Interestingly, we previously reported that the R1 transcript is at least five times less abundant than the one encoding R2 (*5*). Although this may reflect differences in the transcripts' turnover, differences in the promoter elements of the two genes could account for the overexpression of the R2 transcript relative to the other one.

Significant homologies were found between the R1 protein of BHV-1 and those of the three herpesvirus subfamilies (*Alpha-*, *Beta-*, and *gammaherpesvirinae*), of an iridovirus, and of mammalian origin, supporting the hypothesis that the genes were derived from a common precursor. Homologies were distributed throughout the proteins with the exception of the N-terminal ends where the similarities were weak. We identified several conserved domains which may reflect structural constraints indispensable to the enzyme's active sites or to the assembly of holoenzymes. Consistent with this hypothesis, residues which have been implicated in *Escherichia coli* R1 active sites or in ribose binding and transformation (Cys225, Cys462, Cys439, Tyr730, Tyr731, Ser224, Asn437, and Glu441; *8*) were strictly conserved in all sequences examined except in those from human cytomegalovirus and human herpesvirus type 6.

Examination of the BHV-1 nucleotide sequence to the right of the RR genes revealed the presence of the UL38 and UL37 ORFs in the same divergent arrangement as that of other alphaherpesviruses. The UL38 ORF extends from AUG_{4175}, which is in a good sequence context for translation initiation (*9*), to UGA_{2753} and encodes a polypeptide of 474 amino acids. It is flanked by a TATA box (positions 4246–4240) and a polyadenylation signal (positions 2727–2722). According to the location of these elements, we predicted a UL38 transcript of 1.7 kb including the poly(A) tail. An early transcript of this size has indeed been observed by Northern blot analysis of BHV-1 strain K22 (*10*). Furthermore, it precisely maps in the expected position because it was shown to span *Hin*dIII fragments E and O; the 1.4-kb fragment O is present only in strain K22 due to an additional *Hin*dIII site at 0.184 mu and corresponds to the right end of *Hin*dIII fragment I in the Cooper strain (*10*).

The UL37 ORF comprises positions 4391–7462 (1024 amino acid residues). Potential TATA boxes located upstream of UL37 deviate from the consensus at several positions. There is no downstream polyadenylation signal within the sequence presented here, and the adjacent UL36 sequence is not yet available. Nevertheless, a 3.9-kb transcript and a very long transcript (at least 8 kb) have been mapped by Northern blot analysis to the *Hin*dIII E region (*10*) and may encode UL37 and UL36, respectively, although precise transcript boundaries have not been established.

Multiple sequence alignments of the BHV-1 UL38 and UL37 ORFs revealed strong homologies to the corresponding proteins of all alphaherpesviruses which have been sequenced and weaker homologies to the proteins of beta- and gammaherpesviruses. In HSV-1, both the UL38 and UL37 gene products are associated with virions and have been shown to be essential for virus replication in cell culture (*11*). The UL38 protein participates in icosahedral capsid assembly (*12, 13*); the UL37 protein is associated with the viral tegument (*14, 15*) and also

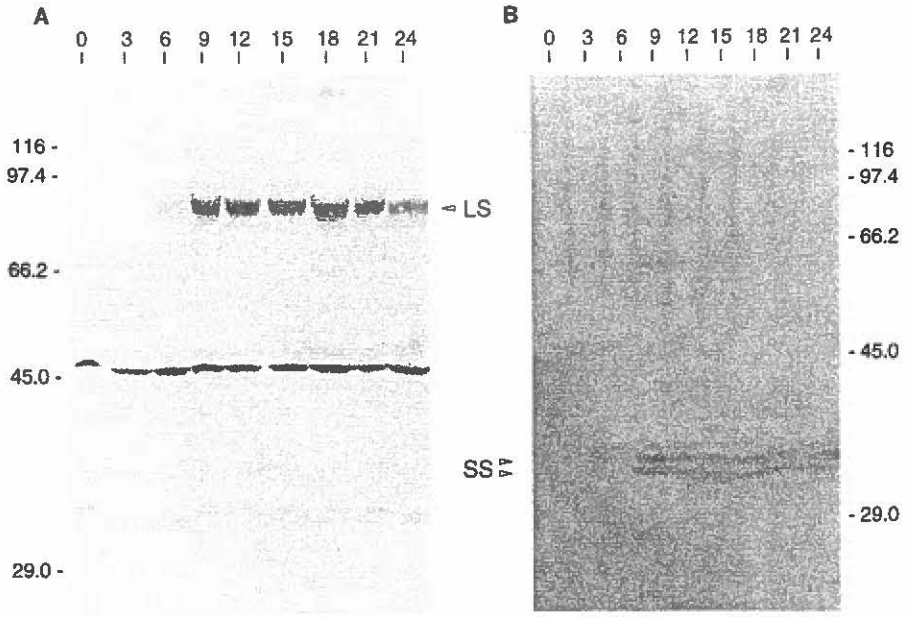


FIG. 4. Expression kinetics of the large and small subunits of BHV-1 RR during the course of *in vitro* infection. Confluent monolayers of MDBK cells (18×10^6 total cells) were infected with BHV-1 at an m.o.i. of 2 for 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, and 24 hr. Cells were washed with PBS and lysed in 500 μl of SDS sample buffer (40 m*M* Tris–HCl, pH 6.8, 2% SDS, 280 m*M* β-mercaptoethanol, 10% glycerol). Lysates (40 μl) were fractionated by SDS–PAGE (10%) and proteins were electrotransferred at 55 V for 4 hr onto a PVDF membrane (Bio-Rad), conditions which allowed complete transfer of high MW proteins. Western blots were performed as described (*21*) using antisera specific to either (A) the R1 or (B) the R2 of BHV-1 RR. Antisera against R1 and R2 were obtained from guinea pigs immunized with the respective polypeptides purified on SDS–PAGE from extracts of *E. coli* BL21 harboring the recombinant plasmids pET/SS and pET/LS (Fig. 1), respectively. Reacting bands were revealed with protein A peroxidase. LS and SS specify the large (R1) and small (R2) subunits of BHV-1 RR, respectively. Sizes in kDa of molecular weight standards are identified on the left and right.

interacts with ICP8, the major DNA binding protein (*16*). Interestingly, the HSV-1 UL38 gene is regulated with strict late kinetics (*17*), whereas the BHV-1 UL38 transcript belongs to the early kinetic class (*10*).

The RR coding sequences obtained in this and a previous study (*5*) allowed us to express the individual subunits as T7-Tag fusion proteins in *E. coli,* via pET/LS and pET/SS recombinant translation vectors (Fig. 1), for the generation of specific antisera. These sera were used to verify whether the accumulation of the two polypeptides in BHV-1-infected cells correlated with our previous observation that the R2 transcript is more abundant than that of R1 (*5*). The small (pET/SS) and large (pET/LS) subunit-specific vectors allowed the synthesis of abundant polypeptides of 36 and 67 kDa, respectively (results not shown), which were of the expected sizes (36,965 and 67,600 Da, respectively). The two recombinant proteins reacted specifically with the commercially available T7-Tag monoclonal antibody (MAb), demonstrating that they included the T7-Tag N-terminal region provided by the translation vector (results not shown). Both proteins were purified by SDS–PAGE and used to generate antisera. Since differences in the immunogenicity of the antigens would interfere with the evaluation of the relative abundance of the two subunits of viral RR in infected cells, the relative concentrations of the antisera were evaluated. For this purpose, we took advantage of the common T7-Tag region of the two fusion polypeptides expressed in *E. coli.* Insoluble fractions obtained from *E. coli* lysates containing either the R2 or R1 hybrid proteins were analyzed by Western as well as dot blottings (results not shown). Since the T7-Tag MAb reacted with the two fusion proteins, it was used as an internal standard to calibrate their relative abundance when using their specific antisera. Dilutions of the antisera specific to the R2 and R1 were adjusted to obtain a difference in the signal which was empirically equivalent to that obtained with the T7-Tag MAb.

Accumulation of the R2 and R1 of BHV-1 RR was analyzed as a function of time by Western blotting of infected cell lysates (Fig. 4). The R1-specific antiserum reacted with a viral polypeptide of 85 kDa in BHV-1-infected cell lysates (Fig. 4A, lanes 3–24) which was absent from mock-infected cells (lane 0). The size of the polypeptide is consistent with the one predicted (86,004 Da) from the deduced amino acid sequence of R1, starting at the AUG_{2409}. The R1 polypeptide was detectable, albeit at a low level, as soon as 6 hr postinfection, indicating that it is expressed as an early product (β) following cell infection. Its levels significantly increased up to 9 hr and remained steady until 24 hr postinfection. The three other proteins (45, 35, and 33 kDa) which were revealed in BHV-1-infected as well as in mock-infected lysates represent cellular proteins cross-reacting with the antiserum.

The R2 antiserum specifically reacted with two polypeptides of 34 and 33 kDa in BHV-1-infected cell lysates (Fig.

4B, lanes 3–24) but did not recognize any polypeptides in mock-infected cells (lane 0). The size range of the polypeptides observed is consistent with the one predicted from the amino acid sequence of the viral R2 (35.25 kDa; *5*). Although the lower band observed may represent a degradation product of the larger one, the possibility that it may represent a different form of the R2 cannot be excluded. The polypeptides accumulated in cells at similar levels as of 9 hr postinfection and their levels remained constant until 24 hr postinfection.

In contrast to the transcript levels, the R1 polypeptide was more abundant than that of the R2. Furthermore, even though at 6 hr postinfection the R2 transcript is five times more abundant than that of R1 (*5*), the R2 polypeptide was only detected at 9 hr, whereas the R1 protein was present as early as 6 hr. Together, these results strongly suggest that the transcript encoding R1 is more efficiently translated than that of R2. Based on Kozak's findings (*9*), the presence of an A residue at position −3 of the initiator AUG codon of the R1 transcript is preferable for translation to the G residue found at this position in R2. Additionally, the larger size of the R1 transcript leader sequence (209 bases relative to 95 for the R2; *5*) may also be advantageous. These features present in the R1 transcript could facilitate its translation and explain the abundance of R1. However, the difference in the abundance of the R1 polypeptide compared to the R2 could also be explained by differences in their half-lives. Since in every organism in which ribonucleotide reductase has been characterized the stoichiometry of the holoenzyme's two subunits is 1:1, our results strongly suggest that free R1 subunits or R1 homodimers exist in the cell.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Johnny Basso for proofreading the manuscript. This work was funded by NSERC OGP0006211 and OGP0003579 as well as by Swiss National Science Foundation Grant 92-03791.

REFERENCES

1. Wyler, R., Engels, M., and Schwyzer, M., *In* "Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses, and Pigs" (G. Wittmann, Ed.), pp. 1–72. Kluwer Academic, Boston/Dordrecht/London, 1989.
2. Ingemarson, R., and Lankinen, H., *Virology* **156**, 417–422 (1987).
3. Simard, C., LaBoissière, S., Séguin, C., and Trudel, M., *Intervirology* **32**, 117–126 (1991).
4. Mayfield, J. E., Good, P. J., Vanoort, V. H., Campbell, A. R., and Reed, D. E., *J. Virol.* **47**, 259–264 (1983).
5. Simard, C., Bastien, N., and Trudel, M., *Virology* **190**, 689–701 (1992).
6. McGeoch, D. J., Dalrymple, M. A., Davison, A. J., Dolan, A., Frame, M. C., McNab, D., Perry, L. J., Scott, J. E., and Taylor, P., *J. Gen. Virol.* **69**, 1531–1574 (1988).
7. Davison, A. J., and Wilkie, N. M., *J. Gen. Virol.* **64**, 1927–1942 (1983).
8. Uhlin, U., and Eklund, H., *Nature* **370**, 533–539 (1994).
9. Kozak, M., *J. Biol. Chem.* **266**, 19867–19870 (1991).
10. Wirth, U. V., Gunkel, K., Engels, M., and Schwyzer, M., *J. Virol.* **63**, 4882–4889 (1989).
11. Ward, P. L., and Roizman, B., *Trends Genet.* **10**, 267–274 (1994).
12. Tatman, J. D., Preston, V. G., Nicholson, P., Elliott, R. M., and Rixon, F. J., *J. Gen. Virol.* **75**, 1101–1113 (1994).
13. Thomsen, D. R., Roof, L. L., and Homa, F. L., *J. Virol.* **68**, 2442–2457 (1994).
14. McLauchlan, J., Liefkens, K., and Stow, N. D., *J. Gen. Virol.* **75**, 2047–2052 (1994).
15. Schmitz, J. B., Albright, A. G., Kinchington, P. R., and Jenkins, F. J., *Virology* **206**, 1055–1065 (1995).
16. Shelton, L. S., Albright, A. G., Ruyechan, W. T., and Jenkins, F. J., *J. Virol.* **68**, 521–525 (1994).
17. Guzowski, J. F., Singh, J., and Wagner, E. K., *J. Virol.* **68**, 7774–7789 (1994).
18. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467 (1977).
19. Maxam, A., and Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 560–564 (1977).
20. Simard, C., Nadon, F., Séguin, C., LaBoissière, S., and Trudel, M., *Arch. Virol.* **110**, 63–75 (1990).
21. Trudel, M., Nadon, F., Séguin, C., Boulay, G., and Lussier, G., *Vaccine* **5**, 239–243 (1987).

ANNEXE III

COMMUNICATIONS

Chalifour, A., N. Gagnon, M. Trudel et C. Simard. 1996. Expression kinetics at the transcriptional and translational level of the gene encoding the BICP27 protein from bovine herpesvirus type 1. American Society for Virology, London, Ontario, Canada.

Langlois, I., A. Chalifour, N. Gagnon, M. Trudel et C. Simard. 1994. Kinetic analysis of the expression of the small and large subunits of ribonucleotide reductase from bovine herpesvirus type-1. VIIth International Conference on Comparative and Applied Virology, Montréal, Québec, Canada.

Simard, C., I. Langlois, A. Chalifour et Michel Trudel. 1994. Non-stoichiometric synthesis of the small and large subunits of ribonucleotide reductase from bovine herpesvirus type 1. 19th International Herpesvirus Workshop, Vancouver, Colombie-Britannique, Canada.