

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

SYLVIE LA BOISSIÈRE

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

AOÛT 1995

On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres; mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison.

H. Poincaré

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
SOMMAIRE	xii
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. GÉNÉRALITÉS SUR LES <i>HERPESVIRIDAE</i>	5
1.1 Historique et taxonomie.....	5
1.2 Structure des génomes.....	7
1.3 Cycle lytique.....	7
1.4 Latence	11
2. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIRUS DE L'HERPÈS BOVIN DE TYPE 1	12
2.1 Historique	12
2.2 Taxonomie.....	13
2.3 Morphologie.....	13
2.4 Parenté antigénique.....	16
3. PATHOGÉNICITÉ DU BHV-1	16
3.1 Infections aiguës	16
3.2 Latence	18
4. GÉNOME.....	19
5. EXPRESSION DES GÈNES	22
5.1 Cycle lytique.....	22
5.2 Latence	23
6. PROPRIÉTÉS ET FONCTIONS DES PROTÉINES.....	24
6.1 Protéines précoces-immédiates.....	24
6.2 Glycoprotéines de surface.....	25
6.3 Enzymes	28
6.4 Autres gènes et/ou protéines.....	30
7. IMMUNITÉ INDUITE PAR LE BHV-1	31
7.1 Immunité non-spécifique	32
7.1.1 Interférons.....	32
7.1.2 Macrophages	32
7.1.3 Cellules NK.....	33
7.2 Immunité spécifique.....	34
7.2.1 Immunité humorale	34
7.2.2 Immunité cellulaire.....	36
7.3 Immunosuppression et immuno-évasion	38
8. VACCINS	39
9. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIRUS DE LA VACCINE	42
9.1 Taxonomie et morphologie	42
9.2 Génome, gènes et protéines.....	42
9.3 Cycle de réplication.....	43

9.4 Utilisation comme vecteur d'expression	45
MATÉRIEL ET MÉTHODES	46
1. CELLULES ET VIRUS	47
1.1 Cellules	47
1.2 Culture cellulaire	47
1.3 Souches virales	48
1.4 Productions virales	48
1.4.1 Production du virus BHV-1	48
1.4.2 Production du virus de la vaccine	49
1.5 Évaluation du titre viral	49
2. BACTÉRIES ET PLASMIDES	50
2.1 Souches d' <i>Escherichia coli</i>	50
2.2 Milieux de croissance des bactéries	50
2.3 Vecteurs de clonage	50
3. PRÉPARATION DE L'ADN	51
3.1 Purification de l'ADN viral	51
3.2 Purification d'ADN plasmidique	53
4. MANIPULATION DE L'ADN	53
4.1 Électrophorèse en gel d'agarose	53
4.2 Digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction	54
4.3 Réparation des extrémités d'un fragment d'ADN	54
4.4 Purification des fragments d'ADN en gel d'agarose	55
4.5 Clonage	55
4.5.1 Préparation des vecteurs	55
4.5.2 Ligation	56
4.5.3 Préparation de bactéries compétentes	56
4.5.4 Transformation de <i>E. coli</i>	57
4.6 Hybridation ADN/ADN	58
4.6.1 Transfert de type Southern	58
4.6.2 Hybridation de colonies	58
4.6.3 Préparation de la sonde	58
4.6.4 Hybridation	59
5. SÉQUENÇAGE	60
5.1 Séquençage chimique	60
5.2 Séquençage enzymatique	61
5.3 Gels de séquence	62
5.4 Analyse des séquences	63
6. MANIPULATION DES ARNS	63
6.1 Purification des ARNs totaux	63
6.1.1 Cellules infectées avec le BHV-1	63
6.1.2 Cellules infectées avec le VV	64
6.2 Sélection des ARNm-polyA+	64
6.3 Électrophorèse et transfert de type Northern	65
6.4 Hybridation	65
7. RÉACTION D'EXTENSION D'AMORCE	66
8. CONSTRUCTION DES RECOMBINANTS DE LA VACCINE	68
8.1 Sous-clonage du gène de la VP8	68

8.2 Mutagenèse dirigée.....	68
8.3 Construction des plasmides de transfert	70
8.4 Transfection.....	73
8.5 Sélection des recombinants	74
9. ÉLECTROPHORÈSES DE PROTÉINES ET IMMUNOEMPRESSES.....	74
9.1 Préparation des lysats cellulaires.....	74
9.2 Électrophorèse de protéines (SDS-PAGE).....	75
9.3 Transfert de type Western et immunoempreinte	75
10. EXPÉRIMENTATION CHEZ LA SOURIS.....	76
10.1 Souris.....	76
10.2 Immunisations	77
11. ELISA.....	77
11.1 Préparation de l'antigène.....	77
11.2 Immunodétection directe	78
12. TESTS DE NEUTRALISATION.....	79
13. TESTS DE LYMPHOPROLIFÉRATION.....	79
RÉSULTATS.....	81
1. SÉQUENCE DU FRAGMENT <i>Hind</i> III M DU GÉNOME DU BHV-1.....	82
2. CARACTÉRISATION DE LA VP8.....	86
2.1 Analyse du gène	86
2.2 Comparaison des séquences de la VP8 chez deux isolats du BHV-1	90
2.3 Homologies de séquences avec les alphaherpesvirus.....	97
2.4 Analyse du transcrit	109
3. SÉQUENCE DE L'ORF PARTIEL EN AVAL DU GÈNE DE LA VP8.....	114
4. CONSTRUCTION ET CARACTÉRISATION DES RECOMBINANTS DE LA VACCINE	120
4.1 Présence du gène de la VP8 dans le génome du VV.....	120
4.2 Analyse des transcrits précoces.....	123
4.3 Synthèse de la VP8 dans les cellules infectées avec les recombinants VV.....	128
5. IMMUNOGÉNÉICITÉ DE LA VP8.....	134
5.1 Mesure de l'immunité humorale.....	137
5.2 Mesure de l'immunité cellulaire	143
DISCUSSION.....	146
1. ANALYSE DU GÈNE DE LA VP8.....	147
2. COMPARAISON DES DEUX SÉQUENCES DE VP8	149
3. COMPARAISON DES SÉQUENCES PROTÉIQUES.....	150
4. ANALYSE DU TRANSCRIT DE LA VP8.....	153
5. CARACTÉRISATION DES RECOMBINANTS DE LA VACCINE	154
6. IMMUNOGÉNÉICITÉ DE LA VP8.....	156
CONCLUSION.....	160
REMERCIEMENTS.....	163
BIBLIOGRAPHIE.....	165

- ANNEXE I** : Gene mapping of infectious bovine rhinotracheitis viral DNA genome
- ANNEXE II** : Genomic heterogeneities in bovine herpesvirus type-1 viral isolates: a major variant selected from a field isolate
- ANNEXE III** : Characterization and transcript mapping of a bovine herpesvirus type 1 gene encoding a polypeptide homologous to the herpes simplex virus type 1 major tegument proteins VP13/14
- ANNEXE IV** : The bovine herpesvirus type 1 major tegument protein VP8 is a poor inducer of immunity in mice
- ANNEXE V** : Liste des communications

LISTE DES TABLEAUX

- TABLEAU I** : Subdivision des virus herpès selon leurs propriétés biologiques
- TABLEAU II** : Composition en acides aminés de la VP8 du BHV-1
- TABLEAU III** : Réponse humorale induite chez les souris BALB/c immunisées i.p. avec les recombinants VV
- TABLEAU IV** : Comparaison de la réactivité en ELISA des sérums de souris BALB/c immunisées avec les recombinants VV par voie i.p. ou i.v.
- TABLEAU V** : Propriétés biologiques des sérums de souris BALB/c immunisées avec les recombinants VV
- TABLEAU VI** : Spécificité de la réponse humorale induite chez les souris BALB/c immunisées avec les recombinants VV
- TABLEAU VII** : Réponse humorale induite chez trois souches de souris immunisées avec les recombinants VV
- TABLEAU VIII** : Prolifération des splénocytes de trois souches de souris inoculées avec les recombinants VV

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1** : Schéma du cycle de réplication lytique du HSV
- FIGURE 2** : Particules du BHV-1 après imprégnation négative avec de l'acide phosphotungstique (PTA 3%, pH 6)
- FIGURE 3** : Génome du BHV-1
- FIGURE 4** : Schéma du vecteur de transfert pSC11
- FIGURE 5** : Stratégies de séquençage du fragment *Hind* III M du génome du BHV-1 par la méthode chimique
- FIGURE 6** : Séquence du gène de la VP8 du BHV-1 ainsi que de ses régions proximales
- FIGURE 7** : Comparaison des séquences du gène de la VP8 provenant des isolats #34 et P8-2 du BHV-1
- FIGURE 8** : Gels de séquence du gène de la VP8 de l'isolat #34 du BHV-1 représentant le début et la fin des changements de cadre de lecture observés chez la séquence de l'isolat P8-2
- FIGURE 9** : Alignement de la séquence déduite en acides aminés de la VP8 avec celle de la gp10, le produit du gène ORF B6 du EHV-4
- FIGURE 10** : Régions d'homologies de la VP8 avec les protéines homologues du HSV-1 et du EHV-4
- FIGURE 11** : Comparaison des séquences en acides aminés de la VP8 des isolats #34 et P8-2 avec les protéines homologues du HSV-1 et du EHV-4 dans les régions de changements de cadre de lecture
- FIGURE 12** : Comparaison du profil d'hydropathicité de la VP8 avec ceux des protéines homologues de deux autres alphaherpèsvirus
- FIGURE 13** : Cinétique d'expression de l'ARNm de la VP8 dans des cellules infectées avec le BHV-1
- FIGURE 14** : Localisation de l'extrémité 5' de l'ARNm de la VP8
- FIGURE 15** : Séquence partielle du gène BUL46 du BHV-1 ainsi que de sa région proximale 5'

- FIGURE 16** : Analyse comparative de la séquence déduite en acides aminés du gène BUL46 avec la protéine homologue du HSV-1
- FIGURE 17** : Construction des vecteurs de transfert ayant servi à générer les recombinants VV
- FIGURE 18** : Analyse de type Southern de l'ADN de recombinants VV
- FIGURE 19** : Analyse de type Northern des ARNm précoces isolés de cellules infectées avec les recombinants VV
- FIGURE 20** : Analyse cinétique de la synthèse de la VP8 dans les cellules infectées avec les recombinants VV
- FIGURE 21** : Analyse cinétique de la synthèse de la VP8 dans des cellules infectées avec le recombinant VV-VP8

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α-TIF	: trans-activateur des gènes précoces-immédiats
ADCC	: lyse des cellules dépendante des anticorps
ADNc	: ADN complémentaire
ADNss	: ADN de sperme de saumon
ATCC	: American Type Culture Collection
BHV-1	: virus de l'herpès bovin de type 1
CMV	: cytomégalovirus
DEPC	: diéthyl pyrocarbonate
DICT	: dose infectieuse en culture de tissu
EDTA	: acide éthylène diamine tétra-acétique
EHV-1	: virus de l'herpès équin de type 1
EHV-4	: virus de l'herpès équin de type 4
FS	: changement de cadre de lecture
HCMV	: cytomégalovirus humain
HSV-1	: virus herpès simplex de type 1
HSV-2	: virus herpès simplex de type 2
h	: heure(s)
i.p.	: intra-péritonéale
I.S.	: indice de stimulation
i.v.	: intra-veineuse
IBR	: rhinotrachéite infectieuse bovine
IFN	: interféron
IPV	: exanthème coïtal

kDa	: kiloDalton
kpb	: kilo paires de bases
MEM	: milieu essentiel minimal
MOI	: multiplicité d'infection
NK	: "natural killer"
ORF	: cadre de lecture
p.i.	: post-infection
PBS	: tampon salin phosphaté
PRV	: "pseudorabies virus"; virus de la pseudorage porcine
RA	: rein d'agneau
SDS	: dodécyl sulfate de sodium
SVF	: sérum de veau foetal
TK	: thymidine kinase
U	: unité
VV	: virus de la vaccine
VZV	: virus de la varicelle-zona

SOMMAIRE

Le virus de l'herpès bovin de type 1 (BHV-1), l'agent étiologique de la rhinotrachéite infectieuse bovine et de l'exanthème coïtal, est un important pathogène des bovidés. La construction d'une carte physique du génome du BHV-1 nous avait permis de localiser la séquence codante d'une protéine abondante de 94 kDa dans le fragment *Hind* III M de 3,7 kpb du génome viral (Annexe I; Simard *et al.* 1990). Dans le but d'identifier les protéines virales pouvant être impliquées dans la réponse immunitaire anti-BHV-1, nous avons d'abord caractérisé le gène codant ce polypeptide de 94 kDa et nous l'avons ensuite exprimé dans le virus de la vaccine (VV) afin d'évaluer, chez la souris, les propriétés immunogéniques de la protéine. Ainsi, la séquence nucléotidique complète du fragment *Hind* III M a été déterminée et trois cadres de lecture ouverts, dont un complet et deux partiels, ont été identifiés. Le cadre de lecture complet s'est avéré être le gène codant la VP8, la protéine majeure du tégument du BHV-1 (Carpenter et Misra 1991). La séquence que nous avons obtenue a ensuite été comparée avec celle d'un autre isolat du BHV-1 et plusieurs divergences, qui affectaient globalement 14,1% des acides aminés, ont été identifiées. Par ailleurs, la comparaison de la séquence protéique de la VP8 a révélé qu'elle était homologue à la gp10 du virus de l'herpès équin de type 4 et aux VP13/14 du virus herpès simplex de type 1. Nous avons aussi caractérisé l'ARNm de la VP8, un transcrit tardif de 4,4 kb dont l'extrémité 5' se situait 39 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction. Nous avons ensuite construit un recombinant VV (VV-VP8) dans lequel le gène de la VP8 était placé sous le contrôle du promoteur précoce-tardif P7.5 du VV. Étant donné que la séquence codante de la VP8 contenait un motif TTTTNT, le signal d'arrêt de la

transcription des gènes précoces du VV, nous avons créé un deuxième recombinant (VV-VP8-Mut), dans lequel le motif avait été substitué par mutagenèse dirigée. La caractérisation des recombinants VV a révélé que le motif était reconnu dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8 et avait mené à la synthèse d'une VP8 tronquée, tandis qu'avec le recombinant VV-VP8-Mut, une protéine complète était synthétisée. L'immunisation de souris BALB/c (H-2^d) avec le recombinant VV-VP8-Mut a induit une faible réponse humorale spécifique à la VP8, tandis qu'aucune réponse spécifique n'a été détectée chez les souris inoculées avec le recombinant VV-VP8. De plus, la faible réponse humorale induite par la VP8 n'était pas restreinte aux souris BALB/c, puisque des résultats similaires ont été obtenus avec des souris C57BL/6 (H-2^b) et C3H (H-2^k). Enfin, nous avons évalué la réponse cellulaire spécifique induite chez les trois races de souris immunisées avec le recombinant VV-VP8-Mut et aucune réponse significativement spécifique à la VP8 n'a été observée chez les souris BALB/c, C57BL/6 et C3H.

INTRODUCTION

Les *Herpesviridae* constituent une des plus importantes familles de virus et à ce jour, une centaine de virus herpès ont été plus ou moins caractérisés. Parmi ceux-ci, le virus de l'herpès bovin de type 1 (BHV-1), un alphaherpèsvirus, est l'agent étiologique de la rhinotrachéite infectieuse bovine et de l'exanthème coïtal. Moins fréquemment, le virus a été associé à des conjonctivites, des dermatites, des entérites, des avortements et des infections systémiques. En conséquence, cette infection virale entraîne d'importantes pertes économiques pour les éleveurs de bovidés.

Jusqu'à récemment, peu d'informations étaient disponibles sur l'organisation génétique du BHV-1. En effet, au moment où le projet a été initié, seules les séquences codantes de cinq protéines avaient été précisément localisées sur le génome viral. La caractérisation fragmentaire du génome du BHV-1 nous avait incités à entreprendre la construction d'une carte physique des gènes via la traduction *in vitro* d'ARNm complémentaires aux différents fragments *Hind* III individuels du génome. Ces expériences avaient permis de cartographier plus de 20 gènes et en particulier, la séquence codante d'une protéine abondante de 94 kilo Dalton (kDa) avait été localisée dans le petit fragment *Hind* III M de 3,7 kpb du génome viral (Annexe I; Simard *et al.* 1990).

Dans le cadre du développement d'un éventuel vaccin sous-unitaire contre le BHV-1, une caractérisation approfondie des protéines virales s'avère nécessaire. Ainsi, les buts de la recherche présentée dans cette thèse sont, dans un premier temps, de caractériser le gène codant le polypeptide de 94 kDa et, dans un deuxième temps, d'évaluer les propriétés immunogéniques de cette protéine. Pour atteindre le premier but fixé, la détermination de la séquence

nucléotidique complète du fragment *Hind* III M a été effectuée et la séquence obtenue a ensuite été analysée à l'aide de logiciels informatiques d'analyse moléculaire afin d'identifier les cadres de lecture ouverts et de déterminer l'identité du polypeptide par homologies de séquences avec les protéines déjà caractérisées des virus herpès. Conjointement avec les travaux de l'équipe du Dr Misra, il a été possible d'identifier la protéine de 94 kDa comme étant la VP8, la protéine majeure du tégument. Pour atteindre le second but fixé, l'expression du gène de la VP8 dans le virus de la vaccine a été l'approche expérimentale retenue. Ces recombinants viraux ont ensuite été utilisés pour immuniser trois races de souris consanguines et l'analyse des réponses humorale et cellulaire spécifiques induites par la VP8 a ensuite été effectuée.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. GÉNÉRALITÉS SUR LES *HERPESVIRIDAE*

1.1 Historique et taxonomie

Le nom de la famille des virus herpès dérive du grec herpes, ερπειν, qui signifie ramper. Le terme herpès, utilisé en médecine pendant plus de 2 000 ans, permettait de décrire une variété de lésions cutanées (Beswick 1962). Jusqu'à maintenant, approximativement 100 espèces distinctes de virus herpès ont été décrites et différentes souches ont été isolées pour chacune des espèces. Des virus herpès ont été isolés de mammifères, d'oiseaux, d'amphibiens, de reptiles et même de poissons osseux (Roizman 1993).

L'architecture du virion demeure la caractéristique la plus importante pour classer un virus dans la famille des *Herpesviridae*. Le virion est composé d'une capsid de symétrie icosaédrale contenant le matériel génétique enroulé comme une bobine. La nucléocapsid est entourée par le tégument, une structure amorphe de nature fibreuse et dense aux électrons (Roizman et Furlong 1974). L'enveloppe du virion est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle sont insérées des glycoprotéines virales formant des spicules (Roizman 1993).

Les membres de la famille des virus herpès ont été classés en trois sous-familles - les *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae* - sur la base de leurs propriétés biologiques telles que la restriction d'hôtes, la durée du cycle de multiplication, l'effet cytopathique, ainsi que sur les caractéristiques observées lors de l'infection latente (Tableau I). De plus, la classification des membres de la famille en des genres distincts est le reflet de

Tableau I: Subdivision des virus herpès selon leurs propriétés biologiques

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

Adapté de Roizman 1982

leur parenté phylogénétique, laquelle est basée sur la structure du génome, la sérologie et les homologies de séquences (Roizman *et al.* 1981). Par exemple, le genre *Simplexvirus* de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* inclut les virus de l'herpès simplex de types 1 et 2 (HSV-1, HSV-2), ainsi que le virus de l'herpès bovin de type 2 qui partagent la même organisation génomique, des homologies de séquences nucléotidiques et sont apparentés sérologiquement (Sterz *et al.* 1974).

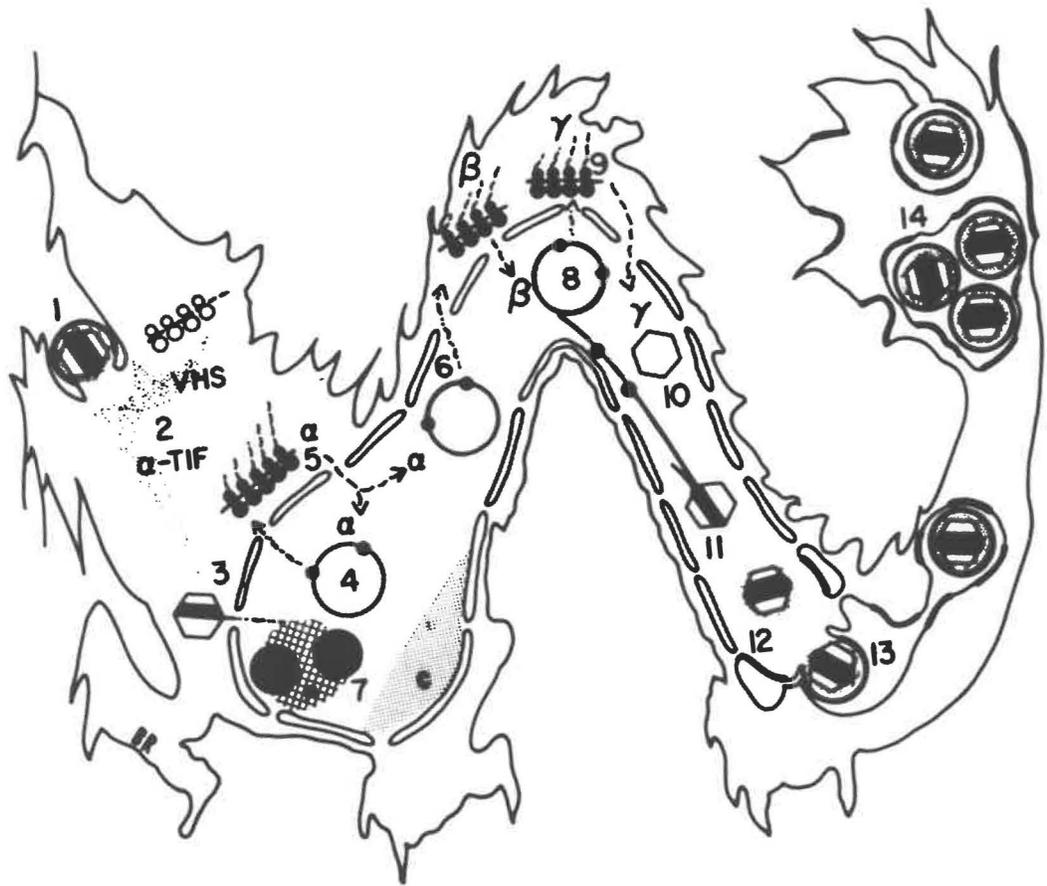
1.2 Structure des génomes

Les virus herpès possèdent un génome constitué d'un ADN double brin linéaire, dont la longueur varie entre 120 et 230 kilo paires de bases (kpb). La composition en G+C du génome varie entre 31 à 75% (Roizman 1993). Une caractéristique intéressante des génomes des virus herpès réside en l'arrangement de leur séquence. En effet, la présence et la localisation de séquences répétées subdivisent les portions uniques des génomes en des segments bien définis qui s'inversent les uns par rapport aux autres, ce qui résulte en l'existence d'isomères de génomes. Cette caractéristique a servi de base pour grouper les ADN des virus herpès en six classes identifiées par les lettres A à F (McGeoch 1989).

1.3 Cycle lytique

Afin d'illustrer les sections 1.3 et 1.4, le HSV-1 a été choisi comme exemple puisqu'il s'agit du virus prototype de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. La représentation schématique du cycle de réplication lytique du HSV est présentée à la Figure 1 (Roizman et Sears 1990). Brièvement, le virus initie l'infection en fusionnant son enveloppe avec la membrane cytoplasmique suite à

Figure 1: Schéma du cycle de réplication lytique du HSV. Les étapes sont décrites dans le texte. L'illustration est tirée de Roizman et Sears (1990).



l'attachement du virion sur la surface cellulaire via des récepteurs spécifiques. La fusion des membranes permet la libération d'au moins deux protéines virales: la protéine responsable de l'arrêt de la synthèse protéique cellulaire (virion host shut off protein; VHS) et l' α -TIF, le trans-activateur des gènes précoces-immédiats. La VHS demeure dans le cytoplasme tandis que l' α -TIF est transporté jusqu'au noyau. La capside, quant à elle, est aussi transportée jusqu'aux pores nucléaires et l'ADN viral est relargué dans le noyau où il se circularise rapidement. La transcription des gènes α ou précoces-immédiats, réalisée par des enzymes cellulaires, est induite par l' α -TIF. Ces ARNm sont ensuite traduits dans le cytoplasme et les protéines retournent dans le noyau où elles induisent l'expression d'une deuxième ronde de transcription qui mène à la synthèse des protéines β ou précoces. À ce stade de l'infection, la chromatine cellulaire est dégradée et les nucléoles sont désaggrégés. L'ADN viral est par la suite répliqué par le mécanisme du cercle roulant qui génère des concatémères de génomes viraux. Pendant ce temps, les protéines γ ou tardives, dont la majeure partie constitue les protéines structurales du virion, sont synthétisées lors d'une nouvelle ronde de transcription/traduction. L'ADN viral est ensuite clivé en unité génomique et emmagasiné dans les capsides nouvellement assemblées et le virus bourgeonne de la membrane nucléaire à l'endroit où les protéines du tégument et de l'enveloppe se sont accumulées. Finalement, les capsides enveloppées sont transportées jusqu'à l'extérieur de la cellule via le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Jusqu'à récemment, on croyait que l'enveloppe virale provenait de la membrane nucléaire interne. Cependant, plusieurs études suggèrent que les virions, en bourgeonnant de la membrane nucléaire interne, perdraient cette enveloppe lors du passage à travers la membrane nucléaire externe ou du réticulum endoplasmique. Les capsides ainsi

libérées dans le cytoplasme acquerraient une nouvelle enveloppe en bourgeonnant à travers la membrane cytoplasmique (Rixon 1993).

1.4 Latence

Une caractéristique biologique commune à tous les membres appartenant aux *Herpesviridae* réside en leur capacité d'induire une infection latente chez leur hôte. Le phénomène de la latence est défini par la persistance du virus en absence de signes cliniques apparents. Au niveau cellulaire, la latence a été définie par la présence du génome viral en absence de production de virus. Cette définition inclut aussi le phénomène de réactivation où des virus infectieux sont générés. Par ailleurs, les virus herpès peuvent demeurer latents pendant toute la durée de vie de leur hôte. Les sites où la latence s'établit sont les neurones (virus herpès neurotropes: HSV-1, HSV-2, virus de la pseudorabie porcine ("pseudorabies"; PRV)), les cellules lymphoïdes (virus herpès lymphotropes: cytomégalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV)) et les cellules épithéliales (EBV) (Hill 1985; Roizman et Sears 1987).

Suite à l'infection primaire, le HSV-1 (virion ou particule subvirale) pénètre dans les nerfs sensitifs qui innervent les cellules infectées et est amené jusqu'aux ganglions périphériques par transport axonal rétrograde. Les génomes viraux persistent dans le noyau du neurone sous la forme d'épisomes circulaires extrachromosomaux (Mellerick et Fraser 1987). La réactivation du virus peut être induite par des stimuli tels que: le stress, les rayons ultra-violets ou la fièvre (Stevens 1989). Suite à cette réactivation, les particules virales sont transportées jusqu'à la peau, généralement au site de l'infection primaire, permettant ainsi l'établissement d'une infection secondaire.

Pendant l'infection latente, seule une petite portion du génome est transcrite, ce qui génère une famille de transcrits se chevauchant et qui sont appelés transcrits associés à la latence (latency associated transcripts; LAT). Par ailleurs, malgré que ces transcrits contiennent plusieurs cadres de lectures ouverts (ORF), aucune protéine n'a été détectée *in vivo* dans les neurones infectés de façon latente (Fraser *et al.* 1992). À ce jour, la fonction des LAT n'a pas été élucidée; ils ne semblent pas requis ni dans la réplication virale ni dans l'établissement et le maintien de l'infection latente. Cependant, des travaux récents suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle dans l'efficacité de l'établissement de la latence ainsi que dans la réactivation *in vitro* et *in vivo* (Rock 1993).

2. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIRUS DE L'HERPÈS BOVIN DE TYPE 1

2.1 Historique

Le virus de l'herpès bovin de type 1 (BHV-1) est l'agent étiologique responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) et de l'exanthème coïtal ("infectious pustular vulvovaginitis"; IPV). Selon McKercher *et al.* (1959a), l'IBR a été observé pour la première fois en 1950 dans des troupeaux de bovidés du Colorado, aux États-Unis où la maladie avait d'abord été appelée "red nose". Dès 1953, l'IBR s'était propagé en Californie ainsi que dans d'autres États et pays. Peu de temps après, le virus a été isolé par Madin *et al.* (1956). Les premiers cas recensés en Europe ont été diagnostiqués en 1960 et actuellement, l'IBR est retrouvé partout dans le monde (Wyler *et al.* 1989).

Par ailleurs, les symptômes cliniques de l'IPV en tant que maladie vénérienne ont été décrits dès 1841 par Rychner, un vétérinaire suisse. Plus tard,

l'IPV a été nommé "Bläschenausschlag", un terme qui a été ensuite latinisé pour "exanthema vesiculosum/pustulosum coïtale" (Wyler *et al.* 1989). Mentionnons enfin que des tests de neutralisation croisée, effectués entre des isolats retrouvés au niveau des systèmes respiratoire et reproducteur de bovins infectés, ont démontré que ces deux pathologies étaient causées par le BHV-1 (McKercher *et al.* 1959b).

2.2 Taxonomie

Le BHV-1 est un membre caractéristique de la famille des *Herpesviridae* (Armstrong *et al.* 1961) et de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* (Roizman 1993). À cause de l'organisation de son génome, le BHV-1 est classé dans le genre *Varicellovirus*, comme le virus de la varicelle-zona (VZV), le PRV et le virus de l'herpès équin de type 1 (EHV-1) (Roizman *et al.* 1992).

2.3 Morphologie

Le virion de l'herpès bovin de type 1 possède les quatre constituants de base de tous les virus herpès (Figure 2). La nucléocapside contient la molécule d'ADN double brin linéaire du virus. La capsid, de symétrie icosaédrale, est formée de 12 pentamères et de 150 hexamères et a un diamètre de 90-110 nm (Caspar et Klug 1962). Cette dernière est entourée du tégument. Enfin, l'enveloppe bilipidique du virion présente à sa surface des spicules formés par des glycoprotéines virales. Le diamètre du virion est d'environ 150-200 nm (Watrach et Bahnemann 1966).

Figure 2: Particules du BHV-1 après imprégnation négative avec de l'acide phosphotungstique (PTA 3%, pH 6). La barre correspond à 100 nm.



2.4 Parenté antigénique

Des tests de neutralisation croisée ont montré que tous les isolats du BHV-1 appartiennent à un seul sérotype et ce, indépendamment de leur origine. En effet, cette caractéristique a permis de démontrer que l'agent étiologique de l'IBR et de l'IPV n'était en réalité qu'un seul et même virus (McKercher *et al.* 1959b). Les souches de BHV-1 avaient été divisées en cinq sous-types soient 1, 2a, 2b, 3a et 3b, en fonction des patrons de restriction obtenus suite à la digestion du génome viral par des endonucléases (Metzler *et al.* 1986; Engels *et al.* 1986). Plus récemment, nous avons démontré que les souches appartenant au sous-type 1 pouvaient aussi être différenciées sur la base de leurs profils de restriction (Simard *et al.* 1991; Annexe II). Mentionnons que les souches du sous-type 1 proviennent généralement d'Amérique du Nord (souche de référence Colorado) tandis que celles du sous-type 2 sont d'Europe (souche de référence K22). Les souches ayant un potentiel neuropathogène avaient été classées dans le sous-type 3 (Engels *et al.* 1986), cependant, elles font dorénavant partie d'un groupe distinct, le BHV-5 (Roizman *et al.* 1992).

3. PATHOGÉNICITÉ DU BHV-1

3.1 Infections aiguës

Une grande variété de manifestations cliniques sont associées aux infections causées par le BHV-1 (revues en détails par Kahrs 1977; Gibbs et Rweyemamu 1977). Cependant, le résultat d'une infection naturelle est probablement déterminé par des facteurs tels que: la souche de virus, la dose, la voie d'inoculation, le statut immunologique de l'animal, ainsi que par

l'environnement. La forme classique de l'IBR est caractérisée principalement par de la fièvre, une respiration rapide, une dépression, une diminution de l'appétit et chez les vaches, par une baisse sévère de la production de lait.

Les animaux atteints sécrètent d'abondantes quantités de mucus, clair au début et devenant mucopurulent à mesure que l'infection progresse. Mentionnons aussi que le museau des animaux prend une couleur rougeâtre, d'où l'origine de l'appellation "red nose". Une auscultation révèle la présence d'une trachéite; cependant les poumons demeurent intacts. Il a été observé qu'une conjonctivite, caractérisée par d'abondantes sécrétions lacrymales, était fréquemment associée à l'infection respiratoire. Pour une vache gestante, l'IBR peut mener à la perte du fœtus. La durée de l'infection respiratoire aiguë varie entre cinq et dix jours. De plus, l'IBR entraîne généralement une infection respiratoire secondaire d'origine bactérienne à *Pasteurella haemolytica* qui peut entraîner la mort de l'animal (Yates 1982).

En ce qui concerne l'IBR, les pertes économiques encourues par les éleveurs de bovidés aux États-Unis seulement sont d'environ 30 millions de dollars par année (Kit 1989). De plus, si l'on considère que cette infection est un facteur majeur du complexe associé aux maladies respiratoires des bovins, dont les coûts annuels ont été estimés à un quart de milliard de dollars aux États-Unis (Wohlgemuth et Herrick 1986), il est concevable de prétendre que les pertes économiques associées à l'IBR se situeraient plutôt dans les 100 millions de dollars annuellement.

La deuxième pathologie la plus fréquemment associée au BHV-1 est l'IPV qui se manifeste cliniquement par la sécrétion de mucus et l'apparition de

pustules sur les muqueuses vaginales et vulvaires de la vache. Chez le mâle, l'infection se loge au niveau des muqueuses du pénis et du prépuce. D'autres manifestations cliniques, moins couramment observées, ont été associées à une infection au BHV-1 telles des dermatites, des encéphalites et des entérites. Mentionnons enfin qu'une infection néonatale ou *in utero* lors des derniers stades de la gestation, résulte en une virémie qui est généralement fatale pour les veaux atteints.

3.2 Latence

Suite à l'infection primaire, le BHV-1, à l'instar de tous les virus herpès, persiste sous forme latente chez son hôte. La latence s'établit dans les ganglions trijumeaux (Homan et Easterday 1980; Ackermann *et al.* 1982) et sacraux (Ackermann *et al.* 1984) de l'hôte et à ce moment, le virus n'est alors plus excrété. Lorsque survient un épisode de réactivation, les animaux infectés réexcrètent le virus, avec ou sans signes cliniques apparents, et transmettent ainsi le BHV-1 aux animaux non-infectés du troupeau.

Actuellement, les mécanismes régissant l'établissement, le maintien et la réactivation de l'infection latente des alphaherpèsvirus demeurent inexpliqués. Cependant, le BHV-1 est considéré comme un modèle animal intéressant pour l'étude de la latence puisque le virus est réactivé de manière reproductible, chez le lapin et le boeuf, suite à un traitement avec des glucocorticoïdes synthétiques comme le dexaméthasone (Sheffy *et al.* 1973; Davies et Duncan 1974; Narita *et al.* 1978; Rock et Reed 1982; Brown et Field 1990).

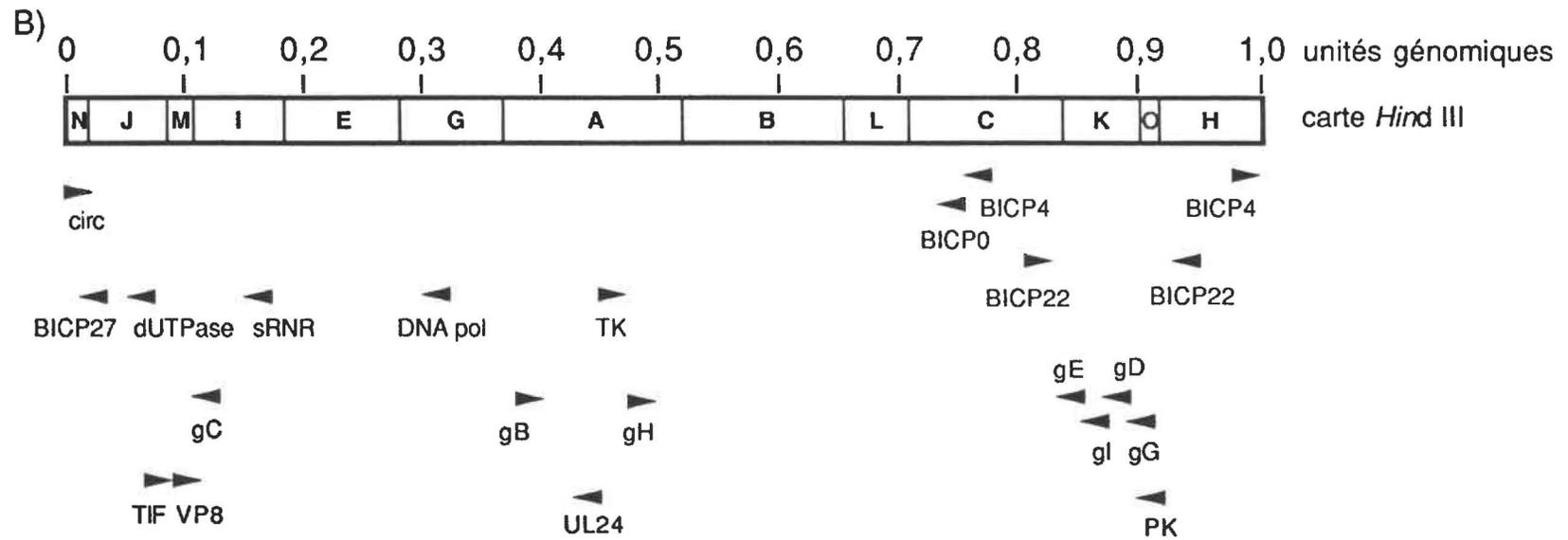
4. GÉNOME

Le génome du BHV-1 est constitué d'une molécule d'ADN linéaire double-brin ayant une longueur approximative de 138 kpb (Figure 3A; Schwyzer 1993). La composition en G+C du génome, estimée par des méthodes physico-chimiques, est de 71 à 72% (Graham *et al.* 1972). Le génome, dont l'organisation est typique des génomes appartenant au groupe D, est composé d'un segment long unique de 105 kpb et d'un segment court unique de 13 kpb bordé par des extrémités répétitives inversées, internes et terminales de 11 kpb (Farley *et al.* 1981; Mayfield *et al.* 1983). La particularité de ce type de génome réside en la capacité du segment court d'inverser son orientation par rapport au segment long ce qui résulte en l'existence de deux formes isomériques de génome, présentes en quantités équimolaires dans une préparation d'ADN purifié à partir de virions.

Les différentes souches de BHV-1 montrent une hétérogénéité considérable dans la région 5' du génome à cause de la présence de séquences répétées de 14 pb dont la fréquence varie entre 8 et 38 copies par génome (Hammerschmidt *et al.* 1986). De plus, environ 10% des molécules d'ADN du virus possèdent une queue d'ADN cellulaire (40-300 pb) localisée à l'extrémité 3' du génome, ce qui suggère que l'ADN du BHV-1 pourrait se recombiner assez fréquemment avec l'ADN cellulaire (Hammerschmidt *et al.* 1990).

Dans les cellules infectées par le BHV-1, les génomes viraux circularisés servent de gabarits pour la réplication de l'ADN et les copies génomiques générées se retrouvent sous la forme de concatémères tête-à-queue qui sont

Figure 3: Génome du BHV-1. **(A)** Schéma du génome viral. Celui-ci est constitué d'un long (U_L; 105 kpb) et d'un court (U_S; 13 kpb) segment unique bordé par des séquences répétitives inversées (R_S; 11 kpb). **(B)** Carte des sites *Hind* III de l'orientation prototype du génome du BHV-1 (adaptée de Mayfield *et al.* 1983) et localisation des gènes viraux dont les séquences ont été publiées. Les unités génomiques sont indiquées en haut de la carte des sites *Hind* III. Le sens des flèches indique l'orientation des séquences codantes qui sont identifiées comme suit: circ; BICP27; dUTPase; TIF, trans-activateur des gènes précoces-immédiats; VP8; gC; sRNR, petite sous-unité de la ribonucléotide réductase; DNA pol, ADN polymérase; gB; UL24; TK, thymidine kinase; gH; BICP0; BICP4; BICP22; gE; gD; gI; gG; PK, protéine kinase.



ensuite clivés en unités génomiques avant d'être encapsidées dans les virions (Hammerschmidt *et al.* 1986).

Jusqu'à présent, les séquences codantes d'une vingtaine de gènes du BHV-1 ont été publiées (Figure 3B). Cependant, un projet de séquençage du génome viral a été initié en 1992 par M. Schwyzer (Université de Zurich, Suisse). Il s'agit d'une collaboration internationale regroupant 12 laboratoires, dont le nôtre. La totalité de la séquence sera bientôt à la disposition de la communauté scientifique puisque actuellement plus de 85% du génome du BHV-1 a été séquencé. Il est à noter que les séquences nucléotidiques complètes des génomes de quatre virus herpès humains (HSV-1, VZV, EBV, HCMV) et de trois herpès animaux ont déjà été déterminées (herpesvirus saimiri, "catfish channel virus", EHV-1).

5. EXPRESSION DES GÈNES

5.1 Cycle lytique

L'expression des gènes du BHV-1 se déroule suivant une cascade qui est similaire à celle des autres alphaherpèsvirus. Les gènes viraux ont été classifiés selon le temps d'apparition des transcrits dans les cellules infectées par le BHV-1 ainsi que par l'utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique ou d'ADN pouvant bloquer leur transcription (Seal *et al.* 1991). Ainsi, les gènes précoces-immédiats sont transcrits en absence de toute synthèse protéique *de novo*, l'expression des gènes précoces débute avec la synthèse des protéines virales tandis que l'expression des gènes tardifs requiert la synthèse de l'ADN viral.

La distribution temporelle et spatiale des transcrits de deux souches du BHV-1 a été analysée en hybridant les fragments *Hind* III du génome sur les ARNm viraux fixés sur support solide (Northern). Avec cette technique, Wirth *et al.* (1989) ont identifié 54 transcrits dont quatre précoces-immédiats, 21 précoces et 12 tardifs de même que 17 transcrits qui n'ont pu être classés dans l'une ou l'autre de ces catégories. Par contre, Seal *et al.* (1991) ont détecté 59 transcrits, dont trois précoces-immédiats, 28 précoces et 28 tardifs. La taille de ces transcrits variait entre 0,4 et 10 kb.

De façon générale, les produits des gènes précoces-immédiats sont impliqués dans la régulation du cycle de réplication du virus, les produits des gènes précoces sont impliqués dans le métabolisme de l'ADN tandis que les protéines tardives constituent la majeure partie des protéines structurales du virus.

5.2 Latence

Rock *et al.* (1986) de même de Kutish *et al.* (1990) ont détecté la présence de transcrits associés à la latence dont la taille variait entre 0,77 et 1,6 kb et dont la localisation intra-cellulaire se situait principalement au niveau du noyau. La région transcrite du génome du BHV-1 chevauche partiellement les transcrits IER2.9 et ER2.6 issus du brin complémentaire d'ADN et codant pour la protéine BICP0 (Wirth *et al.* 1991, 1992). La signification de la présence de cet ARN dans les phénomènes de latence et de réactivation du virus reste à déterminer. Cependant, 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 gènes précoces-immédiats (Bratanich et Jones 1992).

6. PROPRIÉTÉS ET FONCTIONS DES PROTÉINES

L'analyse des protéines virales synthétisées au cours de l'infection lytique a permis d'identifier de 40 à 48 polypeptides sur gel de polyacrylamide. Parmi ceux-ci, quatre protéines précoces-immédiates et six tardives ont été identifiées (Misra *et al.* 1981). Il a aussi été estimé que plus de 25 protéines du BHV-1 sont structurales (Misra *et al.* 1981; Bolton *et al.* 1983).

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

6.1 Protéines précoces-immédiates

Les gènes précoces-immédiats sont transcrits à partir de deux unités de transcription distinctes localisées dans les séquences répétitives inversées du génome viral (Wirth *et al.* 1991). L'unité de transcription 1 (IE-1) génère trois transcrits précoces-immédiats nommés IER4.2, IER2.9 et IER1.5 qui partagent le même promoteur et qui sont issus de l'épissage alternatif d'un ARN pré-messager. L'exon 2 de IER4.2 code la protéine BICP4 (180 kDa), laquelle trans-active les promoteurs des gènes précoces et inhibe l'activité de son propre promoteur (Schwyzer *et al.* 1993). L'exon 2 de IER2.9 partage son extrémité 3' avec le transcrit précoce ER2.6. Ces deux ARN codent la protéine BICP0 (97 kDa; Fraefel *et al.* 1994a) qui trans-active les promoteurs de différents gènes incluant le sien et réprime l'activité du promoteur de l'unité de transcription 2

(Wirth *et al.* 1992). Le troisième transcrit provenant de l'unité de transcription 1, IER1.5, s'étend sur la région 5' du segment U_L du génome qui est liée de façon covalente au segment U_S lors de l'infection lytique lorsque le génome viral est circularisé (Fraefel *et al.* 1993). La protéine codée par ce transcrit a été désignée *circ* (34 kDa); sa fonction biologique est inconnue et il a été récemment démontré qu'elle n'était pas essentielle dans la réplication du virus *in vitro* (Fraefel *et al.* 1994b). L'unité de transcription 2 génère le transcrit épissé IE1.7 dont l'exon 3 porte la séquence codante de la protéine BICP22 (55 kDa; Hayes et Rock 1990) dont la fonction n'est pas encore définie (Schwyzer *et al.* 1994). Il est à noter que le promoteur de ce gène est réactivé durant la phase tardive de l'infection.

6.2 Glycoprotéines de surface

Jusqu'à présent, sept gènes codant des glycoprotéines trans-membranaires ont été identifiés et caractérisés. Il s'agit des glycoprotéines gB, gC, gD, gE, gG, gH et gI (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). Les glycoprotéines gB, gC et gD (anciennement dénommées gI, gIII et gIV respectivement) ont été étudiées de manière approfondie étant donné qu'elles constituent les cibles majeures de l'immunité humorale induite par le virus (voir section 7). Cependant, d'autres études ont aussi porté sur leur rôle biologique au cours de l'infection.

La glycoprotéine gB est constituée de trois polypeptides de 130, 74 et 55 kDa qui dérivent d'un précurseur commun synthétisé au cours de la phase précoce de l'infection (Ludwig et Letchworth III 1987; Nelson *et al.* 1989). Une certaine proportion de la glycoprotéine de 130 kDa est clivée par une protéase cellulaire générant ainsi un hétérodimère de 74 et 55 kDa lié par des ponts

disulfures (Marshall *et al.* 1986; van Drunen Littel-van den Hurk et Babiuk 1986a). Il a été observé que la gB induisait la fusion des membranes cytoplasmiques cellulaires (Fitzpatrick *et al.* 1988; 1990c) et qu'elle était impliquée dans l'attachement et la pénétration du virus à l'intérieur de la cellule-hôte (Liang *et al.* 1991). De plus, il a été démontré que l'abolition du clivage protéolytique de la gB n'affectait pas l'attachement et la pénétration du virus mais celui-ci se propageait moins rapidement d'une cellule infectée à une cellule adjacente non-infectée (Blewett et Misra 1991; Kopp *et al.* 1994). Parmi toutes les glycoprotéines des alphaherpèsvirus, la gB est la plus conservée ce qui suggère qu'elle jouerait un rôle important dans la biologie des virus herpès. La construction de mutants de délétion de la gB du PRV (Raugh *et al.* 1991) et du HSV (Cai *et al.* 1987) a permis de démontrer qu'il s'agissait d'une protéine essentielle pour la réplication du virus. Par conséquent, il est probable qu'il en soit de même chez le BHV-1.

La glycoprotéine gC (90 kDa) est la glycoprotéine la plus abondante du BHV-1. On la retrouve aussi sous la forme d'un homodimère de 180 kDa (Marshall *et al.* 1986; van Drunen Littel-van den Hurk et Babiuk 1986a). Le gène est exprimé durant la phase tardive de l'infection (Ludwig et Letchworth III 1987; Nelson *et al.* 1989). Il a été démontré que la gC était la protéine d'attachement majeure du BHV-1 et qu'elle facilitait la pénétration du virus dans la cellule-hôte (Liang *et al.* 1991). Tout comme chez le HSV (WuDunn et Spear 1989) et le PRV (Mettenleiter *et al.* 1990), l'attachement du BHV-1 serait médié, du moins en partie, par la liaison de la gC sur des récepteurs cellulaires portant des groupements ressemblant aux héparines (heparin-like components; Okazaki *et al.* 1991; Liang *et al.* 1993a). Cependant, d'autres glycoprotéines du BHV-1

seraient aussi impliquées dans l'attachement du virus à la cellule-hôte puisque la gC n'est pas essentielle pour l'infectivité virale *in vitro*. Il a en effet été démontré que des mutants de délétion de la gC pouvaient se répliquer, quoiqu'un peu moins rapidement que le virus sauvage (Liang *et al.* 1991; 1992).

La troisième glycoprotéine majeure du BHV-1, la gD (70 kDa), peut comme la gC former des homodimères (140 kDa; Marshall *et al.* 1986; van Drunen Littelvan den Hurk et Babiuk 1986a). Le gène est exprimé durant la phase précoce de l'infection (Ludwig et Letchworth III 1987; Nelson *et al.* 1989). Cette glycoprotéine est essentielle pour la pénétration du virion dans la cellule-hôte et par conséquent, un mutant de délétion de la gD est non-infectieux (Fehler *et al.* 1992). Une caractéristique intéressante de la gD réside en sa capacité de causer une interférence virale. En effet, il a été observé que des cellules bovines exprimant la gD deviennent partiellement résistantes à l'infection par le BHV-1 ainsi que par le PRV et le HSV, quoiqu'à un degré moindre pour ces deux derniers virus (Tikoo *et al.* 1990; Chase *et al.* 1990). Ce phénomène d'interférence a aussi été observé chez les homologues de la gD de d'autres alphaherpèsvirus qui ont été exprimés dans toute une variété de lignées cellulaires (Chase *et al.* 1993). Toutefois les mécanismes régissant ce phénomène demeurent largement incompris.

La glycoprotéine gE du BHV-1 a une masse moléculaire de 92 kDa (Rijsewijk *et al.* 1992) et il a été démontré qu'elle n'était pas essentielle pour la répllication du virus *in vitro* puisqu'un mutant de délétion possède les mêmes caractéristiques de croissance que le virus sauvage (Rijsewijk *et al.* 1994). Cependant, les plages virales sont de plus petite taille, indiquant ainsi que la gE serait probablement impliquée dans la propagation du virus d'une cellule à

l'autre. Les glycoprotéines gE de plusieurs alphaherpèsvirus forment un complexe lié de façon non-covalente avec la glycoprotéine gI (Johnson et Feenestra 1987; Zuckermann *et al.* 1988; Yao *et al.* 1993) et cette caractéristique a aussi été observée chez le BHV-1 (Rijsewijk *et al.* 1992).

Mentionnons que si les gènes des glycoprotéines gI, gG et gH du BHV-1 ont été localisés sur le génome viral et ont été séquencés (Meyer *et al.* 1991; Leung-Tack *et al.* 1994), seul le produit du gène codant la gH a récemment été identifié. Cette glycoprotéine possède une masse moléculaire de 108 kDa et il est probable qu'il s'agisse de la glycoprotéine anciennement désignée gII (Marshall *et al.* 1986; van Drunen Littel-van den Hurk et Babiuk 1986a; Baranowski *et al.* 1995). Il est aussi à noter que les homologues de séquences retrouvées entre les glycoprotéines gI, gG et gH du BHV-1 et leurs contre-parties du HSV suggèrent qu'elles joueraient des rôles similaires dans l'infection. Ainsi, la gI du HSV qui n'est pas essentielle pour la réplication du virus a été impliquée dans la propagation de l'infection d'une cellule à l'autre. La gH, une glycoprotéine essentielle, semble jouer un rôle dans l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule-hôte, tandis qu'aucune fonction n'a encore été attribuée à la gG jusqu'à maintenant (Spear 1993). Chez le HSV, des glycoprotéines supplémentaires désignées gK, gL et gM ont été identifiées (revue par McGeoch *et al.* 1993) et la similarité observée entre les génomes des alphaherpèsvirus laisse supposer que lorsque le génome du BHV-1 sera entièrement séquencé, des glycoprotéines homologues pourront être identifiées.

6.3 Enzymes

Les génomes des alphaherpèsvirus contiennent des gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ADN et ceux-ci sont exprimés durant la phase précoce de l'infection. En général, ces enzymes ne sont pas requises pour la réplication du virus en culture de cellules mais elles constituent la plupart du temps des facteurs de virulence dans la pathogenèse du virus. En ce qui concerne le BHV-1, Owen et Field (1988) ont localisé et partiellement séquencé le gène de l'ADN polymérase virale. Le gène de la désoxyuridine triphosphatase (dUTPase), l'enzyme qui catalyse la dégradation du dUTP en dUMP, a récemment été caractérisé et la construction d'un mutant de délétion a permis de démontrer que cette enzyme n'était pas essentielle pour le virus *in vitro*, quoique le mutant se répliquait moins bien que le virus sauvage (Liang *et al.* 1993b). Par ailleurs, Simard *et al.* (1992; 1995) ont localisé et caractérisé les gènes codant la petite et la grosse sous-unité de la ribonucléotide réductase virale, l'enzyme catalysant la réduction des ribonucléosides di-phosphates en désoxyribonucléosides diphosphates, ceux-ci étant les précurseurs requis pour la synthèse de l'ADN.

La thymidine kinase (TK) du BHV-1 demeure l'enzyme virale la plus caractérisée. En effet, Weinmaster *et al.* (1982) et Kit et Qavi (1983) ont d'abord isolé des variants TK⁻ du BHV-1, démontrant ainsi que l'enzyme n'était pas requise pour la réplication *in vitro* du virus. Ensuite, la localisation et la séquence du gène ont été rapportées par plusieurs équipes de recherche (Bello *et al.* 1987; 1992; Mittal et Field 1989; Smith *et al.* 1990). *In vivo*, des mutants TK⁻ du BHV-1 sont moins virulents que le virus sauvage et par conséquent, ils constituent des candidats intéressants pour la mise au point d'un vaccin vivant

atténué contre l'infection (voir section 8). De plus, il est intéressant de noter que de tels mutants sont capables d'établir une infection latente chez le lapin ou le boeuf, mais qu'aucune réactivation suite à un traitement des animaux avec des glucocorticoïdes n'a pu être observée (Brown et Field 1990; Gilliam *et al.* 1993). Toutefois, les mécanismes impliqués demeurent inconnus.

6.4 Autres gènes et/ou protéines

La séquence complète de la courte région unique du génome du BHV-1 a récemment été publiée et l'analyse de la séquence a révélé la présence de huit cadres de lecture ouverts potentiels, dont ceux des gènes codant les glycoprotéines gG (ORF 4), gD (ORF 5), gI (ORF 6) et gE (ORF 7; voir section 6.2). L'analyse de la séquence en acides aminés du premier ORF n'a pas révélé d'homologie avec des protéines connues. Par contre, les séquences en acides aminés du second et du huitième ORF sont homologues à deux protéines retrouvées chez les alphaherpèsvirus et dont la fonction n'est pas encore connue (Leung-Tack *et al.* 1994). Enfin, l'ORF 3 contient la séquence codante d'une sérine/thréonine protéine kinase, tel que démontré par homologie de séquences avec le HSV.

En ce qui a trait à la localisation et la caractérisation de gènes codés dans la région longue unique du génome du BHV-1, Bandyopadhyay *et al.* (1990) ont localisé le gène codant la protéine majeure liant l'ADN (major DNA binding protein). La séquence nucléotidique d'un gène homologue à l'ORF UL24 du HSV a aussi été déterminée. De plus, la construction d'un mutant de délétion du gène a démontré que le produit de ce gène n'était pas essentiel pour la réplication *in vitro* du BHV-1 (Whitbeck *et al.* 1994). Chez le HSV, le produit du

gène UL24 code une protéine membranaire dont la fonction est inconnue (Roizman et Sears 1993).

On a récemment caractérisé le gène codant une des protéines qui jouent un rôle clé dans l'infection lytique du BHV-1 (Carpenter et Misra 1992). Ce gène est localisé en amont du gène codant la VP8, la protéine faisant l'objet de cette thèse. Le produit de ce gène est l'homologue du trans-activateur des gènes précoces-immédiats du HSV, l' α -TIF, dont il a été brièvement fait mention à la section 1.3. Chez le BHV-1, la protéine (68 kDa) est synthétisée à la fin de la phase précoce de l'infection lytique et elle se retrouve dans les virions purifiés. Des études *in vitro* ont démontré que cette protéine trans-activait le promoteur de l'unité de transcription 1. De plus, l' α -TIF du BHV-1 formerait un complexe avec des facteurs cellulaires et la trans-activation nécessiterait la présence du motif TAATGAGCT situé dans le promoteur des gènes précoces-immédiats (Misra *et al.* 1994). Ces résultats suggèrent que le mécanisme par lequel l'infection lytique est initiée chez le BHV-1 serait similaire à ce qui a été observé chez le HSV.

7. IMMUNITÉ INDUITE PAR LE BHV-1

La réponse immunitaire induite pour combattre l'infection par le BHV-1 est complexe et inclut les réponses spécifique et non-spécifique. La réponse immunitaire non-spécifique comprend l'action des interférons (IFN), l'activation du complément, les effecteurs précoces de l'inflammation et l'infiltration locale de cellules effectrices telles les neutrophiles, les macrophages et les cellules "natural killers" (NK). La réponse spécifique comprend les lymphocytes T et les anticorps. Il est généralement admis que l'immunité humorale prévient la réinfection, tandis que l'immunité cellulaire, par l'entremise des lymphocytes T ou

par l'interaction des anticorps et des cellules pourvues de récepteurs pour la fraction Fc des immunoglobulines, jouerait un rôle plus important dans la guérison des infections (Rouse et Babiuk 1978). Le patron d'excrétion du BHV-1 dans les nasaux des animaux infectés suggère que la réponse non-spécifique serait prépondérante au cours de l'infection primaire aiguë, tandis que les réponses non-spécifique et spécifique protégeraient les animaux contre l'infection secondaire ou contre la réactivation du virus (Bielefeldt Ohmann *et al.* 1985).

7.1 Immunité non-spécifique

7.1.1 Interférons

Chez les bovins, comme chez d'autres espèces animales incluant l'Homme, les interférons ont été classés en trois types sur la base de leur origine cellulaire, leur spécificité antigénique ainsi que la structure et l'organisation de leurs gènes (Babiuk *et al.* 1985). L'IFN- α est produit par les leucocytes incluant les cellules NK, tandis que l'IFN- β est produit par les fibroblastes et par des cellules épithéliales (les IFN- α et β sont aussi nommés IFN de type I). L'IFN- γ ou IFN de type II est induit dans les lymphocytes T et les cellules NK activés (Samuel 1991).

Lors d'une infection respiratoire par le BHV-1, l'IFN- α est détecté dans les sécrétions nasales des animaux infectés et ce, dès cinq heures post-infection. La quantité maximale d'IFN- α est atteinte entre les 72 à 96 heures suivant le début de l'infection et sa présence persiste durant huit jours (Straub et Ahl 1976). Cette synthèse rapide d'IFN- α procurerait une protection locale au début de l'infection en modulant la migration des leucocytes et en augmentant la capacité de

phagocytose des leucocytes et l'activité cytolytique des cellules NK (Babiuk *et al.* 1985; Lawman *et al.* 1987; Jensen et Shultz 1990).

7.1.2 Macrophages

Les macrophages bovins produisent de l'IFN et ils expriment à leur surface des récepteurs Fc, leur permettant ainsi d'agir en tant que cellules effectrices dans la lyse des cellules dépendante des anticorps ("antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity"; ADCC). *In vitro*, ces cellules peuvent être infectées par le BHV-1 (Forman *et al.* 1982; Bielefeldt Ohmann *et al.* 1984) conduisant ainsi à une diminution de leurs capacités fonctionnelles (Forman et Babiuk 1982). Cependant, un traitement à l'IFN- α rend les macrophages résistants à l'infection par le BHV-1. Parallèlement, le nombre de récepteurs Fc augmente et il en résulte une augmentation de l'activité ADCC (Bielefeldt Ohmann *et al.* 1984). La signification *in vivo* de ces observations demeure inconnue.

L'activation des macrophages résulte également en l'induction d'une activité cytolytique dirigée contre les cellules infectées. Le mécanisme impliqué serait indépendant des anticorps et les cibles n'ont pas été identifiées (Rouse et Babiuk 1977). Il est à noter que les lymphocytes T activés produisent de l'IFN- γ et possiblement d'autres cytokines, qui ont la capacité d'augmenter l'activation des macrophages (Campos *et al.* 1989).

7.1.3 Cellules NK

Les cellules NK constituent une population hétérogène de cellules effectrices non-adhérentes dont l'activité cytolytique n'est pas restreinte par les molécules de classe I ou II du complexe majeur d'histocompatibilité présentes à

la surface des cellules infectées (Trinchieri 1989). Chez les bovins, une activité cytolytique ressemblant à celle médiée par les cellules NK a été associée à une population de cellules non-adhérentes, de large taille, qui ne possédaient pas les marqueurs de surface conventionnels des lymphocytes T et B (Cook et Splitter 1989). Toutefois, une longue période d'incubation est requise afin d'obtenir une lyse optimale des cellules cibles (Campos et Rossi 1986). Une analyse des marqueurs de surface présents sur ces cellules cytolytiques a démontré que cette population serait composée de lymphocytes CD3+, CD45+ et récepteurs Fc+ (Amadori *et al.* 1992).

Par ailleurs, des études ont aussi été entreprises dans le but d'identifier les cibles reconnues par ces cellules cytolytiques. Ainsi, la lyse de cellules infectées par le BHV-1 qui avaient été traitées soit avec de l'acide phosphonoacétique (inhibiteur de la synthèse des protéines tardives) ou avec du cycloheximide (inhibiteur de la synthèse des protéines précoces-immédiates et tardives) a suggéré que ni les protéines précoces-immédiates ni les protéines tardives n'étaient les antigènes reconnus par les cellules effectrices (Cook *et al.* 1989). Il a de plus été observé que des cellules canines exprimant les glycoprotéines gB (Misra *et al.* 1988) et gD (Tikoo *et al.* 1990), qui sont synthétisées pendant la phase précoce de l'infection, étaient reconnues par les cellules NK tandis que des cellules exprimant la gC (Fitzpatrick *et al.* 1989) ne l'étaient pas (Palmer *et al.* 1990). Toutefois, il est possible que cette augmentation de la lyse de ces cellules transfectées soit simplement due à une modification de la structure de la membrane causée par l'insertion des glycoprotéines plutôt qu'à une reconnaissance de l'antigène viral.

7.2 Immunité spécifique

7.2.1 Immunité humorale

La réponse immunitaire systémique humorale dépend de la production d'anticorps sériques appartenant aux classes d'immunoglobulines IgM et IgG (Aguilar-Setién *et al.* 1980). La production d'anticorps anti-BHV-1, détectés par un test de neutralisation *in vitro* du virus, débute de 8 à 12 jours après le début de l'infection et peut persister pendant environ 5 ans (Gibbs et Rweyemamu 1977; Chow 1972), mais sa persistance requiert des restimulations occasionnelles (Kahrs 1977). Au cours de l'infection primaire, il a été observé que la production d'IgM précédait celle des IgG (Rossi et Kiesel 1976), tandis que lors de l'infection secondaire, seules les IgG sont détectées (Guy et Potgieter 1985a). Par ailleurs, on assiste à une production d'IgM et d'IgG suite à la réactivation du virus (Guy et Potgieter 1985b). La réponse humorale mucoale est aussi sollicitée puisque des IgA neutralisantes ont été détectées dans les sécrétions nasales et vaginales d'animaux infectés (Ludwig 1983; Aguilar-Setién *et al.* 1980). Toutefois l'importance de l'immunité mucoale dans la réponse anti-BHV-1 reste à démontrer. En effet, seule une faible réduction de la réplication virale a été observée chez des animaux infectés ayant été traités avec des sécrétions nasales "immunes" contenant entre autres des IgA (Bouffard et Derbyshire 1981).

Une étude entreprise dans le but de définir la spécificité de la réponse humorale induite lors de l'infection par le BHV-1 a démontré que les anticorps présents dans les sérums d'animaux infectés reconnaissaient principalement les glycoprotéines gB, gC et gD (van Drunen Littel-van den Hurk et Babiuk 1986b).

Ces protéines induisent la production d'anticorps neutralisants (Collins *et al.* 1984; Babiuk *et al.* 1987; Hughes *et al.* 1988; van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1985; Scott *et al.* 1988; Lum et Reed 1986). Des études préliminaires ont permis l'identification d'épitopes importants pour la neutralisation (Marshall *et al.* 1988; Fitzpatrick *et al.* 1990a; Tikoo *et al.* 1993). Enfin, il a récemment été démontré que l'immunisation de bovins avec la VP8 purifiée par chromatographie d'affinité induisait une réponse humorale substantielle ainsi que la production d'anticorps neutralisants (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1995).

Il a été suggéré que l'action directe des anticorps via la neutralisation s'effectuait principalement lors d'une réinfection ou lors d'un épisode de réactivation. En effet, lors de l'infection primaire, le rôle joué par les anticorps neutralisants dans la prévention de la propagation du virus demeure incertain parce que d'une part ils apparaissent trop tard et que d'autre part, la propagation virale peut s'effectuer directement d'une cellule à l'autre ou par transport axonal (Kahrs 1977; Aguilar-Setién *et al.* 1980; Rouse et Babiuk 1978). Ainsi, l'action des anticorps s'effectuerait de façon indirecte en requérant leur coopération dans des mécanismes menant à la destruction des cellules infectées tels: la lyse médiée par le complément et les anticorps, l'ADCC et l'ADCC facilitée par le complément. Mentionnons que ces mécanismes ont été mis en évidence *in vitro* et que leur implication *in vivo* demeure hypothétique.

7.2.2 Immunité cellulaire

Tel que mentionné au début de la section 7, la réponse cellulaire serait importante pour la guérison de l'infection. Ainsi, une réponse proliférative et une

activité cytotoxique médiées par des lymphocytes T périphériques de boeufs infectés par le BHV-1 ont été détectées à environ huit jours post-infection (Miller-Edge et Splitter 1986; Brigham et Rossi 1986; Splitter et Eskra 1986; Rutten *et al.* 1990).

Les premières études visant à isoler des lymphocytes T bovins capables de lyser les cellules infectées par le BHV-1 avaient démontré que la lyse n'était pas restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité (Rouse et Babiuk 1977; Brigham et Rossi 1986). Ces résultats suggéraient que des cellules effectrices médiant une cytotoxicité naturelle étaient impliquées dans la lyse des cellules infectées (Rouse et Horohov 1984) puisque l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) requiert une restriction génétique entre la cellule effectrice et la cellule cible. Cependant, Splitter *et al.* (1988) ont isolé des clones CTL spécifiques à des antigènes du BHV-1 et ont démontré qu'ils étaient génétiquement restreints.

Plus récemment, des équipes de recherche ont commencé à identifier les protéines virales reconnues par les lymphocytes T dans le but de caractériser leur rôle dans la réponse cellulaire anti-BHV-1. Jusqu'à présent, il a été démontré que quatre protéines virales (gB, gC, gD et VP8) étaient reconnues par des lymphocytes T auxiliaires CD4+ de bovins immuns pour le BHV-1 (Hutchings *et al.* 1990b). Des épitopes T ont aussi été identifiés chez les gD (Leary et Splitter 1990a) et gC (Leary et Splitter 1990b). Par ailleurs, des clones de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ ont été isolés (Splitter *et al.* 1988). Il a été ensuite démontré que les gC et gD comptaient parmi les antigènes viraux reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques provenant de bovins immuns pour le BHV-1 (Denis *et al.* 1993). Mentionnons en terminant que dans une étude récente, van Drunen

Littel-van den Hurk *et al.* (1995) ont observé que des lymphocytes de bovins immunisés avec une préparation de VP8 purifiée proliféraient *in vitro*, ce qui suggère que cette protéine est impliquée dans l'induction de l'immunité cellulaire anti-BHV-1.

7.3 Immunosuppression et immuno-évasion

L'immunosuppression causée par une infection herpétique a été définie comme un processus actif où l'expression des gènes viraux a des effets directs ou indirects sur les leucocytes de l'hôte, ce qui conduit à une suppression de l'immunité non-spécifique ou spécifique (Rouse et Horohov 1986; McChesney et Oldstone 1987; Rinaldo 1990). Ainsi, l'infection par le BHV-1 provoque une certaine suppression de la réponse immunitaire cellulaire et conséquemment, les animaux deviennent hautement susceptibles aux infections secondaires d'origine bactérienne, ce qui peut mener à des pneumonies sévères (Jericho et Langford 1978).

Il a été observé que les cellules mononucléées d'animaux infectés produisaient moins d'interleukine 2 et que leurs réponses proliférative et cytotoxique étaient réduites, comparativement à des cellules provenant d'animaux non-infectés (Biefeldt Ohmann et Babiuk 1985; Fillion *et al.* 1981). Il a été suggéré qu'une infection non-productive des lymphocytes T par le BHV-1 induisait l'inhibition de la réponse proliférative (Carter *et al.* 1989) en provoquant une lymphocytolyse dont les caractéristiques ressemblent à celles de l'apoptose (Griebel *et al.* 1990). Cependant, il a ensuite été démontré que même le BHV-1 inactivé aux ultra-violets pouvait aussi inhiber la prolifération lymphocytaire, ce

qui suggère que l'inhibition de la prolifération serait causée par l'attachement du virus sur le lymphocyte (Hutchings *et al.* 1990a).

D'autres types d'interactions observées entre les virus herpès et leur hôte réfèrent à ce qu'il est convenu d'appeler immuno-évasion plutôt qu'immunosuppression (Fitzpatrick et Biefeldt Ohmann 1991; Banks et Rouse 1992). Par exemple, l'infection latente des alphaherpèsvirus dans les neurones résulte en une expression restreinte des gènes viraux et en une absence de protéines immunogènes, ce qui permet au virus de persister dans son hôte puisqu'aucune réponse immunitaire n'est générée. En ce qui concerne le BHV-1, il a été démontré que la gC pouvait lier le facteur C3 du complément (Huemer *et al.* 1993). Il est donc possible qu'*in vivo* le virus utilise cette stratégie afin d'augmenter sa résistance à la neutralisation virale médiée par le complément, un mécanisme de défense important au début de l'infection. Par ailleurs, un mimétisme moléculaire observé entre une protéine virale et une protéine cellulaire pourrait permettre au virus de diminuer son immunogénicité en induisant une tolérance spécifique à cet antigène. Ainsi, Fitzpatrick *et al.* (1990c) ont démontré que la gC du BHV-1, qui partage des homologies de séquences avec les membres de la super-famille des immunoglobulines, était antigéniquement reliée à une glycoprotéine cellulaire exprimée à la surface des macrophages, des plaquettes et des leucocytes polymorphonucléaires.

8. VACCINS

Depuis une trentaine d'années, des vaccins conventionnels constitués de virus inactivés ou de virus vivants atténués sont couramment utilisés dans divers pays, incluant le Canada. Cependant, l'utilisation de tels vaccins comporte divers

désavantages dont les principaux sont les suivants: (i) malgré leur utilisation intensive dans différents pays, une augmentation de la morbidité et de la mortalité associées à une infection par le BHV-1 a été notée, (ii) les animaux vaccinés peuvent par la suite être infectés avec une souche sauvage et transmettre ainsi le virus aux autres membres du troupeau, (iii) les vaccins vivants atténués établissent une infection latente chez leur hôte, (iv) la vaccination intra-musculaire de vaches gestantes avec le vaccin vivant atténué a été associée à des avortements, (v) les vaccins vivants atténués sont instables et des révertants virulents peuvent apparaître, (vi) la réponse immunitaire induite par la vaccination avec le virus inactivé est de courte durée et des vaccinations annuelles sont requises. Malgré ces inconvénients, l'efficacité de ces vaccins réside en leur capacité de réduire les signes cliniques associés à une infection par le BHV-1 et conséquemment, de diminuer les pertes économiques qui en découlent (Wyler *et al.* 1989; Kit 1989).

Les problèmes associés à l'utilisation de vaccins conventionnels a encouragé le développement de nouveaux types de vaccins tels que: des vaccins sous-unitaires, des vaccins vivants génétiquement modifiés, des vaccins constitués d'ADN ou des vaccins constitués de virus incapables de compléter leur cycle de réplication lytique. Jusqu'à maintenant, aucun de ces vaccins n'est disponible commercialement. L'utilisation de vaccins sous-unitaires a récemment été revue en détail par van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* (1993). Ceux-ci sont composés d'une combinaison de glycoprotéines virales ou de glycoprotéines individuelles. Afin d'obtenir des quantités suffisamment importantes d'antigènes pour immuniser les animaux, les protéines virales sont, dans la plupart des cas, purifiées par chromatographie d'affinité à l'aide d'anticorps monoclonaux

spécifiques à l'une ou l'autre des glycoprotéines virales. La source d'antigène provient généralement de cellules infectées soit avec le BHV-1 ou soit avec un virus recombinant exprimant un gène codant une des glycoprotéines. Jusqu'à présent, le meilleur candidat pour l'obtention d'un vaccin sous-unitaire contre le BHV-1 est la glycoprotéine gD qui induit des réponses immunitaires humorale et cellulaire (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1990). Toutefois, si l'utilisation de vaccins sous-unitaires comporte certains avantages dont le principal est que ces vaccins ne sont pas constitués de virus vivants, il n'en demeure pas moins que cette approche est peu économique et requiert l'utilisation d'adjuvants.

Les vaccins vivants atténués conventionnels sont basés sur des mutations spontanées générées suite à de nombreux passages du virus en culture de cellules. Conséquemment, ces mutants viraux sont peu caractérisés en ce qui concerne les modifications génétiques survenues et les mécanismes d'atténuation de la virulence (Kit 1989). Cependant, grâce au développement des techniques de biologie moléculaire qui ont permis l'avancement de la caractérisation du génome du BHV-1, il est maintenant possible de cibler les gènes impliqués dans la virulence et de les inactiver au niveau du génome viral. Ainsi, des mutants de délétion des gènes codant la TK (Kit et Qavi 1983; Miller *et al.* 1991) et la dUTPase (Liang *et al.* 1993b) du virus ont été construits. Il est aussi possible d'atténuer la virulence du BHV-1 en inactivant des gènes codant des glycoprotéines non-essentiels pour la réplication virale, telles la gC (Liang *et al.* 1991; 1992) et la gE (van Engelenburg *et al.* 1994). Cependant, même s'il a été démontré que ces virus recombinants étaient effectivement moins virulents *in vivo*, ils possèdent toujours la capacité d'établir une infection latente chez leur hôte.

Une avenue plus prometteuse consiste à inactiver des gènes viraux dont les produits sont essentiels pour la réplication complète du virus. Ces virus défectifs peuvent débiter leur cycle de réplication et par conséquent, induire des réponses immunitaires humorale et cellulaire. En effet, il a été récemment démontré que des souris vaccinées avec un mutant de délétion du gène précoce-immédiat ICP27 ou du gène précoce ICP8 du HSV étaient protégées de l'infection, suite à une épreuve virale (Nguyen *et al.* 1992; Morrison et Knipe 1994).

9. GÉNÉRALITÉS SUR LE VIRUS DE LA VACCINE

9.1 Taxonomie et morphologie

Le virus de la vaccine (VV) a été classé dans la famille des *Poxviridae* et dans la sous-famille des *Chordopoxvirinae*. Il appartient au genre *Orthopoxvirus* qui comprend également le virus de la variole et le virus "cowpox" (Buller et Palumbo 1991). Le VV a été utilisé dans le programme mondial d'éradication de la variole mis sur pied par l'Organisation Mondiale de la Santé dans les années 1970. Les souches de VV les plus couramment utilisées en laboratoire sont les souches WR, Wyeth et IHD qui dérivent de la souche New York City Board of Health, une des souches faisant partie du vaccin contre la variole (Fenner *et al.* 1988).

Les poxvirus sont les plus gros virus d'animaux et ils peuvent même être observés au microscope photonique. Le virion est constitué d'une particule ovoïde dont les dimensions varient entre 170 à 250 nm x 300 à 320 nm. De plus, le virion contient plus de 100 polypeptides qui sont organisés en quatre structures distinctes: une nucléocapside de symétrie hélicoïdale qui contient le

matériel génétique du virus, des corps latéraux dont la fonction demeure inconnue, une membrane et une enveloppe bilipidique (Moss 1990).

9.2 Génome, gènes et protéines

Le génome des *Poxviridae* est composé d'une molécule d'ADN double-brin linéaire dont la longueur varie entre 130 et 300 kpb selon l'espèce (Moss 1990). Les extrémités génomiques forment des boucles en épingle à cheveux (hairpin loops) qui permettent de lier de façon covalente les deux brins d'ADN (Baroudy *et al.* 1982). La séquence nucléotidique complète du génome du virus de la vaccine a été publiée en 1990 (Goebel *et al.*). Le génome est composé d'une molécule d'ADN riche en A et en T (66,6%) dont la longueur est de 191 636 pb. L'analyse de la séquence a permis l'identification de 263 ORF potentiels. Cependant, la fonction de la majorité des protéines codées par ces gènes n'a pas encore été déterminée.

Le génome des *Poxviridae* comprend plusieurs gènes qui codent des enzymes impliquées dans la synthèse des ARNm et celles-ci se retrouvent dans les particules virales infectieuses. Ainsi, les virions contiennent, entre autres, une ARN polymérase ADN dépendante, une poly(A) polymérase, une ADN topoisomérase et les enzymes nécessaires pour coiffer et méthyler les ARNm (Moss 1990).

9.3 Cycle de réplication

Le cycle de réplication des poxvirus se déroule entièrement dans le cytoplasme de la cellule hôte. La majorité des informations concernant la réplication des poxvirus a été obtenue en utilisant le VV comme modèle d'étude.

Le cycle de réplication a été divisé en plusieurs étapes: l'entrée, l'expression séquentielle des gènes, la réplication du génome viral, l'assemblage et la propagation des virions (revue par Moss 1990).

La pénétration du virus s'effectue par fusion avec la membrane cellulaire et les virions sont ensuite internalisés dans le cytoplasme de la cellule hôte. On assiste alors à un premier stade de décapsidation, les enzymes retrouvées dans les particules virales sont relarguées dans le cytoplasme et la transcription des gènes précoces débute. Il a été démontré que la transcription de ces gènes se terminait à environ 50 nucléotides en aval de la séquence TTTTNT (où N représente n'importe quel nucléotide). Les produits des gènes précoces sont impliqués dans les interactions avec l'hôte, dans la synthèse de l'ADN viral et possiblement dans la synthèse des ARNm tardifs. Par la suite, un deuxième stade de décapsidation survient et permet la réplication de l'ADN viral. Pendant ce temps, la transition entre l'expression des gènes précoces et des gènes tardifs s'effectue. Les ARNm tardifs sont caractérisés par la présence d'une queue de poly(A) à leurs extrémités 5' et 3'. De plus, le signal de terminaison de la transcription TTTTNT n'est apparemment pas reconnu pendant la phase tardive de l'infection. Plus récemment, Vos et Stunnenburg (1988) ont identifié une troisième classe de gènes, nommés gènes intermédiaires, dont l'expression n'est pas bloquée par des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN. Les produits des gènes intermédiaires identifiés jusqu'à maintenant ont été impliqués dans l'activation de la transcription des gènes tardifs (Keck *et al.* 1990, 1993; Wright et Coroneos 1993).

La morphogénèse des virions est un phénomène complexe qui débute dans des viroplastes ou usines à virus et se termine dans le cytoplasme. Les

particules virales matures sont ensuite transportées près de la membrane cellulaire et une partie d'entre elles sont relarguées dans le milieu extracellulaire. Toutefois, il est curieux de constater que la majorité des particules virales demeurent à l'intérieur de la cellule une fois le cycle de réplication complété.

9.4 Utilisation comme vecteur d'expression

Le virus de la vaccine a largement été utilisé pour l'expression de gènes provenant de différents virus, bactéries ou parasites (Hruby 1990). La procédure la plus communément employée requiert la construction d'un plasmide de transfert contenant deux régions du génome viral entre lesquelles on retrouve des promoteurs du VV qui contrôlent l'expression du gène hétérologue ou du marqueur de sélection. Ce plasmide est ensuite transfecté dans des cellules infectées par le virus et l'insertion du gène d'intérêt dans le génome viral s'effectue par recombinaison homologue. Dans la plupart des cas, le locus de la thymidine kinase est utilisé comme site d'insertion (Moss 1991).

L'utilisation du VV comme vecteur d'expression comporte un grand nombre d'avantages dont les principaux sont les suivants: (i) le VV peut infecter un large éventail d'hôtes, (ii) les recombinants VV sont faciles à construire, (iii) les taux d'expression sont relativement élevés et (iv) le génome du VV peut accepter des fragments d'ADN dont la longueur maximale est d'environ 25 kpb (Hruby 1990). Les recombinants de la vaccine ont surtout été employés pour des études immunologiques ou comme vaccins potentiels dans la lutte contre des infections affectant les humains ou les animaux (Moss 1991; Mahr et Payne 1992). Ainsi, une attention particulière a été accordée à l'utilisation du VV comme vecteur

d'expression. Cependant depuis quelques années, d'autres poxvirus sont utilisés comme vecteurs d'expression dans le but de développer des vaccins d'intérêt vétérinaire (Esposito *et al.* 1988; Boyle et Coupar 1988; Taylor *et al.* 1988).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. CELLULES ET VIRUS

1.1 Cellules

Les lignées cellulaires MDBK, HEp-2, BS-C-1 et TK-143B ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, É-U). La lignée de cellules épithéliales de reins d'agneau (RA), qui a été développée dans le laboratoire de J. Lecomte (Institut Armand-Frappier), a été utilisée pour la propagation du BHV-1 et pour l'évaluation du titre viral. La lignée de cellules de reins de boeufs MDBK a été employée pour la préparation de l'antigène ELISA ainsi que lors des tests de neutralisation. La lignée cellulaire de reins de singe BS-C-1 a été utilisée pour les transfections tandis que la lignée TK-143B, qui provient d'un ostéosarcome humain, a servi pour la sélection des recombinants de la vaccine. La lignée continue HEp-2, établie à partir d'un carcinome humain, a servi à la propagation des recombinants VV ainsi qu'à l'évaluation des titres viraux.

1.2 Culture cellulaire

Les cellules RA, MDBK et HEp-2 ont été cultivées dans un milieu de croissance constitué en volumes égaux de milieu 199 (Base de Hanks; Gibco Canada, Burlington, Ont.) et de milieu minimum essentiel (MEM; Base de Earle; Gibco) contenant 5% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF; Gibco), 250 mM de bicarbonate de sodium (Gibco) et 50 µg/ml de gentamicine (Schering Canada, Pointe-Claire, Qc). Les cellules TK-143B ont été cultivées dans le même milieu de croissance auquel était ajouté 25 µg/ml de 5-bromo-2'-désoxyuridine (Sigma, St-Louis, MO, É-U). La croissance des cellules BS-C-1 s'est faite dans un milieu constitué en volumes égaux de milieux 199 et MEM contenant 10% (v/v) SVF,

25 mM N-[2-hydroxyéthyl] pipérazine-N'-[acide éthanesulfonique] pH 7,0 (Gibco), 2 mM glutamine (Gibco) et 50 µg/ml de gentamicine. Les cellules en flacons ont été incubées dans une étuve à 37°C tandis que les cellules en plateaux ont été cultivées dans une atmosphère humide en présence de 5% (v/v) de CO₂.

1.3 Souches virales

La souche #34 du BHV-1, un isolat de champ apparenté à la souche prototype Colorado selon les patrons de digestion d'enzymes de restriction, a été obtenue du Dr Mitchell (Gouvernement du Canada, Lethbridge, Alberta). La souche WR du virus de la vaccine a été obtenue de l'ATCC.

1.4 Productions virales

1.4.1 Production du virus BHV-1

Des feuillettes cellulaires confluentes ont été infectés à une multiplicité d'infection (MOI) de 1. La suspension virale a été préparée dans un milieu de croissance sans SVF. Après une adsorption d'une heure (h) et demie à 37°C dans un volume minimal de milieu, l'inoculum viral a été enlevé et remplacé par du milieu sans SVF. Le milieu de culture a été recueilli lorsque l'effet cytopathique optimal était atteint puis clarifié des débris cellulaires par 10 min de centrifugation à 1000 x *g* à 4°C. Par la suite, le virus a été concentré par ultrafiltration sur une colonne Amicon (modèle DH-4; Lexington, MA, É-U) et conservé à -70°C.

1.4.2 Production du virus de la vaccine

Des feuillets de cellules BS-C-1 ont été infectés avec la souche WR du virus de la vaccine à une MOI de 0,1 selon le protocole décrit à la section 1.4.1. Le milieu était récolté lorsque l'effet cytopathique maximal était atteint, aliquoté et conservé à -70°C. Pour les expériences d'immunisation, les recombinants VV ont été produits sur des feuillets de cellules HEp-2. Le milieu de culture a été récolté lorsque l'effet cytopathique maximal était atteint. Le feuillet cellulaire a été détaché avec un grattoir et les débris cellulaires ont été ajoutés au milieu récolté. Les virus ont été purifiés selon le protocole décrit par Talavera et Rodriguez (1991) avant d'être resuspendus dans un tampon salin phosphaté à pH 7,1 (PBS; Gibco) et conservés à -70°C.

1.5 Évaluation du titre viral

La dose infectieuse en culture de tissu (DICT) a été évaluée pour les stocks viraux produits (sections 1.4.1 et 1.4.2). Brièvement, les feuillets de cellules ont été cultivés en plateaux de 96 puits (Flow Laboratories, Mississauga, Ont.). Des dilutions décimales de l'échantillon à titrer ont été effectuées dans du milieu sans SVF et un volume de 25 µl de chacune des dilutions a été ajouté à quatre ou huit puits. Les plateaux ont ensuite été incubés à 37°C pendant 5 jours pour le BHV-1 ou 4 jours pour le VV. Le nombre de puits infectés pour chacune des dilutions a été déterminé et les titres calculés selon la méthode de Karber (Hawkes 1979). Le résultat (DICT₅₀) représente l'inverse de la dilution de l'échantillon permettant d'infecter 50% des cultures (ou puits) inoculés.

2. BACTÉRIES ET PLASMIDES

2.1 Souches d'*Escherichia coli*

Souches: **Génotype:**

XL1-Blue *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac^c, F'[proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(*tet^r)*]*. Cette souche a servi pour tous les clonages.

BMH 71-18 *mut S* *thi, supE, Δ(lac-proAB), [mutS::Tn10][F', proAB, lacI^qZΔM15]*. Cette souche, incapable de réparer les nucléotides non-appariés, a été utilisée lors de la mutagenèse dirigée.

2.2 Milieux de croissance des bactéries

Le milieu LB (1% (p/v) bacto-tryptone, 0,5% (p/v) extrait de levure, 1% (p/v) NaCl) a été utilisé pour la croissance des bactéries. Pour la souche XL1-Blue, 15 µg/ml de tétracycline (Boehringer Mannheim Canada Lté, Laval, Qc) ont été ajoutés au milieu de culture. Les transformants bactériens ont été sélectionnés dans du milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline (Boehringer Mannheim). La croissance des bactéries sur milieu solide s'est effectuée sur des pétris stériles contenant du milieu LB additionné de 1,5% (p/v) de bacto-agar et contenant de l'ampicilline lorsque nécessaire.

2.3 Vecteurs de clonage

pBluescript^{MD} I KS (+) (2961 pb; Stratagene, La Jolla, CA, É-U) est un phagemide dérivant de pUC19. Ce plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline. Des sites multiples de clonage ont été ajoutés dans la portion de

l'opéron *Lac* de *E. coli* présente dans le vecteur. La portion de β -galactosidase codée par ce fragment est capable de compléter l'enzyme défective de l'hôte, suivant sa transformation par le plasmide. Suite à l'ajout d'un substrat chromogène, un phénotype bleu est observé. Inversement, si un fragment d'ADN exogène est introduit dans la région des sites multiples de clonage, l'enzyme est inactivée et un phénotype blanc est observé.

Nous avons également utilisé pTZ19R (2870 pb; Pharmacia Canada Inc., Baie d'Urfée, Qc) qui est un phagemide dérivant de pUC19. Il possède les mêmes caractéristiques que pKS, mais la région des sites multiples de clonage contient moins de sites d'enzymes de restriction que celle de pKS.

3. PRÉPARATION DE L'ADN

3.1 Purification de l'ADN viral

Le protocole suivant a été utilisé pour la purification de l'ADN génomique du virus de la vaccine. Les feuillets de cellules HEp-2 ont été infectés avec le VV à une MOI de 1 et l'infection s'est poursuivie jusqu'à l'obtention d'un effet cytopathique optimal. Les flacons ont alors été soumis à trois cycles de congélation (-70°C) et décongélation (37°C), les lysats cellulaires ont été récoltés et soniqués pendant environ 30 sec avec l'appareil Braunsonic 2000 (Branson, Shelton, CT, É-U). Les lysats ont ensuite été clarifiés par 12 min de centrifugation à 500 x *g* à 4°C.

Les surnageants viraux ont été déposés 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) puis ultracentrifugés à

85 000 x *g* à 4°C pendant 2 h. Le culot viral a été resuspendu dans 800 µl de TEN et la suspension a été transférée dans un tube Eppendorf avant d'être passée aux ultra-sons pour quelques secondes. Par la suite, 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml de DNase I (Boehringer Mannheim) et 100 µg/ml de RNase A (Boehringer Mannheim) ont été ajoutés et la suspension virale a été incubée à 37°C pendant au moins 2 h. La DNase I a été inactivée par l'addition de 10 mM EDTA pH 8,0 et les particules virales ont été lysées dans 1% (p/v) dodécyl sulfate de sodium (SDS). Les protéines ont ensuite été digérées en présence de 400 µg/ml de protéinase K (Boehringer Mannheim) pendant 2 h à 37°C.

Les protéines résiduelles ont été extraites par addition de 1 volume de phénol équilibré et la suspension a été mélangée par inversion de 10 à 20 min. La phase aqueuse a été recueillie après une centrifugation à 12 000 x *g* pendant 5 min. Deux autres extractions ont ensuite été réalisées avec 0,5 volume de phénol équilibré et 0,5 volume d'un mélange de chloroforme-alcool isoamyl (24:1). Par la suite, les phases organiques réunies ont été extraites par 100 µl de TEN. L'ADN présent dans les phases aqueuses réunies a été précipité par l'ajout d'un dixième de volume de 3 M acétate de sodium pH 5.0 et de 2 volumes d'éthanol 95% (v/v) froid. Après centrifugation à 12 000 x *g* durant 10 min, le culot d'ADN a été lavé avec 500 µl d'éthanol 70% (v/v), séché dans une microcentrifugeuse sous vide (Speed Vac Concentrator; Savant, Farmingdale, NY, É-U) et dissous dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). La concentration en ADN a été mesurée par spectrométrie à 260 nm en utilisant la relation: 1 D.O._{260 nm} = 50 µg/ml (Sambrook *et al.* 1989).

3.2 Purification d'ADN plasmidique

La purification rapide d'ADN plasmidique consiste en la lyse alcaline de 2 ml de culture bactérienne, méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989). Cependant, une extraction par un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamyl (25:24:1) était effectuée avant que l'ADN soit précipité par 2 volumes d'éthanol 95% (v/v). L'ADN plasmidique destiné au séquençage enzymatique a été purifié à l'aide d'une trousse de purification par colonne en suivant le protocole qui l'accompagne (Magic^{MD} Minipreps; Fisher Scientific Co. Lté, Montréal, Qc). La concentration en ADN a été évaluée en gel d'agarose en utilisant comme standard une quantité connue d'ADN plasmidique.

Des quantités plus importantes d'ADN plasmidique (médi-prep) ont été purifiées à partir de 50 ou de 100 ml de cultures bactériennes en suivant le protocole décrit en détail par Nicolas (1993). Il est à noter que l'ADN destiné aux transfections était séché et dissous stérilement dans la hotte à flot laminaire.

4. MANIPULATION DE L'ADN

Les techniques décrites dans cette section réfèrent aux protocoles de biologie moléculaire qui ont couramment été utilisés pour les expériences présentées dans cette thèse.

4.1 Électrophorèse en gel d'agarose

Ce type de gel a permis de visualiser avec une bonne résolution tous les fragments d'ADN dont la taille était supérieure à 300 pb. Le gel a été préparé à la concentration désirée (0,8 à 2% (p/v) d'agarose grade électrophorèse; ICN Biomedicals Canada, St-Laurent, Qc) dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate

pH 7,8, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA) contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Les échantillons à analyser ont été mélangés au tampon de chargement (5X = 0,1% (v/v) bleu de bromophénol, 25 mM EDTA pH 8, 1% (p/v) SDS, 25% (v/v) glycérol) avant d'être déposés dans les puits. Les marqueurs de taille utilisés étaient l'ADN du phage λ digéré par *Hind* III (Gibco/BRL) et l'ADN du phage ϕ X174 digéré par *Hae* III (Pharmacia). Après migration, les gels ont été photographiés sous illumination ultra-violette (Fotodyne, New Berlin, NY, É-U).

4.2 Digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction

Les ADN ont été digérés par une ou plusieurs enzymes de restriction selon la procédure suivante: l'ADN était dilué dans un volume de 10 à 50 µl de tampon "One-Phor-All Buffer *Plus*" (Pharmacia) à la concentration optimale définie pour chaque enzyme (0,5X à 2X). Après addition de l'enzyme, le mélange était ensuite incubé, généralement pour toute la nuit, à la température optimale pour la digestion (Sambrook *et al.* 1989). En général, les enzymes de restriction provenaient de Pharmacia ou de Gibco/BRL.

4.3 Réparation des extrémités d'un fragment d'ADN

Il était parfois nécessaire de réparer les extrémités d'un fragment d'ADN (insertion ou vecteur) préalablement digéré par une ou deux enzymes de restriction afin de générer des extrémités compatibles pour le clonage. Lorsque requis, les extrémités 5' dépassantes ont été réparées avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli* (Pharmacia), ce qui a permis la génération d'extrémités franches. L'ADN digéré a d'abord été précipité par l'ajout d'un demi volume de 7,5 M NH₄OAc et de deux volumes d'éthanol 95% (v/v). Le culot d'ADN a ensuite été dissous dans 40,5 µl d'eau déionisée stérile, 10 µl de

tampon Klenow (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 1 mM dithiothréitol) et 2,5 µl de 10 mM dNTP ont ensuite été ajoutés. La réaction a été initiée par l'addition de 10-15 unités (U) de Klenow et incubée durant 20 min à température ambiante. La réaction a été arrêtée en précipitant l'ADN comme décrit précédemment. Le culot a été lavé à l'éthanol 70% (v/v), séché et finalement, l'ADN a été dissous dans l'eau.

4.4 Purification des fragments d'ADN en gel d'agarose

L'ADN digéré a été fractionné par électrophorèse en gel d'agarose et le fragment d'intérêt a été prélevé du gel avec une lame de rasoir. L'ADN présent dans la bande de gel a ensuite été purifié à l'aide de la trousse de purification d'ADN GeneClean^{MD} (BIO/CAN Scientific Inc., Mississauga, Ont.), en suivant les instructions du manufacturier.

4.5 Clonage

4.5.1 Préparation des vecteurs

Deux types de clonage ont été réalisés lors des travaux présentés dans cette thèse: des clonages non-dirigés où l'insertion est clonée dans un site de restriction et des clonages dirigés où le fragment d'intérêt est inséré entre des sites non compatibles. Dans le dernier cas, environ 20 µg d'ADN a d'abord été digéré successivement par les enzymes de restriction choisies et le vecteur a ensuite été purifié tel que décrit dans la section précédente.

En ce qui concerne les clonages non-dirigés, les extrémités 5' du vecteur digéré ont été déphosphorylées afin de réduire le bruit de fond lors de la transformation. Le mélange réactionnel de la digestion (100 µl) a été additionné

de 100 μ l de 100 mM Tris-HCl pH 8,0. Les conditions de déphosphorylation utilisées différaient selon le type d'extrémités 5' générées: (i) pour les extrémités 5' dépassantes, 1 μ l (100-150 U) de BAP (phosphatase alcaline bactérienne; Gibco/BRL) a été ajouté au milieu précédent et le mélange a été incubé durant environ 1 h à 37°C. Cette étape a été répétée une fois. (ii) Pour les extrémités franches ou 5' récessives, l'ADN a d'abord été dénaturé à 95°C durant 3 min puis le tube a été rapidement refroidi dans de l'eau glacée. Après addition de l'enzyme, le mélange a été incubé à 65°C durant environ une heure. Cette étape a été répétée deux fois sauf que deux incubations successives de 30 min à 37°C et à 65°C ont été effectuées. Par la suite, le mélange provenant de l'une ou l'autre des réactions de déphosphorylation a été extrait au phénol puis à l'éther diéthylique, tel que décrit par Simard (1986).

4.5.2 Ligation

Les réactions de ligation ont été effectuées dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8, 7 mM MgCl₂, 1 mM dithiothréitol et 2 mM ATP, en présence de 1 U de ligase du phage T4 (Gibco/BRL), dans un volume réactionnel total de 10 μ l. Le fragment d'ADN à cloner et le vecteur ont été ajoutés dans un rapport molaire (insertion:vecteur) supérieur à trois et la réaction a été incubée pendant toute la nuit à 4°C.

4.5.3 Préparation de bactéries compétentes

Les bactéries compétentes ont été préparées selon le protocole publié par Mandel et Higa (1970). Les souches bactériennes *E. coli* XL1-Blue ou BMH 71-18 *mut S* ont d'abord étéensemencées dans 10 ml de milieu LB et cultivées avec agitation à 37°C pendant environ 16 h. Un ml de cette pré-culture a été ré-

ensemencé dans 100 ml de milieu LB et les bactéries ont été incubées avec agitation à 37°C jusqu'à ce qu'une densité optique de 0,2 à 0,4 à 600 nm soit obtenue. La culture a été conservée sur glace pendant 10 min avant d'être centrifugée à 2000 x *g* pendant 6 min. Le culot de bactéries a été resuspendu dans environ 50 ml de 100 mM CaCl₂ et la suspension a été incubée sur glace 30 min. Les bactéries ont ensuite été centrifugées, le culot a été resuspendu dans 1 ml de 100 mM CaCl₂ et la suspension a été conservée sur glace jusqu'à utilisation.

4.5.4 Transformation de *E. coli*

Cinq µl de la réaction de ligation ont été ajoutés à 100 µl de bactéries compétentes et le mélange cellules:ADN a été incubé sur glace pendant au moins 45 min. Après un choc thermique de 90 sec à 42°C, 1 ml de milieu LB a été ajouté et le mélange a été incubé sous agitation pendant 1 h à 37°C. Différents volumes de culture ont été étalés sur le milieu de croissance solide (section 2.2) sur lequel avaient été préalablement ajoutés 10 µl de 100 mM d'isopropylthio-β-galactoside (IPTG; Boehringer Mannheim) et 50 µl d'une solution de 2% (p/v) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal; Boehringer Mannheim), un substrat chromogène, afin de sélectionner les plasmides recombinants. Après une incubation de 12 à 16 h à 37°C, une vingtaine de colonies blanches ont été choisies aléatoirement et ensemencées dans 2 ml de milieu liquide afin de procéder à la purification de l'ADN plasmidique (section 3.2). Les clones choisis ont été cultivés en milieu liquide et des aliquotes ont été conservées à -70°C en présence de 20% (v/v) glycérol.

4.6 Hybridation ADN/ADN

4.6.1 Transfert de type Southern

Le transfert d'ADN sur une membrane de nylon (Hybond-N; Amersham Canada Lté, Oakville, Ont.) à partir d'un gel d'agarose a été effectué sous vide à l'aide du VacuGene (Pharmacia) en suivant les instructions du manufacturier. Brièvement, l'ADN a d'abord été dénaturé par addition sur le gel de 30 ml de 1,5 M NaCl et 0,5 M NaOH durant 20 min. Le gel a été ensuite neutralisé avec 30 ml de 1,5 M NaCl et 1 M Tris-HCl pH 7,5 pendant 20 min. Enfin, l'ADN a été transféré sur la membrane en présence de 200 ml de 20X SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrate de sodium pH 7,2) pendant 1 h. La membrane a été récupérée, séchée à l'air et exposée durant 5 min sur un trans-illuminateur UV afin de fixer l'ADN. Par la suite, l'hybridation a été réalisée avec une sonde spécifique marquée au [³²P].

4.6.2 Hybridation de colonies

La recherche de clones recombinants a été faite, dans certains cas, par le transfert de colonies bactériennes sur membrane de nylon (Amersham), suivi de la lyse des bactéries, de la dénaturation et de la fixation de l'ADN plasmidique tel que décrit par Sambrook *et al.* (1989). L'ADN a ensuite été hybridé avec une sonde spécifique marquée au [³²P].

4.6.3 Préparation de la sonde

Les fragments d'ADN employés comme sondes pour l'hybridation ont d'abord été purifiés à l'aide de la trousse "GeneClean" (BIO/CAN). L'ADN a été marqué au [α -³²P]dCTP (ICN; 3000 Ci/mmele) à l'aide de la trousse "Oligolabelling Kit" (Pharmacia) en suivant les recommandations du

manufacturier. Après la réaction de marquage, les nucléotides radioactifs non-incorporés ont 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 de l'ADN a ensuite été utilisé pour le comptage de la sonde en Cerenkov (compteur Packard modèle 2200CA; Packard Instruments cie, Downers Grove, IL, É-U). Généralement, les comptes obtenus variaient entre 3 et 5 X 10⁵ cpm pour 3 µl d'ADN marqué. Enfin, la sonde a été neutralisée juste avant l'hybridation par l'ajout de 100 µl de 1 M Tris-HCl pH 8 et 100 µl de 1 N HCl.

4.6.4 Hybridation

Les conditions utilisées pour l'hybridation ainsi que pour le lavage des membranes ont été décrites par Rochaix et van Dillewijn (1982). Les filtres ont été pré-hybridés 4-6 h à 65°C dans 100 ml de 6X SSC, 10X Denhardt (0,2% (p/v) albumine sérique de boeuf, 0,2% (p/v) polyvinylpyrrolidone, 0,2% (p/v) Ficoll type 400), 1 mM EDTA, 0,1% SDS et 50 µg/ml d'ADNss. Cette solution a été remplacée par 50 ml d'une solution fraîche contenant 400 µg/ml d'ADNss. La sonde neutralisée a été ajoutée et l'incubation s'est poursuivie toute la nuit à 65°C. Les membranes ont ensuite été lavées deux fois en présence de 2X SSC durant 5 min à la température ambiante; deux fois avec du 2X SSC, 0,1% SDS (p/v) pendant 1 h à 65°C et deux fois avec du 0,1X SSC durant 1 h à 65°C. Par la suite, les membranes ont été séchées et exposées sous films rayon-X (Kodak X-Omat).

5. SÉQUENÇAGE

5.1 Séquençage chimique

Le fragment *Hind* III M du génome du BHV-1 a été complètement séquencé par la méthode chimique de Maxam et Gilbert (1977). Cette méthode avait été privilégiée au détriment de la méthode enzymatique à cause de la composition élevée en G+C (72%) du génome viral. L'analyse de séquences d'ADN riche en G et en C est souvent compliquée par la présence d'artéfacts dans les gels de séquence qui résultent (i) d'une terminaison anormale ou d'une pause de l'ADN polymérase à cause de la présence de structures secondaires stables sur le gabarit d'ADN et (ii) de la formation de structures secondaires sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé. Par contre, avec la méthode de séquençage chimique, la majeure partie de ces artéfacts peuvent être évités puisqu'aucune réaction de synthèse d'ADN n'est effectuée. Le principe du séquençage chimique consiste à modifier chimiquement, spécifiquement et partiellement les bases contenues dans un fragment d'ADN dont une seule extrémité est marquée.

Une étape préliminaire a consisté à cartographier le fragment *Hind* III M par la technique des digestions multiples afin de déterminer des stratégies de marquage. Ce fragment, d'une longueur approximative de 3700 nucléotides, avait préalablement été cloné dans le site *Hind* III du vecteur pKS (pKS/Mhd; Annexe I). De plus, des stratégies supplémentaires ont été élaborées suite à la cartographie de deux sous-clones du fragment *Hind* III M. Ceux-ci ont été générés en digérant pKS/Mhd par *Hind* III et *Eco* RI, les deux fragments d'ADN de 1,7 et de 2 kpb ont été purifiés individuellement avant d'être insérés entre les sites *Hind* III et *Eco* RI de pKS. La Figure 5 de la section Résultats présente le

diagramme des stratégies de séquençage utilisées relativement à la cartographie des sites de restriction du fragment *Hind* III M du génome du BHV-1.

Les procédures employées pour l'obtention des fragments d'ADN marqués, qui étaient ensuite dégradés chimiquement, ont été décrites en détail par Simard (1986), à l'exception du fait que les fragments d'ADN ont été fractionnés sur un gel d'agarose avant d'être purifiés avec la trousse "GeneClean". Les dégradations chimiques ont été effectuées selon les techniques décrites par Maxam et Gilbert (1977; 1980) et les réactifs suivants ont été utilisés afin de modifier spécifiquement les bases: (i) diméthylsulfate (Aldrich Chemical Company Inc. Milwaukee, WI, É-U) pour les guanosines, (ii) acide formique (Sigma) pour les purines (iii) hydrazine (Aldrich) pour les pyrimidines et (iv) hydrazine (Aldrich) dans 1,8 M NaCl pour les cytosines. Enfin, le lien carbone-azote entre le désoxyribose et la base modifiée a été clivé grâce à un traitement subséquent en présence de 1 M pipéridine (Sigma).

Une fois toutes les étapes complétées, les culots d'ADN ont été dissous dans un tampon de chargement (99% (v/v) formamide, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA pH 8, 0,1% (p/v) bleu de bromophénol, 0,1% (p/v) xylène cyanol) et les fragments ont été analysés en gels de polyacrylamide dénaturants (section 5.3).

5.2 Séquençage enzymatique

Une méthode modifiée de séquençage enzymatique (Sanger *et al.* 1977) a été utilisée afin de (i) résoudre quelques ambiguïtés retrouvées dans la séquence du fragment *Hind* III M du génome du BHV-1, (ii) confirmer les substitutions nucléotidiques survenues lors de la mutagenèse dirigée et (iii)

séquencer la jonction du site *Hind* III à l'extrémité 3' du fragment M et ce, dans le cadre du projet de séquençage du génome du BHV-1.

La méthode de séquençage enzymatique nécessite, en premier lieu, le sous-clonage des fragments d'ADN à séquencer. Ainsi, des petits sous-clones (75-300 nucléotides) contenant les portions d'intérêt ont d'abord été construits en utilisant les sites de restriction présents dans le fragment M. Les clones obtenus ont ensuite été séquencés comme suit. Un à 2 µg d'ADN plasmidique double brin a été dénaturé dans 0,15 M NaOH et 0,15 mM EDTA pendant 30 min à 37°C. L'ADN a été précipité avant d'être dissous dans 10 µl d'eau déionisée stérile. Des amorces dites universelles ont été utilisées pour l'appariement sur l'ADN simple brin et le séquençage a été effectué à l'aide de la trousse "T7 Sequencing Kit" (Pharmacia) en substituant le dGTP par le 7-deaza-dGTP. Après la réaction de synthèse, une étape supplémentaire avec la transférase terminale a été réalisée afin que les fragments d'ADN terminés de façon prématurée à cause de la présence de structures secondaires stables soient chassés de leur position sur les gels de séquence. Ainsi, 2,5 U de transférase terminale (Pharmacia) et 0,125 mM de dNTP ont été ajoutés dans chaque tube et la réaction a été incubée durant 30 min à 37°C (Li et Schweizer 1993).

5.3 Gels de séquence

Les gels de séquences ont été préparés selon le protocole décrit par Sambrook *et al.* (1989). En général, des gels de polyacrylamide de 8% ont été employés pour analyser l'ADN séquencé par l'une ou l'autre des méthodes et la longueur de la migration dépendait de la résolution désirée. Cependant, lorsque le fragment d'ADN séquencé chimiquement était plus long, des gels de 4% ont

aussi été utilisés afin d'optimiser l'obtention des résultats. Une fois la migration terminée, le gel était séché et autoradiographié sur un film Kodak X-Omat XAR5.

5.4 Analyse des séquences

Les séquences obtenues ont été lues manuellement sur les autoradiogrammes. L'analyse de la séquence a été effectuée à l'aide du logiciel MacVector (IBI Sequence analysis software, New Haven, CT, É-U). Les alignements de la séquence en acides aminés de la VP8 avec les séquences de protéines homologues ont été réalisés avec la matrice pam250 du MacVector en utilisant des fenêtres de 50 acides aminés et un pourcentage d'homologie de 20% ou avec le logiciel GeneWorks (Intelligenetics, Inc. Mountain View, CA, É-U) en utilisant les paramètres standards soient un minimum de quatre acides aminés homologues consécutifs pour qu'une région donnée soit considérée significativement homologue et une distance maximale de dix acides aminés entre deux régions homologues pour que celles-ci soient considérées comme des extensions d'une seule région d'homologie. Enfin, les profils d'hydropathicité de la VP8 et des protéines homologues ont été réalisés à l'aide de l'algorithme de Kyte et Doolittle (1982) inclu dans le logiciel GeneWorks.

6. MANIPULATION DES ARNs

6.1 Purification des ARNs totaux

6.1.1 Cellules infectées avec le BHV-1

Les ARNs totaux ont été extraits par la méthode de l'isothiocyanate de guanidium (Chirgwin *et al.* 1979). Des feuilletts de cellules RA confluentes à environ 75% ont été infectés avec le BHV-1 à une MOI de 1. À différents temps

post-infection (p.i.; 0, 6, 12, 18 et 24 h), les feuillettes ont été lavés au PBS et traités à la trypsine-EDTA (0,05% (pv) trypsine, 0,5 mM EDTA; Gibco) diluée dans du PBS afin de dissocier les cellules. Celles-ci ont été récoltées et lysées dans une solution d'isothiocyanate de guanidium (4,2 M isothiocyanate de guanidium, 250 mM citrate de sodium pH 7,5, 0,1 M β -mercaptoéthanol, 0,5% (p/v) sarkosyl). Les ARNs ont été ultracentrifugés à travers un coussin de chlorure de césium (5,7 M CsCl, 10 mM EDTA pH 7,0) durant 16 h à 100 000 x *g*. Le culot d'ARN a été lavé à l'éthanol 70% (v/v), puis dissous dans l'eau déionisée stérile. Les ARNs ont ensuite été précipités par addition d'un dixième de volume de 3 M KOAc pH 5,0 et de 2 volumes d'éthanol 95% (v/v). Le culot a été lavé à l'éthanol 70% (v/v) et séché à l'air. Enfin, les ARNs ont été dissous dans l'eau puis dosés au spectrophotomètre à 260 nm en utilisant la relation: 1 D.O._{260 nm} = 40 μ g/ml (Sambrook *et al.* 1989).

6.1.2 Cellules infectées avec le VV

Des feuillettes confluentes de cellules HEp-2 ont été infectés avec les recombinants VV à une MOI de 2. Afin de permettre l'accumulation des transcrits précoces, les cellules ont été incubées pendant 6 h en présence de 300 μ g/ml de cycloheximide, un puissant inhibiteur des synthèses protéiques. Les cellules ont ensuite été récoltées en détachant le feuillet avec un grattoir stérile. L'extraction des ARNs totaux a été réalisée en suivant le protocole décrit à la section précédente.

6.2 Sélection des ARNm-polyA+

Les ARNm présents dans la préparation d'ARNs totaux de cellules infectées avec le BHV-1 ont été sélectionnés par chromatographie sur oligo(dT)-cellulose

en utilisant les conditions décrites par Sambrook *et al.* (1989). Les ARNm-polyA+ obtenus ont ensuite été dosés au spectrophotomètre à 260 nm.

6.3 Électrophorèse et transfert de type Northern

Deux μg d'ARNm ou 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 NaPO₄ pH 7 (Carmichael et McMaster 1980). Après l'incubation, les échantillons ont immédiatement été déposés sur un gel d'agarose 1,5% préparé dans un tampon 10 mM NaPO₄ pH 7. Le marqueur de tailles utilisé était le RNA ladder (Gibco/BRL). Afin d'éviter la dégradation des ARNs, toutes les solutions avaient préalablement été traitées au 0,05% diéthyl pyrocarbonate (v/v; DEPC) et autoclavées. Après la migration, la bande d'agarose correspondant aux marqueurs de taille a été découpée avec une lame de rasoir, colorée 30 min dans 30 μg d'acridine orange par ml de tampon 10 mM NaPO₄ pH 7 et décolorée 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 transférés sur une membrane de nylon (Amersham) afin de les utiliser ultérieurement pour l'hybridation. Le transfert Northern des ARNs a été effectué par capillarité durant toute la nuit en utilisant le 20X SSC comme solution de transfert. Par la suite, la membrane a été récupérée, séchée à l'air, irradiée à l'UV durant 5 min puis cuite sous vide pendant 2 h à 80°C.

6.4 Hybridation

La membrane de nylon, sur laquelle les ARNs ont été transférés, a été pré-hybridée durant 24 h à 42°C dans une solution contenant 50% (v/v) formamide déionisée, 5X SSC, 1X Denhardt, 0,5 mg/ml ADNss et 0,05% (v/v) DEPC (Rochaix et Malnoë 1982). La solution de pré-hybridation a été ensuite remplacée par 50 ml de 50% (v/v) formamide déionisée, 5X SSC, 0,1 % (p/v) SDS et 0,05% (v/v) DEPC. La sonde neutralisée a été ajoutée et l'incubation s'est poursuivie à 42°C pendant 48 h. La membrane a été lavée deux fois dans une solution de 50% (v/v) formamide déionisée, 5X SSCP (0,6 M NaCl, 75 mM citrate de sodium, 5 mM EDTA, 65 mM KH₂PO₄ pH 7,2) et 0,05% (p/v) SDS durant 2 h à 42°C. Deux autres lavages subséquents ont été effectués à température ambiante dans une solution de 2X SSCP et 0,05% (p/v) SDS durant 2 h. Finalement, la membrane a été séchée à l'air puis exposée sous un film rayon-X.

7. RÉACTION D'EXTENSION D'AMORCE

L'extrémité 5' de l'ARNm de la VP8 a été localisée en effectuant une réaction d'extension d'amorce. Le principe de la méthode consiste à hybrider l'ARNm avec une amorce d'ADN simple-brin marquée à son extrémité 5'. Une réaction de transcription inverse permet ensuite la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) au gabarit d'ARNm. La longueur du fragment d'ADNc, déterminée par électrophorèse sur un gel de séquence, reflète la distance entre le nucléotide marqué de l'amorce et l'extrémité 5' de l'ARNm. Le protocole utilisé pour la réaction d'extension d'amorce s'inspire de Sambrook *et al.* (1989).

L'oligonucléotide 5' GCCCATCCCTAGCGGGCGTCCATGGC 3', qui comprend le codon d'initiation de la traduction du gène de la VP8 (souligné), a servi pour l'expérience. Cet oligonucléotide a été synthétisé à l'aide d'un synthétiseur automatique d'oligonucléotides (Gene Assembler; Pharmacia) au laboratoire de F. Shareck (Institut Armand-Frappier). L'extrémité 5' de l'amorce a été marquée de la façon suivante. A 30 pmoles d'amorce ont été ajoutés 10 µl de 20 mM Tris-HCl pH 9,5, 5 mM spermidine. Puis 5 µl de tampon kinase (500 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM MgCl₂, 50 mM dithiothréitol, 30% (v/v) glycérol) et 20 µl [γ -³²P]ATP (ICN; 10 µCi/µl, 6000 Ci/mmmole) ont été ajoutés. La réaction a été initiée par l'addition de 20 U de polynucléotide kinase du phage T4 (Pharmacia) et le mélange incubé 1 h à 37°C, dans un volume final de 50 µl. L'amorce marquée a ensuite été purifiée à l'aide de la trousse "MermaidMD" (BIO/CAN) en suivant les recommandations du manufacturier, comptée en Cerenkov et diluée, à raison de 50 000 cpm/µl. L'amorce (100 000 cpm) et 10 µg d'ARNs totaux, extraits de cellules infectées avec le BHV-1 (12 h p.i.) ou extraits de cellules non-infectées (section 6.1.1), ont été dissous dans 30 µl de tampon d'hybridation (80% (v/v) formamide, 1 mM EDTA, 0,4 M NaCl, 40 mM pipérazine-N,N'-bis[2-acide éthanesulfonique] pH 6,4). Après une dénaturation de 10 min à 80°C, le mélange amorce/ARN a été hybridé durant toute la nuit à 37°C. Les acides nucléiques ont ensuite été précipités à l'éthanol 95% (v/v) et récupérés par centrifugation. Les culots ont été lavés à l'éthanol 70% (v/v), séchés et dissous dans 20 µl de tampon AMV (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 60 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1 mM dithiothréitol). La réaction d'extension d'amorce a été initiée par l'addition de 20 U de transcriptase inverse AMV (Pharmacia) et le mélange a été incubé pendant 1 h à 42°C. Enfin, les acides nucléiques ont été précipités par l'ajout d'un dixième de volume de 3 M NaOAc pH 5 et de deux volumes

d'éthanol 95% (v/v). Les culots ont été lavés, séchés et dissous dans le tampon d'échantillon pour les gels de séquence. Les échantillons ont été analysés sur un gel dénaturant de 8% (section 5.3), en parallèle avec une réaction de séquençage utilisée comme marqueurs de taille.

8. CONSTRUCTION DES RECOMBINANTS DE LA VACCINE

La Figure 17 de la section des Résultats illustre les principales étapes nécessaires au clonage du gène de la VP8 dans le vecteur de transfert pSC11. Dans un premier temps, le gène de la VP8 a été inséré dans le vecteur pKS et cette construction a ensuite servi de base pour le clonage de la séquence codante dans le vecteur pSC11. Les recombinants VV ont ensuite été construits selon la méthode décrite par Mackett *et al.* (1984).

8.1 Sous-clonage du gène de la VP8

Un fragment *Eco* RI-*Xho* I de 1,7 kpb, contenant la portion 3' du gène de la VP8, a été excisé de pKS/Mhd et inséré entre les sites *Eco* RI et *Xho* I de pKS; le clone obtenu a été nommé pKS/17. Pour cloner la portion 5' du gène, pKS/Mhd a été digéré par *Acc* I et les extrémités 5' dépassantes générées ont été réparées avec la Klenow afin de générer des extrémités franches. L'ADN a ensuite été digéré par *Eco* RI et le fragment de 1,0 kpb a été purifié par "GeneClean" puis inséré entre les sites *Sma* I et *Eco* RI de pKS/17; le clone obtenu a été nommé pKSVP8. Le site *Acc* I est situé 52 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction de la VP8 tandis que le site *Xho* I est localisé 482 nucléotides en aval du codon d'arrêt. Mentionnons en terminant que le clonage de la séquence codante de la VP8 dans le vecteur pKS a dû être réalisé en deux étapes à cause de la présence d'un site *Acc* I à l'intérieur du gène.

8.2 Mutagenèse dirigée

L'analyse de l'ORF de la VP8 a révélé la présence d'un signal potentiel de terminaison de la transcription reconnu par l'ARN polymérase ADN dépendante du virus de la vaccine lors de la phase précoce de l'infection. Ce signal a été localisé entre les nucléotides 1158 à 1164 de la séquence codante de la VP8 (voir Figure 6; section Résultats). La séquence consensus est TTTTNT, où N représente n'importe quel nucléotide (Yuen et Moss 1987). Le signal TTTTGT retrouvé dans le gène de la VP8 a été substitué en ATGTTGT par mutagenèse dirigée, à l'aide de la trousse "Transformer^{MD} Mutagenesis Kit" (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, É-U). Pour ce faire, un fragment *Pst* I de 330 pb, comprenant la région d'intérêt, a d'abord été sous-cloné dans le site *Pst* I de pTZ19R, créant le clone pTZ/P330. Deux oligonucléotides synthétiques, s'hybridant sur le même brin d'ADN et ayant la même orientation, ont été utilisés pour la mutagenèse. L'amorce 5'-TGACTGGTGAATAITCAACCAAGTCATTCT-3' était spécifique à une région du gène de résistance à l'ampicilline du vecteur et contenait deux substitutions nucléotidiques (soulignées) permettant d'abolir le site unique *Sca* I du vecteur. La deuxième amorce, 5'-TGCGCAACTGCCCATATGTTGTCGCGGCCGG-3' contenait les nucléotides nécessaires à la modification du signal de terminaison de la transcription ainsi que le site reconnu par l'enzyme de restriction *Nde* I (région soulignée).

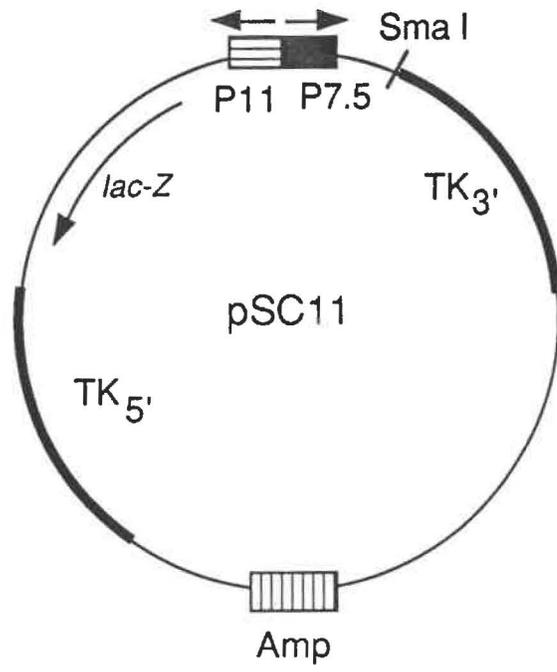
Le protocole utilisé pour la mutagenèse dirigée s'est inspiré de celui décrit dans le manuel d'instructions de la trousse. Brièvement, l'ADN du plasmide pTZ/P330 a d'abord été dénaturé et suite à l'appariement des amorces sur l'ADN simple-brin, le second brin d'ADN a été synthétisé avec la polymérase du phage T4 et les deux fragments reliés par ligation. L'ADN plasmidique a été utilisé pour

transformer la souche de *E. coli* BMH 71-18 *mut S* qui est incapable de réparer les mauvais appariements dans l'ADN. Par la suite, l'ADN de tous les plasmides transformants a été purifié dans le même tube puis digéré par *Sca I* afin de linéariser les plasmides non-mutants. Le mélange d'ADN circulaire et linéaire a ensuite été utilisé pour transformer *E. coli* XL1-Blue. Il est à noter que l'ADN plasmidique linéaire est beaucoup moins efficace pour transformer une souche bactérienne que l'ADN circulaire. Les plasmides mutants ont été sélectionnés en digérant l'ADN purifié des transformants par *Nde I*. Enfin, l'insertion de 330 pb d'un plasmide mutant (pTZ/P330M) a été séquencé en entier afin de s'assurer qu'aucune autre substitution nucléotidique n'était survenue lors de la mutagenèse dirigée. Finalement, le fragment *Pst I* muté de 330 pb a été excisé de pTZP330M et a servi à remplacer le fragment correspondant de pKSVP8, générant ainsi le clone pKSVP8Mut.

8.3 Construction des plasmides de transfert

Le plasmide de transfert pSC11 (Chakrabarti *et al.* 1985) qui a servi pour la construction des recombinants VV, a été fourni par B. Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD, É-U). Les principales caractéristiques de pSC11 sont illustrées à la Figure 4. Ce vecteur contient le gène scindé de la TK du virus de la vaccine, à l'intérieur duquel a été inséré le gène de la β -galactosidase de *E. coli* placé sous le contrôle du promoteur tardif P11 du VV. La β -galactosidase sert de marqueur pour la sélection des recombinants VV. Le promoteur précoce/tardif P7.5 de la vaccine, situé en amont du site unique de clonage *Sma I*, contrôle l'expression du gène d'intérêt. De plus, ce vecteur possède le gène de résistance à l'ampicilline, utile pour la sélection des transformants bactériens. Pour construire pSC11-VP8, pKSVP8 a

Figure 4: Schéma du vecteur de transfert pSC11. Les caractéristiques du plasmide sont décrites dans le texte (inspiré de Chakrabarti *et al.* 1985).



d'abord été digéré par *Bam* HI et *Xho* I et les extrémités 5' dépassantes des deux fragments générés ont été réparées avec la Klenow. Le fragment de 2,7 kpb contenant la séquence codante complète de la VP8 a été purifié et inséré dans le site *Sma* I de pSC11. Les recombinants bactériens ont été sélectionnés par hybridation de colonies. L'ADN plasmidique des clones positifs a été analysé par une double digestion *Bam* HI/*Eco* RI afin de sélectionner un clone dans lequel le gène de la VP8 avait été inséré dans la bonne orientation par rapport au promoteur P7.5.

Enfin, pSC11-VP8-Mut a été construit en digérant pKSVP8Mut par *Apa* I et le fragment de 1,5 kpb généré a été isolé avant d'être utilisé pour remplacer le fragment correspondant de pSC11-VP8. L'ADN plasmidique des recombinants a été analysé par digestion *Eco* RI afin de sélectionner un clone contenant le fragment de 1,5 kpb inséré dans la bonne orientation par rapport au cadre de lecture de la VP8.

8.4 Transfection

Des feuilletts subconfluent de cellules BS-C-1, cultivés dans des plateaux de 12 puits, ont été infectés à une MOI de 0,5 avec la souche WR du VV. Quatre heures après le début de l'infection, le milieu de culture a été vidangé et remplacé par 0,8 ml de milieu frais sans SVF. Les cellules ont été transfectées avec 4 µg de pSC11-VP8, pSC11-VP8-Mut ou pSC11, préalablement linéarisés avec *Sca* I. La transfection a été effectuée à l'aide de 20 µl de "Lipofectin^{MD} Reagent" (Gibco/BRL), en suivant les instructions du fabricant. Environ 16 h après la transfection, 1,5 ml de milieu de culture contenant 20% (v/v) SVF a été ajouté à chacun des puits et l'infection s'est poursuivie jusqu'à ce qu'un effet

cytopathique maximal soit observé. Les surnageants de transfection ont été récoltés et congelés à -70°C.

8.5 Sélection des recombinants

Des feuilletts confluents de cellules TK-143B, cultivés en pétris de 60 mm de diamètre, ont été infectés avec des dilutions décimales de surnageants de transfection. Après une adsorption d'une heure et demie, l'inoculum viral a été remplacé par 5 ml de milieu contenant 1,5% (p/v) de bacto-agar. Lorsque les plages sont devenues visibles, en général après 3 jours d'infection, 300 µg de X-Gal par ml de milieu de culture ont été ajoutés dans chacun des pétris. Des plages bleues ont été repiquées avec une pipette Pasteur et ont ensuite été soumises à deux rondes additionnelles de sélection. Des recombinants VV potentiels ont d'abord été amplifiés en plateaux de 12 puits sur des cellules TK-143B puis en flacons de 25 cm² sur des cellules HEp-2. Enfin, les titres viraux ont été évalués sur des cellules HEp-2, selon la méthode décrite à la section 1.5.

9. ÉLECTROPHORÈSE DE PROTÉINES ET IMMUNOEMPREINTES

9.1 Préparation des lysats cellulaires

Des feuilletts confluents de cellules HEp-2, cultivés en plateaux de 6 puits, ont été infectés à une MOI de 5 DICT₅₀ de recombinants VV par cellule. A différents temps p.i., le milieu a été vidangé, les cellules ont été lavées avec du PBS avant d'être lysées dans 250 µl de tampon d'échantillon (40 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 280 mM β-mercaptoéthanol, 10% (v/v) glycérol et 0,01% (p/v) bleu de bromophénol). Les échantillons ont été transférés dans des tubes Eppendorf et ont été conservés à -20°C.

9.2 Électrophorèse de protéines (SDS-PAGE)

Le fractionnement des protéines par électrophorèse a été effectué en gels d'acrylamide en présence de SDS (Laemmli 1970). Des gels de 7,5% (p/v) acrylamide (rapport acrylamide:bis-acrylamide 38:1) ont été utilisés pour l'analyse des protéines virales. Les gels de séparation ont été préparés dans un tampon 0,375 M Tris-HCl pH 8,4 contenant 5 mM EDTA, 0,1 % (p/v) SDS, 0,03% (v/v) TEMED et 0,025% (p/v) persulfate d'ammonium. Les gels de regroupement étaient constitués de 3% acrylamide et préparés dans un tampon 125 mM Tris-HCl pH 6,8 contenant 0,1 % (p/v) SDS, 0,05% (v/v) TEMED et 0,13% (p/v) persulfate d'ammonium. Avant d'être chargés, les échantillons ont été bouillis à 100°C durant 4 min. L'électrophorèse a été effectuée dans un tampon contenant 25 mM Tris, 0,192 M glycine et 0,1% (p/v) SDS sous un courant de 45 mA. Le marqueur de masse moléculaire utilisé était constitué d'un mélange de protéines standards de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ont.).

9.3 Transfert de type Western et immunoempreinte

L'immunoempreinte de protéines sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF; Bio-Rad) a été effectuée selon la méthode de Trudel *et al.* (1987). Après séparation par électrophorèse, les protéines ont été électrotransférées du gel à la membrane pendant une heure et demie à 50 V dans le tampon d'électrophorèse contenant 20% (v/v) méthanol. Les sites d'adsorption résiduels de la membrane ont été bloqués à l'albumine sérique bovine 1,5% (p/v) dans un tampon TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl) durant 1 h. La membrane a été mise en contact durant 2 h avec un sérum anti-VP8 dilué 1/500 dans un tampon TBS contenant 0,05% (v/v) Tween-20 (TBS-T). Ce sérum

monospécifique a été généreusement fourni par V. Misra (Université de Saskatchewan, Saskatoon, Sask.) et a été produit en immunisant des lapins avec une préparation de VP8 purifiée par SDS-PAGE. Après la fixation des anticorps, la membrane a été lavée trois fois avec du tampon TBS-T puis la protéine-A conjuguée à la peroxydase (Mandel Scientific Co., Rockwood, Ont.), diluée 1/2000 dans le tampon TBS-T, a été ajoutée et l'incubation s'est poursuivie pendant une heure et demie. La membrane a ensuite été lavée à trois reprises dans le tampon TBS-T avant de procéder à la révélation des complexes antigènes-anticorps. Pour ce faire, une solution contenant 2,5 mg de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochlorure (Sigma) et 0,03% (v/v) peroxyde d'hydrogène dans 10 ml de tampon TBS a été utilisée. Enfin, la réaction a été arrêtée en remplaçant la solution de révélation par de l'eau déionisée.

10. EXPÉRIMENTATION CHEZ LA SOURIS

10.1 Souris

Des souris BALB/c (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b) ou C3H (H-2^k) (Charles River, St-Constant, Qc) âgées entre six et huit semaines ont été utilisées pour les expériences décrites dans cette thèse. Les souris ont été maintenues dans des conditions adéquates pour l'expérimentation animale. Avant la première injection, un échantillon sanguin a été prélevé de chaque souris par la technique de saignée au plexus rétro-orbital. Toutes les saignées ont été effectuées par le personnel de l'animalerie de l'Institut Armand-Frappier. Les sérums ont été recueillis après centrifugation des cellules sanguines à 2500 x *g* pendant 15 min et ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

10.2 Immunisations

Des groupes de 5 ou 10 souris ont été immunisées avec 6×10^6 DICT₅₀ de recombinants VV par voie intra-péritonéale (i.p.) ou par voie intra-veineuse (i.v.). Pour les immunisations par voie i.p., les souris ont reçu 0,2 ml de virus dilué dans du PBS (Gibco) tandis que par voie i.v., un volume de 0,1 ml était injecté. Les immunisations ont été données à toutes les deux semaines et les saignées effectuées 13 jours après chaque vaccination. Les sérums des souris appartenant au même groupe expérimental ont été regroupés.

11. ELISA

11.1 Préparation de l'antigène

Le protocole utilisé pour préparer les antigènes pour les ELISA s'inspire de celui décrit par Talbot (1989). Brièvement, des feuillets confluent de cellules MDBK ont été infectés avec le BHV-1 à une MOI de 2 et incubés pendant 27 h. Une culture témoin a été réalisée en parallèle. Le milieu a été vidangé et les flacons ont alors été soumis à trois cycles de congélation (-80°C) et décongélation (37°C). Les lysats cellulaires ont été récoltés, soniqués deux fois durant 1 min avec l'appareil Braunsonic puis centrifugés à $10\,000 \times g$ pour 30 min à 4°C. Le surnageant a été récolté et centrifugé à $100\,000 \times g$ durant 60 min à 4°C. Le culot a été resuspendu dans environ 1 ml de PBS (Gibco). La concentration en protéines de l'antigène viral et de l'antigène témoin a été évaluée avec la trousse de dosage de Bio-Rad basée sur la méthode de Bradford (1976). Finalement, la concentration optimale d'antigène à adsorber au plateau a été déterminée par un test ELISA en échiquier. Brièvement, des dilutions sérielles d'antigène, effectuées dans un sens du plateau (colonne ou

rangée), ont d'abord été adsorbées (section 11.2). La réactivité d'un sérum spécifique au BHV-1 ou d'un sérum témoin a ensuite été analysée selon le protocole décrit à la section suivante. La concentration optimale d'antigène a été établie à environ 1 µg/ml.

11.2 Immunodétection indirecte

La méthode employée pour titrer les anticorps spécifiques aux protéines du BHV-1 a été décrite par Payment *et al.* (1979). L'antigène préparé à la section précédente a été dilué à la concentration optimale dans un tampon PBS sans calcium ni magnésium (Gibco) puis 100 µl ont été adsorbés dans chaque puits de plateaux ELISA à 96 puits (Flow) pour 16 h à 4°C. Après avoir vidangé les plateaux, les sites résiduels ont été bloqués durant 1 h avec 150 µl de diluant ELISA, constitué de tampon PBS sans calcium ni magnésium contenant 10% (v/v) de SVF. Des dilutions sérielles 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 antigène/anticorps a été incubée durant 2 h à la température ambiante puis les puits ont été lavés cinq fois avec une solution de lavage (0,05% (v/v) Tween-20 dans de l'eau déionisée) puis vidés. La détection des anticorps fixés a été réalisée à l'aide d'un antisérum dirigé contre les IgG de souris et conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma). L'anticorps conjugué a été utilisé à une dilution 1/1000, effectuée dans le diluant ELISA contenant 0,2% (v/v) Tween-20, à raison de 100 µl par cupule. Le mélange a été incubé durant 90 min à la température ambiante puis les puits ont été lavés cinq 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, 2,2 mM *o*-phénylène diamine, 3 mM H₂O₂). La réaction a

été arrêtée par addition de 100 µl de 0,1 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.

12. TESTS DE NEUTRALISATION

Les tests de neutralisation ont été effectués selon le protocole décrit par Trudel *et al.* (1987). Brièvement, les dilutions des sérums de souris BALB/c immunisées i.p. trois fois avec les recombinants VV ont été incubées avec une dilution de BHV-1 contenant environ 25 DICT₅₀. Après une incubation de 4 h à 4°C, l'infectivité résiduelle a été évaluée par un test de DICT (section 1.5) en utilisant les cellules MDBK. Le titre neutralisant correspond à la réciproque de la dilution de sérum permettant de neutraliser l'infectivité virale dans 50% des cupules inoculées. La dilution de BHV-1 employée a également été titrée afin de s'assurer du nombre de doses utilisées pour le test.

13. TESTS DE LYMPHOPROLIFÉRATION

Le BHV-1 et la souche WR du VV ont été inactivés en exposant 10⁶ DICT₅₀ par ml de milieu de culture sans SVF à une lampe UV (modèle UVGL-58; UVP Inc., San Gabriel, CA, É-U) placée à une distance de 5 cm, durant 5 et 7 min respectivement. La perte totale de l'infectivité a été testée en inoculant des cellules MDBK avec le BHV-1 inactivé et des cellules HEp-2 avec le VV. Si après 4 jours aucun effet cytopathique n'était observé, le virus était utilisé comme antigène pour les tests de lymphoprolifération. Pour ces tests, les souris ont

d'abord été vaccinées i.p. à trois reprises et trois semaines après la dernière dose, les animaux ont été sacrifiés. Les rates de deux souris par groupe ont été récoltées stérilement et triturées dans un même pétri. Les splénocytes, à raison de 4×10^5 cellules par puits, ont été cultivés en quadruplicatas dans un milieu RPMI-1640 (Gibco) contenant 10% (v/v) de SVF, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine et 50 μM β -mercaptoéthanol. Les cellules ont été stimulées avec le BHV-1 ou le VV inactivés aux UV à une MOI de 0,1 (avant l'inactivation), dans un volume final de 200 μl . Après 4 jours, 1 μCi de [^3H]thymidine (ICN; 22 Ci/mme) a été ajouté dans chaque puits. L'incubation s'est poursuivie pendant 18 h puis les plateaux ont été congelés à -20°C . Les lysats cellulaires ont été récoltés sur des rondelles de fibres de verre qui ont ensuite été mises dans des fioles contenant 7 ml de scintillant (Cytoscint; ICN). L'incorporation de thymidine a été mesurée au compteur à scintillation Packard. L'indice de stimulation (I.S.) a été obtenu en calculant le rapport entre la moyenne des comptes des splénocytes stimulés en présence d'un antigène sur la moyenne des comptes des splénocytes cultivés en absence d'antigène. Un I.S. supérieur à 2 a été considéré comme étant positif (Arvin *et al.* 1987).

RÉSULTATS

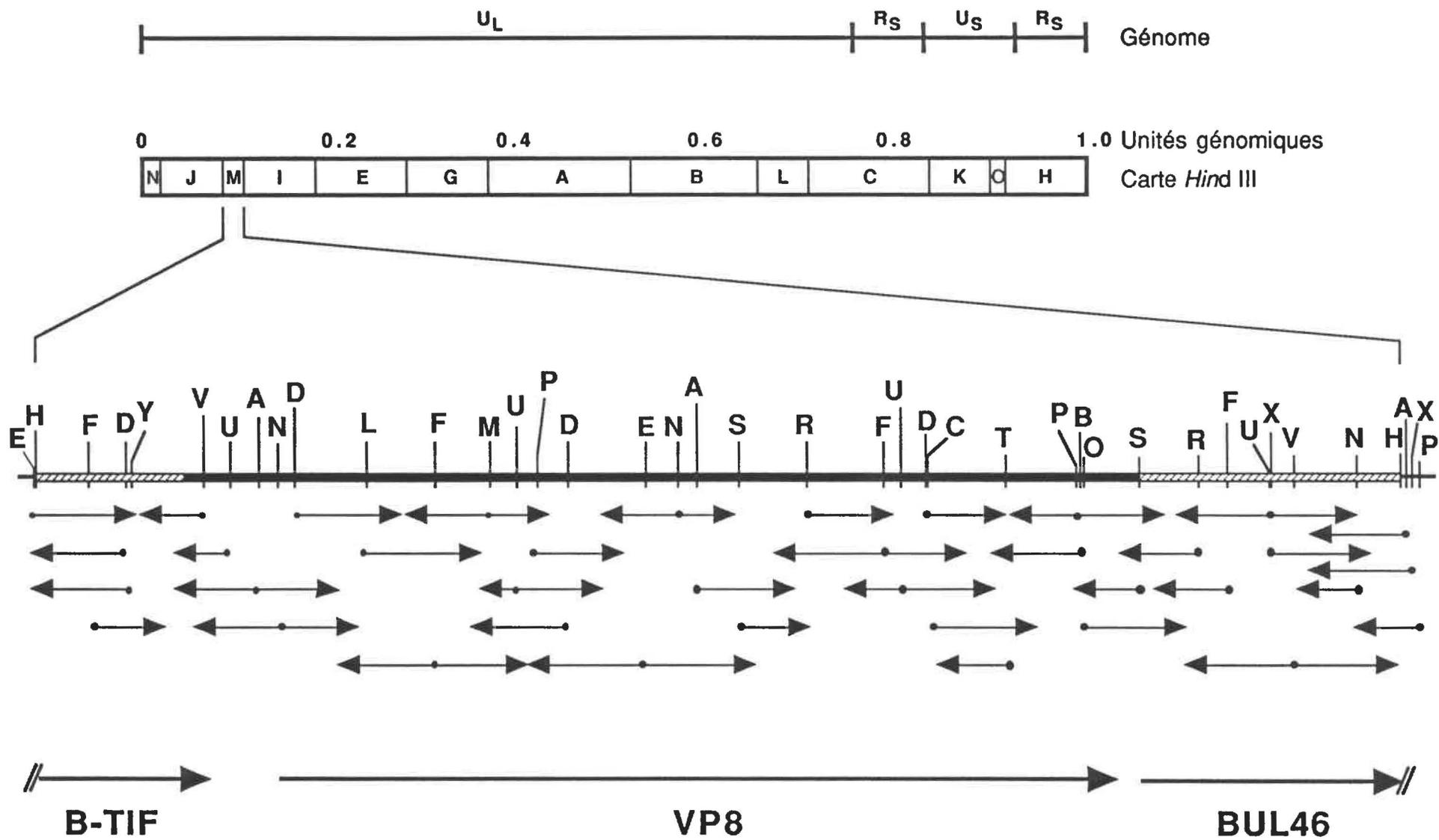
1. SÉQUENCE DU FRAGMENT *HIND* III M DU GÉNOME DU BHV-1

La traduction *in vitro* d'ARNm piégés sur les fragments *Hind* III individuels du génome du BHV-1 avait permis de localiser la séquence codante d'une protéine abondante de 94 kDa dans le petit fragment *Hind* III M de 3,7 kpb (Annexe I; Simard *et al.* 1990). Un des objectifs du travail était de caractériser le gène codant cette protéine. Pour ce faire, la séquence nucléotidique complète du transformant pKS/Mhd, qui contient le fragment *Hind* III M du BHV-1, a été déterminée par la méthode chimique (Maxam et Gilbert 1977). La Figure 5 illustre un diagramme représentant les stratégies de séquençage réalisées ainsi que la carte des sites de restriction qui ont été utilisés pour le marquage des fragments d'ADN. Il est à noter que les sites de restriction du vecteur qui ont été employés pour déterminer les régions bordantes du fragment sont aussi indiqués.

La séquence du fragment M a été déterminée en suivant les stratégies représentées par les flèches qui indiquent l'origine, l'orientation et la longueur de la lecture de la séquence obtenue pour chacun des fragments. La majorité de la séquence nucléotidique a été déterminée par le séquençage des deux brins d'ADN, ce qui a permis de confirmer les pyrimidines d'un brin par les purines de l'autre brin.

La composition en G+C de la séquence nucléotidique obtenue est de 72%; ce fort pourcentage en G+C a généré occasionnellement des compressions dans les gels de séquence, probablement causées par la formation de structures secondaires stables, particulièrement dans les régions où les A et les T étaient largement sous-représentés. Ces régions ont donc dû être séquencées à

Figure 5: Stratégies de séquençage du fragment *Hind* III M du génome du BHV-1 par la méthode chimique. Les sites de restriction employés lors des marquages sont identifiés comme suit: A, *Acc* I; B, *Bgl* I; C, *Cel* II; D, *Dde* I; E, *Eco* RI; F, *Hinf* I; H, *Hind* III; L, *Afl* III; M, *Sma* I; N, *Nco* I; O, *Not* I; P, *Apa* I; R, *Nar* I; S, *Sac* II; T, *Tth* III; U, *Stu* I; V, *Pvu* II; X, *Xho* I; Y, *Sty* I. Les sites A, X, P et E bordant le fragment M appartiennent au vecteur pKS. Les cadres de lectures identifiés sont indiqués dans le bas. La séquence de la région représentée par le trait gras est illustrée à la Figure 6.



plusieurs reprises afin de résoudre les ambiguïtés. De plus, certaines régions ont été confirmées par la méthode enzymatique (Sanger *et al.* 1977).

L'analyse informatique de la séquence obtenue a révélé la présence d'un cadre de lecture ouvert de 2220 nucléotides. De plus, deux ORFs partiels bordant cet ORF complet et situés sur le même brin d'ADN que ce dernier ont été identifiés. La localisation, l'orientation et la longueur de ces cadres de lecture sont illustrées par les flèches au bas de la Figure 5.

Au moment où l'analyse de la séquence était presque terminée, un article portant sur la localisation et la séquence du gène codant la VP8 du BHV-1, la protéine majeure du tégument, a été publié (Carpenter et Misra 1991). Une banque d'expression λ gt11 des fragments génomiques viraux avait été criblée en utilisant un sérum anti-VP8, ce qui avait permis de localiser le gène sur le génome viral. La séquence rapportée était très similaire à la nôtre, permettant ainsi de déterminer que la protéine abondante de 94 kDa représentait la VP8.

L'analyse du gène de la VP8 et la comparaison de la séquence rapportée avec la nôtre sont présentées à la section suivante. La séquence de l'ORF partiel localisé en aval du gène de la VP8 sera analysée à la section 3 des Résultats. Enfin, la séquence complète de l'ORF situé en amont de celui de la VP8 a été publiée par Carpenter et Misra (1992) et code l'homologue de l' α -TIF du HSV. La portion de ce gène contenu dans le fragment M n'est pas présentée dans cette thèse.

2. CARACTÉRISATION DE LA VP8

2.1 Analyse du gène

La Figure 6 présente la séquence nucléotidique et la séquence déduite en acides aminés du gène de la VP8, ainsi que ses régions proximales 5' et 3'. La portion de la séquence nucléotidique montrée dans cette Figure correspond à la région du fragment M qui est représentée par le trait plein à la Figure 5. Cette séquence comprend 2607 nucléotides; elle débute 424 nucléotides en aval du site *Hind* III situé en 5' du fragment M et se termine 733 nucléotides en amont du site *Hind* III en 3'.

La séquence codante de la VP8 débute avec un codon ATG placé dans un contexte favorable pour l'initiation de la traduction puisqu'il est bordé par les séquences GACGCCATGG (Kozak 1986, 1987). La VP8 contient 739 acides aminés pour une masse prédite de 80,7 kDa, ce qui diffère significativement de la masse observée en SDS-PAGE suite à la synthèse de la protéine dans un système de traduction *in vitro* (94 kDa). La composition en acides aminés de la protéine est présentée au Tableau II. On y note un pourcentage élevé de résidus proline (8%) et arginine (12,5%). Par ailleurs, les acides aminés dont les codons contiennent un A ou un U en première ou seconde position, sont peu abondants (e.g. lysine, isoleucine, asparagine). De plus, la plupart des acides aminés sont codés par des codons se terminant par un G ou un C (Figure 6). Ces préférences sont probablement le reflet du haut contenu en G et en C du gène. Enfin, l'analyse de la séquence déduite en acides aminés n'a pas révélé la présence de sites potentiels pour la *N*-glycosylation (Kornfeld et Kornfeld 1985).

Figure 6: Séquence du gène de la VP8 du BHV-1 ainsi que de ses régions proximales. La séquence déduite en acides aminés est représentée par les symboles à une lettre placés en-dessous du deuxième nucléotide des codons respectifs. Les numérotations en acides nucléiques et en acides aminés sont indiquées à droite. Les régions promotrices potentielles du gène sont indiquées par les traits noirs placés au-dessus et en-dessous des nucléotides impliqués. La flèche indique le site d'initiation de la transcription de l'ARNm codant la VP8 et les nucléotides soulignés par un trait fin correspondent au site de fixation de l'oligonucléotide utilisé pour la réaction d'extension d'amorce.

CCGCGGCGGTCGTCGGCCAAAGCCCGGCAAACCATTTCGGGGCACGTATGACGCGCTGCTGGGGGACCGCCTCAACCAGCTGCTGG 86
 ACTTCTAAGGGCGGGCGGAGTGGCGCTTTCGACCCGGCGCGTGGCGTTTTCGAGGGCCTCCCTCTGGCGTAAGGCCTCTGGGCCCT 173
 GCGGGCGGCGGAGCGTTATAAAAGCCACTTGGGTCTACACGGGATTAGTTTTCGCGCCCGCGGCTTTCATAGCGCCCTTAGACGCC 260
 ATGGACGCGCTAGGATGGGCGGCTGAGCGCGCGCGCGCTCCGGAACGTACCGCACGCACCCGTTCCAGCGCCCTCTGCC 347
 M D A A R D G R P E R R R A V S G T Y R T H P F Q R P S A 29
 CGGCGGAGCGCTGGACGCCCTGCGCGCTGCGGACGCCGAGCCGCGGAGCGCGCGGGTCCGGCGCCCGCGGCGTACTTCCAGCGG 434
 R R S A G R P A R C G R R G R G A P R V R R P R P Y F Q R 58
 CCCCCGACGAGGACACCAGTGGAGGACGAGAACGTGTATGATTACATCGACGGCGATAGCAGCGACAGCGCCGACGACTACGATAGC 521
 P P D E D T S E D E N V Y D Y I D G D S S D S A D D Y D S 87
 GATTATTTTACGCTAACCGCGCCCAATCACGGCGCGGATGCTATGGACACAGACGCACCACCCGAGCGCGCCCGGAAGG 608
 D Y F T A N R G P N H G A G D A M D T D A P P E R A P E G 116
 GGTGCCCGCAAGACTACTTGACGGCCACCTGCGCGCCATCGAGGTCCTGCCGAGTCAGCGCCACCAGGAGCCTGCTGGAGCGC 695
 G A P Q D Y L T A H L R A I E V L P E S A P H R S L L E R 145
 ACGGCGGACCGTGTATGCGCAGCAGTTTCCCCGCGGATTTGAGTGGCGGCTCCAAGCGCCGCGCACAGCGCGCGGCGGAGC 782
 T A R T V Y A Q Q F P P R D L S A G S K A P A Q R A R R S 174
 CTCGCGGCTTCCCGCGTGGCGGGGGGGCGGCAAGAACCAGCGGCGAGCAGCAAGGCGACGACCGCGAGCCTGCGCGAGGAC 869
 L R G F R G G G G G Q E P G P D D E G D D A A D L R E D 203
 CTTGTGCCAGACGCGCTACGCGCAGTAGAGCGGCGGAGTGTGCGGAGGGCCCCGCTCCTCAACAGTGGAGCGCGCGCT 956
 L V P D E A Y A H L E R D E R L S E G P P L L N M E A A A 232
 GCGGCTGCGGGGAGAGGAGCGTGGTGGAGGAGCTGTTTACGACGCGCCCTGCCAGCCTCAGGTAGAGGTGCGCGTCCCGAGGAT 1043
 A A A G E R S V V E E L F T Y A P A Q P Q V E V P L P R I 261
 TTGGAGGCGCGGTGCGGCCACGCGCTTCTTCGGCGAGATGTCGCTGGACGCGGTGTGCCGACCGCCGCGCAACGATCAGCGCGTG 1130
 L E G R V R P S A F F A Q M S L D A L C R T P P N D Q R V 290
 GCGCGGAGCGCGCGCTTGGGAGATGGCGGTACCGCGATGGGCTCCTAATAACCACGTTGGAGCACGGTGGACCCGGAATTCTCG 1217
 A R E R A W E M A G T P H G L L I T T W S T V D P E F S 319
 ATCGCGCATGTACGTGGCGCCCGCTGAGGGCACCCGCGCGCTAGTGTGGCGCGCGGATGAAGCGCCATGGCGCTGCGAG 1304
 I G G M Y V G A P E G T R P R L V W R R A M K Q A M A L Q 348
 TACCGGCTGGGGTGGGGGCGCTGTGCCGAGCAGTAGACGCGGAGCATGCCGCCACTGAGGCGTGTCTTTTTGGCGTGACCGG 1391
 Y R L G V G G L C R A V D G A A C R P L R R C S F W R D A 377
 CTGCTGCGGAGTGGCAACTGCCATTTTTGTCGCGCGCGGGCGCGCGCGCGCGCGCTGCCGCGCGCGCGGTTGG 1478
 L L R E C A T A I F C R G R G A R A A P R R L P R P A V G 406
 CTGCTGGCAGCCACGAGTTCACGCCACCGGACGCGTCCCCCACGCGAGCCTCTTTCGCGGCTCAATGGGTTCCCTGATTACTGG 1565
 L L A T A T Q F T P P D A S P H A T L F R G S M G S L I Y W 435
 CACGAGTGGCGGTGATGACTGCGGTGCGCGCCCTGTGCGCGCTACGCGGCGCGCGGCTGCGAGTGGCGGAGCTGTACTG 1652
 H E L R V M L T A V P A L C A R Y A G A G L Q S A E L Y L 464
 CTGGCGTACGGCACTCAGAGGCGCCCGGCTACACGGCAAATGAGCGCTACCGGCTCTCGGCGTACCTGACGCGTGTGTGAGCGCTC 1739
 L A L R H S E A P G Y T A N E R Y A L S A Y L T L F V A L 493
 GCGGAGCGGGGCTGCGCTGGCTGTATCTAGCGGGCGGCACTGCTCGGGCGGCAACCCACAGCGCGCGCTTCCGCGAAGTGGCG 1826
 A E R G L R W L Y L A G A H L L G P H P T A A A F R E V R 522
 GCCAAGATCCCGTACGAGCGGCTGCCGCTAGGCAGCGGACGCTGCACGACCGCAAGTGGAGACGGTGGACTCGGCCACCTTCCAA 1913
 A K I P Y E R L P L G S A T L H D A E V E T V D S A T F Q 551
 GAGGCCCTGGCTTTTAGCGCGCTGGCACATGTTTACGGGGAGGCTACGTAGCGGTGCGAACCAGCGACGCGTGTGATGGCCGAG 2000
 E A L A F S A L A H V Y G E A Y V A V R T A T T L L M A E 580
 TACGCGTCCACGCTGAGCGCCGGACGTGCGGACATGACAGCGGCTTCCGCGGCTGGGGCTGATCGCGCAGCGGCTGATGGC 2087
 Y A V H A E R R D V R Q M T A A F L G V G L I A Q R L M G 609
 AGCCTGAACCTGCTGCTAACGCTAGCCGCGCAGCGGTGACGGGGCGCGGCTGACCGTGGCGGAGGGCACGCTCGCGCGG 2174
 S L N L L L N C V A G A A V Y G G R R V T V R E G T L A R 638
 TACAGCCTGCTAGCGGACGCGGCACTGCCGCTGGTGGCGCCGCTTCCGTTGGAGTTCGCGGAGGCGCGGCGGCTCATGCGC 2261
 Y S L L A D A A L P L V R P V F L V E F R E A R D G V M R 667
 GAGCTGCGGCTGCGGCCGTTGGCAGCCGCGCTGGCGGCAAGCGCGGCTCATGGAGCTGTACCCTCGTGGACAGCATAGAG 2348
 E L R L R V A S P L A G A K R R V M E L Y L S L D S I E 696
 GCGCTGGTGGCGCGAGCGCTAGGTTGCGGCGCGGCTGTTGGCGGCTCGTGGACATCGCGGAGGCGCTGGCGGACACCCGCGAC 2435
 A L V G R E P L G S R P V L G P L V D I A E A L A D H P H 725
 CTCGTCACGGCGATGGCGGGGCGCGCTGGCGGCGGCTAGGCGACGCGCGCTTACGCGCGCTGGGTCCGCCACATCA 2522
 L V T G D G R G P R L G G R *** 739
 GCCACCACGCGCGCGCCCGCCCGCTCGTATGCTATATAGCCATCACGCTTGAATGCCAAGCGCCACTTCCCGCGCGG 2607

Tableau II: Composition en acides aminés de la VP8 du BHV-1

catégorie	radical	acide aminé	nombre	%
neutre	non-polaire	A = alanine	108	14,61
		V = valine	44	5,95
		L = leucine	82	11,1
		I = isoleucine	11	1,49
		M = méthionine	15	2,03
		F = phénylalanine	20	2,71
		W = tryptophane	6	0,81
	polaire	P = proline	59	7,98
		G = glycine	64	8,66
		S = sérine	35	4,74
		T = thréonine	33	4,47
		C = cystéine	9	1,22
		Y = tyrosine	26	3,52
		N = asparagine	8	1,08
chargé	acide	Q = glutamine	18	2,44
		D = aspartate	41	5,55
	basique	E = glutamate	48	6,5
		K = lysine	4	0,54
		R = arginine	92	12,45
		H = histidine	16	2,17
Total			739	100

Des régions promotrices potentielles du gène ont été identifiées en amont du codon d'initiation de la traduction de la VP8. Ces motifs sont indiqués par des traits noirs situés au-dessus et en-dessous des nucléotides impliqués (Figure 6). Ainsi, une boîte CAAT contenant 7 des 9 nucléotides de la séquence consensus (GGYCAATCT; Y = C ou T) a été localisée à la position 17 de la séquence. De plus, une boîte TATA, identique à la séquence consensus TATAAAA (McKnight et Kingsbury 1982), a été identifiée à la position 190. Enfin, aucun signal de polyadénylation (AATAAA; Proudfoot et Brownlee 1976) n'a été trouvé en aval du codon d'arrêt de la traduction.

2.2 Comparaison des séquences de la VP8 chez deux isolats du BHV-1

La séquence de la VP8 présentée à la Figure 6 a ensuite été attentivement comparée avec la séquence publiée par Carpenter et Misra (1991). Il est à noter que ces séquences proviennent de deux isolats appartenant au sous-type 1 du BHV-1. En effet, nous utilisons couramment au laboratoire un isolat de l'Ouest canadien (#34), tandis que celui utilisé par Carpenter et Misra est un isolat américain (P8-2). Le résultat de cette comparaison est illustré à la Figure 7 et seules les différences retrouvées dans la séquence chez l'isolat P8-2, tant au niveau des nucléotides que des acides aminés, sont indiquées. Des insertions de nucléotides dans la séquence précédemment publiée ont créé trois changements de cadre de lecture ("frameshift"; FS), qui affectaient respectivement 14, 55 et 18 acides aminés de la protéine. Le premier changement de cadre de lecture (FS-1) était causé par la présence de deux pyrimidines additionnelles (C et T) et se terminait par l'ajout d'un C. Comme le

montre un gel de séquence représentant la région du début du FS-1 (Figure 8A), les nucléotides C et T sont absents de notre séquence. À l'exception de ces trois bases, les séquences nucléotidiques sont identiques dans la région impliquée.

Le deuxième changement du cadre de lecture (FS-2) était généré par l'insertion d'un A en position 1353, d'un T en position 1403, de deux G en positions 1457 et 1458 et d'un C en position 1467. Le FS-2 se terminait par la délétion de deux C en positions 1468 et 1517. Ces résultats sont confirmés par les Figures 8B et 8C qui présentent respectivement les gels de séquences montrant les régions du début et de la fin du FS-2. De plus, deux autres divergences ont été observées dans le FS-2 où, aux positions 1385 et 1386, un T et un G ont été respectivement remplacés par un G et un C. Ces changements pourraient représenter des transversions individuelles (T→C) ou des inversions dinucléotidiques (TG→GC). Enfin, mentionnons que quatre des insertions retrouvées dans le FS-2 sont situées dans une région extrêmement riche en G et en C, ce qui a donc pu occasionner des compressions dans les gels de séquence.

Le troisième changement du cadre de lecture (FS-3) était causé par l'ajout d'un C en position 2092 et se terminait par l'addition de deux C en positions 2146 et 2147. Les gels de séquence représentant le début et la fin du FS-3 (Figure 8D et 8E) montrent l'absence de ces nucléotides dans notre séquence. En excluant les trois C supplémentaires, les séquences nucléotidiques sont identiques à l'intérieur du FS-3. Il est à noter qu'à cause de tous ces changements, la VP8 de l'isolat P8-2 possède trois acides aminés de plus que celle de l'isolat #34.

Figure 7: Comparaison des séquences du gène de la VP8 provenant des isolats #34 et P8-2 du BHV-1. La séquence nucléotidique et la séquence déduite en acides aminés de la VP8 de l'isolat #34 sont numérotées à droite et sont représentées au-dessus de celles de l'isolat P8-2 (Carpenter et Misra 1991). À l'exception des trois régions de changements de cadre de lecture, les séquences de l'isolat P8-2 sont présentées uniquement aux endroits où des différences ont été notées. Les nucléotides supplémentaires ou manquants sont soulignés par un trait gras. Dans la région 3' non-codante, la portion soulignée de la séquence de l'isolat P8-2 est complémentaire à celle de l'isolat 34.

CCGCGGCGGTCGTCGGCCAAAGCCCGCAAACCCATTCCGGCGGCACGTATGACGCGCTGCTGGGGGACCGCCTCAACCAGCTGCTGG 86
 ACTTCTAAGGGCGGGCGGGCAGTGGCGCTTTCGACCCGGCGCGTGGCGTTTGGCAGGGCTCCCTCTGGCGTAAGGCCTCTGGGCCCT 173
 GCGGGCGGCGGAGCGGTATAAAAGCCACTTGGGTCTACACGGGATTTAGTTTTCGGCGCCGCGCTTCTAGGCGCCCTTAGACGGC 260
 M D A A R D G R P E R R R A V S G T Y R T H P F Q R P S A 29
 ATGGACGCGCTAGGGATGGGCGCCCTGAGCGCCGCGCGCTCTCCGAACGTACCGCACGCACCCGTCCAGCGCCCTCTGCG 347
 CCGCGCCG
 P R R
 R R S A G R P A R C G R R G R G A --- P R V R R P R P Y F Q 57
 CGGCGGAGCGCTGGACGCCTGCGCGCTGCGGACGCCGAGGCCGCGGAGCG---CCGCGGGTCCGGCGCCCGCGCCGCTACTTCCAG 431
 FS-1 → CTGCTGGACGCCCTGCGCGCTGCGGACGCCGAGGCCGCGGAGCG ← FS-1 TG
 L L D A L R A A D A E A A E R D
 R P P D E D T S E D E N V Y D Y I D G D S S D S A D D Y D 86
 CGGCCCGGAGCAGGACACCAGTGGAGCAGAGCGTGTATGATTACATCGACGGCGATAGCAGCGACAGCGCCGACGACTACGAT 518
 T
 S D Y F T A N R G P N H G A G D A M D T D A P P E R A P E 115
 ACGGATTATTTACTGCTAACCGCGCCCAATCACGGCGCCGGCGATGCTATGGACACAGACGCCACCACCGAGCGCCCGCGAA 605
 G G A P Q D Y L T A H L R A I E V L P E S A P H R S L L E 144
 GGGGTGCCCCGCAAGACTACTTGACGGCCACCTGCGCGCATCGAGGTCCTGCGCGAGTCAGCGCCCAACCGGAGCCTGCTGGAG 692
 C
 A
 R T A R T V Y A Q Q F P P R D L S A G S K A P A Q R A R R 173
 CGCACGGCCGGACCGTGTATGCGCAGCAGTTTCCCCGCGCGATTGAGTGCGGCTCCCAAGGCGCGGCACAGCGCGCGCGCGG 779
 CG
 H E G R
 S L R G F P R G G G G G Q E P G P D D E G D D A A D L R E 202
 AGCCTCCGCGCTTCCCGCGTGGCGCGGGGGCGCCAAAGAACC CGCGCAGACGACGAAGGCGACGACGCCGAGACCTGCGCGAG 866
 G
 D L V P D E A Y A H L E R D E R L S E G P P L L N M E A A 231
 GACCTGTGCGCAGCAGGCGCTACGCGACCTAGAGCGCGACGAGCGCTGTCGGAAGGCGCCCGCTCCCTCAACATGGAGCGGCC 953
 T
 A A A A G E R S V V E E L F T Y A P A Q P Q V E V P L P R 260
 GCTGCGCTGCGGGGGAGAGGAGCGTGGTGGAGGAGCTGTTACGTACGCCCTGCCCAGCCTCAGGTAGAGGTGCGCGCTGCCAGG 1040
 I L E G R V R P S A F F A Q M S L D A L C R T P P N D Q R 289
 ATTTGGAGGGCGGGTGGCGCCAGCGCTTCTTCGCGCAGATGTCGCTGGACCGCTGTGCGCAGCGCCCGCAACGATCAGCGC 1127
 V A R E R R A W E M A G T P H G L L I T T W S T V D P E F 318
 GTGGCGCGGAGCGCGCGCTTGGGAGATGGCCGCTACGCCGATGGGCTCCTAATAACCACGTGGAGCACGGTGGACCCGGAATTC 1214
 T
 V C D
 S I G G M Y V G A P E G T R P R L V W R R A M K Q A M A L 347
 TCGATCGGCGCATGTACGTGGCGCCCTGAGGGCACCCGGCCCGGCTAGTGTGGCGCGCGGATGAAGCAGGCCATGGCGCTG 1301
 Q Y R L G V G G L C R A V D G A A C R P L R R C S F W R D 376
 CAGTACCGCTGGGGTGGGGGCGCTGTGCCGAGCAGTAGACGGCGCAGCATGCCGCCACTGAGGCGCTGCTCTTTTGGCGTGAC 1388
 FS-2 → CGAATGCCCGCCACTGAGGCGCTGCTCTTTTGGCGGCA
 R M P P T E A L L F L A A

A L L R E C A T A I F C R G R G A R A A P R R L P R P A V 405
 GCCTGCTGCGCGAGTGGCAACTGCCATTTTTGTCGCGCGCGGGGCGCGGGGCGCGCCGCGCCGCTGCCGCGGCGGGCGGTT 1475
 CGCGCTGCTGCGCGTAGTGGCAACTGCCATTTTTGTCGCGCGCGGGGCGCGGGGCGCGCCGCGCGCTGCCGCGGCGGGCGG
 R A A A R S A Q L P F F V A A G A R G R R R A A P A R G G

G L L A A T Q F T P P D A S --- P H A T L F R G S M G S L I 433
 GGGCTGCTGGCAGCCAGCAGTTCACGCCACCGGACGCGTCC---CCCCACGGGACGCTCTTTCGCGGCTCAATGGGTTCCTGATT 1559
 GGTGGGCTGCTGGCAGCCAGCAGTTCACGCCACCGGACGCGTCC ← FS-2 C
 G W A A G S H A V H A T G R V

Y W H E L R V M L T A V P A L C A R Y A G A G L Q S A E L 462
 TACTGGCAGGAGCTGCGCGTATGCTGACTGCGGTGCCGCGCTGTCGCGCGCTACGCGGGCGCGGGTGCAGTCGGCCGAGCTG 1646

Y L L A L R H S E A P G Y T A N E R Y A L S A Y L T L F V 491
 TACTGCTGGCGCTACGGCACTCAGAGCGCCCGGCTACACGGCAAATGAGCGCTACGCGCTCTCGCGGTACCTGACGCTGTTTGTGTA 1733

A L A E R G L R W L Y L A G A H L L G P H P T A A A F R E 520
 GCGCTCGCGGAGCGGGGCTGCGCTGGCTGTATCTAGCGGGCGCGCACCTGCTCGGGCCGCAACCCACAGCGGCGGCTTCCGCGAA 1820
 C G
 A V

V R A K I P Y E R L P L G S A T L H D A E V E T V D S A T 549
 GTGCGCGCAAGATCCCGTACGAGCGGCTGCCGCTAGGCAGCGGACGCTGCACGACGCGCAAGTGGAGACGGTGGACTCGGCCACC 1907

F Q E A L A F S A L A H V Y G E A Y V A V R T A T T L L M 578
 TTCCAAGAGGCCCTGGCTTTTAGCGCGCTGGCACATGTTTACGGGGAGGCCCTACCTAGCGGTGCGAACCAGCGACGCGCTGCTGATG 1994
 G G

A E Y A V H A E R R D V R Q M T A A F L G V G L I A Q R L 607
 GCCGAGTACGCGGTCCACGCTGAGCGCGGGACGTGGCGCAGATGACAGCGGCCCTTCCCTGGGCGTGGGGCTGATCGCGCAGCGGCTG 2081
 C CG
 A E

M G S L N L L L N C V A G A A V Y G G R R V --- T V R E G T 635
 ATGGGACGCGTGAACCTGCTGCTGAACTGCGTAGCCGCGCAGCGGTGTACGGGGGCGCGCGTGTG---ACGGTGGCGGAGGGCAGC 2165
 FS-3 → CGAACCTGCTGCTGAACTGCGTAGCCGCGCAGCGGTGTACGGGGGCGCGCGTGTCCG ← FS-3
 E P A A E L R S R R S G V R G P A C P

L A R Y S L L A D A A L P L V R P V F L V E F R E A R D G 664
 CTCGCGCGGTACAGCCTGCTAGCGGACGCGGCACTGCCGCTGGTGGCGCCGCGTTCCTGCTGGAGTTCCGGGAGGCCCGCGACGGC 2252
 C T
 S W

V M R E L R L R P V A S P P L A G K R R V M E L Y L S L D 693
 GTCATGCGCGAGCTGCGGCTGCGGCCCGTGGCGAGCCCGCCCTGGCCGCAAGCGCGGGTCAATGGAGCTGTACCTCTCGCTGGAC 2339

S I E A L V G R E P L G S R P V L G P L V D I A E A L A D 722
 AGCATAGAGGCGCTGGTGGCCCGGAGCCGCTAGGTTCCGCGCCGCTGCTGGGCGCGCTCGTGGACATCGCGGAGGCGCTGGCGGAC 2426

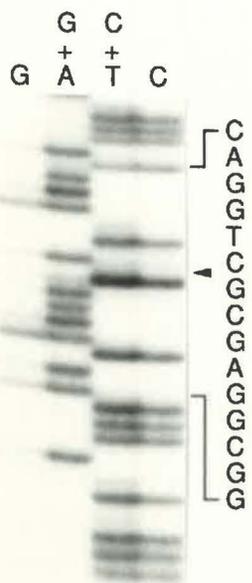
H P H L V T G D G R G P R L G G R *** 739
 CACCCGACCTCGTACGGGCGATGGGCGGGGCGCGCCCTGGGCGCGCGCTAG-GCCGACGGCC-GCGCTTAC-GCGGCG-CTGGG 2510
 C - - C C G

TCCGCCACATCAGCCACCACGCCGCGCGCCCGCCCGCCCTCGTATGCCTATATAGCCATCACGCTTGAATGCCAAGCGCCACTT 2597
 A GCGGGCGGGGCGGAGCATACGGATATACGGCACTGCGGAACCTACGGTTCGGGTTGAA

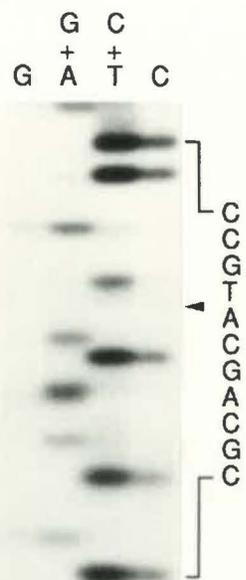
TCCGCGCGCGG
AGGGCGGCGCC 2607

Figure 8: Gels de séquence du gène de la VP8 de l'isolat #34 du BHV-1 représentant le début et la fin des changements de cadre de lecture observés chez la séquence de l'isolat P8-2. Les régions montrées correspondent aux positions de la Figure 7. **(A)** 349 à 363, **(B)** 1346 à 1356, **(C)** 1511 à 1525, **(D)** 2084 à 2098 et **(E)** 2153 à 2139. Les flèches indiquent les régions où des différences ont été observées entre les deux séquences. Dans la séquence de l'isolat P8-2, les nucléotides supplémentaires étaient les suivants: un C et un T aux positions 357 et 358, un A au nucléotide 1353, un C au résidu 2093 et enfin, deux C aux positions 2148 et 2149. Finalement, un C était absent à la position 1517.

(a)



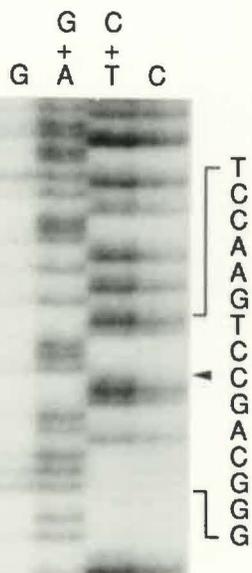
(b)



(c)



(d)



(e)



Par ailleurs, la comparaison des deux séquences a permis d'identifier d'autres différences dans la région codante de la VP8. Ainsi, 29 modifications de nucléotides impliquant trois transversions G→C et 12 transitions dont huit C→T et quatre G→A ont été observées. Des inversions dinucléotidiques ont aussi été notées: cinq GC→CG et une GT→TG. Au total, ces modifications nucléotidiques ont engendré 17 substitutions d'acides aminés.

Dans la région 3' non-codante, quatre insertions et deux délétions de nucléotides, ainsi qu'une transversion T→A ont été observées. De plus, il a été surprenant de constater que dans la région comprise entre les positions 2538 et 2607, la séquence rapportée était parfaitement complémentaire à la nôtre (à l'exception d'un A→C). Comme le montre la Figure 5, la séquence de cette région a été confirmée par quatre stratégies de séquençage distinctes, tandis qu'un seul brin d'ADN a été séquencé par Carpenter et Misra (1991). Ceci suggère que dans cette région, leur séquence pourrait être incorrecte.

En considérant toutes les modifications observées dans la région codante du gène, 14,1% des séquences en acides aminés sont divergentes. Ces différences pourraient être dues à des erreurs d'analyses de séquences ou à des variations entre les isolats 34 et P8-2 du BHV-1.

2.3 Homologies de séquences avec les alphaherpèsvirus

La comparaison de la séquence déduite en acides aminés de la VP8 avec la séquence du HSV-1 (McGeoch *et al.* 1988) avait révélé que la protéine était homologue aux protéines majeures du tégument VP13/14 (Carpenter et Misra 1991), qui sont codées par le gène UL47 (Whittaker *et al.* 1991). Par ailleurs, la

séquence prédite en acides aminés du gène UL47 partage aussi des homologues de séquences avec la gp10 du virus de l'herpès équin de type 4 (EHV-4), le produit du gène ORF B6 (Whittaker *et al.* 1991). Conséquemment, la séquence protéique de la VP8 a été comparée à celles de ces deux protéines à l'aide du logiciel GeneWorks. La Figure 9 présente le résultat de la comparaison de la VP8 avec le produit de l'ORF B6 du EHV-4. Il est à noter que le logiciel crée des espaces afin de maximiser les homologues de séquences. L'alignement des séquences a permis de déterminer que les deux protéines étaient identiques à 29% et en tenant compte des substitutions conservatives (représentées par des astérisques), elles sont homologues à 49%. Des homologues plus grandes (66%) ont été notées dans les portions C-terminales, dans la région comprise entre les acides aminés 417 à 716 de la VP8. Par contre, le pourcentage d'homologie entre les deux protéines est de 39% dans la région comprenant les 225 premiers résidus. Cette faible homologie se reflète aussi par l'abondance d'espaces que le logiciel a dû insérer dans la séquence de la VP8 afin de maximiser l'alignement.

Par ailleurs, une analyse similaire a révélé que la VP8 était identique à 16% avec le produit du gène UL47 du HSV-1 et ce dernier, identique à 12% avec la protéine codée par l'ORF B6 du EHV-4. De plus, le pourcentage d'identité était seulement de 9% lorsque les trois protéines ont été alignées (résultats non-présentés).

Le logiciel MacVector a été utilisé afin de pouvoir identifier les régions où la VP8 et les produits des gènes UL47 et ORF B6 partageaient le plus d'homologies de séquences. Les trois séquences ont été successivement comparées l'une à l'autre en fixant des paramètres de 20% d'homologie pour

Figure 9: Alignement de la séquence déduite en acides aminés de la VP8 avec celle de la gp10, le produit du gène ORF B6 du EHV-4. La séquence de l'ORF B6 provient de Whittaker *et al.* (1991). L'alignement a été effectué avec le logiciel GeneWorks en utilisant les paramètres par défaut du logiciel qui sont décrits dans le chapitre des Matériel et Méthodes. La numérotation en acides aminés des protéines respectives est indiquée à droite. Les astérisques identifient les substitutions conservatives d'acides aminés. Les tirets représentent les espaces créés par le logiciel afin de maximiser l'alignement des deux séquences.

VP8	MD---AARDGRPERRRRAVSGTYRTHPF-----QR--PSAR---RS--AGR-----	35
ORF B6	MDQHGGVIRGAP IRRPRRSIETRSHPFRAAGNTQRTYSTPRLSYRDGLSGRASSLEPGGQAHQNESSTQSTSN	75
Consensus	MD *R G P RR S *R*HPF QR **R R GR	
VP8	-PARC--G--RR-----GRGAPRVRPRPYFQRPPDEDT-----EDENVYDYIDG-DSSDSADDY	85
ORF B6	QPSTSEFWGLRRVFSDDAPAQPQAPRSRADFAPPEEDSSSEEEDEEGPSQAPLDEEDQLMYADQYVGNSSDDN	150
Consensus	P * G RR P * R R* F PP*ED*S **E Y*D * S DD*	
VP8	DSDYFTANRG-P-NHGAGDAMDTDAPPERAPEGGAP---QDYTLAHLRAIEVLPESAPH--RSLLEARTARTVYAQ	153
ORF B6	EEDYLQPEVEYPTSAESGEYHNSGMFAEEPESESESDMENYETYEENDTEVISDDSHRLTRTWLDRSIRLMDDA	225
Consensus	* DY*** P * G* * ***E PE* Y T EV* * R**L*R**R *	
VP8	QFPDRLSAGSKAPAQRA-RRSLRGRFPRGGGGQEPGPDDEGDDAADL--REDLVPDEAYAHLEDERLSEGPPL	225
ORF B6	LAQSSEISKAITKSTRRLYDSQFTPGGRGYKQTEPESQRLVHLSRAGMYDSDEIVMTGDYMEVDDDPNSAYQSWV	300
Consensus	* **S R* ** RG* ** P* A * **V* Y* ** D * **	
VP8	LNMEAAAAAAGERSVVEELFTYAPAQPQVEVPLPRILEGRV-RPSAFFAQM--SLDALCRTP-----PNDQRV	290
ORF B6	RAIHHPVAMNPSWEETISNHTNTSFSADIDYDIDELIEMNLARTPPVFEGLLDSADFFYRLPMLYTYATITQDEA	375
Consensus	* **A* T* *** ** * **E * R **F ** S*D***R P ** *	
VP8	ARERRAWEMAGTPHGLLITTWSTVDPEFSIGGMVGAPEGTRPRLVWRRAMQAMALQYRLGVGGLCRAVDG-AA	364
ORF B6	YEERQAWSNTQALHGHEQSSWPALVSDYSKGGMYVSPTQE--PRGIWRRALKQAMALQLKLCVLGLTEFVTKREL	448
Consensus	ER AW * *HG **W * * S GMYV** PR *WRR*QAMALQ L*V GL* *V *	
VP8	CRPLRRCSFWRDALLR---ECATA----IFCRGR----GAR--AAP-----RRLPRPAVGLLAATQFTPP	416
ORF B6	TQHSAVTFVLVDSLRTAKNCYLASRLLVFAWERRETGVRRPAEPLIALSGVTLLQPLPPEVSELEQRTFDIG	523
Consensus	* *F* D LLR C A *F R G*R A P LP * LL *F *	
VP8	DASPHATLFRGSMGLIYWHELVRMLTAVPALCARYAGAGLQSAEYLLALRHSEAPGYTANERYALSAYLTLFV	491
ORF B6	LRTPQSGVFRAFFGPLVYWAEELRRALRPAAINCRYVGHQLTSEIYLLARAHASAPGYTKEELVAMEATLTLGT	598
Consensus	*P **FR *G L*YW ELR *L **A** RY*G* LQ* E*YLLA HS PGYT E A* A*LTL	
VP8	ALAERGLRWLYLAGAHLGPHPTAAAFREVRAKIPYERLPLGSATLHDAEVEVTVDSATFQEAALAFSALAHVYGEA	566
ORF B6	LMLEVALQWIHVASAQLLSENDALKAFRRVSASIPHALAPLGSIRLHDAEFEVLSNPDMVARDETALSQALFLG	673
Consensus	***E L W* *A*A LL* * AFR V A IP *PLGS* LHDAE*E * * * A *AL *	
VP8	YVAVRTATTLMAEYAVHAERRDVRQMTAAFLGVGLIAQRLMGSINLLNLCVAGAAVYGGRRVTVREGTLARYSL	641
ORF B6	YFSVRTALTACMRDYANEVDGGSKETVTGLFLGVGLIIQRLAGHMNLLNCMAGAALYGGSKIAIHSLTLPRYSL	748
Consensus	Y* VRTA T* M *YA ** **T *FLGVGLI*QRL*G *N*LLNC*AGAA*YGG * * TL*RYSL	
VP8	LADAALPLVRPVFLVEFREARDGVMRELRLRPVAPPLAGKRRVMELYLSLDSIEALVGREPLGSRPVLGPLVDI	716
ORF B6	LADVMAPMLQQQSLVDFWRARDMLELEITPRPGPPTQGRVLEMLPSSDDLPAIMPSPGQVNNAGLGRMVDM	823
Consensus	LAD***P** LV*F ARD ** EL * P **PP GKR V*E* L D * A* *** * LG *VD*	
VP8	AEALADHPLVLTGDG-----RG---PRLGGR-----	739
ORF B6	AKHLQHYRETIIGDDASSVGRGLMKSGVGRHALEAEKVIRYSPKST	872
Consensus	A L * GD RG *G R	

des fenêtres de 50 acides aminés. Les deux régions homologues ainsi identifiées sont présentées à la Figure 10. La première région (Figure 10A), localisée approximativement dans le centre de la VP8, comprend les acides aminés 400 à 476, tandis que la deuxième englobe les résidus 505 à 644 (Figure 10B). Dans la première région, 17 acides aminés sur 77 (22%) sont conservés chez les trois protéines virales. De plus, 16 résidus supplémentaires (43%) sont communs entre les protéines homologues du BHV-1 et du EHV-4, tandis que 10 additionnels (35%) sont conservés entre le BHV-1 et le HSV-1. Mentionnons aussi que le pourcentage d'identité entre les produits des gènes UL47 et ORF B6 n'est que de 25% (19 acides aminés). Dans la seconde région, 27 résidus sur 144 sont conservés entre les trois protéines virales (19%). Au total, 65 acides aminés sont partagés entre la VP8 et la gp10 (45%), tandis que 41 (28%) sont communs entre la VP8 et les VP13/14. De plus, les protéines homologues du HSV-1 et du EHV-4 sont identiques à 24%. Par ailleurs, l'analyse de ces deux régions a aussi révélé qu'elles ne semblaient pas contenir de portions où le pourcentage d'identité entre les trois protéines était plus élevé puisque la plus longue série d'acides aminés conservés consécutifs est de trois dans la première région et de quatre dans la deuxième. Cependant, si on exclut la séquence du HSV-1 dans la seconde région, deux domaines comprenant sept acides aminés consécutifs (aa 597 à 603 et 638 à 644 de la VP8) étaient conservés chez les protéines du BHV-1 et du EHV-4.

Les résultats de ces analyses indiquent que la VP8 est plus homologue à la protéine codée par le gène ORF B6 du EHV-4 qu'au produit du gène UL47 du HSV-1, mais que ces trois protéines sont peu conservées chez les alphaherpèsvirus.

Figure 10: Régions d'homologies de la VP8 avec les protéines homologues du HSV-1 et du EHV-4. Les séquences du HSV-1 (gène UL47, VP13/14) et du EHV-4 (ORF B6, gp10) proviennent respectivement de McGeoch *et al.* (1988) et de Whittaker *et al.* (1991). L'analyse a été effectuée avec le logiciel MacVector en utilisant des fenêtres de 50 acides aminés et un pourcentage d'homologie de 20%. **(A)** et **(B)** représentent les régions où les trois polypeptides contenaient des homologies égales ou supérieures à 20%. Les positions des acides aminés des protéines correspondantes sont indiquées à droite. Les acides aminés communs sont entourés par des boîtes. Les tirets représentent des espaces créés afin de maximiser l'alignement.

A)

BHV L P R P A V G L L A A T Q F T P P D A S P H A T L F 425
 EHV L P P E V S E L L E Q R T F D I G L R T P Q S G V F 532
 HSV V G A A A V P L L S A G G L V S P Q S G P D A A V F 359

BHV R G S M G S L I Y W H E L R V M L T A V P A L C A R 451
 EHV R A F F G P L V Y W A E L R R A L R D P A A I N C R 558
 HSV R S S L G S L L Y W P G V R A L L D R D C R V A A R 385

BHV Y A G A G L Q S A E L Y L L A L R H S E A P G Y T 476
 EHV Y V G F H L Q T S E I Y L L A R A H S A S P G Y T 583
 HSV Y A G R M T Y L A T G A L L A R F N P D A V R C V 410

B)

BHV G A H L L G P H P T A A A F R E V R A K I P Y E R L 530
 EHV S A Q L L S E N D A L K A F R R V S A S I P H A L A 637
 HSV R G G A P A P A R A P P A F A D V A R E E L F R A L 465

BHV P L G S A T L H D A E V E T V D S A T F Q E A L A F 556
 EHV P L G S I R L H D A E F E V L S N P D V M V A R D E 663
 HSV P L G S P A V V G A E H E A L G D T A A R R L L A N 491

BHV S A L A H V Y G E A Y V A V R T A T T L L - - - - M 578
 EHV T A L S Q A L F L G Y F S V R T A L T A C - - - - M 685
 HSV S G L N A V L G A A V Y A L H T A L A T V T L K Y A 517

BHV A E Y A V H A E R R D V R Q M T A A F L G V G L I A 604
 EHV R D Y A N E V D G G S K E T V T G L F L G V G L I I 711
 HSV R A C G D A H R R R D D A A A T R R I L A A G L V L 543

BHV Q R L M G S L N L L L N C V A G A A V Y G G R R V T 630
 EHV Q R L A G H M N F L L N C M A G A A L Y G G S K I A 637
 HSV Q R L L G F A D T V V A C V T L A A F D G D S R P P 669

BHV V R E G T L A R Y S L L A D 644
 EHV I H S L T L P R Y S L L A D 751
 HSV R W A R T P P C Y A C V L R 583

La comparaison des deux séquences de VP8 avec les protéines homologues du HSV-1 et du EHV-4 a aussi été effectuée dans les trois régions de changements de cadre de lecture (Figure 11). Le logiciel MacVector a été utilisé pour cette analyse étant donné les faibles pourcentages d'homologie qui sont retrouvés entre les trois protéines. La séquence dérivée de l'isolat #34 est plus similaire à celles des produits du gène UL47 du HSV-1 et de l'ORF B6 du EHV-4 que la séquence dérivée de l'isolat P8-2. Cette observation est particulièrement significative dans le FS-3 où 14 résidus sur 18 sont conservés entre l'isolat #34 et l'un ou l'autre des alphaherpèsvirus, comparativement à un seul pour l'isolat P8-2. On note aussi que dans cette région, quatre acides aminés (une cystéine, deux alanines et une glycine) sont identiques chez le HSV-1, l'EHV-4 et l'isolat #34. Par ailleurs, les séquences sont beaucoup moins conservées dans le FS-1 où sur 14 acides aminés, quatre sont identiques entre l'isolat #34 et l'un ou l'autre des alphaherpèsvirus, comparativement à deux pour l'isolat P8-2. En ce qui concerne le FS-2, 16 résidus sur 55 sont conservés entre l'isolat #34 et le HSV-1 et/ou l'EHV-4, comparativement à 8 pour l'isolat P8-2. De plus, trois acides aminés (une alanine et deux leucines) sont communs entre l'isolat #34 et les deux autres alphaherpèsvirus, tandis qu'aucun acide aminé ne l'est pour l'isolat P8-2.

Le profil d'hydrophobicité de la VP8 a ensuite été comparé avec ceux des protéines homologues du HSV-1 et du EHV-4 (Figure 12) et cette analyse a révélé une caractéristique commune. En effet, les portions N-terminales des trois protéines, dans la région comprenant les 200 premiers acides aminés, étaient fortement hydrophiles. De plus, les 100 premiers acides aminés des protéines du BHV-1 et du HSV-1 contenaient respectivement 20% et 23% de résidus arginine,

Figure 11: Comparaison des séquences en acides aminés de la VP8 des isolats #34 et P8-2 avec les protéines homologues du HSV-1 et du EHV-4 dans les régions de changements de cadre de lecture. Les séquences du HSV-1 (gène UL47, VP13/14) et du EHV-4 (ORF B6, gp10) proviennent respectivement de McGeoch *et al.* (1988) et de Whittaker *et al.* (1991). Les positions en acides aminés des protéines respectives sont indiquées à gauche et à droite. Les alignements ont été effectués avec le logiciel MacVector. Les résidus communs de l'une ou l'autre des séquences de VP8 et du HSV-1 et/ou du EHV-4, sont encadrés.

FS-1

BHV #34 33 A G R P A R C G R R G R G A 46
 HSV 2 S A R E P A G R R R R A S T 15
 EHV 2 D Q H H G V R G G A P I R R 15
 BHV P8-2 33 L L D A L R A A D A E A A E 46

FS-2

BHV #34 365 C R P L R R C S F W R D A L L R E C A T A I F C R G R G 392
 HSV 299 W V C G T R L H A E A R G S D L D D R A A E L R R Q F A 326
 EHV 472 A S R L L V F A W E R R R E T G V R R P A E P L I A L S 499
 BHV P8-2 366 M P P T E A L L F L A A R A A A R S A Q L P F E V A A G 393

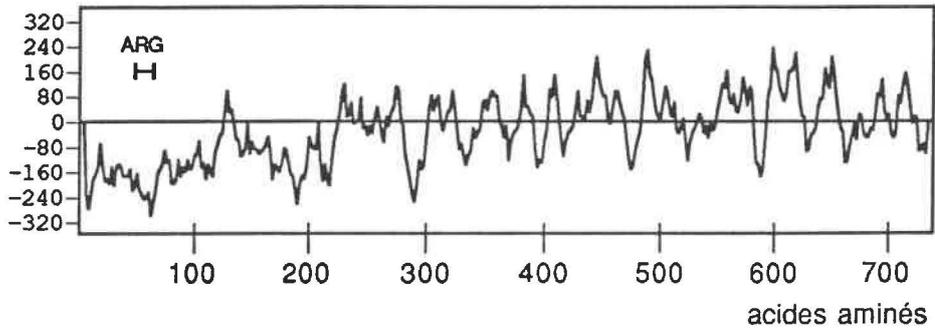
BHV #34 393 A R A A P R R L P R P A V G L L A A T Q F T P P D A S 419
 HSV 327 S L T A L R P V G A A A V P L L S A G G L V S P Q S G 353
 EHV 500 G V T L L Q P L P P E V S E L L E Q R T F D I G L R T 526
 BHV P8-2 394 A R G R R R A A P A R G G G W A A G S H A V H A T G R 420

FS-3

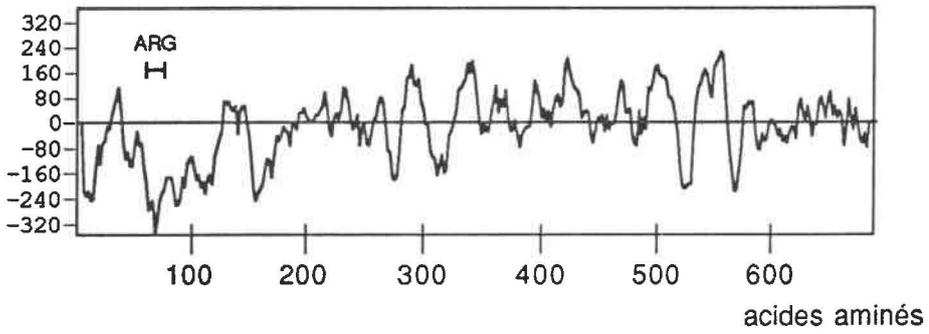
BHV #34 612 N L L L N C V A G A A V Y G G R R V 629
 HSV 551 D T V V A C V T L A A F D G D S R P 568
 EHV 719 N F L L N C M A G A A L Y G G S K I 736
 BHV P8-2 614 E P A A E L R S R R S G V R G P A C 631

Figure 12: Comparaison du profil d'hydropathicité de la VP8 avec ceux des protéines homologues de deux autres alphaherpèsvirus. Les séquences du HSV-1 (gène UL47, VP13/14) et du EHV-4 (ORF B6, gp10) proviennent respectivement de McGeoch *et al.* (1988) et de Whittaker *et al.* (1991). Les profils ont été obtenus à l'aide de l'algorithme de Kyte et Doolittle (1982) contenu dans le logiciel GeneWorks en utilisant des fenêtres de 11 acides aminés. Les indices positifs indiquent les régions hydrophobes et les indices négatifs, les régions hydrophiles. ARG et GLU identifient respectivement les domaines riches en arginines ou en acides glutamiques.

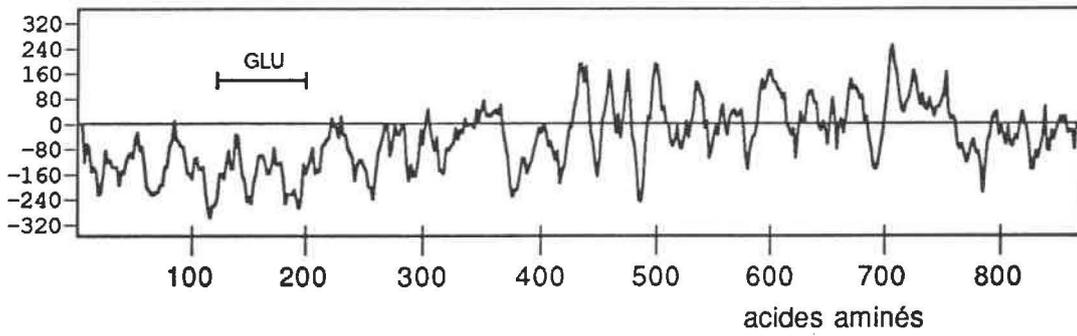
BHV-1



HSV-1



EHV-4



ce qui leur donne une extrémité N-terminale fortement basique. Une grande proportion des résidus arginine est concentrée dans les régions englobant les acides aminés 41 à 53 (54%) de la VP8 et 63 à 75 (69%) de la séquence déduite du gène UL47, constituant ainsi des domaines riches en arginines. Par contre, cette caractéristique est absente de la portion N-terminale de la gp10 du EHV-4, qui possède plutôt une région riche en acides glutamiques, la rendant acide (Whittaker *et al.* 1991). Enfin, mentionnons que selon les profils d'hydropathicité, aucune région hydrophobe pouvant refléter la présence d'un peptide signal n'a été mis en évidence dans la portion N-terminale de ces trois protéines.

2.4 Analyse du transcrit

La cinétique d'expression de l'ARNm de la VP8 dans des cellules infectées avec le BHV-1 a été analysée par hybridation de type Northern (Figure 13) en utilisant comme sonde un fragment *Eco* RI-*Sma* I de 387 pb (nucléotides 822 à 1209 selon Figure 6). La sonde a révélé un transcrit abondant d'environ 4,4 kb qui était présent à un taux maximal entre 18 et 24 h p.i.. Cependant, l'ARNm était détectable à 6 h p.i. lorsque la membrane était surexposée. De plus, la sonde n'a révélé aucun transcrit dans le puits contenant les ARNs isolés de cellules non-infectées (Figure 13; puits M), ce qui confirme la spécificité du signal obtenu. Le résultat de l'hybridation suggère que l'ARNm de la VP8 est exprimé durant la phase tardive de l'infection.

La localisation précise du site d'initiation de la transcription de l'ARNm de la VP8 a été déterminée par une réaction d'extension d'amorce (Figure 14). Un oligonucléotide complémentaire aux nucléotides 258 à 282 (Figure 6) chevauchant le site d'initiation de la traduction de la VP8, a été synthétisé pour

Figure 13: Cinétique d'expression de l'ARNm de la VP8 dans des cellules infectées avec le BHV-1. Les ARNs polyA+, isolés de cellules non-infectées (puits M) ou de cellules infectées avec le BHV-1 durant 6, 12, 18 et 24 h, ont été hybridés avec une sonde de 387 pb correspondant à une région interne de la séquence codante de la VP8. Les marqueurs de taille sont indiqués à gauche.

kb M 6 12 18 24

9,5 —

7,5 —

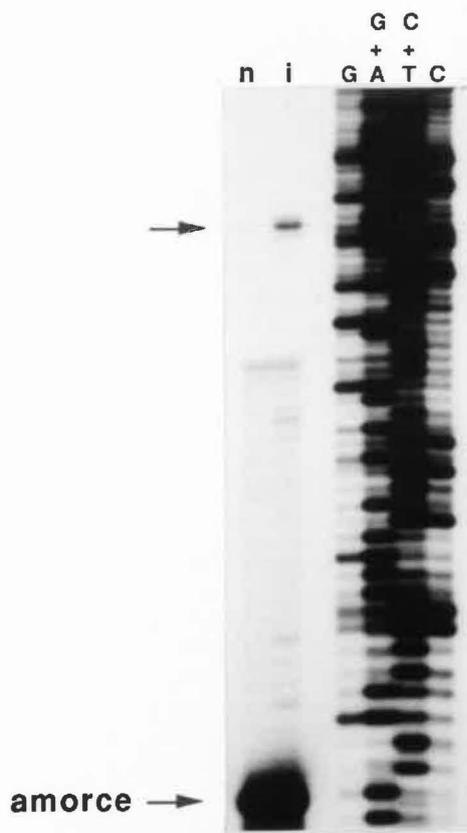
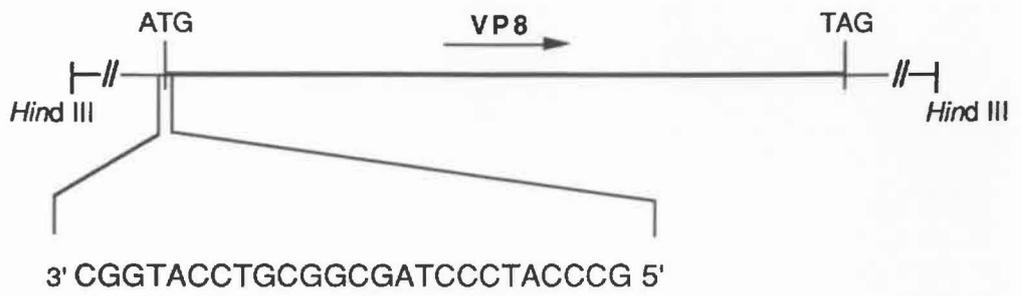
4,4 —

2,4 —

1,4 —



Figure 14: Localisation de l'extrémité 5' de l'ARNm de la VP8. La réaction d'extension d'amorce a été effectuée avec un oligonucléotide marqué, complémentaire aux positions 258 à 282 de la Figure 6. L'amorce a été hybridée avec des ARNs totaux isolés de cellules non-infectées (puits n) ou de cellules infectées durant 12 h (puits i). Après la transcription inverse, les fragments d'ADN synthétisés ont été analysés sur un gel de séquence 8%, en parallèle avec un fragment d'ADN séquencé par la méthode chimique comme marqueur de tailles (puits G à C). Les bandes correspondant à l'amorce et au fragment d'ADN synthétisé sont identifiées par les flèches.



l'expérience. La transcription inverse des ARN isolés de cellules infectées avec le BHV-1 a permis la synthèse d'un fragment d'ADN long de 61 bases (Figure 14; puits i). Par contre, aucun fragment d'ADN n'a été synthétisé à partir des ARNs isolés de cellules non-infectées (Figure 14; puits n). Le résultat de la réaction d'extension d'amorce indique que l'extrémité 5' du transcrit de la VP8 débute 39 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction ou 25 nucléotides en aval de la boîte TATA potentielle. Enfin, mentionnons que les résultats obtenus sur la détermination de la taille de l'ARNm (4,4 kb) ainsi que sur la localisation de son extrémité 5' confirment l'absence d'un signal de polyadénylation en aval du codon d'arrêt de la traduction.

3. SÉQUENCE DE L'ORF PARTIEL EN AVAL DU GÈNE DE LA VP8

La séquence nucléotidique et la séquence déduite en acides aminés de l'ORF en aval du gène de la VP8 sont présentées à la Figure 15. La séquence illustrée débute immédiatement après le codon d'arrêt de la VP8 et la numérotation des nucléotides concorde avec celle de la Figure 6. Cette séquence comprend 916 nucléotides; les premiers 831 sont localisés dans le fragment *Hind* III M, tandis que les 85 autres appartiennent au fragment *Hind* III I du génome viral. La jonction des fragments M et I a été déterminée par le séquençage d'un sous-clone *Pvu* II/*Sma* I de 368 pb (Figure 15).

Le cadre de lecture a été identifié par homologies de séquences avec le produit du gène UL46 du HSV-1 (McKnight *et al.* 1987) et conséquemment, cet ORF a été nommé BUL46. La séquence codante débute par un codon ATG situé dans un contexte favorable pour l'initiation de la traduction (Kozak 1986; 1987). Cet ATG est situé 130 nucléotides en aval du codon d'arrêt de la traduction de la

Figure 15: Séquence partielle du gène BUL46 du BHV-1 ainsi que de sa région proximale 5'. Le premier nucléotide de la séquence correspond à celui placé immédiatement après le codon d'arrêt de la traduction de la VP8; la numérotation, indiquée à droite, suit celle de la Figure 6. La séquence déduite en acides aminés est représentée par des symboles à une lettre placés en-dessous du deuxième nucléotide des codons respectifs; la numérotation est indiquée à droite. La boîte TATA potentielle est soulignée, ainsi que les sites de restriction mentionnés dans le texte.

GGCGACGGCCG 2491
CGCTTACGCGGCGCTGGGTCCGCCACATCAGCCACCACGCCCGCGCGCCCGCCCGCC 2551
TCGTATGCCTATATAGCCATCACGCTTGAATGCCAAGCGCCACTTTCGCCCGCGCGCGAA 2611
ATGGCGTGGCCGGCCGCCTCTCGGGGCTCATCGAGCGGGCGGGCAGAGAAGGGGTGCCTG 2671
M A W P A A S R G L I E R R A E K G C L 20
CTGCCGACGCTCGCAGATGCCACGGCCGCGGCCGTGGTGGCCTTGCAGGAGGCGACCGAG 2731
L P T L A D A T A A A V V A L Q E A T E 40
CCTCTGTGCGGGGCTCCGCTGTTTGGCGCCGAGCGCGCGGCCGCGCTGCTCGGCGTGCGC 2791
P L C G A P L F G A E R A A A L L G V R 60
TCCAACGCCGTCCCGGAGGCGCTGGTTCTGTGCGACTCGGCGAAAGACGCCGACGACGAG 2851
S N A V P E A L V L S D S A K D A D D E 80
TACCGGCTGGAGTATGACCGCGCCGACGCGGGTGTGGCGGGCGCGGGCTCTCTAAG 2911
Y R L E Y D R A A A R V L A G A R L S K 100
GACGCCGTCTGGCGCGGGTCATCGGCTCGTACTGGAAGTACCTGAAGGCCTCGAGCGGC 2971
D A V W R A V I G S Y W K Y L K A S S G 120

Pvu II
GCTGACGTGAACATCGACGGCGCGGCCGGCGGGCGGCGATGGAGCAGGCGCAGCTGACG 3031
A D V N I D G A A G G A A M E Q A Q L T 140
AACGTGATGCTCTTTGCGCCACATACGCGCGCCGGGCTCGCGCTCGCCGTTCAAGCAC 3091
N V M L F A P T Y A R R A S R S P F K H 160
AAGCAGGACAACGCGGCGTACAAAACCGCAGCGGCGGAGCTGCGCGGCGCCCTGCGCGCG 3151
K Q D N A A Y K T A A A E L R G A L R A 180
GTGGAAAAGTATATGTATTACATGCGGCCGGGCGACCCCATGGTCGAAAGCCCCGACACG 3211
V E K Y M Y Y M R P G D P M V E S P D T 200
GAAGCCCGCCTGCAGGAAATTTTGGCGTACCGCGACGGCCTACCGCTGGCTGCTGTGG 3271
E A R L Q E I L A Y A A T A Y R W L L W 220

Hind III
TTCATGGACGCGCTCGATGGCACGGTGTGCGCAAGCTTGGCAAGCGCCCCTCGGCCGCG 3331
F M D A L D G T V L R K L G K R P S A A 240
GTGGGGCCGCCGAGCCGCGGCCCGGGCGAGCTGTGCGAGCGCCATCTGACCGGCGGC 3391
V G P P E P R P P G E L C E R H L T G G 260

Sma I
CCGGG 3396
P 261

VP8. Il est à noter que deux autres ATG ont été localisés en amont du site potentiel d'initiation de la traduction. Cependant, ils ne sont pas dans le même cadre de lecture que le produit du gène UL46 du HSV-1 et de plus, ils ne sont pas situés dans un contexte favorable pour l'initiation de la traduction. Ainsi, il est peu probable que l'un ou l'autre de ces ATG soient utilisés pour initier la traduction de la protéine.

La séquence protéique contient 261 acides aminés et parmi ceux-ci, 233 sont localisés dans le fragment *Hind* III M. L'analyse de la séquence en acides aminés n'a pas révélé de caractéristiques particulières; cette analyse pourra toutefois être complétée lorsque la séquence entière du gène sera connue.

Enfin, l'analyse des régions promotrices potentielles a révélé la présence d'une boîte TATA (TATATAG) possédant six des sept bases de la séquence consensus (McKnight et Kinsbury 1982). Ce motif est situé entre les positions 2561 et 2567 ou 45 à 51 nucléotides en amont du codon présumé de l'initiation de la traduction.

La comparaison des séquences prédites en acides aminés des protéines homologues du BHV-1 et du HSV-1 est présentée à la Figure 16. Au total, 91 acides aminés sont conservés (35% d'identité) et les résidus communs sont retrouvés tout au long des deux séquences. On note aussi que fréquemment, au moins deux acides aminés consécutifs sont conservés. L'analyse partielle de la séquence du gène BUL46 indique que la protéine est plus conservée que la VP8. Mentionnons que le gène UL46 du HSV-1 code les protéines du tégument VP11/12 (Zhang et McKnight 1993) mais que le produit du gène homologue du BHV-1 n'a pas encore été identifié.

Figure 16: Analyse comparative de la séquence déduite en acides aminés du gène BUL46 avec la protéine homologue du HSV-1. La séquence du gène UL46 provient de McKnight *et al.* (1987). La comparaison des séquences a été effectuée avec le logiciel MacVector en utilisant des fenêtres de 50 acides aminés et un pourcentage d'homologie de 20%. Les positions des acides aminés des protéines respectives sont indiquées à droite et les résidus conservés sont encadrés. Les tirets représentent les espaces créés afin de maximiser l'alignement.

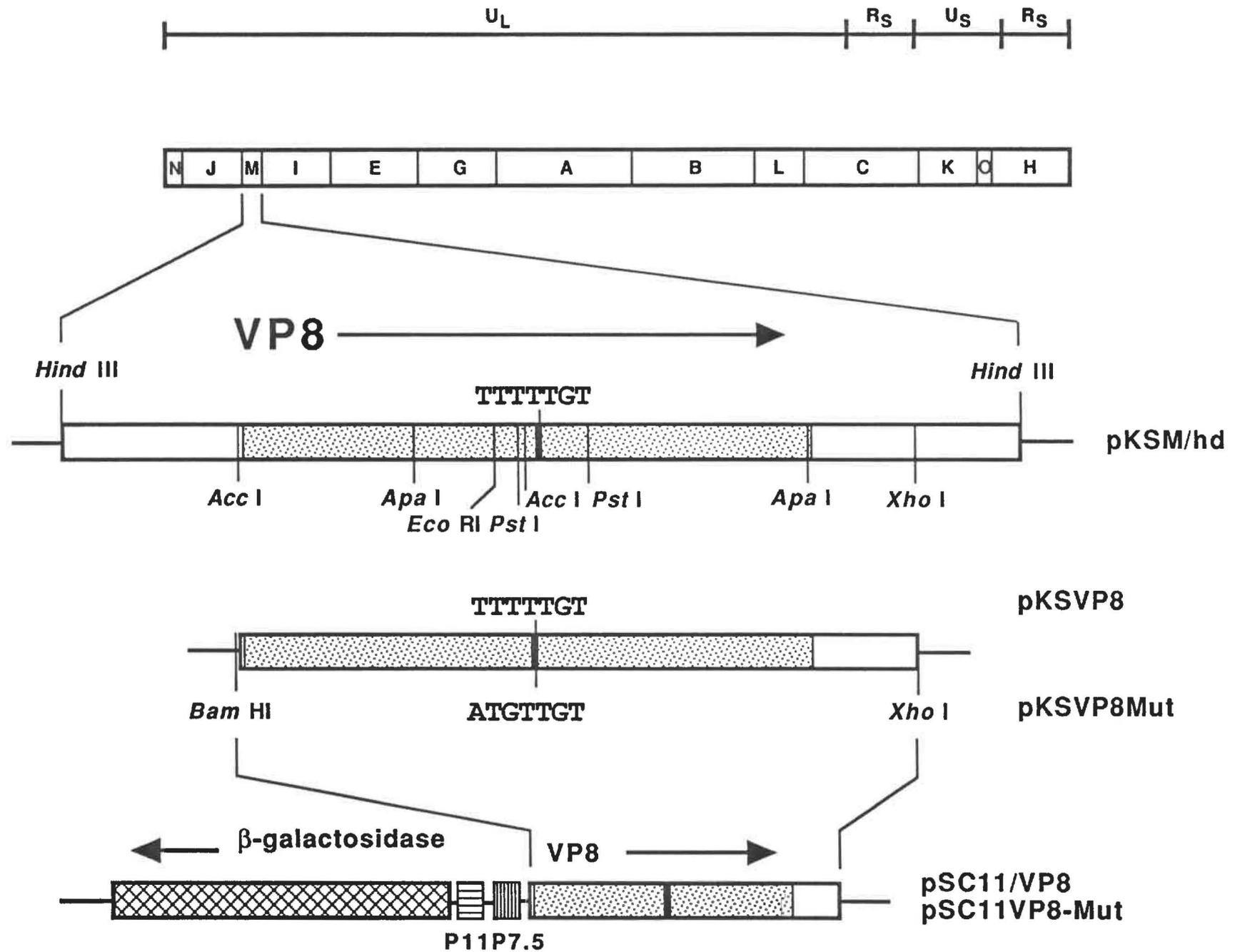
BHV	M A W P A A S R	G L I	E R R A E K	G C L L P T	L A	25						
HSV	N L I R G D N A	G V P	E R R I F G	G C L L P T	P E	45						
BHV	D A T A	A A V V	A L	Q E A T E P L C G	A P L	F G A	50					
HSV	G L L S	A A V G	A L	R Q R S D D A Q P	A F L	T C T	70					
BHV	E	R A A A	L	L G V R S	N A	V P E A	L	V L S D S	A	K	75	
HSV	D	R S V R	L	A A R Q H	N T	V P E S	L	I V D G L	A	S	95	
BHV	D	A D D	E Y	R L E Y	D R	A A	A R V	L	A G A R	L	S K	100
HSV	D	P H Y	E Y	I R H Y	A S	A A	T Q A	L	G E V E L	T	G	120
BHV	D A V W	R A	V I G S	Y W K Y L	K - - A S	S G A D V	123					
HSV	G Q L S	R A	I L T Q	Y W K Y L	Q T V V P	S G L D V	145					
BHV	N I	D	G A A G G A A M E Q A Q L T N V M	L	F A P T	148						
HSV	P E	D	P V - - - - - G D C D P S L H V	L	L R P T	164						
BHV	Y	A	R R A S -	R	S P F K H K Q D N	A A	Y	K T A A	A	172		
HSV	L	A	P K L L A	R	T P F K S G A A A	A	K	Y A A T V	A	189		
BHV	E	L	R G A L	R A V E K	Y M Y Y	M R P	G D P	M V E S	197			
HSV	G	L	R D A L	H R I Q Q	Y M F F	M R P	A D P	S R P S	214			
BHV	P	D	T E A	R L	Q E	I L A Y A A T A	Y R W	L L	W F M	222		
HSV	T	D	T A L	R L	N E	L L A Y V S V L	Y R W	A S	W M L	239		
BHV	D A L	D	G T	V	L R K	L	G K R P S A A V G P P E -	P	246			
HSV	W T T	D	K H	V	C H R	L	S P S N R R F L P L G G S	P	264			
BHV	R P	P	G E	L C E R H L	T G	G P	261					
HSV	E A	P	A E	T F A R H L	D R	G P	279					

En guise de conclusion pour cette première partie du travail, mentionnons que dans le cadre du projet international de séquençage du génome du BHV-1, les résultats que nous avons obtenus sur la caractérisation des gènes de la VP8 et BUL46 font maintenant partie de la banque de séquences, ce qui représente une contribution de plus de 3000 nucléotides.

4. CONSTRUCTION ET CARACTÉRISATION DES RECOMBINANTS DE LA VACCINE

Le deuxième objectif du travail était d'évaluer les propriétés immunogéniques de la VP8. Pour ce faire, la totalité de la séquence codante de la VP8 a d'abord été insérée dans le plasmide pSC11 en suivant les procédures décrites dans le chapitre des Matériel et Méthodes (Figure 17) et par la suite, un recombinant VV a été construit (VV-VP8). De plus, l'analyse de l'ORF de la VP8 avait révélé la présence d'un signal de terminaison de la transcription reconnu par l'ARN polymérase ADN dépendante du VV lors de la phase précoce de l'infection. Étant donné qu'il avait été démontré que la reconnaissance de ce signal pouvait affecter l'expression et l'immunogénicité d'une protéine exogène dans le virus de la vaccine (Earl *et al.* 1990; Zhou *et al.* 1991), un deuxième recombinant (VV-VP8-Mut), dans lequel le motif avait été modifié par mutagenèse dirigée, a aussi été construit. Comme témoin négatif pour les expériences d'immunisations, un recombinant VV a été généré en utilisant le vecteur de transfert pSC11 sans insertion d'ADN exogène (VV-TK⁻).

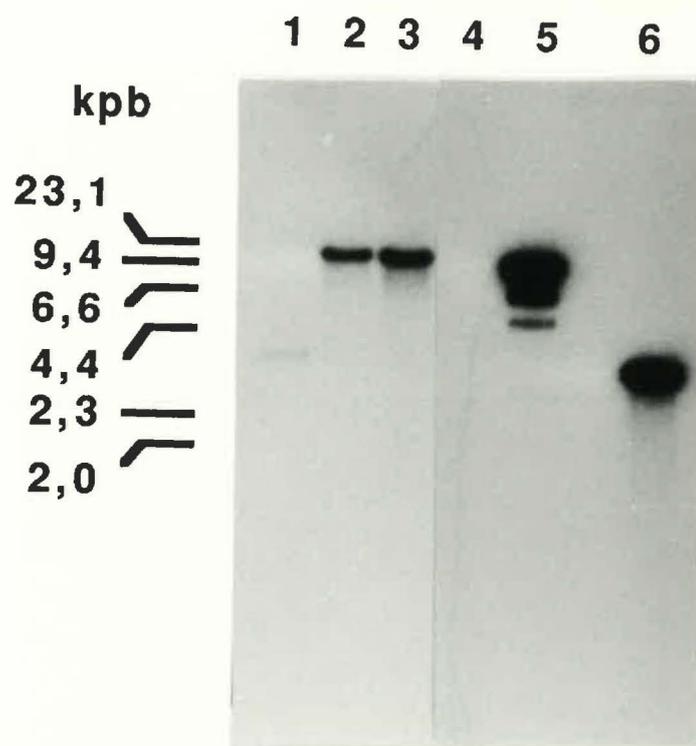
Figure 17: Construction des vecteurs de transfert ayant servi à générer les recombinants VV. Les noms des clones obtenus sont indiqués à droite. La séquence codante de la VP8 est représentée par les boîtes grises. La localisation du signal d'arrêt de la transcription des gènes précoces du VV (TTTTTGT) et de sa forme modifiée (ATGTTGT) est indiquée. Les sites de restriction utiles pour la compréhension des étapes de clonage décrites dans le texte sont identifiés. Les promoteurs P7.5 et P11 du VV ainsi que la séquence codante de la β -galactosidase de *E. coli* sont représentés par des boîtes.



4.1 Présence du gène de la VP8 dans le génome du VV

La présence du gène de la VP8 dans le génome du virus de la vaccine a été confirmée par hybridation de type Southern. L'ADN génomique de recombinants VV potentiels a été purifié puis digéré par *Hind* III. Les fragments ont ensuite été fractionnés en gel d'agarose, transférés sur une membrane de nylon puis hybridés avec une sonde correspondant au fragment *Hind* III M du génome du BHV-1 (Figure 18). La sonde a révélé une bande d'environ 11 kpb dans les puits contenant l'ADN du recombinant VV-VP8 (Figure 18; puits 2) et du recombinant VV-VP8-Mut (Figure 18; puits 3). De plus, une bande d'environ 11 kpb ainsi que deux fragments d'ADN de 6,6 et 5,0 kpb ont été détectés dans le puits contenant pSC11-VP8 linéarisé (Figure 18; puits 5). Ces deux derniers fragments représentent probablement une légère dégradation de l'ADN plasmidique. Enfin, la sonde a révélé un fragment d'ADN de 3,7 kpb dans le puits contenant pKS/Mhd digéré par *Hind* III (Figure 18; puits 6). Par contre, aucun signal n'a été détecté dans les puits contenant respectivement l'ADN du VV sauvage (Figure 18; puits 1) ou de pSC11 linéarisé (Figure 18; puits 4). Le résultat obtenu avec l'hybridation démontre que le gène de la VP8 a été inséré dans le génome du VV. De plus, la taille du fragment d'ADN révélé par la sonde correspond avec ce qui était prévu étant donné qu'environ 6 kpb (séquences codantes de la VP8 et de la β -galactosidase) ont été insérés dans le locus de la TK virale qui est localisé dans le fragment *Hind* III J de 5 kpb du génome du VV (Goebel *et al.* 1990).

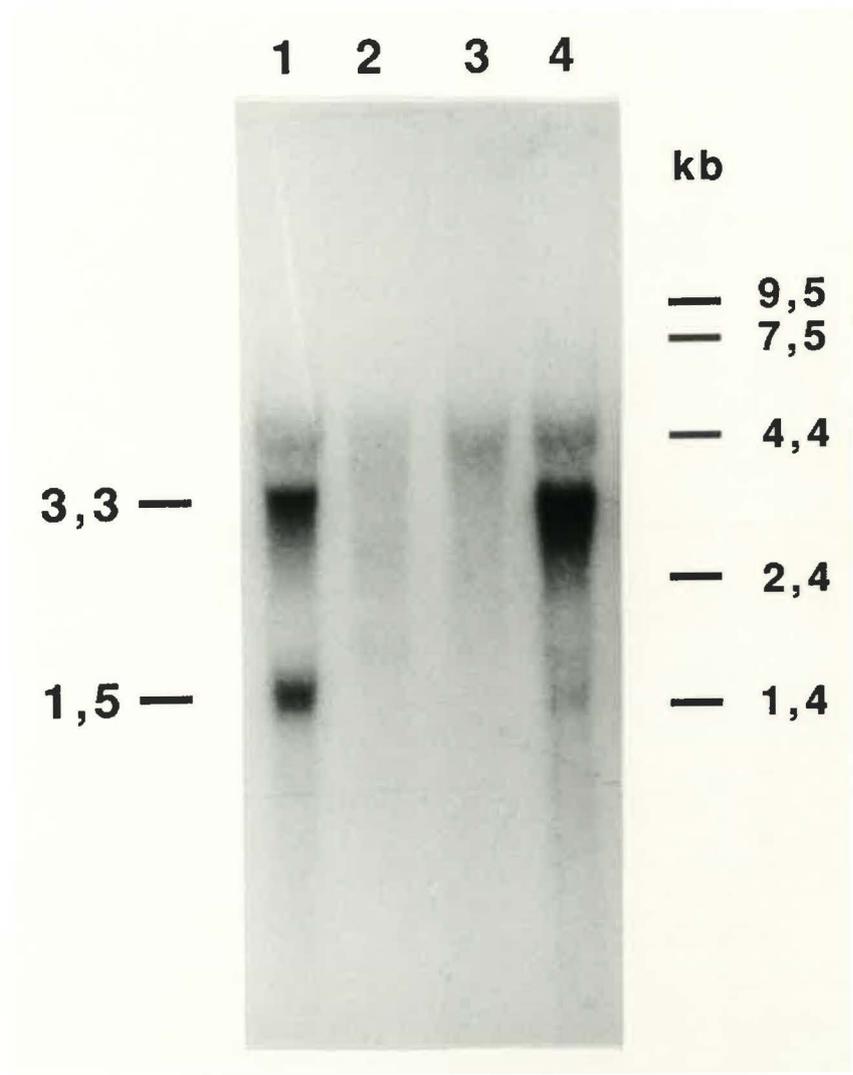
Figure 18: Analyse de type Southern de l'ADN de recombinants VV. Les ADNs de la souche WR du VV (puits 1), du recombinant VV-VP8 (puits 2) et du recombinant VV-VP8-Mut (puits 3) ont été purifiés, digérés par *Hind* III et les fragments ont été fractionnés en gel d'agarose 0,8%, en parallèle avec pSC11 (puits 4) et pSC11-VP8 (puits 5) linéarisés ainsi qu'avec pKS/Mhd digéré par *Hind* III (puits 6). Les fragments d'ADN ont ensuite été transférés sur une membrane de nylon puis hybridés avec une sonde correspondant au fragment *Hind* III M du BHV-1. La position des marqueurs de taille (kpb) est indiquée à gauche.



4.2 Analyse des transcrits précoces

Afin de déterminer si le signal de terminaison de la transcription des gènes précoces était reconnu *in vitro* par l'ARN polymérase ADN dépendante du VV, une hybridation des ARNm précoces, isolés de cellules infectées avec les recombinants VV en absence de synthèse protéique, a été effectuée en utilisant une sonde spécifique au gène de la VP8 (Figure 19). La taille prédite de l'ARNm de la VP8 transcrit dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8 était d'environ 1,3 kb (le signal étant situé entre les nucléotides 1158 à 1164 de la séquence codante), tandis que la taille du transcrit pleine longueur, d'au moins 2,7 kb, ce qui correspond à la longueur de l'insertion. L'hybridation des ARNs isolés de cellules infectées avec le recombinant VV-VP8 a révélé la présence de deux transcrits majeurs de 1,5 et 3,3 kb (Figure 19; puits 1). Par contre, la sonde a détecté un transcrit majeur de 3,3 kb ainsi qu'un transcrit mineur de 1,5 kb dans le puits contenant les ARNs isolés de cellules infectées avec le VV-VP8-Mut (Figure 19; puits 4). De plus, aucun signal spécifique n'a été révélé dans les puits 2 et 3 qui contenaient respectivement des ARNs isolés de cellules non-infectées ou infectées avec le recombinant VV-TK⁻. Ces résultats indiquent que le signal de terminaison de la transcription des gènes précoces retrouvé dans le gène de la VP8 était reconnu par l'ARN polymérase du VV mais que la reconnaissance du motif n'était que partielle puisque des ARNm pleine longueur étaient aussi retrouvés dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8. De plus, la substitution du motif TTTTTNT a presque entièrement aboli la synthèse du transcrit tronqué de 1,5 kb dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8-Mut et conséquemment, l'ARNm de 3,3 kb était plus abondant dans les cellules infectées avec ce recombinant que dans les cellules infectées avec le

Figure 19: Analyse de type Northern des ARNm précoces isolés de cellules infectées avec les recombinants VV. Les cellules HEp-2 non infectées (puits 2) ou infectées avec les recombinants VV-VP8 (puits 1), VV-VP8-Mut (puits 4) ou VV-TK⁻ (puits 3) ont été incubées durant 6 h en présence de cycloheximide (300 µg/ml). Les ARNs totaux ont été séparés en gel d'agarose 1,5%, transférés par capillarité sur une membrane de nylon puis hybridés avec une sonde spécifique au gène de la VP8. La position des marqueurs de taille (kb) est indiquée à droite et la taille calculée des transcrits est à gauche.

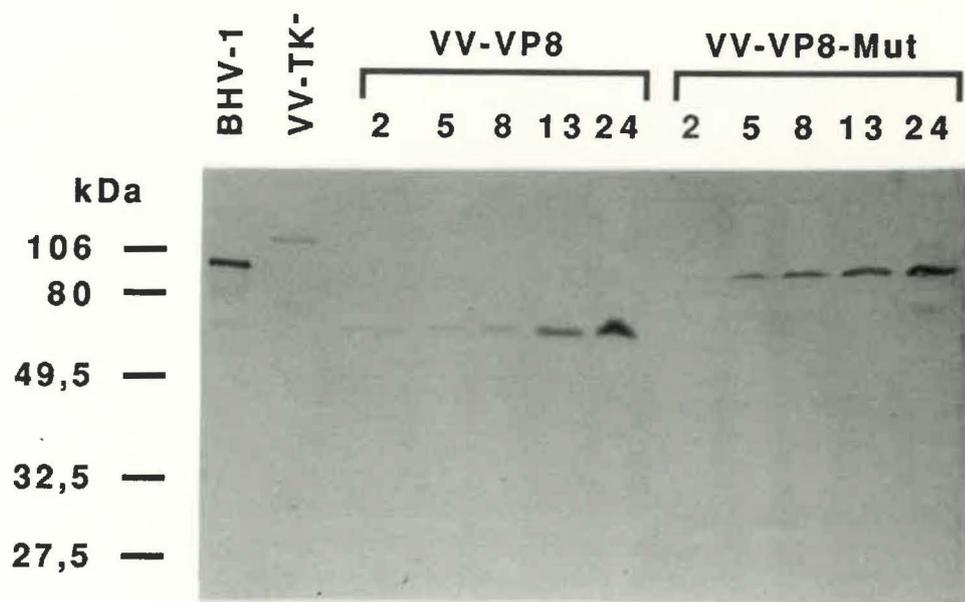


recombinant VV-VP8. Enfin, la taille du transcrit pleine longueur (3,3 kb) suggère que l'ARN polymérase du VV utilisait le signal de terminaison de la transcription du gène de la TK qui est localisé environ 700 nucléotides en aval de la jonction 3' de l'insertion de 2,7 kpb. Ce résultat était anticipé étant donné qu'aucun signal de terminaison n'était présent dans la portion 3' non-codante du gène de la VP8 insérée dans le génome du VV.

4.3 Synthèse de la VP8 dans les cellules infectées avec les recombinants VV

Des immunoempreintes ont été effectuées afin d'analyser l'expression de la VP8 dans les cellules infectées avec les recombinants VV à différents temps p.i. (Figure 20). Il est à noter que l'antisérum monospécifique utilisé pour détecter la VP8 (94 kDa) reconnaissait aussi une autre protéine du BHV-1, probablement la gC (90 kDa; voir aussi Figure 21). De plus, cet antisérum n'a pas révélé de protéines dans le puits qui contenait le lysat de cellules infectées avec le recombinant VV-TK⁻. Par contre, le sérum anti-VP8 a révélé une protéine de 69 kDa qui était détectable dès 2 h p.i. et qui n'était présente que dans les puits contenant les lysats de cellules infectées avec le recombinant VV-VP8. De plus, une protéine de 94 kDa a été révélée dans les puits contenant les lysats de cellules infectées avec le recombinant VV-VP8-Mut. Par ailleurs, le temps d'apparition de cette protéine correspond avec ce qui avait été observé pour le polypeptide de 69 kDa. De plus, la taille de la protéine de 94 kDa révélée dans les puits des lysats de recombinant VV-VP8-Mut était identique à la VP8 du BHV-1, ce qui confirme qu'une VP8 pleine longueur était synthétisée dans les cellules infectées avec ce recombinant. Par contre, la taille de la protéine de 69 kDa produite dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8

Figure 20: Analyse cinétique de la synthèse de la VP8 dans les cellules infectées avec les recombinants VV. Les cellules HEp-2 ont été infectées avec les recombinants VV-VP8 ou VV-VP8-Mut durant 2, 5, 8, 13 et 24 h ou ont été infectées avec le recombinant VV-TK⁻ pour 24 h. Les protéines totales ont été fractionnées en SDS-PAGE 7,5%, en parallèle avec les protéines de virions BHV-1, puis ont été électro-transférées sur une membrane PVDF. L'immunodétection de la VP8 a été effectuée avec un antisérum monospécifique de lapin (dilution 1/500). La position des marqueurs de taille (kDa) est indiquée à gauche.



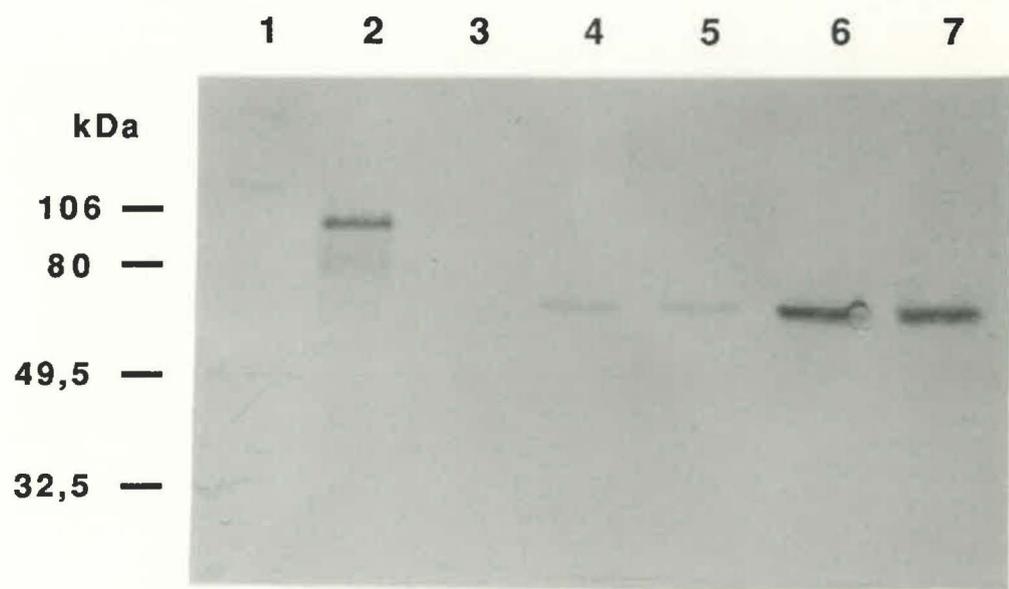
suggère qu'il s'agirait d'une VP8 tronquée, dont la synthèse résulterait de la traduction du transcrit de 1,5 kb. Cependant, il est à noter que le signal de terminaison de la transcription des gènes précoces étant situé entre les acides aminés 386 à 388 de la VP8, une protéine tronquée d'environ 52 kDa plutôt que 69 kDa était attendue. Mentionnons en terminant que lors de ces analyses en immunoempreintes, que nous avons noté que la VP8 tronquée était moins abondante que la VP8 pleine longueur et ce, particulièrement au début de l'infection.

Une deuxième cinétique d'infection a été effectuée afin de déterminer si une VP8 pleine longueur pouvait être synthétisée dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8 à des temps d'infection postérieurs à 24 h (Figure 21). Comme précédemment, les protéines ont été analysées en immunoempreinte en utilisant le sérum anti-VP8. Le résultat présenté à la Figure 21 montre que même à 48 h p.i., seule la VP8 de 69 kDa est détectée par le sérum monospécifique. Les résultats des deux cinétiques d'infection suggèrent que dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8, la VP8 de 94 kDa pourrait ne pas être synthétisée ou si elle l'est, la quantité produite serait sous le seuil de détection du sérum anti-VP8.

5. IMMUNOGÉNÉICITÉ DE LA VP8

Les recombinants VV ont ensuite été utilisés pour immuniser des souris afin d'évaluer les propriétés immunogéniques de la VP8. Le recombinant VV-TK⁻ a été employé comme témoin négatif, tandis qu'un recombinant VV exprimant le gène de la gC du BHV-1 (VV-BgC) a été utilisé comme témoin positif. Ce recombinant avait préalablement été construit dans notre laboratoire à partir du

Figure 21: Analyse cinétique de la synthèse de la VP8 dans des cellules infectées avec le recombinant VV-VP8. Les cellules HEp-2 ont été infectées avec le recombinant VV-VP8 et récoltées à 4 (puits 3), 8 (puits 4), 12 (puits 5), 24 (puits 6) et 48 h (puits 7) p.i. ou ont été infectées avec le recombinant VV-TK⁻ durant 48 h (puits 1). Les protéines totales ont été fractionnées en SDS-PAGE, en parallèle avec les protéines de virions BHV-1 (puits 2), puis électrotransférées sur une membrane de PVDF. La VP8 a été détectée avec le sérum anti-VP8 de lapin (dilution 1/500). La position des marqueurs de taille (kDa) est indiquée à gauche.



vecteur de transfert pSC11 dans lequel la séquence codante de la gC avait été insérée dans le site *Sma* I (Simard *et al.* résultats non-publiés).

5.1 Mesure de l'immunité humorale

Dans une première série d'expériences, l'immunogénicité de la VP8 a été évaluée chez des souris BALB/c (Tableau III). Les animaux ont d'abord été immunisés i.p. avec 6×10^6 DICT₅₀ de recombinants VV purifiés et les titres ELISA des anticorps sériques ont ensuite été déterminés. Il est à noter qu'afin de maximiser la détection de la réponse humorale spécifique à la VP8, un lysat cellulaire récolté au moment où l'expression de la VP8 était maximale dans les cellules infectées avec le BHV-1, a été utilisé comme antigène pour les ELISA. Étant donné qu'aucune réponse détectable n'avait été induite chez les souris ayant reçu une dose de VV-VP8 ou de VV-VP8-Mut, deux doses supplémentaires ont été données i.p. et les sérums ont ensuite été analysés après chaque immunisation (Tableau III). De faibles titres en anticorps spécifiques à la VP8 ont été détectés dans les sérums de souris immunisées avec le recombinant VV-VP8-Mut, tandis qu'aucune réponse spécifique n'a été induite par le recombinant VV-VP8. Par contre, l'immunisation avec le VV-BgC a stimulé la production d'un taux élevé d'anticorps sériques chez les souris. Enfin, aucune réactivité n'a été observée avec les sérums de souris injectées avec le recombinant VV-TK⁻ ou avec le PBS.

Il avait été précédemment démontré que l'immunisation i.v. de souris avec des recombinants VV induisait généralement des titres en anticorps plus élevés que l'immunisation i.p. (Andrew *et al.* 1989). Ainsi, des nouveaux groupes de souris ont reçu deux injections i.v. afin de déterminer si la voie d'immunisation

Tableau III:

Réponse humorale induite chez les souris BALB/c immunisées i.p. avec les recombinants VV

Immunisation ¹	Titres ELISA ²		
	1 dose	2 doses	3 doses
PBS	<16	<16	<16
VV-TK ⁻	<16	<16	<16
VV-VP8	<16	<16	<16
VV-VP8-Mut	32	64	256
VV-BgC	6 400	25 600	25 600

¹ Des groupes de 10 souris ont été immunisées avec les recombinants VV ou ont été injectées avec du PBS. Les immunisations ont été données à toutes les deux semaines.

² Le titre 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.

pouvait être impliquée dans la faible réponse humorale observée. Cependant, les titres ELISA étaient similaires aux titres obtenus après deux immunisations i.p. (Tableau IV).

Des tests de neutralisation ont été effectués afin de déterminer si les sérums de souris vaccinées à trois reprises avec les recombinants VV contenaient des anticorps capables de neutraliser l'infectivité du BHV-1 (Tableau V). Seuls les animaux immunisés avec le recombinant VV-BgC ont développé des anticorps neutralisants.

Des immunoempreintes ont été effectuées pour confirmer que l'immunité humorale induite était spécifique aux protéines du BHV-1 (Tableau VI). Pour ce faire, les protéines du virion du BHV-1 ont été utilisées comme antigènes et les sérums testés avaient été récoltés après trois doses administrées par voie i.p.. Les souris immunisées avec les recombinants VV-BgC ou VV-VP8-Mut ont démontré une réponse spécifique au BHV-1, tandis que les anticorps produits contre la VP8 synthétisée par le recombinant VV-VP8 étaient incapables de reconnaître la VP8 du BHV-1. De plus, aucune réactivité n'a été observée avec les sérums de souris injectées avec le recombinant VV-TK⁻ ou avec le PBS. Il est à noter qu'en immunoempreinte, les sérums des souris immunisées avec l'un ou l'autre des recombinants VV ont réagi contre les protéines du virus de la vaccine lorsque celles-ci étaient utilisées comme antigène (Tableau VI). Les résultats obtenus avec la souris BALB/c indiquent que la VP8 est un faible inducteur de l'immunité humorale.

Deux autres souches de souris consanguines ont été utilisées afin d'exclure la possibilité que la faible réponse humorale induite par la VP8 soit restreinte aux

Tableau IV:

Comparaison de la réactivité en ELISA des sérums de souris BALB/c immunisées avec les recombinants VV par voie i.p. ou i.v.

Immunisation ¹	Voie d'inoculation	
	intra-péritonéale	intra-veineuse
PBS	<16 ²	<16
VV-TK ⁻	<16	<16
VV-VP8	<16	<16
VV-VP8-Mut	64	64
VV-BgC	25 600	n.d. ³

¹ Des groupes de 10 ou 5 souris ont respectivement été immunisées avec les recombinants VV par voie i.p. ou i.v.. Un intervalle de deux semaines sépare les deux injections.

² Le titre ELISA 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.

³ Non déterminé

Tableau V:

Propriétés biologiques des sérums de souris BALB/c immunisées avec les recombinants VV

Immunisation ¹	Neutralisation <i>in vitro</i> ²
PBS	<8
VV-TK ⁻	<8
VV-VP8	<8
VV-VP8-Mut	<8
VV-BgC	8

¹ Des groupes de 10 souris ont été immunisées i.p. à trois reprises avec les recombinants VV. Les doses ont été administrées aux deux semaines.

² Le titre neutralisant est exprimé par la réciproque de la dilution capable de neutraliser 50% de l'infectivité du BHV-1 mesurée par un test DICT₅₀.

Tableau VI:

Spécificité de la réponse humorale induite chez les souris BALB/c immunisées
avec les recombinants VV

Immunisation ¹	Spécificité des anticorps ²		
	protéines du BHV-1		protéines du VV
	VP8	BgC	
PBS	-	-	-
VV-TK	-	-	+
VV-VP8	-	-	+
VV-VP8-Mut	+	-	+
VV-BgC	-	+	+

¹ Des groupes de 10 souris ont été immunisées i.p. à trois reprises avec les recombinants VV. Les doses ont été administrées aux deux semaines.

² La spécificité des anticorps a été analysée en immunoempreinte.

souris BALB/c. Ainsi, des souris C57BL/6 (H-2^b), C3H (H-2^k) et BALB/c (H-2^d) ont été immunisées i.p. à trois reprises avec les recombinants VV-VP8-Mut, VV-BgC ou VV-TK⁻. Deux semaines après la dernière injection, les sérums ont été récoltés et leur réactivité en ELISA a été déterminée (Tableau VII). Les résultats obtenus indiquent que les réponses en anticorps ne varient pas de façon significative entre les différentes souches de souris utilisées et confirment que la VP8 est incapable d'induire une forte réponse humorale chez la souris.

5.2 Mesure de l'immunité cellulaire

La prolifération des lymphocytes T spécifiques à la VP8 a été évaluée chez les souris BALB/c, C57BL/6 et C3H immunisées avec le recombinant VV-VP8-Mut. Les splénocytes ont été stimulés *in vitro* avec le BHV-1 inactivé aux UV et en parallèle, des cultures témoins ont été stimulées avec le VV inactivé aux UV (Tableau VIII). Pour les trois souches de souris utilisées, les animaux vaccinés avec les recombinants VV-VP8-Mut ou VV-TK⁻ ont développé une immunité cellulaire détectable, spécifique aux antigènes du virus de la vaccine. Par contre, les splénocytes des souris injectées avec le PBS n'ont pas proliféré en réponse à l'un ou l'autre des antigènes viraux utilisés. De plus, les moyennes des I.S. obtenues avec les souris BALB/c, C57BL/6 et C3H immunisées avec le recombinant VV-VP8-Mut comparées aux moyennes correspondantes des I.S. obtenues avec les souris inoculées avec le recombinant VV-TK⁻ n'étaient pas significativement différentes en réponse au BHV-1, ce qui indique que la prolifération observée n'était pas spécifique à la VP8. Ces résultats suggèrent que la VP8 ne contiendrait pas d'épitopes T restreints aux haplotypes murins H-2^d, H-2^b et H-2^k.

Tableau VII:

Réponse humorale induite chez trois souches de souris immunisées avec les recombinants VV

Souris	Immunisation ¹	Titres ELISA ²
BALB/c (H-2 ^d)	PBS	<16
	VV-TK ⁻	<16
	VV-VP8-Mut	128
	VV-BgC	25 600
C57BL/6 (H-2 ^b)	PBS	<16
	VV-TK ⁻	16
	VV-VP8-Mut	64
	VV-BgC	25 600
C3H (H-2 ^k)	PBS	<16
	VV-TK ⁻	16
	VV-VP8-Mut	32
	VV-BgC	12 800

¹ Des groupes de 5 souris ont été immunisées i.p. avec les recombinants VV. Trois doses ont été données à des intervalles de deux semaines.

² Le titre 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.

Tableau VIII:

Prolifération des splénocytes de trois souches de souris inoculées avec les recombinaux VV

Souris	Immunisation	Prolifération en présence du ¹ :	
		BHV-1	VV
BALB/c (H-2 ^d)	VV-VP8-Mut	1.2 ± 0.2 ²	2.5 ± 1.1
	VV-TK ⁻	1.0 ± 0.2	3.2 ± 0.8
	PBS	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.1
C57BL/6 (H-2 ^b)	VV-VP8-Mut	2.0 ± 0.7	3.2 ± 1.4
	VV-TK ⁻	1.2 ± 0.3	3.2 ± 1.4
	PBS	0.9 ± 0.3	0.3 ± 0.2
C3H (H-2 ^k)	VV-VP8-Mut	1.4 ± 0.4	2.2 ± 0.6
	VV-TK ⁻	1.1 ± 0.3	2.3 ± 0.3
	PBS	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.3

¹ Les résultats représentent la moyenne de deux expériences.

² Indice de stimulation ± écart-type à la moyenne.

DISCUSSION

1. ANALYSE DU GÈNE DE LA VP8

Nous avons d'abord déterminé la séquence nucléotidique complète du fragment *Hind* III M du génome du BHV-1 afin d'identifier le gène codant une protéine abondante de 94 kDa. L'analyse de la séquence obtenue avait permis d'identifier trois cadres de lecture dont deux étaient partiels, ainsi qu'un ORF complet de 2220 nucléotides qui s'est avéré être le gène de la VP8, la protéine majeure du tégment. Cette protéine qui se retrouve en abondance dans les virions et dans les cellules infectées avec le BHV-1 avait été alternativement désignée VP8 (Misra *et al.* 1981), VP7 (Pastoret *et al.* 1980), 91 kDa (Collins *et al.* 1984) ou 107 kDa (Marshall *et al.* 1986). Par ailleurs, les travaux de Bolton *et al.* (1983) et Marshall *et al.* (1986) avaient démontré de façon indirecte que la VP8 était localisée dans le tégment de la particule virale et ceci a récemment été confirmé par une étude faisant appel à des techniques de microscopie électronique (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1995).

La VP8 possède une masse moléculaire prédite de 80,7 kDa, ce qui diffère significativement de la masse apparente observée en gel de polyacrylamide (94 kDa). De même, une différence notable a aussi été observée entre les masses apparente (69 kDa) et prédite (environ 52 kDa) de la VP8 synthétisée dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8. Cette divergence pourrait être causée par la migration anormale de la protéine en SDS-PAGE, due à l'abondance de résidus prolines retrouvés dans la VP8. En effet, la structure particulière de cet acide aminé ralentirait la migration des protéines en gel de polyacrylamide (Ferguson *et al.* 1984).

L'analyse de la VP8 n'a pas révélé la présence de sites potentiels pour la *N*-glycosylation ni de région hydrophobe caractéristique d'un peptide signal dans la portion N-terminale de la protéine. Toutefois, il a été récemment démontré que la VP8 contient des sucres *O*-liés qui seraient apparemment acquis durant le transport des nucléocapsides tégmentées à travers l'appareil de Golgi (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1995). Il est cependant possible que cette modification post-traductionnelle de la VP8 ne survienne qu'à un faible niveau étant donné la similitude des masses moléculaires observées en SDS-PAGE entre la VP8 synthétisée *in vitro* (Annexe I; Simard *et al.* 1990) et *in vivo*. Par ailleurs, des études portant sur la glycosylation de protéines du tégment de virus herpès ont démontré que les VP13/14 du HSV (Meredith *et al.* 1991) peuvent lier des lectines et que la gp10 du EHV-4 (Whittaker *et al.* 1991) ainsi que des protéines du tégment du HCMV (Benko *et al.* 1988) peuvent être respectivement marquées avec de la [³H]glucosamine et du [³H]galactose. Bien que la signification de ce type de modification observée chez des protéines structurales virales demeure inconnue, la glycosylation pourrait jouer un rôle dans la localisation intracellulaire des protéines ou dans leur activité biologique.

La boîte TATA localisée à 25 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, pourrait servir de promoteur pour l'expression de l'ARNm de la VP8 (Jones et Yamamoto 1985; McKnight et Kinsbury 1982). Ce résultat concorde avec ce qui a été précédemment observé chez le HSV où les promoteurs des différentes classes de gènes contiennent généralement les éléments typiques des promoteurs cellulaires reconnus par l'ARN polymérase II. En effet, la majorité des promoteurs possèdent une boîte TATA, localisée approximativement entre les positions -25 à -30 par rapport au site d'initiation de la transcription et ce motif

est requis pour l'expression du gène (Roizman 1993). Toutefois, étant donné que l'ARNm de la VP8 apparaît durant la phase tardive de l'infection, il est probable que la boîte CAAT trouvée à la position 190 ne soit pas fonctionnelle. Des études portant sur l'analyse des promoteurs de gènes tardifs du HSV ont montré que les séquences en amont de la boîte TATA n'étaient pas requises pour l'expression de cette classe de gènes (Steffy et Weir 1991; Kibler *et al.* 1991; Goodart *et al.* 1992). Il est à noter que des études similaires n'ayant pas encore été entreprises sur les promoteurs des gènes tardifs du BHV-1, la signification des boîtes TATA et CAAT demeure hypothétique.

2. COMPARAISON DES DEUX SÉQUENCES DE VP8

La comparaison des deux séquences de la VP8 a révélé la présence de trois changements de cadre de lecture et de 29 autres substitutions nucléotidiques qui affectent globalement 14,1% des acides aminés. Il est possible que ces divergences aient été causées par des erreurs d'analyse de séquences puisque Carpenter et Misra ont utilisé la méthode enzymatique, tandis que nous avons employé la méthode chimique. Il a été mentionné dans le chapitre des Matériel et Méthodes que le séquençage enzymatique de fragments d'ADN riche en G et C pouvait résulter en des arrêts aléatoires dans la synthèse d'ADN qui seraient probablement causés par la présence de structures secondaires stables. Ainsi, il est possible que les nucléotides supplémentaires de la séquence de Carpenter et Misra aient été des artéfacts nucléotidiques, ce qui aurait entraîné la création des trois changements de cadre de lecture. Cette hypothèse est renforcée par les plus grandes homologues de séquences en acides aminés retrouvées entre la VP8 de l'isolat #34 et les protéines homologues de deux autres alphaherpèsvirus qu'avec la VP8 de l'isolat P8-2.

Cependant, il est à noter que même avec la méthode chimique de séquençage, des compressions de nucléotides ont aussi été observées et il est possible qu'une partie des différences entre les deux séquences soit attribuable à des erreurs de notre part.

D'autre part, il ne faut pas négliger le fait que la comparaison de la VP8 avec les protéines homologues du HSV-1 et du EHV-4 a révélé que ces protéines sont peu conservées chez les alphaherpèsvirus. Ceci suggère que les gènes codant ces protéines du tégument seraient sujets à de fréquentes mutations et ainsi, il est possible que les divergences observées entre la VP8 provenant de deux isolats du BHV-1 n'en soient que le reflet. Quoiqu'il en soit, il serait intéressant de cloner et de séquencer les gènes de la VP8 d'autres isolats et en particulier, d'isolats européens qui appartiennent au sous-type 2 du BHV-1.

3. COMPARAISON DES SÉQUENCES PROTÉIQUES

L'analyse informatique de la séquence déduite en acides aminés de la VP8 a révélé qu'elle était homologue avec les protéines majeures du tégument VP13/14 du HSV-1 qui sont codées par le gène UL47, ainsi qu'avec la gp10 du EHV-4, le produit de l'ORF B6. De plus, la VP8 partage des homologies avec le produit du gène ORF-11 du VZV (résultat non-présenté), quoiqu'à un degré moindre qu'avec le HSV-1 et elle ne possède pas d'homologue connu parmi les bêta- et les gammaherpèsvirus. Ces résultats indiquent que ces protéines sont peu conservées parmi les virus herpès. Par ailleurs, la VP8 est plus homologue à la gp10 qu'avec les VP13/14, ce qui suggère que le BHV-1 serait plus apparenté phylogénétiquement au EHV-4 qu'au HSV. Cette observation a été confirmée

par des arbres phylogénétiques établis à partir des séquences des gènes codant la gB et la thymidine kinase de virus herpès (McGeoch et Cook 1994).

Par ailleurs, les portions N-terminales des trois protéines étaient fortement hydrophiles et contenaient une grande proportion d'acides aminés avec des groupements polaires chargés et cette caractéristique conférait à la protéine du EHV-4 une région N-terminale acide, mais basique chez le BHV-1 et le HSV. De plus, cette nature basique était principalement causée par l'abondance de résidus arginines, la plupart étant concentrés dans un domaine. Ces observations révèlent des caractéristiques communes entre la VP8 et les VP13/14, suggérant ainsi que le lien entre ces protéines pourrait être plus important que ce que laissent supposer les analyses comparatives d'homologies de séquences. Il est possible que ce domaine hydrophile riche en arginines puisse conférer à la protéine la capacité de lier l'ADN de façon non-spécifique. En effet, il a été démontré que les VP13/14 sont associées à la matrice nucléaire pendant l'infection (Pinard *et al.* 1987) et qu'elles peuvent lier l'ADN viral (Blair et Honess 1983).

Par ailleurs, la séquence protéique partielle du gène BUL46 était homologue aux protéines du tégument VP11/12 du HSV-1 (McKnight *et al.* 1987; Zhang et McKnight 1993) et le pourcentage d'identité entre ces protéines était supérieur à celui observé entre la VP8 et les VP13/14, ce qui suggère que le gène UL46 serait plus conservé que le gène UL47. De plus, la récente caractérisation des gènes UL46h et UL47h du virus de la maladie de Marek indique que le gène UL46 est effectivement plus conservé et que la plus grande homologie est retrouvée dans la portion N-terminale de la protéine (Yanagida *et*

al. 1993). Cette observation pourra être confirmée ou infirmée lorsque le gène BUL46 sera séquencé en totalité.

Il est intéressant de noter que dans la longue région unique du génome du HSV-1, on retrouve un groupe de trois gènes comprenant les ORFs UL46 à UL48. De même, il a été observé que l'ORF B6 du EHV-4, l'ORF-11 du VZV, l'UL47h du virus de la maladie de Marek ainsi que la VP8 sont aussi inclus dans un groupe de gènes. En effet, nos résultats ont montré que le gène de la VP8 est bordé par deux ORFs homologues aux gènes UL46 et UL48 du HSV-1. De plus, ce groupe de gènes du BHV-1 et du HSV-1 sont situés approximativement dans la même région du génome viral, considérant que l'orientation prototype du génome du HSV-1 est inversée par rapport au génome du BHV-1 (Davison et Wilkie 1983). Ainsi, ces observations peuvent indiquer que les protéines codées par ce groupe de gènes ont des fonctions biologiques similaires chez les alphaherpèsvirus. Chez le HSV-1, il a été démontré que les produits des gènes UL47 et UL46 modulent l'activité de l' α -TIF (gène UL48), une protéine impliquée dans l'induction de la transcription des gènes précoces-immédiats (Batterson et Roizman 1983; Campbell *et al.* 1984). Cependant, le type de régulation exercée par ces protéines demeure controversée. En effet, McKnight *et al.* (1987) ont montré dans un système d'expression transitoire que le produit du gène UL47 diminue l'activité de l' α -TIF, tandis que le produit du gène UL46 l'augmente. Par contre, l'analyse de mutants de délétion de l'un ou l'autre de ces deux gènes a révélé que la protéine codée par le gène UL47 augmente l'activité de l' α -TIF et que le produit du gène UL46 n'a aucun effet notable (Zhang *et al.* 1991).

Par ailleurs, les protéines codées par les gènes UL46, UL47 et UL48 sont présentes en grandes quantités dans la particule virale et constituent une part

importante du tégument du virion. Il a de plus été démontré que les VP11/12 et les VP13/14 sont des phosphoprotéines (Zhang et McKnight 1993; Meredith *et al.* 1991) et des évidences indiquent que la VP8 serait aussi phosphorylée (V. Misra, communication personnelle). De plus, une étude récente portant sur l' α -TIF du BHV-1 a montré que la protéine trans-active le promoteur d'un gène précoce-immédiat, ce qui suggère que l'infection lytique serait initiée par un mécanisme similaire à ce qui a été observé pour le HSV-1 (Misra *et al.* 1994). Toutes les similitudes notées entre le BHV-1 et le HSV-1, en ce qui a trait à ce groupe de gènes et à leurs produits, renforcent l'hypothèse selon laquelle la VP8 pourrait exercer des fonctions de régulation semblables à celles des VP13/14 du HSV-1.

4. ANALYSE DU TRANSCRIT DE LA VP8

L'analyse cinétique de l'ARNm de la VP8 a révélé un transcrit de 4,4 kb apparaissant tardivement dans les cellules infectées avec le BHV-1. Généralement, les gènes codant les protéines structurales des virus herpès sont exprimés durant la phase tardive de l'infection et nos résultats indiquent qu'il en est de même pour la VP8. Par ailleurs, le transcrit que nous avons détecté correspond probablement à l'ARNm tardif de 4,5 kb, complémentaire au fragment *Hind* III M, qui a précédemment été identifié par Wirth *et al.* (1989).

La localisation précise de l'extrémité 5' de l'ARNm de la VP8 par la réaction d'extension d'amorce a montré que le transcrit débutait 39 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction. Ce résultat confirme ceux de Carpenter et Misra (1991) qui avaient localisé le site d'initiation de la transcription approximativement 1100 nucléotides en amont du site unique *Eco* RI (position

1209). Par ailleurs, le transcrit possède une courte région 5' non-codante, comparativement à celle de l'ARNm du gène UL47 du HSV qui contient 195 nucléotides (McKnight *et al.* 1987).

Les résultats obtenus sur la caractérisation du transcrit de la VP8 confirment l'absence d'un signal de polyadénylation en aval du codon d'arrêt de la traduction. Cette observation a aussi été notée dans la région 3' non-traduite des gènes UL47 du HSV-1 et UL47h du virus de la maladie de Marek (McKnight *et al.* 1987; Yanagida *et al.* 1993). Il est possible que l'ARNm de la VP8 partage son extrémité 3' avec le transcrit du gène BUL46 puisque chez le HSV-1, l'ARNm de 4,7 kb du gène UL47 partage son extrémité 3' avec le transcrit de 2,5 kb du gène UL46 (Hall *et al.* 1982; McKnight *et al.* 1987).

5. CARACTÉRISATION DES RECOMBINANTS DE LA VACCINE

L'abondance de la VP8 dans les virions ainsi que dans les cellules infectées avec le BHV-1 nous a incités à déterminer ses propriétés immunogéniques afin d'évaluer son potentiel en tant que vaccin sous-unitaire. Dans ce but, le rôle de la VP8 dans l'induction de l'immunité humorale et cellulaire a été étudié chez la souris suite à l'expression du gène dans un recombinant du virus de la vaccine. Cette approche expérimentale a été privilégiée, au détriment de la purification de la protéine, afin d'éviter le risque potentiel d'une interférence causée par la présence d'autres protéines virales et/ou cellulaires dans la préparation de VP8 purifiée. Par ailleurs, le plasmide de transfert pSC11, dans lequel l'expression du gène est placée sous le contrôle du promoteur précoce/tardif P7.5, a été choisi pour la construction des recombinants VV principalement parce qu'il a été démontré que généralement, les antigènes

synthétisés durant la phase précoce de l'infection sont reconnus par les lymphocytes T et B (Coupar *et al.* 1986).

Étant donné la présence d'un signal potentiel de terminaison de la transcription des gènes précoces à l'intérieur de la séquence codante de la VP8, nous avons construit deux recombinants VV, l'un contenant le gène original (VV-VP8) et l'autre, une version légèrement modifiée de celui-ci, le motif de terminaison ayant été aboli par mutagenèse dirigée (VV-VP8-Mut). Des analyses subséquentes ont démontré que la présence du motif TTTTNT avait induit la terminaison prématurée de la transcription, ce qui a résulté en la synthèse d'une VP8 tronquée dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8. Cependant, la substitution du motif dans le recombinant VV-VP8-Mut a permis la synthèse d'une protéine dont la migration en gel de polyacrylamide était identique à la VP8 produite dans les cellules infectées avec le BHV-1. Curieusement, il nous a été impossible de détecter la présence de la VP8 pleine longueur pendant toute la durée de l'infection avec le recombinant VV-VP8. Ce phénomène pourrait être attribuable à la limite de détection du sérum en immunoempreinte puisque l'ARNm pleine longueur (3,3 kb) est détectable en hybridation de type Northern. À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui rapporte une telle observation. En effet, il a précédemment été rapporté que durant la phase tardive de l'infection, la présence du signal TTTTNT dans des gènes étrangers au VV n'empêchait pas la détection de la protéine pleine longueur (Earl *et al.* 1990; Lowry *et al.* 1992). Nos résultats suggèrent que le motif TTTTNT est fonctionnel à tous les stades de l'infection, possiblement à cause de la réactivation de la fonction précoce du promoteur P7.5 durant la phase tardive (Garces *et al.* 1993). D'autre part, il est aussi possible que

l'inhibition de la fonction tardive du promoteur en plus d'une longue demi-vie de la VP8 tronquée ait été à l'origine de notre incapacité à détecter la protéine de 94 kDa dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8. Quoiqu'il en soit, l'opportunité d'isoler des recombinants VV qui exprimaient deux formes de VP8 nous a incités à conduire la présente étude avec les deux recombinants, considérant leur utilité possible pour l'identification de régions immunogéniques.

6. IMMUNOGÉNICITÉ DE LA VP8

L'immunisation des souris avec le recombinant VV-VP8-Mut a induit une faible réponse humorale spécifique à la VP8. Il a de plus été noté que le titre en anticorps augmentait avec le nombre de vaccinations. Cette faible réponse n'a pas été causée par un problème relatif au processus d'immunisation puisque tous les groupes de souris, à l'exception des animaux ayant reçu du PBS, ont développé des anticorps spécifiques au virus de la vaccine et qu'aucune différence dans les titres ELISA n'a été observée en utilisant deux voies d'inoculation. De plus, le recombinant VV-BgC a induit chez la souris une réponse humorale supérieure à ce qui avait précédemment été observé chez des bovins immunisés avec un recombinant VV similaire (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1989). Enfin, une faible réponse en anticorps a été notée chez les trois races de souris consanguines qui ont été utilisées pour la présente étude. Ainsi, ces résultats indiquent que la VP8 est un faible inducteur de l'immunité humorale chez la souris. Alternativement, il est possible qu'un bas niveau d'expression *in vivo* ou une courte demi-vie de la protéine aient été en partie responsables de la faible réponse observée.

Par ailleurs, aucune réponse spécifique à la VP8 du BHV-1 n'a été détectée dans les sérums de souris immunisées avec le recombinant VV-VP8. La différence entre les réponses humorales induites par les deux recombinants suggère que la portion antigénique de la VP8 serait plus ou moins localisée dans la région C-terminale de la protéine. Cependant, cette hypothèse semble peu vraisemblable étant donné que cette portion de la VP8 est fortement hydrophobe selon le profil d'hydropathicité de la protéine. D'autre part, il est probable que la VP8 tronquée ait adoptée une conformation tri-dimensionnelle différente de la protéine native et conséquemment, l'absence de réponse humorale observée avec les souris immunisées avec le recombinant VV-VP8 pourrait s'expliquer par le fait que la majorité des épitopes sont non-linéaires.

La relation entre le nombre d'immunisations avec le recombinant VV-VP8-Mut et l'augmentation des taux d'anticorps spécifiques à la VP8 est similaire à ce qui avait été observé chez l'hôte naturel, lorsque soumis à des expositions successives au BHV-1 (van Drunen Littel-van den Hurk et Babiuk 1986b). Cependant, malgré que la VP8 semble être un faible inducteur de l'immunité humorale chez la souris, il a très récemment été démontré que l'immunisation de bovins avec une préparation de VP8 purifiée par chromatographie d'affinité induisait, en plus d'une réponse humorale appréciable, la production d'anticorps neutralisants (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1995). Cette contradiction pourrait être en partie attribuable aux différentes approches expérimentales utilisées dans ces deux études. Il est en effet possible que des protéines virales et/ou cellulaires aient été présentes dans la préparation de VP8 purifiée et qu'elles aient ainsi pu contribuer à augmenter l'amplitude de la réponse immunitaire. Par contre, la faible réponse humorale induite par la VP8 chez la

souris n'a pas nécessairement de corrélation avec les propriétés immunogéniques de la protéine chez l'hôte naturel.

Aucune réponse lymphoproliférative spécifique à la VP8 n'a été induite chez les souris BALB/c, C57BL/6 et C3H immunisées avec le recombinant VV-VP8-Mut, ce qui suggère que la VP8 ne contiendrait pas d'épitopes restreints aux haplotypes H-2^b, H-2^d ni H-2^k. Nos résultats entrent en contradiction avec deux études antérieures dans lesquelles la VP8 stimulait la prolifération *in vitro* de lymphocytes de bovins (Hutchings *et al.* 1990b; van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1995). Toutefois, comme il a été mentionné précédemment, cette divergence pourrait être expliquée par l'utilisation d'approches expérimentales différentes. En effet, dans ces études, les antigènes utilisés pour stimuler la prolifération des lymphocytes étaient constitués de protéines virales fixées sur une membrane de nitrocellulose (Hutchings *et al.* 1990b), de VP8 purifiée par chromatographie d'affinité (Hutchings *et al.* 1990b; van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1995) ou de particules virales purifiées (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1995) et conséquemment, une possible contamination avec des protéines virales autres que la VP8 ne peut être exclue.

Des recombinants VV exprimant des gènes viraux sous le contrôle du promoteur P7.5 ont été utilisés avec succès pour induire une réponse T spécifique à l'antigène cible. Ceci a été démontré pour une variété de virus dont le CMV murin (Volkmer *et al.* 1987), le virus respiratoire syncytial (Connors *et al.* 1991) ou le virus influenza (Coupar *et al.* 1986). Cependant, il a aussi été observé que des réponses cellulaires spécifiques étaient induites lorsque l'antigène était administré dans un contexte naturel mais pas dans un contexte artificiel comme avec un recombinant VV (Tanaka *et al.* 1991). De plus, le choix

du vecteur exprimant un antigène donné semble aussi être important pour l'induction de la réponse cellulaire. En effet, il a récemment été démontré qu'un recombinant adénovirus exprimant le gène de la gB du HCMV induisait une réponse cellulaire spécifique chez la souris, tandis qu'aucune réponse n'avait été générée avec un recombinant VV exprimant le même antigène (Berencsi *et al.* 1993). En tenant compte de toutes ces observations, il est possible que la compétition entre les peptides dérivés de la VP8 et les peptides dérivés du VV pour la liaison sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité aient influé sur la réponse cellulaire qui a été induite chez la souris. Par conséquent, la faible réponse cellulaire qui a été observée dans la présente étude pourrait être en partie attribuable à l'utilisation d'un recombinant du VV comme vaccin.

D'autre part, il ne faut pas négliger le fait que dans les recombinants VV, la VP8 n'est pas présente dans les virions (résultats non-présentés) et doit donc être synthétisée *de novo* dans les cellules infectées afin d'induire une réponse immunitaire cellulaire qui sera de ce fait, principalement restreinte aux antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité. Par contre, l'injection d'animaux avec la VP8 purifiée induira une réponse restreinte aux antigènes de classe II. Ainsi, il est possible que notre incapacité à détecter une réponse cellulaire spécifique à la VP8 soit due à cette différence de stimulation du système immunitaire puisque dans les tests de prolifération de splénocytes, la majorité des cellules stimulées sont celles qui présentent les antigènes en association avec les molécules de classe II. Quoiqu'il en soit, afin de vérifier l'importance de la VP8 dans la réponse immunitaire contre le BHV-1, le recombinant VV-VP8-Mut a été envoyé dans le laboratoire du Dr Pastoret en Belgique et des tests d'activité T-cytotoxique, dans lesquels les cellules cibles

seront infectées avec le recombinant VV, seront effectués en utilisant comme cellules effectrices, des lymphocytes de bovins immunisés avec le BHV-1.

CONCLUSION

La traduction *in vitro* d'ARNm provenant de cellules infectées avec le BHV-1 avait permis de localiser la séquence codante d'une protéine abondante de 94 kDa dans le fragment *Hind* III M de 3,7 kpb du génome viral (Annexe I). Nous avons déterminé la séquence nucléotidique complète du fragment *Hind* III M afin de caractériser le gène codant cette protéine, qui s'est avérée être la VP8, la protéine majeure du tégument du BHV-1. La comparaison de la séquence déduite en acides aminés a révélé que la VP8 partageait des homologies de séquences avec la gp10 du EHV-4 et les VP13/14 du HSV, respectivement codées par les gènes ORF B6 et UL47 (McKnight *et al.* 1987; Whittaker *et al.* 1991). Les travaux que nous avons réalisés sur la caractérisation du gène de la VP8 pourraient servir de base pour la construction d'un mutant de délétion afin de déterminer si la protéine est essentielle ou non pour la réplication du BHV-1. Des études pourraient aussi être entreprises dans le but de déterminer la fonction biologique de la protéine dont l'homologue chez le HSV a été impliqué dans la régulation de l'activité de l' α -TIF, le trans-activateur des gènes précoces-immédiats. Par ailleurs, la localisation précise du site d'initiation de la transcription du gène de la VP8 et l'analyse des séquences proximales en 5' de la séquence codante pourraient ouvrir la voie à des travaux sur la caractérisation des promoteurs des gènes tardifs du BHV-1. Enfin, mentionnons que dans le cadre du projet de séquençage du génome viral, les séquences nucléotidiques du gène de la VP8 et de l'ORF partiel homologue au gène UL46 du HSV font maintenant partie de la banque de séquences et ceci représente une contribution de plus de 3000 nucléotides.

Nous avons également exprimé le gène de la VP8 dans le virus de la vaccine afin de déterminer les propriétés immunogéniques de la protéine. La

caractérisation des recombinants VV a révélé que le signal TTTTGT était reconnu dans les cellules infectées avec le recombinant VV-VP8, ce qui avait conduit à la synthèse d'une protéine de 69 kDa et que la substitution du motif par mutagenèse dirigée avait aboli la reconnaissance du motif. L'immunisation de souris BALB/c, C57BL/6 et C3H avec le recombinant VV-VP8-Mut a induit une faible immunité humorale et en ce qui concerne la stimulation de l'immunité cellulaire, aucune réponse spécifique au BHV-1 n'a été obtenue avec la prolifération *in vitro* des splénocytes murins. Les résultats de notre étude indiquent que la VP8 est un faible inducteur de l'immunité chez la souris. Cependant, nos résultats divergent de ceux qui ont été obtenus suite à l'immunisation de bovins avec la VP8 purifiée par chromatographie d'affinité (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* 1995) et nous croyons que cette divergence pourrait être partiellement attribuable à l'utilisation de deux approches expérimentales différentes. Toutefois, malgré les résultats décevants que nous avons obtenus chez la souris, il serait intéressant d'utiliser les recombinants VV dans des études chez l'hôte naturel et ces expériences pourraient permettre de mieux définir le rôle joué par la VP8 dans l'induction de la réponse immunitaire anti-BHV-1. Ainsi, des animaux pourraient être immunisés avec le recombinant VV-VP8-Mut afin de mesurer la réponse immunitaire générée ou celui-ci pourrait être utilisé dans des tests de cytotoxicité afin de déterminer l'importance de la VP8 dans la stimulation de la réponse cellulaire suite à l'infection au BHV-1 et s'il y a lieu, la caractérisation des épitopes pourrait être entreprise.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais adresser mes remerciements au docteur Michel Trudel pour avoir accepté la direction de mes études graduées. Je désire aussi remercier la docteure Claire Simard pour avoir accepté de co-diriger mes travaux, d'en avoir supervisé la majeure partie et plus particulièrement, pour avoir toujours été présente lors des moments difficiles. Je garderai longtemps le souvenir des heures innombrables que nous avons passées, Claire et moi, à révéfier chaque nucléotide de la séquence du fragment M. Enfin, je les remercie également pour l'opportunité offerte de m'intégrer à la communauté scientifique internationale par les participations aux congrès.

Je tiens à remercier le docteur Pierre Talbot pour l'énergie qu'il a dépensée afin d'améliorer le processus du passage au doctorat sans rédaction du mémoire de maîtrise. Sans lui, toute cette procédure serait beaucoup plus qu'une simple formalité.

Je remercie également les membres des laboratoires des Dr Trudel et Simard pour leur support et plus particulièrement, Nathalie Bastien pour son amitié et Nicole Gagnon pour son aide technique lors des immunisations et des sacrifices des souris.

Je désire aussi remercier le Dr Claude Daniel, avec qui j'ai partagé cinq ans de ma vie, pour son support constant, ses encouragements et sa patience. Un merci à la communauté étudiante de l'Institut parmi laquelle j'ai découvert des gens qui sont par la suite devenus des amis.

Enfin, je remercie le Fonds de formation des chercheurs et d'aide à la recherche (FCAR) et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour m'avoir octroyé les bourses d'études qui m'ont permis de poursuivre mes travaux.

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.
- ACKERMANN, M., E. PETERHANS et R. WYLER. 1982. DNA of bovine herpes virus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.* **43**: 36-40.
- AGUILAR-SETIÉN, A., P.-P. PASTORET et F. SCHOENAERS. 1980. L'immunité envers le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (bovid herpesvirus 1). *Ann. Méd. Vét.* **124**: 103-122.
- AMADORI, M., I.L. ARCHETTI, R. VERARDI et C. BERNERI. 1992. Target recognition by bovine mononuclear, MHC-unrestricted cytotoxic cells. *Vet. Microbiol.* **33**: 383-392.
- ANDREW, M.E., B.E.H. COUPAR et D.B. BOYLE. 1989. Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. *Immunol. Cell Biol.* **67**: 331-337.
- 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.
- ARVIN, A.M., S. SOLEM, C.M. KOROPCHAK, E. KINNEY-THOMAS et S.G. PARYANI. 1987. Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus glycoprotein, g1, and to a non-glycosylated protein, p170, in the strain 2 guinea-pig. *J. Gen. Virol.* **68**: 2449-2454.
- BABIUK, L.A., H. BIELEFELDT OHMANN, G. GIFFORD, C.W. CZARNIECKI, V.T. SCIALLI et E.B. HAMILTON. 1985. Effect of bovine α 1 interferon on bovine herpesvirus type 1-induced respiratory disease. *J. Gen. Virol.* **66**: 2383-2394.
- BABIUK, L.A., J. L'ITALIEN, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, T. ZAMB, M.J.P. LAWMAN, G. HUGHES et G.A. GIFFORD. 1987. Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology* **159**: 57-66.
- 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.

- BANKS, T.A. et B.T. ROUSE. 1992 . Herpesviruses - Immune escape artists? Clin. Infect. Dis. **14**: 933-941.
- BARANOWSKI, E., J. DUBUISSON, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, L.A. BABIUK, A. MICHEL, P.-P. PASTORET et E. THIRY. 1995. Synthesis and processing of bovine herpesvirus-1 glycoprotein H. Virology **206**: 651-654.
- BAROUDY, B.M., S. VENKATESAN et B. MOSS. 1982. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. Cell **28**: 315-324.
- BATTERSON, W. et B. ROIZMAN. 1983. Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of α genes. J. Virol. **46**: 371-377.
- BELLO, L.J., J.C. WHITBECK et W.C. LAWRENCE. 1987. Map location of the thymidine kinase gene of bovine herpesvirus 1. J. Virol. **61**: 4023-4025.
- BELLO, L.J., J.C. WHITBECK et W.C. LAWRENCE. 1992. Sequence and transcript analysis of the bovine herpesvirus 1 thymidine kinase locus. Virology **189**: 407-414.
- BENKO, D.M., R.S. HALTIWANGER, G.W. HART et W. GIBSON. 1988. Virion basic phosphoprotein from human cytomegalovirus contains O-linked N acetylglucosamine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 2573-2577.
- BERENCSI, K., R.F. RANDO, C. DETAISNE, E. PAOLETTI, S.A. PLOTKIN et E. GONCZOL. 1993. Murine cytotoxic T cell response specific for human cytomegalovirus glycoprotein B (gB) induced by adenovirus and vaccinia virus recombinants expressing gB. J. Gen. Virol. **74**: 2507-2512.
- BESWICK, T.S.L. 1962. The origin and use of the word herpes. Med. Hist. **6**: 214-232.
- 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.
- BIELEFELDT OHMANN, H., J.E. GILCHRIST et L.A. BABIUK. 1984. Effect of recombinant DNA-produced bovine interferon alpha (BoIFN- α 1) on the interaction between bovine alveolar macrophages and bovine herpesvirus type 1. J. Gen. Virol. **65**: 1487-1495.

- BIELEFELDT OHMANN, H., W.C. DAVIS et L.A. BABIUK. 1985. Functional and phenotypic characterization of bovine natural cytotoxic cells. *Immunobiology* **169**: 503-519.
- BLAIR, E.D. et R.W. HONESS. 1983. DNA-binding proteins specified by herpesvirus saimiri. *J. Gen. Virol.* **64**: 2697-2715.
- BLEWETT, E.L. et V. MISRA. 1991. Cleavage of the bovine herpesvirus glycoprotein B is not essential for its function. *J. Gen. Virol.* **72**: 2083-2090.
- 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.
- BOUFFARD, A. et J.B. DERBYSHIRE. 1981. Effects of some components of the humoral immune response on the replication of bovine herpesvirus type 1 in tracheal organ cultures. *Vet. Microbiol.* **6**: 129-142.
- BOYLE, D.B. et B.E.H. COUPAR. 1988. Construction of recombinant fowlpox viruses as vectors for poultry vaccines. *Virus Res.* **10**: 343-356.
- 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. et C.J. JONES. 1992. Localization of *cis*-acting sequences in the latency-related promoter of bovine herpesvirus 1 which are regulated by neuronal cell type factors and immediate-early genes. *J. Virol.* **66**: 6099-6106.
- BRIGHAM, S.H. et C.R. ROSSI. 1986. Cell-mediated cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells stimulated *in vitro* for infectious bovine rhinotracheitis virus-infected cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **13**: 203-212.
- BROWN, G.A. et H.J. FIELD. 1990. Experimental reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) by means of corticosteroids in an intranasal rabbit model. *Arch. Virol.* **112**: 81-101.
- BULLER, R.M.L. et G.J. PALUMBO. 1991. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol. Rev.* **55**: 80-122.
- CAI, W., S. PERSON, S.C. WARNER, J. ZHOU et N.A. DELUCA. 1987. Linker insertion, nonsense and restriction site deletion mutations of the gB glycoprotein gene of herpes simplex virus-1. *J. Virol.* **61**: 714-721.

- CAMPBELL, M.E.M., J.W. PALFREYMAN et C.M. PRESTON. 1984. Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a *trans*-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *J. Mol. Biol.* **180**: 1-19.
- CAMPOS, M. et C.R. ROSSI. 1986. Cytotoxicity of bovine lymphocytes after treatment with lymphokines. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 1524-1528.
- CAMPOS, M., H. BIELEFEDT OHMANN, D. HUTCHINGS, N. RAPIN, L.A. BABIUK et M.J.P. LAWMAN. 1989. Role of interferon- γ inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)-infected cells. *Cell. Immunol.* **120**: 259-269.
- 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. 1991. The most abundant protein in bovine herpes 1 virions is a homologue of herpes simplex virus type 1 UL47. *J. Gen. Virol.* **72**: 3077-3084.
- CARPENTER, D.E. et V. MISRA. 1992. Sequences of the bovine herpesvirus 1 homologue of herpes simplex virus type-1 α -*trans*-inducing factor (UL48). *Gene* **119**: 259-263.
- CARTER, J.J., A.D. WEINBERG, A. POLLARD, R. REEVES, J.A. MAGNUSON et N.S. MAGNUSON. 1989. Inhibition of T-lymphocyte mitogenic responses and effects on cell functions by bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* **63**: 1525-1530.
- CASPAR, D.L.D. et A. KLUG. 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *In: "Basic mechanisms in animal virus biology"*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 27, Frisch, L. (Ed.), New York, pp. 1-24.
- CHAKRABARTI, S., K. BRECHLING et B. MOSS. 1985. Vaccinia virus expression vector: coexpression of β -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3403-3409.
- CHASE, C.C.L., C. LOHFF et G.J. LETCHWORTH. 1993. Resistance and susceptibility of bovine cells expressing herpesviral glycoprotein D homologs to herpesviral infections. *Virology* **194**: 365-369.
- CHASE, C.C.L., K. CARTER-ALLEN, C. LOHFF et G.J. LETCHWORTH III. 1990. Bovine cells expressing bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein IV resist infection by BHV-1, herpes simplex virus, and pseudorabies virus. *J. Virol.* **64**: 4866-4872.

- CHIRGWIN, J.M., A.E. PRZYBYLA, R.J. MACDONALD et W.J. RUTTER. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299.
- CHOW, T.L. 1972. Duration of immunity in heifers inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **160**: 51-54
- COLLINS, J.K., A.C. BUTCHER, C.A. RIEGEL, V. MCGRANE, C.D. BLAIR, Y.A. TERAMOTO et S. WINSTON. 1984. Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* **52**: 403-409.
- CONNORS, M., P.L. COLLINS, C.-Y. FIRESTONE et B.R. MURPHY. 1991. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J. Virol.* **65**: 1634-1637.
- COOK, C.G. et G.A. SPLITTER. 1989. Characterization of bovine mononuclear cell populations with natural cytolytic activity against bovine herpesvirus 1-infected cells. *Cell. Immunol.* **120**: 240-249.
- COOK, C.G., G.J. LETCHWORTH et G.A. SPLITTER. 1989. Bovine naturally cytolytic cell activation against bovine herpes virus type 1-infected cells does not require late viral glycoproteins. *Immunology* **66**: 565-569.
- COUPAR, B.E.H., M.E. ANDREW, G.W. BOTH et D.B. BOYLE. 1986. Temporal regulation of influenza hemagglutinin expression in vaccinia virus recombinants and effects on the immune response. *Eur. J. Immunol.* **16**: 1479-1487.
- DAVIES, D.H. et J.R. DUNCAN. 1974. The pathogenesis of recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus induced in calves by treatment with corticosteroids. *Cornell Vet.* **64**: 340-366.
- DAVISON, A.J. et N.M. WILKIE. 1983. Location and orientation of homologous sequences in the genomes of five herpesviruses. *J. Gen. Virol.* **64**: 1927-1942.
- 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 type 1-specific cytotoxic lymphocytes T depending on the method of *in vitro* stimulation. *Immunology* **78**: 78: 7-13.
- EARL, P.L., A.W. HUGIN et B. MOSS. 1990. Removal of cryptic poxvirus transcription termination signals from the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene enhances expression and immunogenicity of a recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* **64**: 2448-2451.

- 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.
- ESPOSITO, J.J., J.C. KNIGHT, J.H. SHADOCK, F.J. NOVEMBRE et G.M. BAUER. 1988. Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. *Virology* **167**: 313-316.
- FARLEY, J.E., I.B. SKARE et J. SKARE. 1981. Inverted repeat sequences in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. In: *"The human herpes viruses: an interdisciplinary perspective"*. Nahmias, A.J., Dowdle, W.R., Schinazi, R.F. (Ed.), Elsevier-North Holland, New York, p. 590.
- FEHLER, F., J.M. HERRMANN, A. SAALMULLER, T.C. METTENLEITER et G.M. KEIL. 1992. Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1-expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant. *J. Virol.* **66**: 831-839.
- FENNER, F., D.A. HENDERSON, I. ARITA, Z. JEZEK et I.D. LADNYI. 1988. Smallpox and its eradication. World Health Organization, Geneva
- FERGUSON, B., N. JONES, J. RICHTER et M. ROSENBERG. 1984. Adenovirus Ela gene product expressed at high levels in *Escherichia coli* is functional. *Science* **224**: 1343-1346.
- FILION, L.G., R.L. MCGUIRE et L.A. BABIUK. 1981. Nonspecific suppressive effect of bovine herpesvirus type 1 on bovine leukocyte functions. *Infect. Immun.* **42**: 106-112.
- FITZPATRICK, D.R. et H. BIELEFELDT OHMANN. 1991. Mechanisms of herpesvirus immuno-evasion. *Microb. Pathog.* **10**: 253-259.
- FITZPATRICK, D.R., T.J. ZAMB, M.D. PARKER, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, L.A. BABIUK et M.J.P. LAWMAN. 1988. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII in transfected murine cells. *J. Virol.* **62**: 4239-4248.
- 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.J. REDMOND, S.K. ATTAH-POKU, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, L.A. BABIUK et T.J. ZAMB. 1990a. Mapping of 10 epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoproteins gI and gIII. *Virology* **176**: 145-157.

- FITZPATRICK, D.R., M. SNIDER, L. MCDOUGALL, T. BESKORWAYNE, T.J., ZAMB et H. BIELEFELDT OHMANN. 1990b. Molecular mimicry: a herpesvirus glycoprotein antigenically related to a cell surface glycoprotein expressed by macrophages, polymorphonuclear leucocytes, and platelets. *Immunology* **70**: 504-512.
- FITZPATRICK, D.R., T.J. ZAMB et L.A. BABIUK. 1990c. Expression of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gI in transfected bovine cells induces spontaneous cell fusion. *J. Gen. Virol.* **71**: 1215-1219.
- 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.
- FRAEFEL, C., U.V. WIRTH, B. VOGT et M. SCHWYZER. 1993. Immediate-early transcription over covalently joined genome ends of bovine herpesvirus 1: the *circ* gene. *J. Virol.* **67**: 1328-1333.
- FRAEFEL, C., M. ACKERMANN et M. SCHWYZER. 1994a. Identification of the bovine herpesvirus 1 *circ* protein, a myristylated and virion-associated polypeptide which is not essential for virus replication in cell culture. *J. Virol.* **68**: 8082-8088.
- FRAEFEL, C., J. ZENG, Y. CHOFFAT, M. ENGELS, M. SCHWYZER et M. ACKERMANN. 1994b. Identification and zinc dependence of the bovine herpesvirus 1 transactivator protein BICP0. *J. Virol.* **68**: 3154-3162.
- FRASER, N.W., T.M. BLOCK et J.G. SPIVACK. 1992. The latency-associated transcripts of herpes simplex virus: RNA in search of function. *Virology* **191**: 1-8.
- GARCES, J., K. MASTERNAK, B. KUNZ et R. WITTEK. 1993. Reactivation of transcription from a vaccinia virus early promoter late in infection. *J. Virol.* **67**: 5394-5401.
- GIBBS, E.P.J. et M.M. RWEYEMAMU. 1977. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bull.* **47**: 317-343.
- GILLIAM, S.E., A.M. THACKRAY, G.A. BROWN et H.J. FIELD. 1993. The pathogenesis of wild type and drug resistant mutant strains of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in the natural host. *Arch. Virol.* **128**: 43-54.

- GOEBEL, S.J., G.P. JOHNSON, M.E. PERKUS, S.W. DAVIS, J. P. WINSLOW et E. PAOLETTI. 1990. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179**: 247-266.
- GOODART, S.A., J.F. GUZOWSKI, M.K. RICE et E.K. WAGNER. 1992. Effect of genomic location on expression of β -galactosidase mRNA controlled by the herpes simplex virus type 1 UL38 promoter. *J. Virol.* **66**: 2973-2981.
- GRAHAM, B.J., H. LUDWIG, D.L. BRONSON, M. BENYESH-MELNICK et N. BISWAL. 1972. Physicochemical properties of the DNA of herpes viruses. *Biochim. Biophys. Acta* **259**: 13-23.
- GRIEBEL, P.J., H. BIELEFELDT OHMANN, M.J.P. LAWMAN et L.A. BABIUK. 1990. The interaction between bovine herpesvirus type 1 and activated bovine T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* **71**: 369-377.
- GUY, J.S. et L.N. POTGIETER. 1985a. Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am. J. Vet. Res.* **46**: 893-898.
- GUY, J.S. et L.N. POTGIETER. 1985b. Kinetics of antibody formation after the reactivation of bovine herpesvirus-1 infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.* **46**: 899-901.
- HALL, L.M., K.G. DRAPER, R.J. FRINK, R.H. COSTA et E.K. WAGNER. 1982. Herpes simplex virus mRNA species mapping in *EcoRI* fragment I. *J. Virol.* **43**: 594-607.
- HAMMERSCHMIDT, W., H. LUDWIG et H.-J. BUCK. 1986. Short repeats cause heterogeneity at genomic terminus of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* **58**: 43-49.
- HAMMERSCHMIDT, W., R. LURZ, H. LUDWIG et H.-J. BUHK. 1990. Recombination of genomic terminus of bovine herpesvirus type 1 with cellular DNA. *J. Gen. Virol.* **71**: 2043-2051.
- HAWKES, R.A. 1979. General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. In: *"Diagnostic procedures of viral, rickettsial and chlamydial infections"*. Lennette, E.H. et Schmidt, N.J. (Ed.), American Health Association, Washington DC, pp. 34-35.
- HAYES, M.K. et D.L. ROCK. 1990. Identification of a novel bovine herpesvirus type 1 immediate-early infected cell protein. *Arch. Virol.* **112**: 291-300.
- HILL, T.J. 1985. Herpes simplex virus latency. In: *"The herpesviruses"*, vol. 3. Roizman, B. (Ed.), Plenum Publishing Corp., New York, pp. 175-240.

- HOMAN, E.J. et B.C. EASTERDAY. 1980. Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *Am. J. Vet. Res.* **41**: 1212-1213.
- HRUBY, D.E. 1990. Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 153-170.
- HUEMER, H.P., C. LARCHER, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et L.A. BABIUK. 1993. Species selective interaction of *Alphaherpesvirinae* with the "unspecific" immune system of the host. *Arch. Virol.* **130**: 353-364.
- HUGHES, G., L.A. BABIUK et S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK. 1988. Functional and topographical analyses of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. *Arch. Virol.* **103**: 47-60.
- 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.
- JENSEN, J. et R.D. SCHULTZ. 1990. Bovine natural cell mediated cytotoxicity (NCCM): activation by cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **24**: 113-129.
- JERICO, K.W.F. et E.V. LANGFORD. 1978. Pneumonia in calves produced with aerosols of bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Comp. Med.* **42**: 269-277.
- JOHNSON, D.C. et V. FEENSTRA. 1987. Identification of a novel herpes simplex virus type 1-induced glycoprotein which complexes with gE and binds immunoglobulin. *J. Virol.* **61**: 2208-2216.
- JONES, K.A. et K.R. YAMAMOTO. 1985. Two distinct transcriptional factors bind to the HSV thymidine kinase promoters *in vitro*. *Cell* **42**: 559-572.
- KAHRS, R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **171**: 1055-1064.
- KECK, J.G., C.J. BALDICK et B. MOSS. 1990. Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late transactivator genes. *Cell* **61**: 801-809.

- KECK, J.G., F. FEIGENBAUM et B. MOSS. 1993. Mutational analysis of a predicted zinc-binding motif in the 26-kilodalton protein encoded by the vaccinia virus A2L-gene: correlation of zinc binding with late transcriptional transactivation activity. *J. Virol.* **67**: 5749-5753.
- KIBLER, P.K., J. DUNCAN, B.D. KEITH, T. HUPEL et J.R. SMILEY. 1991. Regulation of herpes simplex virus true late gene expression: sequences downstream from the US11 TATA box inhibit expression from an unreplicated template. *J. Virol.* **65**: 6749-6760.
- KIT, S. 1989. Recombinant-derived modified-live herpesvirus vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* **251**: 219-236.
- KIT, S. et H. QAVI. 1983. Thymidine kinase (TK) induction after infection of TK-deficient rabbit cell mutants with bovine herpesvirus type 1 (BHV-1). Isolation of TK⁻ BHV-1 mutants. *Virology* **130**: 381-389.
- 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.
- KORNFELD, R. et S. KORNFELD. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 631-664.
- KOZAK, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292.
- KOZAK, M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**: 947-950.
- 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.
- KYTE, J. et R.F. DOOLITTLE. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LAWMAN, M.J.P., G. GIFFORD, M. GYONGYOSSY-ISSA, R. DRAGAN, J. HEISE et L.A. BABIUK. 1987. Activity of polymorphonuclear (PMN) leukocytes during bovine herpesvirus-1 induced respiratory disease: effect of recombinant bovine interferon alpha I. *Antiviral Res.* **8**: 225-238.

- LEARY, T.P. et G.A. SPLITTER. 1990a. A method for rapid identification of T lymphocyte epitopes. *Peptide Res.* **3**: 259-263.
- LEARY, T.P. et G.A. SPLITTER. 1990b. Recombinant herpesviral proteins produced by cell-free translation provide a novel approach for the mapping of lymphocyte T epitopes. *J. Immunol.* **145**: 718-723.
- 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.
- LI, M. et H.P. SCHWEIZER. 1993. Resolution of common DNA sequencing ambiguities of GC-rich DNA templates by terminal deoxynucleotidyl transferase without dGTP analogues. *Focus* **15**: 19-20.
- LIANG, X.P., L.A. BABIUK, S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, D.R. FITZPATRICK et T.J. ZAMB. 1991. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoprotein gI, gIII, and gIV. *J. Virol.* **65**: 1124-1132.
- LIANG, X.P., L.A. BABIUK et T.J. ZAMB. 1992. An *in vivo* study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing β -galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology* **189**: 629-639.
- LIANG, X.P., L.A. BABIUK et T.J. ZAMB. 1993a. Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology* **194**: 233-243.
- LIANG, X.P., M. TANG, B. MANNS, L.A. BABIUK et T.J. ZAMB. 1993b. Identification and deletion mutagenesis of the bovine herpesvirus 1 dUTPase gene and a gene homologous to herpes simplex virus UL49.5. *Virology* **195**: 42-50.
- LOWRY, P.W., S. SOLEM, B.N. WATSON, C.M. KOROPCHAK, H.M. THACKRAY, P.R. KINCHINGTON, W.T. RUYECHAN, P. LING, J. HAY et A.M. ARVIN. 1992. Immunity in strain 2 guinea-pigs inoculated with vaccinia virus recombinants expressing varicella-zoster virus glycoproteins I, IV, V or the protein product of the immediate early gene 62. *J. Gen. Virol.* **73**: 811-819.
- LUDWIG, G.V. et G.J. LETHWORTH III. 1987. Temporal control of bovine herpesvirus 1 glycoprotein synthesis. *J. Virol.* **61**: 3292-3294.
- LUDWIG, H. 1983. Bovine herpesvirus. In: "*The herpesviruses*", vol. 2. Roizman, B. (Ed.), Plenum Publishing Corp., New York, pp. 135-214.

- LUM, M.A. et D.E. REED. 1986. Identification of bovine herpesvirus-1 polypeptides involved in serum neutralization. *Vet. Microbiol.* **11**: 213-220.
- MACKETT, M., G.L. SMITH et B. MOSS. 1984. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J. Virol.* **49**: 857-864.
- MADIN, S.H., C.J. YORK et D.G. MCKERCHER. 1956. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* **124**: 721-722.
- MAHR, A. et L.G. PAYNE. 1992. Vaccinia recombinants as vaccine vectors. *Immunobiol.* **184**: 126-146.
- 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.
- MAXAM, A.M. et W. GILBERT. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 560-564.
- MAXAM, A.M. et W. GILBERT. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**: 499-560.
- 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.
- MCCHESENEY, M.B. et M.B.A. OLDSTONE. 1987. Viruses perturb lymphocyte functions: selected principles characterizing virus-induced immunosuppression. *Annu. Rev. Immunol.* **5**: 279-304.
- MCGEOCH, D.J. 1989. The genomes of the human herpesviruses: contents, relationship, and evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**: 235-265.
- MCGEOCH, D.J. et S. COOK. 1994. Molecular phylogeny of the *Alphaherpesvirinae* subfamily and a proposed evolutionary timescale. *J. Mol. Biol.* **238**: 9-22.
- MCGEOCH, D.J., B.C. BARNETT et C.A. MACLEAN. 1993. Emerging functions of alphaherpesvirus genes. *Sem. Virol.* **4**: 125-134.

- 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.
- 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.
- MCKNIGHT, J.L.C., P.E. PELLETT, F.J. JENKINS et B. ROIZMAN. 1987. Characterization and nucleotide sequence of two herpes simplex virus 1 genes whose products modulate α -*trans*-inducing factor-dependent activation of α genes. *J. Virol.* **61**: 992-1001.
- MCKNIGHT, S.L. et R. KINGSBURY. 1982. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* **217**: 316-324.
- MELLERICK, D.M. et N.W. FRASER. 1987. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology* **158**: 265-275.
- MEREDITH, D.M., J.A. LINDSAY, I.W. HALLIBURTON et G.R. WHITTAKER. 1991. Post-translational modification of the tegument proteins (VP13 and VP14) of herpes simplex virus type 1 by glycosylation and phosphorylation. *J. Gen. Virol.* **72**: 2771-2775.
- METTENLEITER, T.C., L. ZSAK, F. ZUCKERMANN, N. SUGG, H. KERN et T. BEN-PORAT. 1990. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J. Virol.* **64**: 278-286.
- 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.
- 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.

- MILLER, J.M., C.A. WHETSTONE, L.J. BELLO et W.C. LAWRENCE. 1991. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus 1 to cause abortion in cattle. *Am. J. Vet. Res.* **52**: 1038-1043.
- MILLER-EDGE, M. et G. SPLITTER. 1986. Patterns of bovine T cell-mediated immune responses to bovine herpesvirus 1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **13**: 301-319.
- MISRA, V., R.M. BLUMENTHAL et L.A. BABIUK. 1981. Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). *J. Virol.* **40**: 367-378.
- MISRA, V., 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., 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.
- MITTAL, S.K. et H.J. FIELD. 1989. Analysis of the bovine herpesvirus type 1 thymidine kinase (TK) gene from wild-type virus and TK-deficient mutants. *J. Gen. Virol.* **70**: 901-918.
- MORRISON, L.A. et D.M. KNIPE. 1994. Immunization with replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1: sites of immune intervention in pathogenesis of challenge virus infection. *J. Virol.* **68**: 689-696.
- MOSS, B. 1990. *Poxviridae* and their replication. In: "*Virology*". Fields, B.N., Knipe, D.M., Chanock, R.M., Hirsch, M.S., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B. (Ed.), Raven Press Ltd, New York, pp. 2079-2111.
- MOSS, B. 1991. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* **252**: 1662-1667.
- 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.
- NELSON, R., A.-M. ADACHI, H. CHISHOLM et V. MISRA. 1989. Temperature-sensitive mutants of bovine herpesvirus type 1: mutants which make unaltered levels of "early" glycoproteins but fail to synthesize a "late" glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **70**: 125-132.

- 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.
- 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, L.J. et H.J. FIELD. 1988. Genomic localization and sequence analysis of the putative bovine herpesvirus-1 DNA polymerase gene. *Arch. Virol.* **98**: 27-38.
- PALMER, L.D., T.P. LEARY, D.M. WILSON et G.A. SPLITTER. 1990. Bovine natural killer-like cell responses against cell lines expressing recombinant bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *J. Immunol.* **145**: 1009-1014.
- PASTORET, P.-P, G. BURTONBOY, A. AGUILAR-SETIÉN, M. GODART, M.E. LAMY et F. SCHOENAERS. 1980. Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovid herpesvirus I) from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins. *Vet. Microbiol.* **5**: 187-192.
- 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.
- PINARD, M.-F., R. SIMARD et V. BIBOR-HARDY. 1987. DNA-binding proteins of herpes simplex virus type 1-infected BHK cell nuclear matrices. *J. Gen. Virol.* **68**: 727-735.
- PROUDFOOT, N.J. et G.G. BROWNLEE. 1976. 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**: 211-214.
- RAUH, I., F. WEILAND, F. FEHLER, G. KEIL et T.C. METTENLEITER. 1991. Pseudorabies virus mutants lacking the essential glycoprotein gIII can be complemented by glycoprotein gI of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* **65**: 621-631.
- RIJSWIJK, F.A.M., J. MAGDALENA, J. MOEDT, M.J. KAASHOEK, M.A. MARIS-VELDHUIS, A.L.J. GIELKENS et J.T. VAN OIRSCHOT. 1992. Identification and functional analysis of glycoprotein E (gE) of bovine herpesvirus type 1. *Proceedings of the 17th International Herpesvirus Workshop*, Edimbourg, p. 245.

- 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, abstract 419.
- RINALDO, C.R. 1990. Immune suppression by herpesviruses. *Annu. Rev. Med.* **41**: 331-338.
- 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.
- ROCHAIX, J.-D. et P. MALNOË. 1982. Use of DNA-RNA hybridizations for locating chloroplast genes and for estimating the size and abundance of chloroplast DNA transcripts. In *"Methods in chloroplast molecular biology"*. Edelman, M., Hallick, R., Chua, N.-H. (Ed.), Elsevier Biomedical Press, New York, pp. 477-489.
- ROCK, D.L. 1993. The molecular basis of latent infections by alphaherpesviruses. *Sem. Virol.* **4**: 157-165.
- ROCK, D.L. et D.E. REED. 1982. Persistent infection with bovine herpesvirus type 1: rabbit model. *Infect. Immun.* **35**: 371-373.
- ROCK, D.L., W. HAGEMOSER, F.A. OSORIO et D.E. REED. 1986. Detection of bovine herpesvirus type 1 RNA in trigeminal ganglia of latently infected rabbits by *in situ* hybridization. *J. Gen. Virol.* **67**: 2515-2520.
- ROIZMAN, B. 1982. The family *Herpesviridae*: general description, taxonomy, and classification. In: *"The herpesviruses"*, vol. 1. Roizman, B. (Ed.), Plenum Publishing Corp., New York, pp. 1-23.
- ROIZMAN, B. 1993. The family *Herpesviridae*: a brief introduction. In: *"The human herpesviruses"*. Roizman, B., Whitley, R.J., Lopez, C. (Ed.), Raven Press Ltd, New York, pp. 1-9.
- ROIZMAN, B. et D. FURLONG. 1974. The replication of herpesvirus. In: *"Comprehensive virology"*, vol. 3. Fraenkel-Conrat, H., Wagner, R.R. (Ed.), Plenum Press, New York, pp. 229-403.
- 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. *In: "Virology"*. Fields, B.N., Knipe, D.M., Chanock, R.M., Hirsch, M.S., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B. (Ed.), Raven Press Ltd, New York, pp. 1795-1894.
- ROIZMAN, B. et A.E. SEARS. 1993. Herpes simplex viruses and their replication. *In: "The human herpesviruses"*. Roizman, B., Whitley, R.J., Lopez, C. (Ed.), Raven Press Ltd, New York, pp. 11-68.
- ROIZMAN, B., L.E. CARMICHAEL, F. DENHARDT, G. DE-THE, A.J. NAHMIAS, W. PLOWRIGHT, F. RAPP, P. SHELDRIK, 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.
- ROSSI, C.R. et G.K. KIESEL. 1976. Antibody class and complement requirement of neutralizing antibodies in the primary and secondary antibody response of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. *Arch. Virol.* **51**: 191-198.
- ROUSE, B.T. et L.A. BABIUK. 1977. The direct antiviral cytotoxicity by bovine lymphocytes is not restricted by genetic incompatibility of lymphocytes and target cells. *J. Immunol.* **118**: 618-623.
- ROUSE, B.T. et L.A. BABIUK. 1978. Mechanisms of recovery from herpesvirus infections- a review. *Can. J. Comp. Med.* **42**: 412-427.
- ROUSE, B.T. et D.W. HOROHOV. 1984. Cytotoxic T lymphocytes in herpesvirus infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **6**: 35-66.
- ROUSE, B.T. et D.W. HOROHOV. 1986. Immunosuppression in viral infections. *Rev. Inf. Dis.* **8**: 850-873.
- RUTTEN, V.P.M.G., G.H. WENTINK, W.A.C. DE JONG, A.C.A. VAN EXSEL et E.J. HENSEN. 1990. Determination of BHV1 specific immune reactivity in naturally infected and vaccinated animals by lymphocyte proliferation assays. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **25**: 259-267.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- SAMUEL, C.E. 1991. Antiviral actions of interferon: interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology* **183**: 1-11.
- SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- SCHWYZER, M. 1993. Genome map of bovine herpesvirus 1. In: "*Genetic maps*", 6ième édition. O'Brien, S.J. (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 1.166-1.170.
- 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.
- SCHWYZER, M., U.V. WIRTH, B. VOGT et C. FRAEFEL. 1994. BICP22 of bovine herpesvirus 1 is encoded by a spliced 1.7 kb RNA which exhibits immediate early and late transcription kinetics. *J. Gen. Virol.* **75**: 1703-1711.
- SCOTT, N.A., J.M. WHALLEY, J.S. MATTICK, P.A. UNDERWOOD, L. ABOUD, K.L. WILLIAMS et P. KIRKLAND. 1988. Identification of major antigenic proteins of bovine herpesvirus 1 and their correlation with virus neutralizing activity. *Vet. Microbiol.* **16**: 109-121.
- 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.
- SHEFFY, B.E. et D.H. DAVIES. 1972. Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140**: 974-976.
- SIMARD, C. 1986. Clonage et séquençage de l'ADN complémentaire codant le précurseur de la petite sous-unité de la RUBISCO de *Chlamydomonas moewusii*. Thèse de doctorat, Université Laval.
- SIMARD, C., F. NADON, C. SÉGUIN, S. LABOISSIÈRE et M. TRUDEL. 1990. Gene mapping of infectious bovine rhinotracheitis viral DNA genome. *Arch. Virol.* **110**: 63-75.
- 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'-end transcript mapping of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from bovine herpesvirus type-1. *Virology* **190**: 689-701.
- SIMARD, C., I. LANGLOIS, D. STYGER, B. VOGT, C. VLCEK, A. CHALIFOUR, M. TRUDEL et M. SCHWYZER. (1995). Sequence analysis of the UL39, UL38 and UL37 homologues of bovine herpesvirus type 1 and expression studies of the two subunits of its ribonucleotide reductase (UL40, UL39). (en préparation).
- SMITH, G.A., P.L. YOUNG et J.S. MATTICK. 1990. The location and nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of bovine herpesvirus type 1.2. *J. Gen. Virol.* **71**: 2417-2424.
- SPEAR, P.G. 1993. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Sem. Virol.* **4**: 167-180.
- SPLITTER, G.A. et L. ESKRA. 1986. Bovine T lymphocyte response to bovine herpesvirus-1: cell phenotypes, viral recognition and acid-labile interferon production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **11**: 235-250.
- SPLITTER, G.A., L. ESKRA et A.F. ABRUZZINI. 1988. Cloned bovine cytolytic T cells recognize bovine herpes virus-1 in a genetically restricted, antigen-specific manner. *Immunology* **63**: 145-150.
- STEFFY, K.R. et J.P. WEIR. 1991. Mutational analysis of two herpes simplex virus type 1 late promoters. *J. Virol.* **65**: 6454-6460.
- STERZ, H., H. LUDWIG et R. ROTT. 1974. Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mammillitis virus. *Intervirology* **2**: 1-13.
- STEVENS, J.G. 1989. Human herpesviruses: a consideration of the latent state. *Microbiol. Rev.* **53**: 318-332.
- STRAUB, O.C. et R. AHL. 1976. Lokale interferonbildung beim rind nach intranasaler infektion mit avirulentem IBR-IPV-virus und deren wirkung auf eine anschließende infektion mit maul und klauenseuche-virus. *Zbl. Vet. Med. B.* **23**: 470-482.
- TALAVERA, A. et J.M. RODRIGUEZ. 1991. Isolation and handling of recombinant vaccinia viruses. In: *"Methods in molecular biology"*, vol. 8: Practical molecular virology: viral vectors for gene expression. Collins, M. (Ed.), Humana Press, Clifton, pp. 235-247.

- TALBOT, P.J. 1989. ELISA. In: "*Manuel de techniques virologiques*". Payment, P., et Trudel, M. (Ed.), Presses de l'Université du Québec, Québec, pp.149-153.
- TANAKA, Y., A. ISOBE, M. MASUDA, H. TOZAWA, Y. KOYANAGI, N. YAMAMOTO et H. SHIDA. 1991. Immunogenicity of human T cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) antigens for cytotoxic T lymphocytes in the rat system. *J. Immunol.* **147**: 3646-3652.
- TAYLOR, J., R. WEINBERG, B. LANGUET, P. DESMETTRE et E. PAOLETTI. 1988. Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* **6**: 497-503.
- 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.
- TIKOO, S.K., T.J. ZAMB et L.A. BABIUK. 1993. Analysis of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* **67**: 2103-2109.
- TRINCHIERI, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* **47**: 187-376.
- TRUDEL, M., F. NADON, C. SEGUIN, G. BOULAY et G. LUSSIER. 1987. Vaccination of rabbits with a bovine herpesvirus type 1 subunit vaccine: adjuvant effect of ISCOMs. *Vaccine* **5**: 239-243.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. et L.A. BABIUK. 1986a. Synthesis and processing of bovine herpesvirus 1 glycoproteins. *J. Virol.* **59**: 401-410.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. et L.A. BABIUK. 1986b. Polypeptide specificity of the antibody response after primary and recurrent infection with bovine herpesvirus 1. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 274-282.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., J. VAN DEN HURK et L.A. BABIUK. 1985. Topographical analysis of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins: use of monoclonal antibodies to identify and characterize functional epitopes. *Virology* **144**: 216-227.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., T. ZAMB et L.A. BABIUK. 1989. Synthesis, cellular location, and immunogenicity of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII expressed by recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* **63**: 2159-2168.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., G.A. GIFFORD et L.A. BABIUK. 1990. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. *Vaccine* **8**: 358-368.

- 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.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., S. GARZON, J. VAN DEN HURK, L.A. BABIUK et P. TIJSSSEN. 1995. The role of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1 in infection and immunity. *Virology* **206**: 413-425.
- VAN ENGELENBURG, F.A.C., M.J. KAASHOEK, F.A.M. RIJSEWIJK, L. VAN DEN BURG, A. MOERMAN, A.L.J. GIELKENS et J.T. VAN OIRSCHOT. 1994. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J. Gen. Virol.* **75**: 2311-2318.
- VOLKMER, H., C. BERTHOLET, S. JONJIC, R. WITTEK et U.H. KOSZINOWSKI. 1987. Cytolytic T lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus nonstructural immediate-early protein pp89 expressed by recombinant vaccinia virus. *J. Exp. Med.* **166**: 668-677.
- VOS, J.C. et H.G. STUNNENBERG. 1988. Derepression of a novel class of vaccinia virus genes upon DNA replication. *EMBO J.* **7**: 3487-3492.
- WATRACH, A.M. et H. BAHNEMANN. 1966. The structure of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Arch. Ges. Virusforsch.* **18**: 1-7.
- WEINMASTER, G.A., V. MISRA, R. MCGUIRE, L.A. BABIUK et E. DECLERCQ. 1982. Bovid herpesvirus type-1 (infectious bovine rhinotracheitis virus)-induced thymidine kinase. *Virology* **118**: 191-201.
- WHITBECK, J.C., L.J. BELLO et W.C. LAWRENCE. 1988. Comparison of the bovine herpesvirus 1 gl gene and the herpes simplex virus type 1 gB gene. *J. Virol.* **62**: 3319-3327.
- WHITBECK, J.C., W.C. LAWRENCE et L.J. BELLO. 1994. Characterization of the bovine herpesvirus 1 homolog of the herpes simplex virus 1 UL24 open reading frame. *Virology* **200**: 263-270.
- WHITTAKER, G.R., M.P. RIGGIO, I.W. HALLIBURTON, R.A. KILLINGTON, G.P. ALLEN et D.M. MEREDITH. 1991. Antigenic and protein sequence homology between VP13/14, a herpes simplex virus type 1 tegument protein, and gp10, a glycoprotein of equine herpesvirus 1 and 4. *J. Virol.* **65**: 2320-2326.
- 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.

- WIRTH, U.V., B. VOGT et M. SCHWYZER. 1991. The three major immediate-early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J. Virol.* **65**: 195-205.
- 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.
- WOHLGEMUTH, K. et J.B. HERRICK. 1986. Bovine respiratory disease complex. *Animal Health Nutrition* **October**: 26-28.
- WRIGHT, C.F. et A.M. CORONEOS. 1993. Purification of the late transcription system of vaccinia virus: identification of a novel transcription factor. *J. Virol.* **67**: 7264-7270.
- WUDUNN, D. et P.G. SPEAR. 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* **63**: 52-58.
- WYLER, R., M. ENGEL et M. SCHWYZER. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: *"Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs"*. Developments in veterinary virology, Wittmann, G. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 1-72.
- YANAGIDA, N., S. YOSHIDA, K. NAZERIAN et L.F. LEE. 1993. Nucleotide and predicted amino acid sequences of Marek's disease virus homologues of herpes simplex virus major tegument proteins. *J. Gen. Virol.* **74**: 1837-1845.
- YAO, Z., W. JACKSON, B. FORGHANI et C. GROSE. 1993. Varicella-zoster virus glycoprotein gpl/gpIV receptor: expression, complex formation, and antigenicity within the vaccinia virus T7 RNA polymerase transfection system. *J. Virol.* **67**: 305-314.
- 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.
- YUEN, L. et B. MOSS. 1987. Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of vaccinia virus early genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6417-6421.
- ZHANG, Y. et J.L.C. MCKNIGHT. 1993. Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression. *J. Virol.* **67**: 1482-1492.

- ZHANG, Y., D.A. SIRKO et J.L.C. MCKNIGHT. 1991. Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in α TIF-mediated transcriptional induction: characterization of three viral deletion mutants. *J. Virol.* **65**: 829-841.
- ZHOU, J., A. MCINDOE, H. DAVIES, X.-Y. SUN et L. CRAWFORD. 1991. The induction of cytotoxic T-lymphocyte precursor cells by recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus type 16 L1. *Virology* **181**: 203-210.
- ZUCKERMANN, F.A., T.C. METTENLEITER, C. SCHREURS, N. SUGG et T. BENPORAT. 1988. Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication. *J. Virol.* **62**: 4622-4626.

ANNEXE I

Simard, C., F. Nadon, C. Séguin, S. LaBoissière et M. Trudel. 1990. Gene mapping of infectious bovine rhinotracheitis viral DNA genome. Arch. Virol. **110**: 63-75.

Gene mapping of infectious bovine rhinotracheitis viral DNA genome

Claire Simard, Francine Nadon, Cécile Séguin, Sylvie LaBoissière, and M. Trudel

Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval,
Québec, Canada

Accepted October 10, 1989

Summary. A bovine herpesvirus I (BHV-I) *Hind*III genomic bank spanning 89% of the entire genome was constructed and individual fragments analyzed for their capacity to select specific mRNAs which were then expressed by in vitro translation assays. This procedure allowed the mapping of more than 20 viral polypeptides to discrete regions of the DNA genome. Some polypeptides map in neighboring *Hind*III fragments while most seem encoded in single fragments. In particular, the coding sequences for an abundant 94 kDa polypeptide, which is the potential unglycosylated precursor of gII glycoprotein, have been assigned to the small 3.6 kbp *Hind*III genomic fragment M. The localization of structural and non-structural gene-coding sequences will help to characterize viral polypeptides and eventually, a better understanding of BHV-I infection will be gained.

Introduction

Bovine herpesvirus I is an alphaherpesvirus and has been associated with a variety of clinical syndromes in cattle. BHV-I infection causes principally severe respiratory tract diseases but also vulvovaginitis, abortions, encephalitis, conjunctivitis and generalized systemic infections. Viral strains associated with respiratory or genital diseases have been referred to as infectious bovine rhinotracheitis (IBR) or infectious pustular vulvovaginitis (IPV) viruses, respectively [9, 20, 21].

The genome of BHV-I is a 137 kbp linear double-stranded DNA [15] which is divided into a long (L) and a short (S) segment; the latter is flanked by inverted repeat sequences and can invert its orientation relative to the L component to yield two isomeric forms [6]. BHV-I specifies more than 25 structural polypeptides of which probably 11 are glycosylated [2, 16]. The major glycoproteins are gI, a 130 kDa protein constituted of 74 and 55 kDa subunits, gII, a 108 kDa polypeptide, gIII, a 90 kDa protein, and gIV, a 71 kDa protein

[3, 5, 26]. Glycoproteins, being located on the viral envelope and on the surface of virus-infected cells [8, 17, 28], play important roles during viral infection such as recognizing receptor sites for attachment and penetration of virus in cells. Hemagglutinating activity of several BHV-I strains has been reported [23] and this function assigned to gIII glycoprotein [24].

Until recently, BHV-I research was mainly directed toward classification of virus isolates, characterization of viral polypeptides using electrophoretic analysis, restriction endonucleases analysis of viral DNA, cross-reactivity of specific antibodies, etc. At present, very little is known concerning the genomic organization of the virus: only the coding sequences for gI, gIII and gIV major glycoproteins and for the DNA polymerase and thymidine kinase enzymes have been precisely located on the DNA genome [1, 11, 18, 19, 25, 29]. In this study, we used translations of mRNAs selected by hybridization to the DNA of individual *Hind*III genomic fragments to construct a physical map of IBR viral genome. This procedure allowed the mapping of several polypeptides in discrete regions of the genome; in particular, we present evidence that gII glycoprotein coding sequences are located in the small 3.6 kbp *Hind*III fragment M.

Material and methods

Virus and cells

Strain #34 of IBR, a field isolate, was kindly provided by Dr. Mitchell (Gouvernement du Canada, Lethbridge, Alberta): this isolate is related to the Colorado strain, based on restriction endonuclease and serological analysis. Virus was cultured in confluent monolayer sheets of ovine kidney (OK) cell line as described previously [24].

Specific IBR serum

The preparation of polyvalent serum directed against IBR virus has already been described [24].

Purification of viral DNA and construction of genomic bank

Viral supernatant was concentrated by ultracentrifugation through a 5 ml cushion of 40% sucrose in TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl). The pellet was resuspended in TEN and digested for 1 h at 37°C with 50 µg DNase/ml and 50 µg RNase A/ml, in presence of 10 mM MgCl₂, to eliminate cellular nucleic acid contaminants. DNase was then inhibited by adding a 0.02 volume of 500 mM EDTA, the viruses were lysed with 1% SDS (final) and proteins digested with 250 µg proteinase K/ml for 1 h at 37°C. The mixture was extracted 3–4 times with phenol:CHCl₃:isoamylalcohol (24:24:1) and the viral DNA was precipitated with ethanol, collected with a Pasteur pipette, washed with 70% ethanol, briefly dried and redissolved in TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

Purified viral DNA was digested with *Hind*III and generated fragments were ligated with dephosphorylated *Hind*III linearized pKS+ prophage DNA (Stratagene, California, U.S.A.), using standard procedures [13]. Recombinant molecules were used to transform *E. coli* XL1-Blue competent cells.

Purification of mRNA

IBR or mock-infected OK cells were collected at 6, 12, 18, or 24 h post-infection and total RNA was purified using the guanidine isothiocyanate method [4]. PolyA⁺ mRNAs were isolated by oligo(dT)cellulose chromatography [13].

Hybrid-selected translation

Each selected recombinant plasmidic DNA (10–20 µg) was *Hind*III digested and fractionated in preparative 0.3% or 1% agarose gels, depending on the length of inserted DNA, in the presence of ethidium bromide. After separation of genomic and vector DNA, the former was electroeluted by perpendicular migration on 1 × 1 cm Hybond-N membrane (Amersham Canada Ltd, Oakville, Ontario) inserted in agarose at one extremity of the band; the binding of DNA on membrane was assessed by visualization under UV light. The membranes were air-dried and DNA covalently linked to the filter by UV light exposure for 4 min. To release unlinked DNA molecules, membranes were individually washed 3 times with 0.4 N NaOH at 42 °C, then with water until pH neutrality. The membranes were assembled and incubated at 42 °C, for 4–6 h in 2 ml vial containing 1.5 ml of prehybridization solution (50% recrystallized formamide, 0.5 M NaCl, 20 mM Pipes pH 6.4, 1 mM EDTA, 0.2% SDS and 100 µg/ml of polyA). PolyA⁺-mRNA (80 µg) isolated from IBR-infected cells (24 h post-infection) were denatured 30 min at 45 °C in 0.75 ml of 67% formamide, 1.4 mM EDTA and 0.27% SDS, after which 80, 100, and 70 µl of 250 mM Pipes pH 6.4, 5 M NaCl and H₂O, respectively, were added. Membranes were transferred in hybridization solution and incubated at 42 °C, overnight. The next day, unbound mRNAs were recovered by ethanol precipitation and hybridized membranes washed in batch, twice with 5 ml of 2 × SSC, 0.5% SDS at room temperature for 10 min, 3 times with 1 × SSC, 0.25% SDS at 37 °C for 20 min and 3 times with 0.1 × SSC, 2 mM EDTA at room temperature for 2–3 min. They were briefly dried and individually placed in the bottom of 1.5 ml centrifuge tubes. Bound mRNAs were eluted in 50 µl of water by boiling 1 min and quickly freezing in a dry ice/ethanol bath (30 s); tubes were then transferred on ice and opened. Frozen membranes were raised up with yellow tips in such a way that capping of the tube could hold them in position. Eluates were recovered by full spin for 1 min and conserved at –70 °C. When needed, five µl of mRNA eluates were directly used in rabbit reticulocyte lysate translation assays (Gibco/BRL Canada, Burlington, Ontario or Bio/Can Scientific Inc., Mississauga, Ontario). Synthesized polypeptides were analysed on 10% or 10–15% SDS polyacrylamide gels, according to the method of Laemmli [10].

Results

Construction of genomic IBR bank

In order to better characterize bovine herpesvirus-1, viral proteins were mapped on the viral DNA genome. One of the best ways to achieve this is by translation of hybrid-selected mRNA, as was demonstrated with Epstein-Barr virus [22]. For this purpose, an IBR genomic bank was constructed in pKS⁺ plasmid DNA, using *Hind*III restriction endonuclease. Clones were identified by parallel electrophoretic analysis of *Hind*III digests of recombinant plasmid DNA and viral DNA; to be certain of the identification of each clone and also to discriminate clones containing comigrating genomic fragments, double digests with *Hind*III and either *Hpa*I, *Bam*HI, or *Eco*RI were examined for the presence of DNA fragments of the expected sizes (results not shown) [15]. All but N, F,

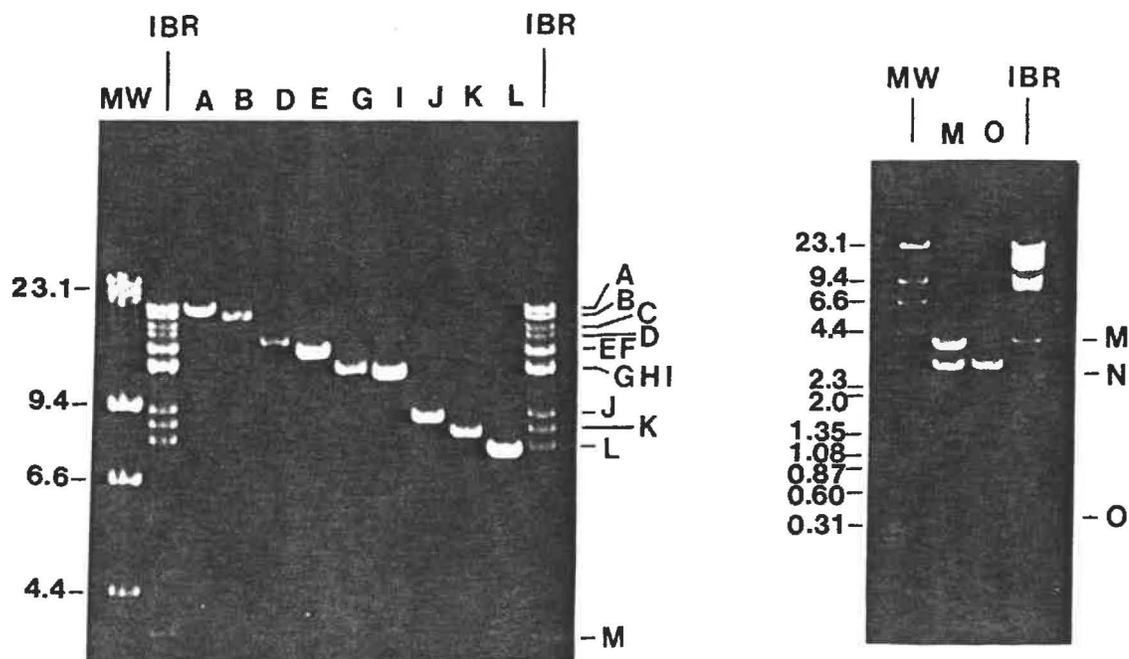


Fig. 1. Analysis of *Hind*III digested IBR genomic DNA and corresponding cloned DNA fragments. Purified genomic (*IBR*) and recombinant plasmidic DNA *A* pKS/Ahd, *B* pKS/Bhd, *D* pKS/Dhd, *E* pKS/Ehd, *G* pKS/Ghd, *I* pKS/Ihd, *J* pKS/Jhd, *K* pKS/Khd, *L* pKS/Lhd, *M* pKS/Mhd, and *O* pKS/Ohd were *Hind*III digested and analysed in 0.5% agarose gel. Genomic DNA fragments are identified at the right of the figure. Molecular weight standards (*MW*) of λ *Hind*III and $\phi \times 174$ -*Hae*III are indicated in kbp

H (which are located at the ends of the linear viral genome), and C fragments generated with restriction endonuclease *Hind*III have been cloned (Fig. 1). Surprisingly, the migration of the inserted fragment in the clone identified as "D" (Fig. 1, lane D) is slightly faster than the parental fragment D (see below).

As noted by Mayfield et al. [15], genomic clones containing *Hind*III fragment C and D are difficult to obtain, possibly due to the presence of repetitive sequences within these fragments: their unique clone containing fragment D also contained fragment L and, as was the case here, they were unable to clone fragment C. In the present study, a clone containing a single insertion which migrates between fragments D and E/F (Fig. 1, lane D) was suspected to contain fragment D, based on double digestion analysis and was further examined. The inserted DNA was labelled *in vitro* and hybridized on Southern blot of *Hind*III digests of IBR viral DNA and recombinant plasmid DNA pKS/Bhd, pKS/Dhd, and pKS/Ehd (containing B, "D", and E genomic fragments, respectively): the labelled fragment only hybridized with itself and with the viral DNA region containing C/D fragments (results not shown). This experiment, along with hybrid-selection of mRNA (see below) ascertained that the insert contained in

this recombinant plasmid DNA is fragment D. That the inserted DNA is slightly smaller than viral fragment D may be explained assuming an *in vivo* rearrangement in *E. coli* cells resulting in a deletion, due to repetitive sequences.

Analysis of in vitro translated viral polypeptides

Translation of mRNAs extracted from cells at different time-points after mock and IBR-infection was used to determine the optimum time at which mRNA should be extracted for hybrid-selection and also to discriminate viral versus host polypeptides. No difference was observed between synthesized polypeptides with mRNA from mock-infected cells, extracted 6 or 24 h post-infection (Fig. 2). The comparison of polypeptides obtained from host-mRNA with those synthesized with mRNA from IBR-infected cells was, however, quite significant:

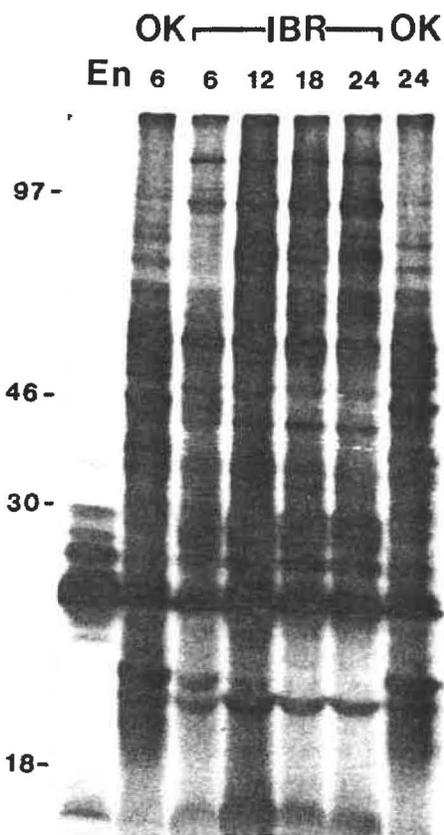


Fig. 2. Comparison of *in vitro* synthesized polypeptides with mRNA extracted from mock-infected and IBR-infected OK cells. PolyA + mRNA from mock-infected (*OK*) and IBR-infected (*IBR*) OK cells were extracted at 6, 12, 18, and 24 h post-infection and translated in rabbit reticulocyte lysate (Gibco, Ont., Canada). Polypeptides were analysed in denaturing 10% polyacrylamide gel. *En* Endogeneous products. Molecular weights of standards are indicated in kDa

in the latter, new polypeptides appeared and most of host-polypeptides were either absent or disappeared with time after infection with IBR virus. Particularly, major polypeptides of 50, 48, and 36 kDa as well as minor proteins of 97, 95, 81, 74, 68, 58, 51, 41, and 38 kDa were synthesized with mRNA from mock-infected cells but were completely absent from translations with mRNA extracted from IBR-infected cells at 6, 12, 18, or 24 h post-infection. Furthermore, host polypeptides of 44 and 20 kDa were synthesized in decreasing quantities with mRNA from 6 and 12 h post-infection with IBR and were absent from translations with mRNA extracted at 18 or 24 h post-infection with IBR; a similar observation was noted for 84 and 30 kDa polypeptides which were absent from translations with mRNA extracted at 12, 18, and 24 h post-infection with IBR.

We thus found only 6 polypeptide bands (MW of 89, 67, 66, 60, 54, and 19 kDa) that were obtained with mRNA extracted from mock-infected as well as IBR-infected cells; these polypeptides may either correspond to host or to viral proteins as they may contain comigrating viral and host polypeptides. In the case of 66, 60, and 54 kDa bands, viral polypeptides are probably present since intensity of the bands increased at 6 or 12 h post-infection with IBR compared to the two mock-infected controls. These results showed that most of the polypeptides resolved in IBR lanes belong to IBR virus.

In vitro translations of mRNA extracted at 6, 12, 18, and 24 h post-infection with IBR showed that the amount of synthesis of the majority of individual polypeptides obtained seemed constant over the infection period studied: this is the case for 150, 140, 100, 93, 82, 54, 45, 32, and 27.5 kDa proteins. However, the amount of 77, 66, 60, 40, and 28.5 kDa polypeptides increased at 12 compared with 6 h post-infection with IBR and this observation is specially evident with the 77 kDa polypeptide which is totally absent 6 h post-infection but quite abundant at 12. Seeing that some viral polypeptides were more abundantly synthesized at 12–24 h after IBR infection but that no decrease was observed during this period, 24 h was chosen for infection time before extraction of mRNAs that were used for hybrid-selection.

In consideration of the previous findings, the mapping of viral polypeptides, to *Hind*III fragments by translation of hybrid-selected mRNAs was first performed directly (without subsequent immunoprecipitation) in order to map non-structural as well as structural polypeptides and also to eliminate the possibility that some non immunogenic proteins and others in insufficient quantity to be detected, would be missed.

Translation of hybrid-selected mRNA

*Hind*III DNA fragments contained in recombinant plasmid DNA and plasmid pKS vector (negative control) were covalently fixed to nylon membranes and hybridized to mRNA extracted from IBR-infected cells. After washing and elution, complementary mRNAs were translated in vitro and synthesized prod-

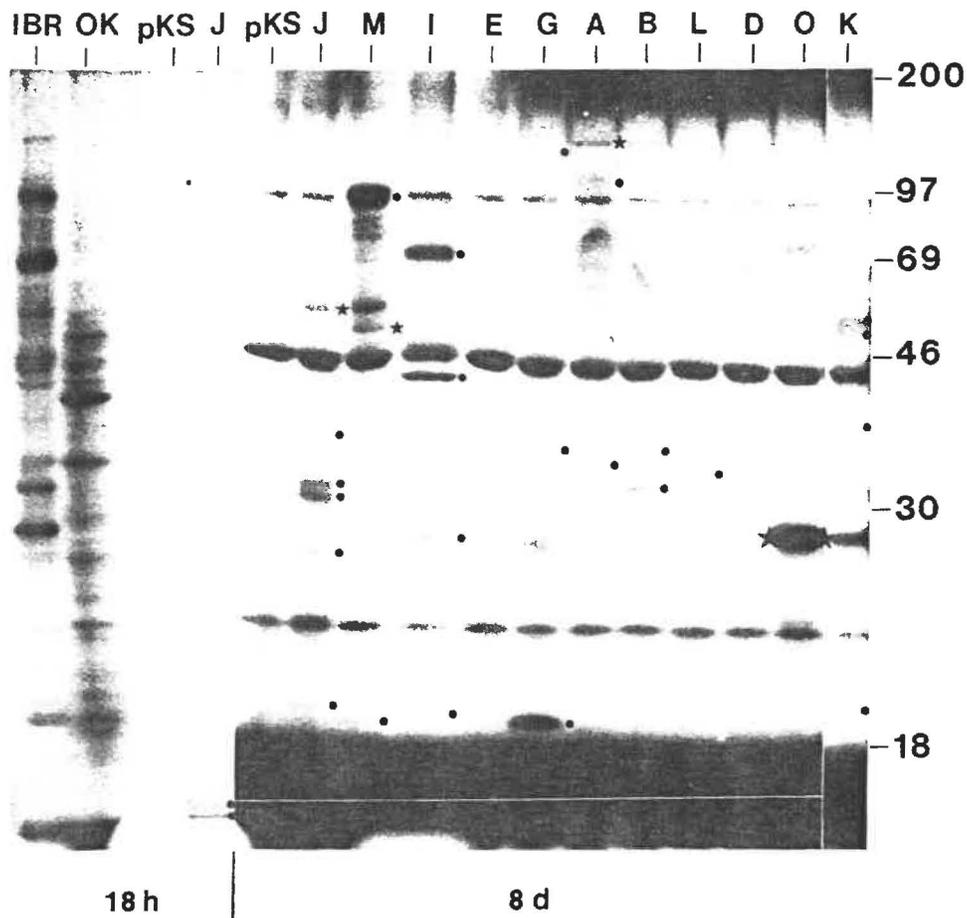


Fig. 3. Hybrid-selected translations of mRNA. mRNA isolated from IBR-infected OK cells at 24 h post-infection were hybridized to the purified IBR-*Hind*III fragments A, B, D, E, G, I, J, K, L, M, and O and also to the pKS+ vector DNA. After washing and elution, bound mRNA from the corresponding genomic DNA fragment (A-O, pKS) as well as total polyA+ mRNA isolated from mock-infected (OK) and IBR-infected (IBR) cells were translated in vitro and synthesized polypeptides were analysed in denaturing 10–15% polyacrylamide gel. The fluorographed gel was exposed 18 h (18 h) and 8 days (8 d). ●, ★ Polypeptides mapping in single and neighboring genomic fragments, respectively. Molecular weights of standards are indicated in kDa

ucts analysed on SDS-polyacrylamide gel (Fig. 3); for easier interpretation, translations were analysed by ordering fragments as they appear in the viral genome.

By comparison with the negative control (which corresponds to endogenous products of the translation system, Fig. 3, lanes pKS), more polypeptides were synthesized with mRNA selected by individual fragment DNA (except fragment E, lane E) and each protein profile obtained differed from others. Furthermore, each polypeptide synthesized with hybrid-selected mRNA had a corresponding product obtained by translation of total viral mRNA (Fig. 3, lane IBR). Also,

all polypeptides seen in the latter were eventually synthesized with mRNA complementary to one or an other fragment. On the other hand, all polypeptides appearing in translation with mock-infected (Fig. 3, lane OK) but not those with IBR-infected (lane IBR) mRNAs were never synthesized with hybrid-selected mRNAs and the common bands in lanes IBR and OK were either synthesized or not after hybrid-selection with the respective coding fragments, depending on the presence of viral polypeptides in the respective band (note that coding sequences may also be contained in N, F, H, and C uncloned fragments). These important observations assure the specificity of mRNA hybridization with DNA fragments.

Polypeptides mapping in single HindIII fragment

Most viral proteins seemed to be encoded by single *HindIII* fragment (black dots in Fig. 3; Fig. 4), since they are not visualized in juxtaposed fragments. However, for these polypeptides the possibility exists that a fraction of the respective genes, that would be too small for efficient hybridization, be present in the left or right neighbours of the respective coding fragment. Furthermore, the coding sequences for some polypeptides mapping within the J or K fragments, could extend through the N or C/H/F fragments, respectively, as these fragments were not cloned nor analysed in this study (see map in Fig. 4). Keeping in mind these reservations, polypeptides of 36.5, 32, 31, 27, 20, 15.5, and 15.0 kDa mapped in the 9.0 kbp fragment J; after few days exposure to X-ray film, the 15.5 and 15.0 kDa proteins were hidden by unincorporated ³⁵S-methionine background but were well resolved after 18 h (Fig. 3).

Polypeptides of 94 and 19 kDa mapped in the 3.6 kbp M fragment. Abundant 74 kDa polypeptide mapped in the 11.7 kbp fragment I, along with 43, 28.5, and 19.5 kDa proteins. For its part, G fragment (11.9 kbp) encoded 120 (which corresponds to 140 kDa protein in Fig. 2), 34.5, 28, and 19 kDa polypeptides. Proteins of 105, and 33.5 kDa mapped in the A fragment and 34 and 31.5 kDa proteins, in B. A 33 kDa polypeptide (evident on R-X film) mapped in the 7.7 kbp fragment L and finally, 55, 52, 38, and 20 kDa polypeptides mapped in the 8.4 kbp fragment K.

Polypeptides mapping in neighboring HindIII fragments

Few proteins mapped in two neighboring fragments: gene sequences for these polypeptides contained a *HindIII* restriction site. The 59 kDa protein is encoded in the right and left parts of J and M fragments, respectively. The 52 kDa polypeptide seemed to be encoded at the 3' end of fragment M and the 5' end of fragment I, although most of the coding sequence was contained in the former. The 130 kDa polypeptide (which corresponds to 150 kDa in Fig. 2) was encoded by fragments A and B; this was the larger polypeptide resolved after *in vitro* translation with mRNA from IBR-infected cells.

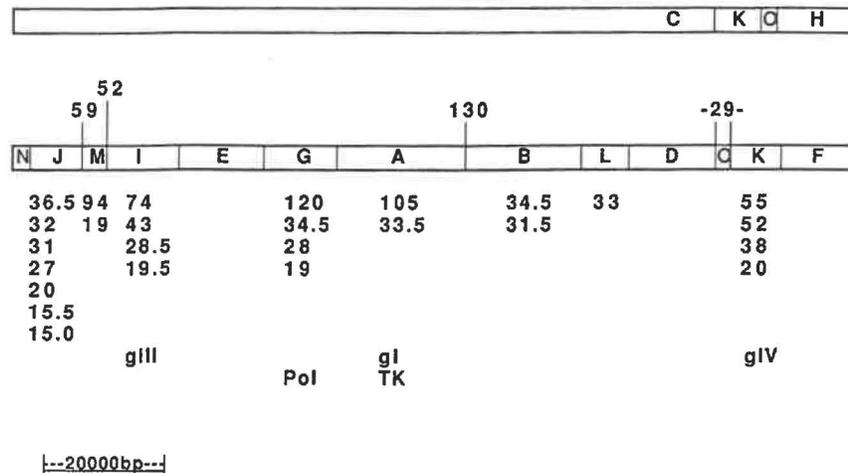


Fig. 4. Physical map of IBR DNA viral genome. *Hind*III restriction map of IBR (Cooper strain) is from Mayfield et al. [15]. Molecular weights of viral proteins are in kDa: polypeptides encoded within single genomic fragment are indicated below the respective coding fragment and those encoded by neighboring fragments, above the respective *Hind*III restriction site. The previous mapping of gI [11], gIII, and gIV [29] major glycoproteins and of DNA polymerase (*Pol*) [19] and thymidine kinase (*TK*) [1] genes on the viral genome is indicated

Finally, a polypeptide of 29 kDa mapped in the three neighboring fragments D, O, and K. As the intensity of the band in lane D is weak, it is possible that D sequences homologous with hybridized mRNA mainly corresponded with a non-coding region of the gene. The fragment O (400 bp) and the 5' end of fragment K (8.4 kbp) shared most coding sequences of the 29 kDa protein. These results confirmed that the recombinant pKS/Dhd contained the *Hind*III fragment D since ordering of terminal fragments in the genome is D-O-K-F or C-K-O-H (see Fig. 4); if the inserted fragment were fragment C, only a large intron in fragment K could explain why translational mRNA for the 29 kDa polypeptide hybridizes with C, K, and O. A physical map compiling our results is presented in Fig. 4.

The products of translation assays were immunoprecipitated with polyvalent serum directed against purified IBR virus. After electrophoresis, a few bands present in Fig. 3 disappeared (results not shown): 20 kDa protein in J, 19.3 kDa in M, 120 and 34.5 kDa in G, 130 kDa in A/B, and 33 kDa in L. These polypeptides could correspond to non-structural viral polypeptides although the quantity of immunoprecipitated proteins may also have been too small to be detected.

Discussion

Most polypeptides that are synthesized *in vitro* with mock-infected mRNA are absent from translations with mRNA extracted from IBR-infected cells at 6, 12, 18, and 24 h post-infection (Fig. 2). These results suggest that either host

mRNA transcription is inhibited quickly after IBR infection or host mRNAs are less efficiently translated *in vitro* than viral mRNAs. However, since the synthesis of some host polypeptides is only absent in translations with mRNA extracted from IBR-infected cells at 12 to 18 h or more post-infection (that is mRNA are efficiently translated at 6 or 12 h), it is most probable that transcription of host mRNAs is inhibited following IBR infection. Certainly, these *in vitro* experiments may not reflect the *in vivo* effect but they nevertheless point out the severity of the cellular injury caused by IBR virus.

Using translation of mRNA selected by hybridization with IBR *Hind*III fragments, several viral polypeptides were mapped in discrete regions of the DNA genome: most are encoded in single and few in neighboring *Hind*III fragments (Fig. 4). Coding sequences for viral polypeptides are distributed on all fragments examined with the exception of E for which no translatable mRNA has been selected. Excluding results obtained with fragment M, the coding capacity in each fragment is sufficient for encoding the size and number of polypeptides we have mapped in each. The small 3.6 kbp fragment M could not encode all the polypeptide bands seen in lane M of Fig. 3 and due to the presence of smear in the range of 72 to 86–88 kDa, faint and ill-defined bands of 86, 80, and 72 kDa were considered uncompleted products. The number and size of the polypeptides mapped to fragment M (Fig. 4) suggest that both strands of the DNA encode polypeptides.

Proteins with slightly differing MW which map in the same genomic fragment (e.g., 15.0 and 15.5 kDa polypeptides in lane J) could be the result of incorrect initiation or termination during translation [14]. Some polypeptides with the same MW map in distal regions of the viral genome (e.g., 34.5 kDa polypeptides in fragment G and B and 19 kDa proteins in M and G fragments); these polypeptides probably are independent IBR proteins although translational mRNA could be spliced and exons located in the different fragments.

Some polypeptides should be immature forms of viral glycoproteins as the glycosylation process is inefficient in the rabbit reticulocyte system. In an attempt to correlate precursor proteins with their mature forms, translations of hybrid-selected mRNA were assayed in the presence and in the absence of canine pancreatic microsomal membranes. In both cases, no variation in the migration of synthesized polypeptides was noted, with the exception of the 55 kDa polypeptide encoded within *Hind*III fragment K which resulted in a smear ranging from 55 to 70 kDa (results not shown).

Recently, using homologous hybridization probes or marker rescue experiments, the coding sequences for gI (130 kDa), gIII (90 kDa), and gIV (71 kDa) major IBR glycoproteins, were located in the A, I, and K *Hind*III fragments, respectively [18, 25, 29]; thus far, the fourth major glycoprotein of IBR, gII (108 kDa) has not been mapped. The molecular weights of unglycosylated precursors for gI, gII, gIII, and gIV have already been reported to be 105, 90, 61, and 58 kDa, respectively [27]. The 105 and 55 kDa polypeptides synthesized from mRNA selected with A and K *Hind*III fragments should correspond to

unglycosylated precursors for the gI and gIV glycoproteins, respectively. This is supported by the fact that *in vitro* processing of the 55 kDa polypeptide resulted in a 55–70 kDa smear (see above).

The 74 kDa protein synthesized with mRNA selected by the I fragment is probably a unglycosylated precursor for gIII glycoprotein. Indeed, coding sequences for gIII glycoprotein have been precisely located to 2.4 kbp *Bam*HI-*Eco*RI fragment present in fragment I [7, 29]. Translation of mRNA hybrid selected with this 2.4 kbp *Bam*HI-*Eco*RI fragment resulted in a 74 kDa protein (results not shown); the difference in MW from the one reported may either be strain related or due to partial post-translational modification *in vitro* or to difference in electrophoretic resolution. Interestingly, no synthesis of this polypeptide has been observed in translation of mRNA extracted 6 h post-infection with IBR (see 77 kDa protein in Fig. 1, lane 6/IBR) which correlates well with its previous designation as a gamma protein ([12], GVP9 polypeptide in [16]). In fact, it has been shown that gIII glycoprotein only appears, *in vivo*, by 8 h after IBR infection [27].

No other polypeptide than the 94 kDa protein synthesized in lane M of Fig. 4 could correlate with the reported MW for a gII unglycosylated precursor. This observation along with the abundance of the polypeptide obtained suggest that gII glycoprotein is encoded by *Hind*III fragment M. However, this hypothesis must be ascertained by subsequent experiments such as immunoprecipitation with specific antibodies or sequence determination.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (90-EQ-3021).

References

1. Bello LJ, Whitbeck JC, Lawrence WC (1987) Map location of the thymidine kinase gene of bovine herpesvirus-1. *J Virol* 61: 4023–4025
2. Bolton DC, Chung Zee Y, Ardans AA (1983) Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 8: 57–68
3. Chang LWS, Zee YC, Pritchett RF, Ardans AA (1986) Neutralizing monoclonal antibodies directed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Arch Virol* 88: 203–215
4. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294–5304
5. Collins JK, Butcher AC, Riegel CA, McGrane V, Blair CD, Teramoto YA, Winston S (1984) Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus 1. *J Virol* 52: 403–409
6. Farley JE, Skare IB, Skare J (1981) Inverted repeat sequences in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. In: Nahmias AJ, Dowdle WR, Schinazi RF (eds) *The human herpesviruses, an interdisciplinary perspective*. Elsevier, New York, p 590
7. Fitzpatrick DR, Zamb T, Parker MD, van Drunen Littel-van den Hurk S (1988) Expression of bovine herpesvirus 1 glycoproteins gI and gIII in transfected murine cells. *J Virol* 62: 4239–4248

8. Glorioso JC, Smith JW (1977) Immune interactions with cells infected with herpes simplex virus: antibodies to radioiodinated surface antigens. *J Immunol* 1: 114–121
9. Kahrs RF (1977) Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J Am Vet Med Assoc* 171: 1055–1064
10. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685
11. Lawrence WC, D'Urso RC, Kundel CS, Whitbeck JC, Bello LJ (1986) Map location of the gene for a 130,000 dalton glycoprotein of bovine herpesvirus 1. *J Virol* 60: 405–414
12. Ludwig GV, Letchworth III GJ (1987) Temporal control of bovine herpesvirus 1 glycoprotein synthesis. *J Virol* 61: 3292–3294
13. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
14. Marsden HS, Haarr L, Preston CM (1983) Processing of herpes simplex virus proteins and evidence that translation of thymidine kinase mRNA is initiated at three separate AUG codons. *J Virol* 46: 434–445
15. Mayfield JE, Good PJ, Vanoort HJ, Campbell AR, Reed DE (1983) Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J Virol* 47: 259–264
16. Misra V, Blumenthal RM, Babiuk LA (1981) Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). *J Virol* 40: 367–378
17. Misra V, Gilchrist JE, Weinmaster G, Qualtiere L, Van den Hurk S, Babiuk LA (1982) Herpesvirus-induced “early” glycoprotein. Characterization and possible role in immune cytolysis. *J Virol* 43: 1046–1054
18. Misra V, Nelson R, Smith M (1988) Sequence of a bovine herpesvirus type-1 glycoprotein gene that is homologous to the herpes simplex gene for the glycoprotein gB. *J Virol* 62: 4239–4248
19. Owen LJ, Field HJ (1988) Genomic localization and sequence analysis of the putative bovine herpesvirus-1 DNA polymerase gene. *Arch Virol* 98: 27–38
20. Pastoret PP, Thiry E, Brochier B, Derboven G (1982) Bovine herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann Rech Vét* 13: 221–235
21. Pauli G, Darai G, Storz J, Ludwig H (1981) IBR/IPV viruses: genome structure and disease. *Med Microbiol Immunol* 169: 129
22. Seibl R, Wolf H (1985) Mapping of Epstein-Barr virus proteins on the genome by translation of hybrid-selected RNA from induced P3HR1 cells and induced Raji cells. *Virology* 141: 1–13
23. Trépanier P, Séguin C, Bastien Y, Boulay G, Lussier G, Trudel M (1985) Hemagglutinating activity associated with bovine herpesvirus type 1. *Vet Microbiol* 10: 517–523
24. Trudel M, Séguin C, Nadon F, Boulay G, Trépanier P, Lussier G (1987) Hemagglutination inhibition and virus neutralizing response of rabbits inoculated with bovine herpesvirus 1 subunit vaccine. *Vet Microbiol* 13: 107–119
25. Whitbeck JC, Bello LJ, Lawrence WC (1988) Comparison of the bovine herpesvirus-1 gI gene and the herpes simplex virus type-1 gB gene. *J Virol* 62: 3319–3326
26. van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA (1985) Effect of tunicamycin and monensin on biosynthesis, transport, and maturation of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins. *Virology* 143: 104–118
27. van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA (1986) Synthesis and processing of bovine herpesvirus 1 glycoproteins. *J Virol* 59: 401–410
28. van Drunen Littel-van den Hurk S, Van den Hurk JV, Gilchrist JE, Misra FV, Babiuk LA (1984) Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties. *Virology* 135: 466–479

29. Zamb T (1988) Identification of the genes encoding the major immunogenes of BHV 1: the mapping subcloning and expression in foreign systems of the gB, gC, and gD gene homologs. 13TH International Herpesvirus Workshop, UCI, Irvine, California

Authors' address: Dr. Claire Simard, Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Case Postale 100, Laval, Québec H7V 1B7, Canada.

Received August 18, 1989

ANNEXE II

Simard, C., S. LaBoissière, C. Séguin et M. Trudel. 1991. Genomic heterogeneities in bovine herpesvirus 1 viral isolates: a major variant selected from a field isolate. *Intervirology* **32**: 117-126.

Genomic Heterogeneities in Bovine Herpesvirus Type 1 Viral Isolates: A Major Variant Selected from a Field Isolate

Claire Simard, Sylvie LaBoissière, Cécile Séguin, Michel Trudel

Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Ville de Laval, Qué., Canada

Key Words. BHV-1/IBR virus · Restriction profiles · Genomic variations · Insertional mutant

Summary. We have analyzed viral DNA patterns, obtained following digestion of six different infectious bovine rhinotracheitis isolates, using a panel of restriction enzymes. Several differences in profiles were observed, particularly for a Canadian viral strain which presumably contained a genome that was larger than the other five infectious bovine rhinotracheitis genomes. Also, an insertion/deletion of a *Hind*III restriction site was found in the DNA of a Danish strain; this additional *Hind*III site was localized precisely within the original *Hind*III E fragment of the infectious bovine rhinotracheitis virus. Interestingly, results could be used to distinguish each viral strain examined from the others by simple digestion with the appropriate enzyme.

Introduction

Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is associated with a wide variety of clinical manifestations such as respiratory diseases, genital infections, ocular carcinoma, encephalitis, and abortion [1]. BHV-1 is a member of the alphaherpesvirinae subfamily [2]. The viral genome is a 136-kbp linear double-stranded

Address inquiries to: Dr. Claire Simard, Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval des Rapides, Ville de Laval, Qué. (Canada) H7V 1B7

DNA which is composed of long and short unique segments and two inverted repeats. The short-segment region situated between the inverted repeats occurs in two alternative orientations relative to the long segment, resulting in the existence of two isomeric forms [3].

In an effort to differentiate BHV-1 clinical isolates, their polypeptide profiles, antigenic characteristics, and genomic restriction endonuclease patterns have been compared [2, 4-10]. It generally is accepted that BHV-1 isolates are divided into three types/subtypes [6, 9]. Strain I is referred to as infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus, and the associated reference strain is the Colorado

Received: February 9, 1990

Accepted: June 8, 1990

(or Cooper) isolate. Strain II is referred to as infectious pustular vulvovaginitis virus, and the reference strain is the K-22 isolate. Finally, strain III, which includes N569 and A663 isolates [11, 12], has been found to exhibit neuropathogenic effects. Mayfield et al. [13] presented restriction maps for *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, and *HpaI* enzymes of the Colorado strain and compared them to those of the K22 isolate.

Investigations [5, 7] suggest that the IBR group is very homogeneous. By restriction endonuclease analysis, only one fragment (the *EcoRI* fragment C) is found to be heterogeneous in size within the strain I isolates examined [7]. Furthermore, several authors have used restriction endonuclease analysis to compare various isolates of BHV-1 [5, 6, 8-10, 14-17], and no difference was noted between the IBR isolates. However, the restriction enzymes used in these studies were mainly *HindIII*, *BamHI*, *HpaI*, and *EcoRI*, for which there are very few restriction sites (12, 8, 6, and 6, respectively) [13] in the IBR genome. With respect to the entire genome, the total number of nucleotides involved in the comparative analysis was 192 (32 total sites \times 6 nucleotides/site) which only represents 0.14% of the whole genome. Even though restriction fragment lengths were similar throughout the isolates, the inference of homogeneity of the IBR genomes was based on a small proportion of conserved viral DNA.

The purpose of the present study was to pursue previous investigations by comparing and analyzing restriction endonuclease patterns of six different IBR isolates, using a more elaborate panel of enzymes. With this approach, restriction fragment length polymorphisms were frequently observed between the isolates examined. Furthermore, a major variant selected from a field isolate

was found to contain a genome that was possibly 45-50 kbp larger than the others. Finally, an insertion/deletion *HindIII* cleavage site was found in the viral DNA of a Denmark strain and was localized within the original *HindIII* genomic fragment E of IBR virus.

Materials and Methods

Viruses and Cell Cultures

English and Danish BHV-1 field isolates were kindly supplied by Dr. Edwards (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Weybridge, Surrey, England) and Dr. Hoff-Jørgensen (Statens Veterinære Serumlaboratorium, Copenhagen, Denmark), respectively. Two Canadian field isolates were provided by Dr. Darcel (Agriculture Canada, Lethbridge, Alta., Canada; isolate No. 34) and by Dr. Thorsen (Department of Veterinary Microbiology and Immunology, University of Guelph, Ont., Canada; isolate No. 2116). A third Canadian strain was isolated at the Institut Armand-Frappier, cloned in our laboratory, and named IAF-2F. The Los Angeles strain (ATCC VR-188) of IBR virus was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md., USA). Note that a remarkable similarity was previously found in biological, serological, and biochemical analysis of the European viral strains [18].

Each viral strain was propagated, as previously described, on confluent monolayer sheets from an ovine kidney cell line [19]. Extracellular virus was harvested and concentrated by ultrafiltration, as previously reported [20].

Viral Purification and DNA Extraction

Concentrated virus was pelleted, and viral DNA was extracted as recently described [21]. Briefly, sedimented virus was suspended in 1 ml of TEN buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl), and treated with DNase I and RNase A (50 μ g/ml each) and then with proteinase K (250 μ g/ml). The mixture was extracted several times with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). The DNA was precipitated with ethanol and dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA):

Restriction Endonuclease Analysis

One microgram of DNA extracted from each viral isolate was digested overnight with various restriction endonuclease enzymes (10 U each), according to the recommendations provided by the manufacturer. The reactions were terminated by addition of 0.2 vol of 25% glycerol, 25 mM EDTA, 1% SDS, and 0.1% bromophenol blue. Digests (0.5 µg of DNA) were fractionated in 0.4% agarose gel in TBE buffer (90 mM Tris-HCl, 90 mM boric acid, 2.4 mM EDTA, pH 8.3) for about 16 h at 14 V in the presence of ethidium bromide (0.5 µg/ml). Gels were photographed under UV transillumination with Polaroid type 667 film.

Radiolabeling of Probe and Southern Blotting

The pKS/Ehd clone containing the genomic IBR *HindIII* fragment E [21] was radiolabeled by random priming in the presence of [α - 32 P]-dCTP, using a commercial oligolabeling kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The reaction was terminated when recommended, and 10 µl of 10 mg/ml of salmon sperm DNA was added as a carrier. The DNA was precipitated with 1 ml of 10% trichloroacetic acid at 0° for 15 min, centrifuged, and then precipitated again, in order to eliminate unincorporated nucleotides. The pellet was dissolved in 300 µl of 0.33 N NaOH. Before hybridization, the probe was neutralized by adding 100 µl of 1 M Tris-HCl, pH 7.5, and 100 µl of 1 N HCl.

When needed, Southern blots of fractionated DNA were prepared with a Vacu-Gene vacuum blotting system (Pharmacia) on nylon membranes (Hybond-N; Amersham, England). The DNA was then covalently fixed to the membrane by UV exposure for 5 min. For specific detection of viral DNA, the blot was first prehybridized and then hybridized using the conditions described by Rochaix and van Dillewijn [22].

Results

It is clear from the literature that IBR and infectious pustular vulvovaginitis virus strains are distinguished easily using restriction endonuclease analysis of viral DNA with the few enzymes already mapped on the genome. However, the level of divergence

between members of the same group is unknown, and, consequently, no significant information is provided concerning stability/conservation as well as evolution of the viral genome. In order to detect genomic variations between members of IBR-like isolates, we have compared patterns of viral DNA from six different strains, following digestions with eleven restriction enzymes. To investigate the variability of viral DNA within the same country as well as around the world, one isolate from the USA, three from Canada, and two from Europe were examined.

Comparison of BamHI, EcoRI and HindIII Digests

Patterns of the six viral DNA generated with *BamHI*, *EcoRI*, and *HindIII* restriction enzymes were similar and indicated that all six isolates were members of the IBR group (fig. 1). Nevertheless, differences were observed. We immediately noted that high molecular weight fragments in the range of 55 kbp of the IAF-2F DNA were surprisingly resistant to digestion with *BamHI* and *HindIII* (fig. 1, lane f). These fragments could represent artifacts and have never been reported by others, but we obtained repeatedly the same result with four new preparations of viral DNA and always with the *BamHI* and *HindIII* (also with *SalI*, see below) restriction enzymes. These bands may represent either a complex structure of DNA, causing steric hindrance at internal sites that could prevent digestion, or a linear fragment, suggesting that the IAF-2F isolate has a larger genome than other isolates examined. Indeed, it is probable that the latter possibility is accurate, since additional bands were also observed in other restriction profiles of the IAF-2F isolate (see below).

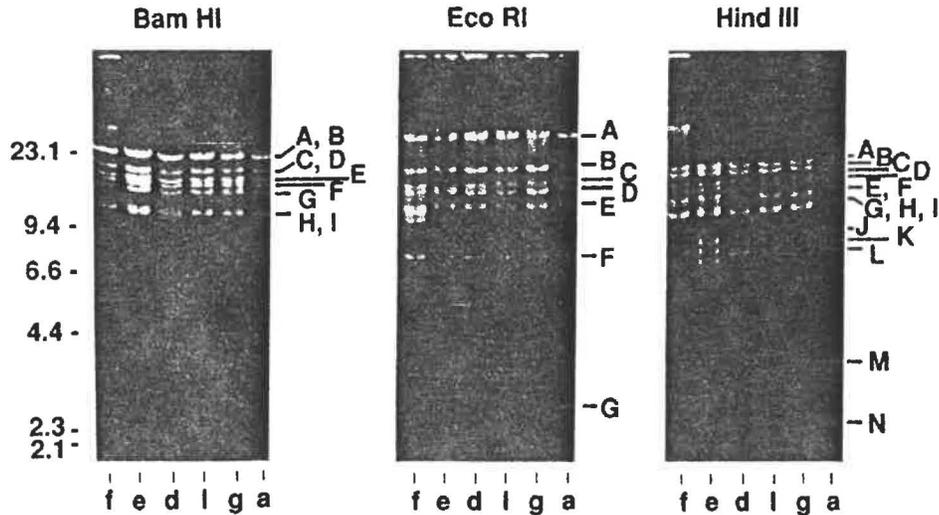


Fig. 1. Viral DNA from IAF-2F (f), English (e), Danish (d), Los Angeles (l), Guelph (g), and Alberta (a) isolates were digested with *Bam*HI, *Eco*RI, and *Hind*III restriction enzymes and analyzed in 0.4% agarose gel. Genomic fragments (letters A–N) were identified from the map constructed by Mayfield et al. [13]. Molecular weights of λ -*Hind*III DNA standards are indicated in kilobase pairs.

The *Bam*HI pattern obtained from the Danish isolate was different from that of the other isolates, since the H and I (11.0 and 10.5 kbp) fragments were slightly resolved during the migration (fig. 1, lane d). The isolate obtained from the University of Guelph contained a 21-kbp fragment that was absent in other isolates (fig. 1, lane g). Based on its relative intensity, this fragment was probably in 0.5-molar amount and could thus correspond to the A genomic fragment [see map in ref. 13].

The profile obtained from the IAF-2F isolate following *Eco*RI digestion (fig. 1, lane f) was significantly different from the reported pattern for IBR [7, 13] which is very similar to those obtained from Danish, Los Angeles, Guelph, and Alberta isolates (fig. 1, lanes d, l, g, and a, respectively). Indeed, additional bands appeared in lane f, corresponding to 13-kbp (in 0.5-molar abundance, between D

and E fragments), 11-kbp (2- to 3-molar abundance), and 10-kbp (1-molar amount) fragments. Finally, from the English isolate (fig. 1, lane e), the C and D *Eco*RI DNA fragments comigrated but were well resolved for all other isolates (fig. 1, lanes f, d, l, g, a).

The *Hind*III profiles obtained from Los Angeles, Alberta, and Guelph isolates were similar (fig. 1, lanes l, a, and g, respectively), apart from the presence of an additional faint band (6.8 kbp, 0.5 molar) which was consistently recovered in the latter strain. A small variation was observed in the English pattern (fig. 1, lane e), since *Hind*III E and F genomic fragments did not comigrate. In the Danish isolate pattern (fig. 1, lane d), C and D fragments were better resolved than they were in other isolates. Furthermore, an additional fragment of 5.2 kbp was generated, and, upon closer examination, it was apparent that the intensity of E/F (13.5 kbp) and K (8.0

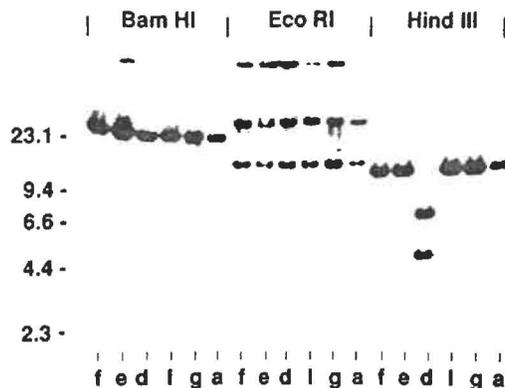


Fig. 2. Hybridization of the labeled pKS/Ehd clone containing IBR *HindIII* fragment E with a Southern blot performed from the gel in figure 1. Molecular weights of λ -*HindIII* DNA standards are indicated in kilobase pairs.

kbp) DNA bands had diminished (a single instead of two fragments) and increased (two instead of a single fragment), respectively. We, thus, postulate that an additional *HindIII* site in either E or F genomic fragments could have generated the 8.0- and 5.2-kbp fragments. To support this hypothesis and also to determine which of E or F fragments was involved, we have hybridized the purified and labeled 5.2-kbp fragment with imprints of *BamHI*, *EcoRI*, and *HindIII* profiles for the six isolates. After autoradiography, hybridized bands observed in *HindIII* digests were only the 5.2-kbp fragment in the Danish lane and the E/F fragments of the other five isolates; in the two other digests, only the A/B *BamHI* (the 21-kbp fragment of the Guelph isolate did not hybridize) and D *EcoRI* genomic fragments of the six isolates hybridized with the probe (results not shown). Based on the map constructed by

Mayfield et al. [13], the additional *HindIII* site in the Danish viral DNA should be in the original E genomic fragment. This was confirmed by hybridization of a Southern blot with the pKS/Ehd clone from our genomic IBR bank [21] and containing the E *HindIII* fragment (fig. 2). The labeled probe hybridized with the 8.0- and 5.2-kbp fragments of the Danish *HindIII* profile (fig. 2, lane d), the E *HindIII* fragments of the other five isolates (fig. 2, lanes f, e, l, g, a) and the B *BamHI* fragment as well as the A and D *EcoRI* fragments of all six isolates.

Profile Variations in Other Digests

Several *SaII*-digested fragments were generated for all isolates examined, and the patterns obtained were quite similar (fig. 3A), except for the presence of a high molecular weight fragment (33 kbp) for the IAF-2F isolate (fig. 3A, lane f). No significant restriction fragment length polymorphism could be seen in *SaII* digests, with the exception of the IAF-2F isolate. However, small variations in migration were observed for the first (16 kbp), third (12.5 kbp), and fourth (10.0 kbp) DNA bands generated from the Danish isolate (fig. 3A, lane d).

Digestions with the *KpnI* enzyme also generated patterns that were very similar among the six viral DNA (fig. 3A). However, additional fragments in the range of 12 kbp were obtained for the IAF-2F isolate (fig. 3A, lane f).

Restriction fragment length polymorphisms were noted from *DraI* digests (fig. 3A). In particular, the profile of fragments generated in the range of 2.7–3.8 kbp was unique for most isolates. Although all viral DNA generated a fragment of 2.9 kbp, fragments of 3.8 kbp for both the Los Angeles and Alberta isolates (lanes l and a), of 3.1 and

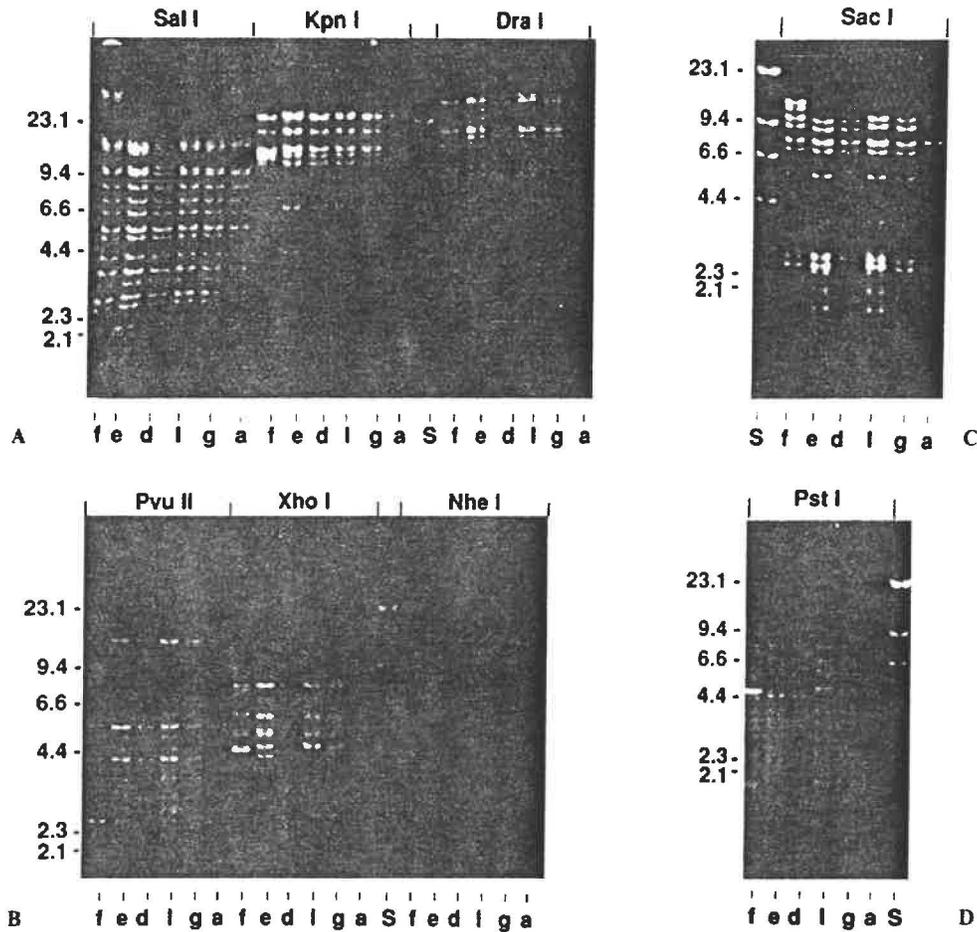


Fig. 3. Viral DNA from IAF-2F (f), English (e), Danish (d), Los Angeles (l), Guelph (g), and Alberta (a) isolates were digested with *SalI*, *KpnI* and *DraI* (A); *PvuII*, *XhoI*, and *NheI* (B); *SacI* (C), and *PstI* (D) and analyzed in 0.4% agarose gels. Molecular weights of λ -*HindIII* standards (lanes S) are indicated in kilobase pairs.

3.2 kbp for the English (lane e) and Danish (lane d) isolates, respectively, of 3.6 kbp (2 molar) for the IAF-2F (lane f), and, finally, of 3.7 and 3.45 kbp for the Guelph viral isolate (lane g) also were observed. The IAF-2F viral DNA also diverged, as three additional fragments of 8.4, 8.0, and 7.3 kbp were generated. Furthermore, a 10.0-kbp DNA band present

in five isolates was absent in the Danish strain, but a new one (11.0 kbp) was observed.

Significant polymorphisms in number and/or length of fragments also were observed from *PvuII* digests in the 5.8- to 7.1-kbp range, resulting in unique patterns for each isolate (fig. 3B). A single DNA band of 6.5 kbp was observed in the English (e)

lane, two bands of 6.6 and 5.8 kbp in the IAF-2F (f) lane, of 7.1 and 7.0 kbp in the Danish (d) lane, of 6.9 and 6.1 kbp in the Los Angeles (l) lane, of 7.0 and 6.0 kbp in the Alberta (a) lane, and three fragments of 6.9, 6.6, and 6.1 kbp in the Guelph (g) lane. Other variations were noted: a 2.95-kbp fragment was detected from the Danish isolate, but not from the others, and a difference in the stoichiometry of a 2.5-kbp fragment was noted from the IAF-2F isolate, as compared with the other five strains. In addition, the IAF-2F isolate contained *PvuII* fragments of 11.5 (2-molar amount), 8.8, and 8.0 kbp which were not found in the others.

Differences were observed from *XhoI* digests in fragments that ranged from 4.4 to 7.0 kbp (fig. 3B). A single DNA band of 7.0 kbp was detected in the IAF-2F (f), English (e), Los Angeles (l), and Guelph (g) lanes, whereas a fragment of 6.6 kbp was present in the Alberta (a) lane, and two fragments of 6.9 and 6.6 kbp were seen in the Danish (d) lane. A single DNA band of 6.0 kbp was present in the English (e), Danish (d), Los Angeles (l) and Guelph (g) lanes, but was resolved into two bands of 6.2 and 5.8 kbp in IAF-2F (f) and Alberta (a) lanes. Furthermore, two bands of 4.7 and 4.4 kbp were observed in e and d lanes instead of single bands of 4.7 or 4.6 kbp in the l/g/a and f lanes, respectively. Additional fragments (8.4 and 7.5 kbp) also were observed from IAF-2F *XhoI* digest.

A major band of 17.0 kbp was observed from *NheI* digestions in IAF-2F (f), Los Angeles (l), Guelph (g), and Alberta (a) lanes, but was totally absent in English (e) and Danish (d) lanes (fig. 3B). A 9.0-kbp DNA band was observed for 5 of the 6 isolates, but was absent for the English isolate (lane e); in the latter, an additional band of 8.0 kbp was

nevertheless observed. Although a fragment of 7.2 kbp was present for all six isolates, an additional band of 6.9 kbp was only observed from IAF-2F and Los Angeles strains. Finally, bands of 12.0 and 11.0 kbp were only generated from the IAF-2F isolate.

From *SacI* digests, only minor variations were observed in the six patterns, with the exception of the two 2-molar fragments of 12.5 and 11.0 kbp generated by the IAF-2F viral DNA (fig. 3C). The first two fragments from each profile were slightly different in length: the English (e), Danish (d), and Guelph (g) isolates generated fragments of 9.0 and 8.5 kbp, whereas those generated by the IAF-2F (f), Los Angeles (l), and Alberta (a) isolates were 9.2 and 8.8 kbp.

Digestion of the six viral DNA with *PstI* generated fragments smaller than 8.2 kbp, and differences were observed in the range of 4.5–5.5 kbp (fig. 3D). A band of 4.8 kbp was common to all six isolates, although the stoichiometry in f lane was significantly greater than others. Slight variations in migration were observed in the following bands: a fragment of 4.7 kbp for the English and Danish isolates, of 5.2 kbp for the Los Angeles and Guelph isolates, of 5.5 kbp for the Alberta isolate, and of 4.5 kbp for the IAF-2F isolate. Finally, two bands of 7.4 and 5.7 kbp were only detected from the IAF-2F isolate.

Discussion

Analysis of restriction profiles, obtained from six BHV-1 viral DNA, clearly established that all isolates belong to the IBR group, since the overall patterns with individual enzymes were similar. Nevertheless, several differences were found within strains. The differences noted include either

fragment size heterogeneity or appearance/disappearance of fragment which results from insertion/deletion of a restriction site. Variations were also observed in *Bam*HI, *Eco*RI, and *Hind*III patterns, for which no such differences had been noted for IBR isolates in previous reports. This may be due partially to the better resolution attained in the present study using 0.4% agarose gel (instead of 0.6–0.8% used in other studies).

The present research allowed the characterization of a major variant of IBR virus, the isolate named IAF-2F. Additional fragments were generated following digestions with restriction enzymes as compared with the five other strains examined. The supplementary bands seen from *Bam*HI, *Hind*III (fig. 1), and *Sa*II (fig. 3A) digests of IAF-2F viral DNA were diffuse due to their high molecular weights. However, those generated with *Dra*I, *Pvu*II, *Xho*I, *Nhe*I, and especially *Sa*I (fig. 3) were well defined, of medium length, and resolved from fragments in common with other isolates, such that their size could be precisely determined. Their continued presence in subsequent experiments, as well as their relative intensity in the profiles, clearly showed that they do not represent partial digestion products. Finally, the divergences observed in IAF-2F patterns as compared with others could not be related either to the cell line used for viral propagation or to the method used for DNA isolation, since these parameters were identical for the six isolates examined. The most probable conclusion to draw from these observations is that the genome of the IAF-2F isolate is larger than other IBR genomes; we presume that the difference in size is in the range of 45–50 kbp. Such a variant strain, obtained in our laboratory after plaque purification of a field isolate, was never isolated before. A

primary infection might have been caused by a 'wild'-type IBR strain, and the variant isolate could have resulted from an *in vivo* mutation soon after infection. We hypothesize that a fragment of exogenous DNA originating from chromosomal DNA, or from an undetected pathogen in the host, or a duplicate fragment of viral DNA had been integrated in the viral genome *in vivo*, and this inserted mutant had been permanently conserved under undefined selective pressure, finally replacing the 'wild'-type isolate. Indeed, the possibility of *in vitro* molecular events has been rejected, since the inoculum is routinely derived from only two to three viral passages, and alterations in herpesvirus genomes are induced only after multiple passages of viruses in cultured cells [23–25].

The viral DNA of the mutant strain is still similar to the prototype DNA, since most of the bands generated after restriction enzyme digestions of the other five viral DNA analyzed were also recovered from the DNA mutant. This was the case for all enzymes examined. Furthermore, no variation in polypeptide profiles was noted when poly-A+mRNA extracted from cells infected with the IAF-2F or the Alberta isolates were translated *in vitro* [unpubl. results], and no difference was noted in its cytopathogenicity. These results, along with the strong homology found by Southern hybridization using the IBR *Hind*III genomic fragment E as probe, confirmed undoubtedly its membership in the IBR group. At present, the origin of the 45- to 50-kbp inserted DNA as well as its location in the viral genome remain unknown. Future experiments will be performed to answer these questions. The discovery of this large IBR genome (in the 180-kbp range) may be an indication of the

tolerance of the viral capsid to deliver a viable and infectious virus.

An insertion/deletion of a *Hind*III restriction site was found for the Danish isolate, within the original *Hind*III E fragment, and generated 8.0- and 5.2-kbp fragments. Based on the map constructed by Mayfield et al. [13], the precise location of the additional *Hind*III site should be 5.2 kbp downstream from the 5'-end of the original E fragment, since the 5.2-kbp fragment hybridized with *Eco*RI D fragment, but did not with the *Eco*RI A fragment.

Based on the intensity of the band, we suspected that the 21-kbp fragment obtained in the *Bam*HI pattern of the Guelph isolate (fig. 1, lane g) corresponded to the A genomic fragment. The fact that the pKS/Ehd clone containing the IBR *Hind*III E fragment did not hybridize with the 21-kbp fragment, but did with the following *Bam*HI fragment (which was equivalent to other strains and corresponded to the B fragment in the reported map [13]), confirmed the identification of the 21-kbp band as being the *Bam*HI A fragment.

Interestingly, from the patterns obtained with *Xho*I, *Nhe*I, and *Pst*I, it would seem appropriate to group together the two European isolates and the four North American isolates. For example, only the European isolates contained a 4.4-kbp *Xho*I fragment and a 4.7-kbp *Pst*I fragment, though no 17.0-kbp *Nhe*I fragment. Nevertheless, each viral strain examined could easily and unambiguously be discriminated from the others by simple digestion: for example, the Danish strain with either *Hind*III, *Nhe*I, or *Pvu*II, the English isolate with *Nhe*I or *Pvu*II (and as a last resort with *Eco*RI), the Guelph isolate with *Bam*HI, the Alberta isolate with *Pst*I, the Los Angeles isolate with *Xho*I (although the

pattern obtained was very similar to the Guelph profile), and, finally, the IAF-2F isolate with all enzymes examined (except *Kpn*I with which additional fragments were not well resolved from the common IBR bands). Thus, by contrast to previous studies, we have found that members of the IBR group are not homogeneous. Our results suggest that the IBR viruses constantly mutate and continue to evolve, and perhaps this could lead to a major individualization of its members.

Acknowledgments

The authors thank Mrs. Janet Stewart and Susan Moir for reading the manuscript. S.L. was supported by a fellowship from the 'Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada'. This work was funded by the 'Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche' (90-EQ-3021).

References

- 1 Gibbs EPJ, Rweyemamu MM: Bovine herpesviruses. I. Bovine herpesvirus 1. *Vet Bull* 1977; 47:317-343.
- 2 Ludwig H: Bovine herpesviruses; in Roizman B (ed): *The Herpesviruses*. New York, Plenum Press, 1983, vol 2, pp 135-314.
- 3 Farley I, Skare B, Skare J: Inverted repeat sequences in infectious rhinotracheitis virus DNA; in Nahmias AJ, Dowdle WR, Schinazi RF (eds): *The Human Herpes Viruses: An Interdisciplinary Perspective*. New York, Elsevier/North-Holland Publishing, 1981, p 590.
- 4 Ludwig H: Herpesviruses of bovidae: The characterization, grouping and role of different types including latent viruses; in Whittmann G, Gaskell RM, Rziha HJ (eds): *Latent Herpes Virus Infection in Veterinary Medicine*. The Hague, Nijhoff, 1984, pp 171-189.
- 5 Metzler AE, Matile H, Gassmann U, Engels M, Wyler R: European isolates of bovine herpesvirus

- 1: A comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1985;85:57-69.
- 6 Metzler AE, Schudel AA, Engels M: Bovine herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch Virol* 1986;87:205-217.
- 7 Misra V, Babiuk LA, Le Q Darcel C: Analysis of bovine herpes virus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Arch Virol* 1983;76:341-354.
- 8 Engels M, Steck F, Wyler R: Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 1981;67:169-174.
- 9 Engels M, Giuliani C, Wild P, Beck TM, Loepfe E, Wyler R: 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* 1986/87;6:57-73.
- 10 Seal BS, St Jeor SC, Taylor REL: Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus 1 DNA and nucleic acid homology between isolates. *J Gen Virol* 1985;66:2787-2792.
- 11 French EL: A specific virus encephalitis in calves: Isolation and characterization of the causal agent. *Aust Vet J* 1962;38:216-221.
- 12 Carillo BJ, Ambrogi A, Schudel AA, Vazquez M, Dahme E, Pospischil A: Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *Zentralbl Veterinärmed [B]* 1983;30:327-332.
- 13 Mayfield JE, Good PJ, Van Oort HJ, Campbell AR, Reed DE: Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J Virol* 1983;47:259-264.
- 14 Gregersen JP, Pauli G, Ludwig H: Bovine herpesvirus 1: Differentiation of IBR- and IPV-viruses and identification and functional role of their major immunogenic components. *Arch Virol* 1985;84:91-103.
- 15 Whetstone CA, Wheeler JG, Reed DE: Investigation of possible vaccine-induced epizootics of infectious bovine rhinotracheitis, using restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res* 1986;47:1789-1795.
- 16 Whetstone CA, Miller JM, Bortner DM, Van Der Maaten MJ: Changes in the bovine herpesvirus 1 genome during acute infection, after reactivation from latency, and after superinfection in the host animal. *Arch Virol* 1989;106:261-279.
- 17 Miller JM, Van Der Maaten MJ, Whetstone CA: Effects of a bovine herpesvirus-1 isolate on reproductive function in heifers: Classification as a type-2 (infectious pustular vulvovaginitis) virus by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res* 1988;49:1653-1656.
- 18 Trépanier P, Minocha HC, Ibrahim AI, Sheikh-Omar AR, Montpetit C, Lecomte J, Alain R, Lussier G, Trudel M: Further biological, serological and biochemical characterization of North American, European and Southeast Asian strains of bovine herpesvirus 1 compared with other alpha-herpesvirinae members. *Vet Microbiol* 1988;18:219-231.
- 19 Trudel M, Séguin C, Nadon F, Boulay G, Trépanier P, Lussier G: Hemagglutination inhibition and virus neutralizing response of rabbits inoculated with bovine herpesvirus 1 subunit vaccine. *Vet Microbiol* 1987;13:107-119.
- 20 Trudel M, Payment P: Concentration and purification of rubella virus hemagglutinin by hollow fiber ultrafiltration and sucrose density centrifugation. *Can J Microbiol* 1980;26:1334-1339.
- 21 Simard C, Nadon F, Séguin C, LaBoissière S, Trudel M: Gene mapping of infectious bovine rhinotracheitis viral DNA genome. *Arch Virol* 1990;110:63-75.
- 22 Rochaix JD, van Dillewijn J: Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. *Nature* 1982;296:70-72.
- 23 Allen GP, Yeargan MR, Bryans JT: Alterations in the equine herpesvirus 1 genome after in vitro and in vivo virus passage. *Infect Immun* 1983;40:436-439.
- 24 Hirai K, Ikuta K, Kato S: Structural changes of the DNA of Marek's disease virus during serial passage in cultured cells. *Virology* 1981;115:385-389.
- 25 Lomniczi B, Gielkens A, Csobai I, Ben-Porat T: Evolution of pseudorabies virions containing genomes with an invertible long component after repeated passage in chicken embryo fibroblasts. *J Virol* 1987;61:1772-1780.

ANNEXE III

LaBoissière, S., M. Trudel et C. Simard. 1992. Characterization and transcript mapping of a bovine herpesvirus 1 gene encoding a polypeptide homologous to the herpes simplex virus type 1 major tegument proteins VP13/14. *J. Gen. Virol.* **73**: 2941-2947.

Characterization and transcript mapping of a bovine herpesvirus type 1 gene encoding a polypeptide homologous to the herpes simplex virus type 1 major tegument proteins VP13/14

Sylvie LaBoissière, Michel Trudel and Claire Simard*

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

Using *in vitro* translation of hybrid-selected mRNA, we have previously shown that bovine herpesvirus type 1 *Hind*III fragment M encodes an abundant 94K polypeptide. Using immunoprecipitation and sequencing analyses, it has now been shown that the polypeptide is related to the major tegument protein VP8 and is homologous to the herpes simplex virus type 1 major tegument proteins VP13/14. The sequence of the VP8 gene (field isolate 34) is reported and compared to published data. Several differences between the sequences were detected, resulting particularly from base insertions/deletions generating three

major frameshifts affecting an area of 87 amino acid residues of the encoded protein. In addition, sequence comparison revealed 29 single base alterations, excluding frameshift regions, producing 17 amino acid substitutions. Overall, 14.1% of the deduced amino acid sequences were divergent. We have also established that the last 152 nucleotides of the previously reported sequence correspond to the sequence of the minus not the sense strand. Finally, we report that the 4.4 kb transcript of the VP8 gene is initiated 39 nucleotides upstream from the translation start codon.

Introduction

Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), the aetiological agent of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis, is a virus of cattle distributed world-wide. The virus, a member of the *Alphaherpesvirinae* subfamily (Roizman *et al.*, 1982), has also been associated with conjunctivitis, encephalitis, enteritis, dermatitis and abortion (Gibbs & Rweyemamu, 1977).

The BHV-1 genome is a linear dsDNA molecule of approximately 140 kbp which is divided into unique long (U_L) and short (U_S) regions. The latter is bounded by inverted repeat sequences (R_S) and can invert its orientation relative to U_L , resulting in the existence of two isomeric forms (Farley *et al.*, 1981). The genome encodes more than 40 polypeptides (Metzler *et al.*, 1985; Misra *et al.*, 1981), 20 of which have been located in discrete genomic regions using translation of mRNA hybrid-selected to individual *Hind*III DNA fragments (Simard *et al.*, 1990). In particular, coding sequences of an abundant polypeptide (hereafter named VP8) with an apparent M_r of 94K have been assigned to the small 3.7 kbp *Hind*III fragment M. At present, gene coding

sequences for the gI, gIII and gIV major glycoproteins, gH glycoprotein, thymidine kinase, part of the DNA polymerase and the VP8 major tegument protein have been reported (Carpenter & Misra, 1991; Fitzpatrick *et al.*, 1989; Kit & Kit, 1986; Meyer *et al.*, 1991; Misra *et al.*, 1988; Mittal & Field, 1989; Owen & Field, 1988; Smith *et al.*, 1990; Tikoo *et al.*, 1990; Whitbeck *et al.*, 1988).

In this study, the sequence of the gene encoding the VP8 tegument protein of a Canadian field isolate (34) is reported and compared to data obtained by Carpenter & Misra (1991) using the American isolate P8-2. This comparison identified several areas of divergence resulting from base insertions/deletions as well as single base alterations. In particular, three distinct frameshifts affecting a total of 87 amino acid residues of the encoded protein were found in the previously reported sequence. Finally, the precise mapping of the 5' end and the kinetics of expression of the VP8 gene transcript are presented.

Methods

Cells, virus and viral DNA. The BHV-1 isolate (strain 34) was provided by Dr D. Mitchell (Gouvernement du Canada, Lethbridge, Alberta) and has been shown to be related to the Colorado strain

The nucleotide sequence data reported have been submitted to the GenBank database and assigned the accession number M84469.

(subtype 1.1, Metzler *et al.*, 1985) based on restriction endonuclease (Simard *et al.*, 1991) and serological analyses. Virus was grown in confluent monolayers of an ovine kidney (OK) cell line as previously described (Trudel *et al.*, 1987). Extracellular virions were concentrated by ultrafiltration (Trudel & Payment, 1980) and viral DNA was purified as reported (Simard *et al.*, 1990).

Northern blot hybridization and primer extension analyses. Poly(A)⁺ mRNA was isolated as described (Simard *et al.*, 1990) from cells at 0, 6, 12, 18 and 24 h post-infection (p.i.) with BHV-1. mRNA (2 µg) was fractionated in an agarose gel, blotted onto a Hybond-N membrane and hybridized with a radiolabelled 387 bp *Sma*I-*Eco*RI fragment, according to the method of Simard *et al.* (1992).

Primer extension analyses were performed essentially as described by Sambrook *et al.* (1989) using the oligonucleotide 5' GCCCATCCC-TAGCGGCGTCCATGGC 3', encompassing the translation initiation codon of the VP8 gene coding sequences. Briefly, the oligonucleotide was radiolabelled with [γ -³²P]ATP and T4 kinase, and then annealed with 10 µg of total RNA extracted either from BHV-1-infected (12 h p.i.) or mock-infected cells. Reaction mixtures were heated at 80 °C for 10 min and incubated at 37 °C for 12 h to allow annealing. After reverse transcription, synthesized products were analysed on 8% sequencing gels.

DNA sequencing. The cloning of the 3.7 kbp BHV-1 *Hind*III fragment M into the prokaryotic pKS vector (clone pKS/Mhd) has been described elsewhere (Simard *et al.*, 1990). Caesium chloride-purified pKS/Mhd plasmid DNA was mapped using combinations of single and double digestions with several restriction enzymes. Both strands of the inserted fragment were then sequenced by the chemical method of Maxam & Gilbert (1977). Sequence data were assembled and analysed using the MacVector sequence analysis software (International Biotechnologies).

Results and Discussion

Individual BHV-1 *Hind*III fragments have previously been analysed for their ability to select complementary mRNA. Upon *in vitro* translation, a gene encoding an abundant 94K polypeptide has been assigned to the small 3.7 kbp fragment M (Simard *et al.*, 1990). Owing to the abundance of the translated polypeptide, we planned to express the gene in a viral vector to define the role of the protein in cellular and humoral immunity. To this end, the characterization of the gene coding sequences has been undertaken, and the restriction map and sequencing strategies employed are shown in Fig. 1.

The nucleotide sequence of fragment M has a G+C content of 72%, which agrees with previous estimates based on the whole viral genome (Graham *et al.*, 1972). This high G+C content generates occasional nucleotide compressions in sequencing gels, particularly in regions containing long stretches of 20 to 40 G and C residues. Therefore, the regions involved were sequenced several times.

Open reading frame (ORF) analyses identified a single long and complete ORF (Fig. 1) with considerable similarity to the VP8 gene coding sequences reported previously (Carpenter & Misra, 1991). In addition, two partial ORFs located at the extremities of fragment M

were found in the same orientation as the VP8 gene. The nucleotide sequence of the latter gene and of proximal regions can be seen in Fig. 2(a).

The VP8 gene coding sequence initiates with an ATG codon in a good context for the initiation of translation, since it is flanked by GACGCCATGG (Kozak, 1986, 1987). The latter feature is of interest because it may partially explain the abundance of the polypeptide *in vivo* (Carpenter & Misra, 1991) and *in vitro* (Simard *et al.*, 1990). The VP8 polypeptide is composed of 739 amino acid residues with an M_r of 80.7K (Fig. 2a), which differs significantly from the M_r estimated from the polypeptide translated *in vitro* (94K). However, the deduced primary structure of the protein indicated that it contains 8% proline residues and it has previously been shown that proline-rich polypeptides exhibit anomalous migration in SDS-PAGE (Ferguson *et al.*, 1984). Finally, analysis of the VP8 amino acid sequence did not reveal putative sites for *N*-glycosylation (Kornfeld & Kornfeld, 1985), or a hydrophobic region characteristic of a signal peptide. However, recent studies have provided evidence that some herpesviral tegument proteins may be glycosylated. It has been reported that herpes simplex virus type 1 (HSV-1) VP13/14 can bind lectins (Meredith *et al.*, 1991), whereas equine herpesvirus type 4 (EHV-4) gp10 (Whittaker *et al.*, 1991) and human cytomegalovirus (Benko *et al.*, 1988) tegument proteins can be radio-labelled with [³H]glucosamine and [³H]galactose, respectively. However, it remains to be determined whether the VP8 protein is glycosylated. Actual results indicate that such processing may occur only at a low level because the apparent M_r of the VP8 protein synthesized either *in vivo* (92K; Carpenter & Misra, 1991) or *in vitro* (94K; Simard *et al.*, 1990) is very similar.

Upstream from the coding region, a CAAT box motif and a TATA box are found at positions 17 and 190, respectively. These sequences may function as a promoter for the expression of the VP8 transcript (Jones & Yamamoto, 1985; McKnight & Kingsbury, 1982). However, the CAAT box motif identified here may not be significant because it has recently been demonstrated that sequences upstream from the TATA box are dispensable for the transcription of true HSV-1 late genes (Steffy & Weir, 1991; Kibler *et al.*, 1991). Finally, no polyadenylation consensus sequence was found downstream from the stop codon.

Sequence variations of Canadian versus American isolates

The sequence presented in Fig. 2(a) has been conscientiously compared with previously published data (Carpenter & Misra, 1991). However, several divergences were identified, even though both isolates belong to BHV-1 subtype 1.1. In particular, three frameshifts

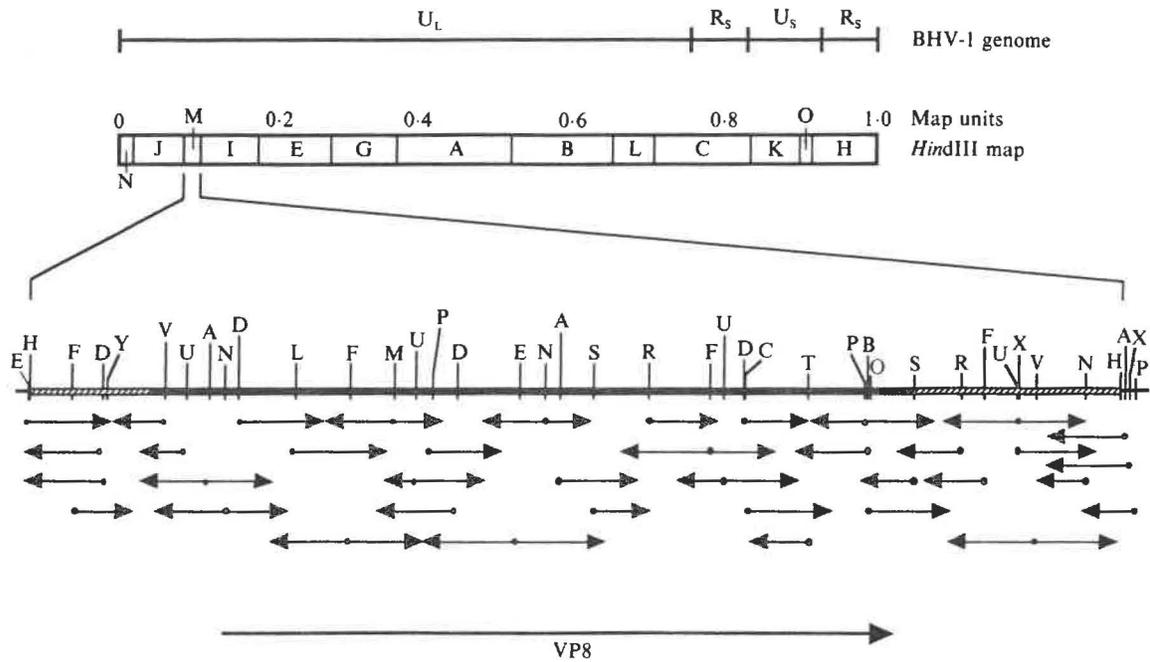


Fig. 1. Map location of and sequencing strategy for BHV-1 *Hind*III fragment M. The viral genome is illustrated at the top, showing U_L, U_S and R_S. The *Hind*III map of the prototype genome is shown below, adapted from Mayfield *et al.* (1983). Restriction sites used in sequencing strategies are labelled as follows: A, *Acc*I; B, *Bgl*I; C, *Cel*II; D, *Dde*I; E, *Eco*RI; F, *Hinf*I; H, *Hind*III; L, *Afl*III; M, *Sma*I; N, *Nco*I; O, *Not*I; P, *Apa*I; R, *Nar*I; S, *Sac*II; T, *Tth*III; U, *Stu*I; V, *Pvu*II; X, *Xho*I; Y, *Sty*I. The flanking sites A, X, P and E belong to the pKS parental vector. Arrows indicate origin, direction and length of the sequenced fragments. Orientation, location and length of the gene encoding the VP8 protein are represented with an arrow at the bottom of figure. The nucleotide sequence shown in Fig. 2(a) corresponds to the region depicted by the solid line.

affecting 14, 55 and 18 amino acid residues of the encoded protein were created in the reported sequence by the addition of base residues. Specifically, the first frameshift (FS-1) extends from positions 357 to 399, being generated by the insertion of two pyrimidines (CT) and terminated by an additional C residue. With the exception of the latter three differences, the sequences are identical in the region involved. As shown by a sequencing gel representing the region encompassing the beginning of FS-1 (Fig. 3a), no additional C or T residues are contained within our sequence. The second frameshift was generated by the insertion of an A residue at position 1353, an additional T at position 1403, two G residues at positions 1457 and 1458 and a C at position 1467. The frameshift ended with the deletion of two C residues at positions 1468 and 1517. Confirming our results, Fig. 3(b) and (c) present sequencing gels representing the beginning and end of FS-2, respectively. In addition, two other differences were found in the FS-2 region at positions 1385 and 1386, where T and G were replaced by G and C residues. These changes could either represent individual transversions (T→G, G→C) or dinucleotide inversions (TG→GC). Finally, a third frameshift (FS-3) was found between positions 2092 and 2147, being created by the addition of a C residue and

terminated by the insertion of two C residues. With the exception of these three differences, the sequences were identical in the FS-3 region. Sequencing gels representing the beginning and end of FS-3 revealed that our sequence did not contain additional residues in these regions (Fig. 3d and e, respectively). All these changes show that the previously reported VP8 amino acid sequence is three amino acid residues longer than ours.

Other differences in the coding region were found. These resulted from 29 base alterations involving eight C→T and four G→A transitions, three G→C transversions, and five GC→CG, one GT→TG and one GT→CG dinucleotide inversions. As a consequence, 17 amino acid substitutions were identified in the deduced polypeptide sequences. Finally, four local base additions, two base deletions and one T→A transversion were found in the 3' non-coding region. Furthermore, in the region between positions 2538 to 2607, the previously reported nucleotide sequence was found to be perfectly complementary (with the exception of an A→C) to our sequence. We have used four distinct strategies in the sequencing of this region, as compared to the single strand sequencing used for the P8-2 sequence. It is thus probable that the latter sequence may have been incorrect in this region.

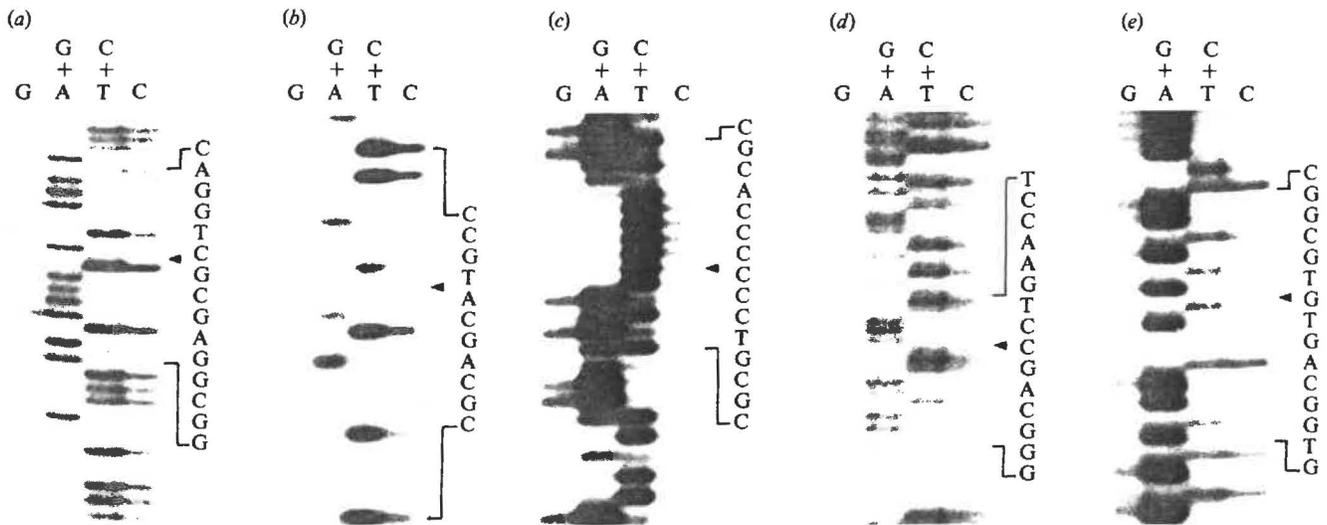


Fig. 3. Sequencing gels of the BHV-1 34 VP8 gene representing the beginning and end of frameshifts found in isolate P8-2. Areas of sequence correspond to positions 349 to 363 (a), 1346 to 1356 (b), 1511 to 1525 (c), 2084 to 2098 (d) and 2153 to 2139 (e) in Fig. 2(a). Arrows point at regions of difference in the two sequences. In strain P8-2, extra residues were as follows: C and T at positions 357 and 358, A at residue 1353, C at residue 2093, and C and C at residues 2148 and 2149. Finally, a C residue was deleted at position 1517.

Significance of sequence variations

The nucleic acid sequence divergences described above have major effects on the predicted amino acid sequence, especially in the three frameshift regions. Overall, 14.1% of the deduced amino acid sequences were divergent. Nevertheless, it will be essential to establish whether these differences arose from strain variations or from sequencing errors.

Both sequences were compared with homologous polypeptide sequences derived from the HSV-1 UL47 (McGeoch *et al.*, 1988) and EHV-4 ORF B6 (Whittaker *et al.*, 1991) genes. Regions included in the three frameshifts yielded information relevant to the divergence observed. As shown in Fig. 2(b), the sequence derived from isolate 34 is more similar than that of P8-2 to those of the HSV-1 and EHV-4 counterparts. This was especially true for the third frameshift, in which 14 of 17 residues were conserved in strain 34, compared to a single one in P8-2. These findings may suggest that the P8-2 sequence is incorrect in these regions.

Transcript identification and mapping

The kinetics of expression of the transcript encoding the VP8 polypeptide were analysed by Northern blot hybridization using a 387 bp *SmaI-EcoRI* fragment, positions 822 to 1209, as a probe. The probe detected an abundant 4.4 kb transcript which was present at a maximum between 18 and 24 h p.i. (Fig. 4a). The mRNA began to appear at 6 h p.i., as observed after prolonged exposure of the gel (data not shown). Our observations confirm that the VP8 transcript is expressed late during infection and indicate that it represents the true late (γ_2) 4.5 kb transcript previously mapped to *HindIII* fragment M (Wirth *et al.*, 1989). Finally, the size of the transcript confirms that no polyadenylation site is found downstream from the stop codon.

The precise location of the 5' end of the VP8 mRNA was determined by primer extension analyses using a 25-mer oligonucleotide complementary to nucleotides 258 to 282, encompassing the translation initiation codon

Additional nucleotides found in one or the other sequence are indicated by solid bars below the corresponding residues. The underlined nucleotides of the P8-2 sequence in the 3' non-coding region are complementary to the isolate 34 sequence. Putative CAAT and TATA boxes are identified with solid bars placed above and below each motif. The broken line encompassing the region between residues 258 and 282 represents the site of fixation of the complementary oligonucleotide used in primer extension analysis. The arrow represents the transcriptional start site of the VP8 mRNA. (b) Amino acid alignments of the BHV-1 VP8 proteins with the homologous proteins of two other herpesvirus in the three frameshift regions found in (a). The HSV-1 (UL47 gene, VP13/14) and EHV-4 (ORF B6 gene, gp10) sequences are from McGeoch *et al.* (1988) and Whittaker *et al.* (1991), respectively. Actual amino acid positions of the respective polypeptides are indicated to the left and right. Comparisons were performed using the MacVector software. Common residues within one or the other BHV-1 VP8 protein and either HSV-1 or EHV-4, or both are boxed.

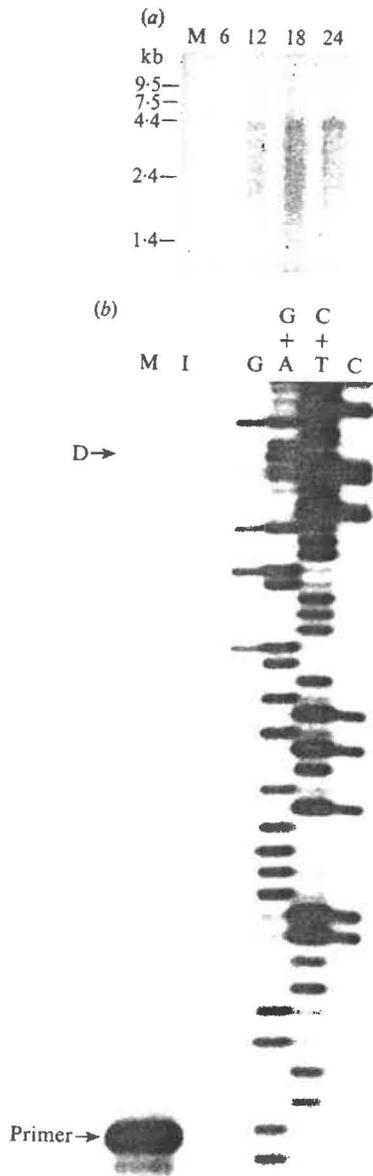


Fig. 4. Temporal analysis and localization of the 5' end of the BHV-1 VP8 transcript. (a) Northern blot hybridization of poly(A)⁺ mRNA extracted from either mock-infected cells (lane M) or BHV-1-infected cells at 6, 12, 18 and 24 h p.i. using a 387 bp DNA fragment included in the VP8 gene coding sequences as a probe. RNA size standards are indicated. (b) Primer extension analysis of the VP8 transcript using a radiolabelled 25-mer oligonucleotide, complementary to positions 258 to 282. The primer was hybridized with RNA isolated either from mock- (lane M) or BHV-1-infected cells (lane I). After reverse transcription, synthesized products were analysed on 8% sequencing gels. In parallel, a chemically sequenced DNA fragment was used as a size ladder (lanes G to C). The bands corresponding to the primer and to the DNA (fragment D) synthesized from viral mRNA are identified.

of the VP8 gene coding sequences (Fig. 4b). Reverse transcription of RNA isolated from BHV-1-infected cells resulted in the synthesis of a 61 base DNA fragment (lane I). In contrast, no DNA was synthesized from

RNA isolated from mock-infected cells (lane M). These results indicate that the 5' extremity of the VP8 transcript is located 39 nucleotides upstream from the translation initiation codon or 25 nucleotides downstream from the putative TATA box. These findings expand upon those obtained by Carpenter & Misra (1991), in which the 5' end was located approximately 1100 bp upstream from position 1209, corresponding to the unique *EcoRI* site.

In conclusion, the major sequence divergences found in the VP8 protein genes from the two different BHV-1.1 isolates could provide further insight into the VP8 gene stability of BHV-1 isolates. Indeed, when the BHV-1 VP8 protein was compared with homologous polypeptides from HSV-1, EHV-4 and varicella-zoster virus (ORF 11; Davison & Scott, 1986), little conservation of sequences was observed. This suggests that genes encoding this tegument protein are subject to frequent mutation. This hypothesis is strengthened by the fact that no homology was found between these alphaherpesvirus proteins and those of either beta- or gammaherpesviruses. Thus, it will be of great interest to confirm the data for BHV-1 strain P8-2, and subsequently to clone and sequence VP8 genes from other isolates.

The authors thank Ms Janet Stewart for proofreading the manuscript. S.L. was supported by a studentship from the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC), Canada. This work was funded by the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec (90-EQ-3021) and NSERC OGP0106053.

References

- BENKO, D. M., HALTIWANGER, R. S., HART, G. W. & GIBSON, W. (1988). Virion basic phosphoprotein from human cytomegalovirus contains *O*-linked *N* acetylglucosamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **85**, 2573-2577.
- CARPENTER, D. E. & MISRA, V. (1991). The most abundant protein in bovine herpes 1 virions is a homologue of herpes simplex virus type 1 UL47. *Journal of General Virology* **72**, 3077-3084.
- DAVISON, A. J. & SCOTT, J. E. (1986). The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *Journal of General Virology* **67**, 1759-1816.
- FARLEY, J. E., SKARE, I. B. & SKARE, J. (1981). Inverted repeat sequences in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. In *The Human Herpes Viruses: An Interdisciplinary Perspective*, p. 590. Edited by A. J. Nahmias, W. R. Dowdle & R. F. Schinazi. New York: Elsevier/North Holland.
- FERGUSON, B., JONES, N., RICHTER, J. & ROSENBERG, M. (1984). Adenovirus E1a gene product expressed at high levels in *Escherichia coli* is functional. *Science* **224**, 1343-1346.
- FITZPATRICK, D. R., BABIUK, L. A. & ZAMB, T. J. (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.
- GIBBS, E. P. J. & RWEYEMAMU, M. M. (1977). Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Veterinary Bulletin* **47**, 317-343.
- GRAHAM, B. J., LUDWIG, H., BRONSON, D. L., BENYESH-MELNICK, M. & BISWAL, N. (1972). Physicochemical properties of the DNA of herpes viruses. *Biochimica et biophysica acta* **259**, 13-23.

- JONES, K. A. & YAMAMOTO, K. R. (1985). Two distinct transcriptional factors bind to the HSV thymidine kinase promoters *in vitro*. *Cell* **42**, 559-572.
- KIBLER, P. K., DUNCAN, J., KEITH, B. D., HUPEL, T. & SMILEY, J. R. (1991). Regulation of herpes simplex virus true late gene expression: sequences downstream from the US11 TATA box inhibit expression from an unreplicated template. *Journal of Virology* **65**, 6749-6760.
- KIT, M. & KIT, S. (1986). Thymidine kinase deletion mutants of bovine herpesvirus 1, vaccines against infectious bovine rhinotracheitis containing same and methods for the production and use of the same. *U.S. Patent* 796.840.
- KORNFELD, R. & KORNFELD, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* **54**, 631-664.
- KOZAK, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- KOZAK, M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology* **196**, 947-950.
- MCGEOCH, D. J., DALRYMPLE, M. A., DAVISON, A. J., DOLAN, A., FRAME, M. C., MCNAB, D., PERRY, L. J., SCOTT, J. E. & TAYLOR, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology* **69**, 1531-1574.
- MCKNIGHT, S. L. & KINGSBURY, R. (1982). Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* **217**, 316-324.
- MAXAM, A. M. & GILBERT, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **74**, 560-564.
- MAYFIELD, J. E., GOOD, P. J., VANOORT, H. J., CAMPBELL, A. R. & REED, D. E. (1983). Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus (Cooper strain). *Journal of Virology* **47**, 259-264.
- MEREDITH, D. M., LINDSAY, J. A., HALLIBURTON, I. W. & WHITTAKER, G. R. (1991). Post-translational modification of the tegument proteins (VP13 and VP14) of herpes simplex virus type 1 by glycosylation and phosphorylation. *Journal of General Virology* **72**, 2771-2775.
- METZLER, A. E., MATILE, H., GASSMANN, U., ENGELS, M. & WYLER, R. (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology* **85**, 57-69.
- MEYER, A. L., PETROVSKIS, E. A., DUFFUS, W. P. H., THOMSEN, D. R. & POST, L. E. (1991). Cloning and sequence of an infectious bovine rhinotracheitis virus (BHV-1) gene homologous to glycoprotein-H of herpes simplex virus. *Biochimica et biophysica acta* **1090**, 267-269.
- MISRA, V., BLUMENTHAL, R. M. & BABIUK, L. A. (1981). Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). *Journal of Virology* **40**, 367-378.
- MISRA, V., NELSON, R. & SMITH, M. (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.
- MITTAL, S. K. & FIELD, H. J. (1989). Analysis of the bovine herpesvirus type 1 thymidine kinase (TK) gene from wild-type virus and TK-deficient mutants. *Journal of General Virology* **70**, 901-918.
- OWEN, L. J. & FIELD, H. J. (1988). Genomic localization and sequence analysis of the putative bovine herpesvirus-1 DNA polymerase gene. *Archives of Virology* **98**, 27-38.
- ROIZMAN, B., CARMICHAEL, L. E., DENHARDT, F., DE THE, G., NAHMIAS, A. J., PLOWRIGHT, W., RAPP, F., SHELDRIK, P., TAKAHASHI, M. & WOLF, K. (1982). Herpesviridae: definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* **16**, 201-217.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SIMARD, C., NADON, F., SÉGUIN, C., LABOISSIÈRE, S. & TRUDEL, M. (1990). Gene mapping of infectious bovine rhinotracheitis viral DNA genome. *Archives of Virology* **110**, 63-75.
- SIMARD, C., LABOISSIÈRE, S., SÉGUIN, C. & TRUDEL, M. (1991). Genomic heterogeneities in bovine herpesvirus type 1 viral isolates: a major variant selected from a field isolate. *Intervirology* **32**, 117-126.
- SIMARD, C., BASTIEN, N. & TRUDEL, M. (1992). Sequencing, 5' and 3'-end transcript mapping of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from bovine herpesvirus type-1. *Virology* (in press).
- SMITH, G. A., YOUNG, P. L. & MATTICK, J. S. (1990). The location and nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of bovine herpesvirus type 1.2. *Journal of General Virology* **71**, 2417-2424.
- STEFFY, K. R. & WEIR, J. P. (1991). Mutational analysis of two herpes simplex virus type 1 late promoters. *Journal of Virology* **65**, 6454-6460.
- TIKOO, S. K., FITZPATRICK, D. R., BABIUK, L. A. & ZAMB, T. J. (1990). Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. *Journal of Virology* **64**, 5132-5142.
- TRUDEL, M. & PAYMENT, P. (1980). Concentration and purification of rubella virus hemagglutinin by hollow fiber ultrafiltration and sucrose density centrifugation. *Canadian Journal of Microbiology* **26**, 1334-1339.
- TRUDEL, M., SÉGUIN, C., NADON, F., BOULAY, G., TRÉPANIÉ, P. & LUSSIER, G. (1987). Hemagglutination inhibition and virus neutralizing response of rabbits inoculated with bovine herpesvirus 1 subunit vaccine. *Veterinary Microbiology* **13**, 107-119.
- WHITBECK, J. C., BELLO, L. J. & LAWRENCE, W. C. (1988). Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and the herpes simplex virus type 1 gB gene. *Journal of Virology* **62**, 3319-3327.
- WHITTAKER, G. R., RIGGIO, M. P., HALLIBURTON, I. W., KILLINGTON, R. A., ALLEN, G. P. & MEREDITH, D. M. (1991). Antigenic and protein sequence homology between VP13/14, a herpes simplex virus type-1 tegument protein, and gp10, a glycoprotein of equine herpesvirus-1 and herpesvirus-4. *Journal of Virology* **65**, 2320-2326.
- WIRTH, U. V., GUNKEL, K., ENGELS, M. & SCHWYZER, M. (1989). Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus transcripts. *Journal of Virology* **63**, 4882-4889.

(Received 13 July 1992; Accepted 23 July 1992)

ANNEXE IV

LaBoissière, S., M. Trudel et C. Simard. 1995. The bovine herpesvirus type 1 major tegument protein VP8 is a poor inducer of immunity in mice. (soumis).

COMMUNICATIONS

LaBoissière, S., M. Trudel et C. Simard. 1994. Immunogenicity of recombinant vaccinia viruses expressing the bovine herpesvirus type 1 major tegument protein in mice. 19th International Herpesvirus Workshop, Vancouver, Colombie-Britannique, Canada.

Fraefel, C., S. LaBoissière, M. Schwyzer, I. Held, C. Simard et M. Ackermann. 1994. Bovine herpesvirus 1 immediate-early protein BICP0 affects gene expression and increases the infectivity of transfected viral DNA. 19th International Herpesvirus Workshop, Vancouver, Colombie-Britannique, Canada.

LaBoissière, S., M. Trudel et C. Simard. 1993. Construction and characterization of recombinant vaccinia viruses expressing the major tegument protein of bovine herpesvirus type 1. 18th International Herpesvirus Workshop, Pittsburgh, Pennsylvanie, États-Unis.

LaBoissière, S., M. Trudel et C. Simard. 1991. The complete sequence of the *Hind* III fragment M of bovine herpesvirus type 1. 10th Annual Meeting of American Society for Virology, Fort Collins, Colorado, États-Unis.

LaBoissière, S., C. Simard et M. Trudel. 1990. Putative localization and partial characterization of the bovine herpesvirus gII glycoprotein on the viral genome. 15th International Herpesvirus Workshop, Washington D.C., États-Unis.

LaBoissière, S., C. Simard et M. Trudel. 1990. Important heterogeneities in the genomes of bovine herpesvirus viral isolates. 4th Annual Bovine Herpesvirus Workshop, Washington D.C., États-Unis.

LaBoissière, S., C. Simard et M. Trudel. (1990). Hétérogénéités génomiques du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. 58ième congrès de l'Association Canadienne Française pour l'Avancement des Sciences, Ste-Foy, Québec, Canada.