



**HAL**  
open science

# LE VIRUS DE LA RHINOTRACHÉITE INFECTIEUSE BOVINE (BOVINE HERPESVIRUS 1): ASPECTS BIOCHIMIQUES

E. Thiry, P.-P. Pastoret

► **To cite this version:**

E. Thiry, P.-P. Pastoret. LE VIRUS DE LA RHINOTRACHÉITE INFECTIEUSE BOVINE (BOVINE HERPESVIRUS 1): ASPECTS BIOCHIMIQUES. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1984, 15 (4), pp.455-465. hal-00901527

**HAL Id: hal-00901527**

**<https://hal.science/hal-00901527>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Article de Synthèse**

**LE VIRUS DE LA RHINOTRACHÉITE INFECTIEUSE BOVINE (BOVINE HERPESVIRUS 1): ASPECTS BIOCHIMIQUES**

E. THIRY et P.-P. PASTORET

*Service de Virologie et de Pathologie des Maladies Virales, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Rue des Vétérinaires, 45, B-1070 Bruxelles, Belgique*

**Summary**

INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS (BOVINE HERPESVIRUS 1): BIOCHEMICAL ASPECTS. — The biochemical characteristics of infectious bovine rhinotracheitis virus (Bovine herpesvirus 1, BHV 1) are reviewed: description of the virion particle and virus purification, analysis of structural and non structural proteins, nucleic acid properties, restriction endonuclease analysis of the viral DNA. The authors emphasize the biochemical methods able to insure a better understanding of the molecular epidemiology of BHV 1 and of its latency; also to develop biochemical weapons against the infection.

**Introduction**

**Le virion: morphologie et purification**

**Les protéines virales**

*Les protéines structurales*

*Les protéines non structurales*

*Régulation de l'expression des gènes*

*Les marqueurs de souche*

*La constitution antigénique*

**L'acide nucléique viral**

*Description*

*L'analyse du DNA viral par digestion enzymatique*

*Étude du site de latence du BHV 1*

**Conclusions.**

Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovine herpesvirus 1, BHV 1) (Pastoret *et al.*, 1982) a jusqu'à présent été peu étudié sur le plan moléculaire, en comparaison d'autres herpesvirus d'importance vétérinaire, comme le virus de la maladie d'Aujeszky (Suid herpesvirus 1, SHV 1) ou le virus de la rhinopneumonie équine (Equid herpesvirus 1, EHV 1).

Les informations livrées par les études biochimiques sont pourtant d'une portée très pratique. L'analyse des protéines virales et l'analyse du génome viral par les endonucléases de restriction permettent la caractérisation des souches virales et complètent les méthodes de différenciation biologique (Pastoret *et al.*, 1980b; Thiry *et al.*, 1983a). L'hybridation moléculaire *in situ* détecte le DNA viral dans les cellules infectées et est un moyen de repérer dans l'organisme le génome du virus maintenu à l'état latent (Ackermann *et al.*, 1982). L'étude des enzymes viro-induits devrait faciliter la mise au point de substances antivirales spécifiques et efficaces contre le BHV 1 (Weinmaster *et al.*, 1982).

L'intérêt fondamental de telles recherches n'est pas à dénier non plus. L'étude approfondie du génome du BHV 1 apporte des éléments supplémentaires à la connaissance des herpesviridae. L'existence de parentés sérologiques entre le BHV 1 et d'autres herpesvirus a déjà été rapportée, notamment pour le SHV 1 (Aguilar-Setién *et al.*, 1979), le EHV 1, le virus de la maladie de Marek, l'herpesvirus caprin (Ludwig, 1983), mais si une homologie existe entre le BHV 1 et d'autres herpesvirus, c'est l'étude moléculaire qui en apportera les preuves définitives.

Cet article tente de faire la synthèse des connaissances actuelles sur la biochimie du BHV 1. Il insiste particulièrement sur les méthodes qui apportent des éléments nouveaux à l'épizootologie de l'infection due au BHV 1, à la compréhension de sa latence et aux moyens de lutte contre la rhinotrachéite infectieuse bovine.

### Le virion : morphologie et purification

Le BHV 1 appartient à la sous-famille des alphaherpesvirinae (Roizman *et al.*, 1981). Il possède les caractères morphologiques du groupe des herpesvirus : nucléocapside de symétrie icosaédrale, qui mesure 108 nm et comporte 162 capsomères ; ceux-ci ont un diamètre proche de 20 nm et sont parcourus selon leur axe longitudinal par un canal de 3,5 à 4 nm de diamètre. La nucléocapside contient le noyau qui protège le DNA bicaténaire. Elle est séparée de l'enveloppe par le tégument (Pastoret *et al.*, 1978). L'enveloppe porte des projections à sa surface (Valicek et Smid, 1976). Dès 1958 (Tousimis *et al.*), la taille

du virion est estimée à 150 nm par des méthodes biophysiques.

En chlorure de césium (CsCl), la densité de flottaison du BHV 1 est égale à 1,25 g/cm<sup>3</sup>, avec des valeurs extrêmes de 1,233 et 1,259 g/cm<sup>3</sup> (Bagust, 1972), mais le CsCl endommage l'enveloppe virale et inactive très rapidement le virus (Pastoret, 1979). Les gradients préformés de saccharose (20-65 %) (Black et Slack, 1972) et de tartrate de potassium (10-40 %) (Talens et Zee, 1976) conservent mieux l'infectivité virale. En tartrate de potassium, la densité de flottaison du virion est de 1,21 g/cm<sup>3</sup> (Bolton *et al.*, 1983) ou 1,22 g/cm<sup>3</sup> (Talens et Zee, 1976), celle de la nucléocapside est de 1,25 g/cm<sup>3</sup> (Bolton *et al.*, 1983). En centrifugation zonale au travers d'un gradient préformé de tartrate de potassium, Misra *et al.* (1981) mettent en évidence deux bandes de matériel viral. Les deux bandes contiennent toutes deux des glycoprotéines. Elles sont donc probablement constituées de virus enveloppés. Le matériel qui sédimente le plus rapidement comprend les particules contenant le DNA viral, tandis que le composé qui sédimente le plus lentement renferme les capsides vides. Le DNA représente 6 % de l'ensemble du virion (Pastoret, 1979).

### Les protéines virales

#### *Les protéines structurales*

Sklyanskaya *et al.* (1977) séparent en gel de polyacrylamide 18 polypeptides de structure dont les poids moléculaires (PM) s'échelonnent entre 29000 et 250000 daltons ; 8 polypeptides sont glycosylés. Pastoret *et al.* (1980b) mettent en évidence 21 polypeptides de structure dont 10 sont glycosylés (PM : 31000 à 275000 daltons) (fig. 1). Des études plus récentes, utilisant des gels de meilleure résolution, assignent au BHV 1 25 à 33 protéines structurales : Misra *et al.* (1981) obtiennent en gel de polyacrylamide 25 bandes différentes (PM : 12000 à 330000 daltons). Cinq des bandes obtenues pourraient contenir deux ou trois protéines, comme le révèle l'électrophorèse à deux dimensions. Ils en concluent que le virion possède au moins 25 protéines, plus vraisemblablement 28 à 33, dont 11 sont glycosylés. Bolton *et al.* (1983) obtiennent 33 protéines de structure (PM : 13000 à 275000 daltons) : 15 polypeptides sont étroitement associés à la nucléocapside, 13 à l'enveloppe virale. Ils suggèrent que vp8 et vp13 (nomenclature de Bolton *et al.*, 1983), les polypeptides les plus liés à l'enveloppe, constitueraient les antigènes de surface majeurs, au niveau des projections de l'enveloppe, et contiendraient les déterminants reconnus par les anticorps neutralisants. La protéine vp7, dans la nomenclature de Pastoret *et al.* (1980b), semble être le composé

majeur, car il représente 14,21 % de l'ensemble des protéines (Pastoret, 1979).

#### Les protéines non structurales

Quinze protéines non structurales sont repérées en gel de polyacrylamide dans les extraits de cellules rénales bovines (GBK et MDBK) infectées par le BHV 1 (Misra *et al.*, 1981). Parmi celles-ci, une thymidine kinase d'origine virale est synthétisée; elle diffère de l'enzyme cellulaire par sa spécificité de substrat, sa thermostabilité et sa capacité à utiliser d'autres donneurs de

phosphates que l'ATP (Weinmaster *et al.*, 1982). Elle diffère également de la thymidine kinase (TK) de l'herpes simplex virus, car elle ne phosphoryle pas l'acyclovir [9-(2-hydroxyéthoxyméthyl) guanine].

La TK viro-induite a acquis une grande importance dans l'étude des substances antiherpétiques. Les analogues de la thymidine, sélectionnés comme composés antiviraux, sont transformés en monophosphates exclusivement par la TK d'origine virale: ceci leur donne leur spécificité d'action. Les autres phosphorylations sont probablement assurées par des TK d'origine cellulaire. Lorsque l'analogue de thymidine est incorporé comme nucléotide dans la chaîne de DNA, il bloque l'élongation ultérieure du DNA et agit comme inhibiteur de la DNA-polymérase viro-induite. L'acyclovir est un exemple d'analogue de la thymidine, efficace envers l'herpes simplex virus (Elion *et al.*, 1977); il n'est pas phosphorylé par la TK du BHV 1 (Weinmaster *et al.*, 1982), ce qui explique l'incapacité de l'acyclovir à empêcher la multiplication du BHV 1 (Thiry *et al.*, 1983c).

La même stratégie de production d'analogues de thymidine peut être poursuivie dans l'espoir d'obtenir des substances antivirales efficaces envers le BHV 1. Le bromovinyl-désoxyuridine (BVdU: E-5-[1-bromovinyl]-2'-désoxyuridine) (de Clercq *et al.*, 1979) est phosphorylé par la TK du BHV 1 et prévient la multiplication virale: son activité *in vitro* est démontrée (Babiuk *et al.*, 1983). Bien que le BVdU soit incorporé dans le DNA viral, il ne provoque pas l'arrêt de la synthèse des chaînes de DNA en voie d'élongation (Misra *et al.*, 1983b). Le BVdU inhibe partiellement la glycosylation des glycoprotéines virales (Misra *et al.*, 1983b): c'est là que réside son activité antivirale envers le BHV 1, et non sur un processus lié à la réplication du DNA, alors qu'il a été sélectionné dans ce but comme antiviral.

La DNA-polymérase est un enzyme viro-induit surtout connu comme cible de substances antiherpétiques, comme l'acyclovir et le phosphonoformate. Le phosphonoformate inhibe sélectivement la DNA-polymérase viro-induite: cet analogue de pyrophosphate agit probablement au niveau des sites de liaison des pyrophosphates sur l'enzyme. Il présente *in vitro* une certaine activité envers le BHV 1 (Schwers *et al.*, 1980).

#### Régulation de l'expression des gènes

Les protéines des herpesvirus sont classées en polypeptides  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , selon l'ordre dans lequel elles sont synthétisées (Roizman et Morse, 1978). La transcription des gènes  $\alpha$  («immediate early») ne requiert pas l'expression d'autres gènes viraux et, en l'absence de synthèse protéique (traitement à la cycloheximide), les RNA messagers correspondants s'accumulent dans la cellule. Si la

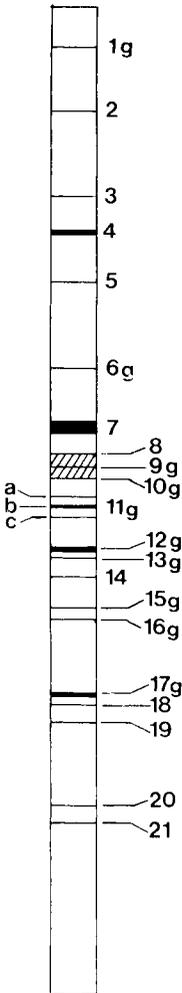


Fig. 1. Répartition schématique des polypeptides du Bovine herpesvirus 1 (souche Los Angeles) dans un gel de polyacrylamide à 10%. (d'après Pastoret, 1979). g: polypeptide glycosylé.

synthèse protéique est à nouveau autorisée, les gènes  $\alpha$  sont exprimés, même en l'absence d'une nouvelle synthèse de RNA messagers (addition d'actinomycine D). La synthèse des protéines  $\beta$  dépend de la synthèse préalable des protéines  $\alpha$  et, en retour, arrête la synthèse de ces protéines  $\alpha$ . La transcription des gènes  $\gamma$  («late») requiert l'expression préalable des gènes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et la synthèse de DNA viral.

Dans les cellules infectées par le BHV 1 et traitées à la cytosine arabinoside (inhibiteur de la synthèse de DNA), au moins cinq polypeptides manquent ou sont synthétisés en très petites quantités; ils sont identifiés comme les vrais polypeptides  $\gamma$ , puisqu'ils ne sont presque pas synthétisés en l'absence de synthèse de DNA (Misra *et al.*, 1981). Dans les cellules infectées, traitées à la cycloheximide, lavées, puis traitées à l'actinomycine D, trois polypeptides  $\alpha$  sont reconnus: aucun n'est glycosylé. Les polypeptides viraux synthétisés même en l'absence de synthèse de DNA sont les protéines  $\beta$  (Misra *et al.*, 1981). Une protéine glycosylée appartient à cette classe. Elle a fait l'objet d'une étude particulière (Misra *et al.*, 1982). En effet, comme elle est synthétisée précocement dans l'infection virale, elle est peut-être parmi les premières protéines virales reconnues par le système immunitaire de l'hôte.

La TK, décrite plus haut, est classée parmi les polypeptides  $\beta$ , car son expression dans les cellules infectées est indépendante de la synthèse de DNA viral (Weinmaster *et al.*, 1982).

#### *Les marqueurs de souche*

L'électrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide peut être utilisée pour différencier entre elles des souches de BHV 1: des différences mineures mais constantes sont observées dans le profil électrophorétique des protéines structurales entre souches respiratoires de BHV 1 (IBR: «infectieux bovine rhinotracheitis») et souches génitales (IPV: «infectieux pustular vulvovaginitis») (Pastoret *et al.*, 1980b). Des isolements classés comme souches IBR ou souches IPV par l'analyse du DNA par des endonucléases de restriction montrent également des variations légères du profil électrophorétique des protéines (Metzler *et al.*, 1983).

Néanmoins, les différences observées sont faibles et l'analyse des protéines ne semble pas le bon moyen de caractériser les souches de BHV 1. Sur 115 souches canadiennes étudiées par cette technique, six seulement ont montré des différences, situées sur un nombre limité de polypeptides (Misra *et al.*, 1983a).

#### *La constitution antigénique*

Cinq antigènes majeurs peuvent être identifiés par immunoelectrophorèse. Des antisérums spéci-

fiques ont été préparés contre trois d'entre eux. L'immunoprécipitation révèle trois composés immunogéniques majeurs: ils sont identiques pour les souches IBR et IPV; ce sont des glycoprotéines de 93000, 74000 et 69000 daltons. Les deux premières sont impliquées de manière prépondérante dans la séroneutralisation (Gregeresen, 1983; Pauli *et al.*, 1983).

Une batterie d'anticorps monoclonaux a été préparée envers le BHV 1 purifié (van den Hurk *et al.*, 1983; Metzler, communication personnelle). Un groupe d'anticorps monoclonaux réagit avec une glycoprotéine de 105000 daltons; une autre classe est spécifique de deux glycoprotéines (180000 et 91000 daltons); une troisième précipite trois glycoprotéines (130000, 70000 et 50000 daltons) (van den Hurk *et al.*, 1983).

### **L'acide nucléique viral**

#### *Description*

Le DNA bicaténaire du BHV 1 a une densité égale à 1,73 g/cm<sup>3</sup> (1,729 à 1,731) en CsCl et un contenu en guanine-cytosine (G + C) de 72 % (Russel et Crawford, 1964; Plummer *et al.*, 1969; Black et Slack, 1972; Ludwig, 1972a; Geder *et al.*, 1978). Ces valeurs sont très proches de celles obtenues pour le SHV 1 (Ludwig, 1972a). La densité du DNA viral est très différente de celle du DNA cellulaire bovin, de sorte qu'il est aisé de les séparer par centrifugation isopycnique (Ludwig et Storz, 1973). Le coefficient de sédimentation du DNA du BHV 1 est de 39 S (Russel et Crawford, 1964).

L'hybridation sur filtre des DNA viraux ou du DNA viral avec les RNA issus de cellules infectées ne détecte aucune homologie entre le génome du BHV 1 et celui d'autres herpesvirus: herpes simplex virus 1 et 2, SHV 1 virus de la mamillite bovine (Ludwig, 1972b; Ludwig *et al.*, 1972; Sterz *et al.*, 1973/1974).

Babiuk et Rouse (1976) ont découvert des ribonucléotides associés au DNA viral par une liaison covalente. La signification de cette présence n'est pas éclaircie.

Le poids moléculaire du DNA du BHV 1 a d'abord été estimé à 96 Md (mégadaltons) (Geder *et al.*, 1978) et de 90 à 100 Md (Engels *et al.*, 1981c). Il est vraisemblablement voisin de 88 Md [142 kb (kilobases)]; ce poids moléculaire a été calculé à partir des cartes de restriction obtenues par les endonucléases de restriction *EcoRI*, *HpaI* et *HindIII*, pour la souche K22 (souche IPV) (Skare, 1979; Farley *et al.*, 1981).

La taille du génome peut légèrement varier d'une souche à l'autre: 136,9 kb (84,5 Md) pour la souche Cooper (souche IBR) et 138,7 kb

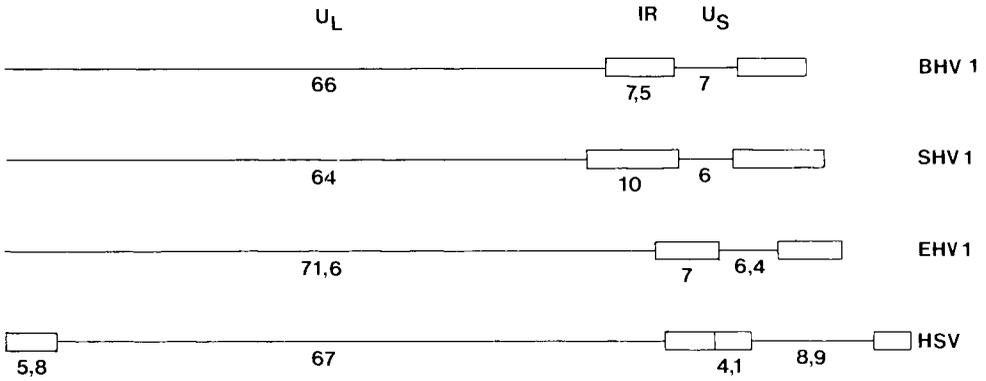


Fig. 2. Structures génomiques du Bovine herpesvirus 1 (souche K22) (d'après Farley *et al.*, 1981), du Suid herpesvirus 1 (SHV 1) (d'après Ben-Porat *et al.*, 1979), du Equine herpesvirus 1 (EHV 1) (d'après Henry *et al.*, 1981) et du herpes simplex virus (HSV) (d'après Roizman, 1979); U<sub>L</sub> : région unique longue; U<sub>S</sub> : région unique courte; IR : séquence répétée inverse; les poids moléculaires des segments génomiques sont exprimés en mégadaltons.

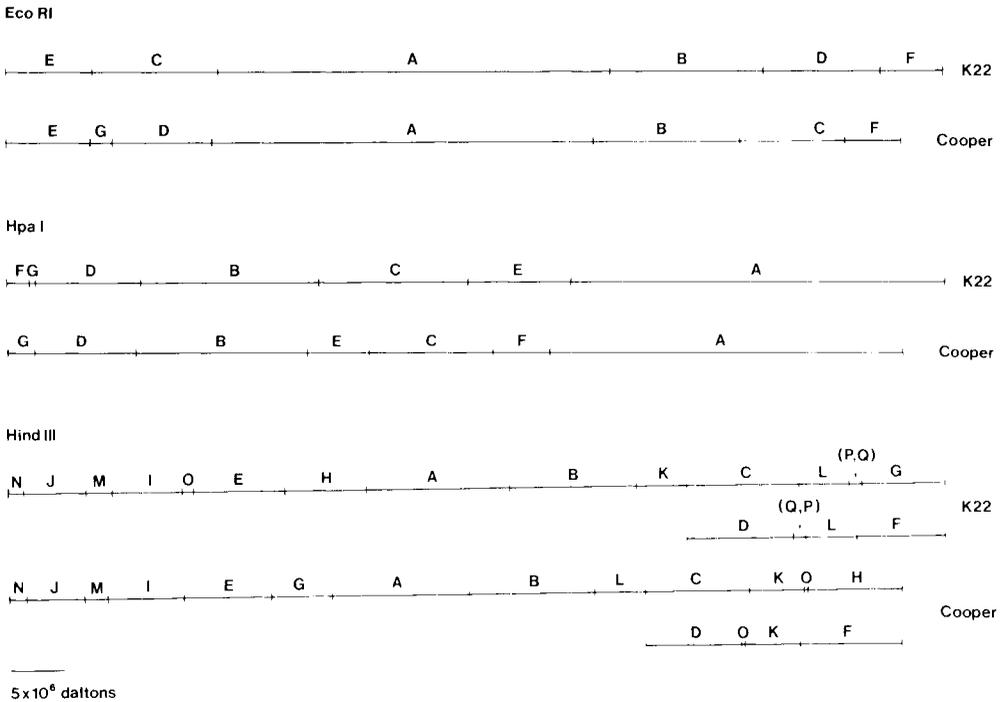


Fig. 3. Cartes de restriction du génome du Bovine herpesvirus 1 pour les endonucléases *EcoRI*, *HpaI* et *HindIII*. Le DNA de deux souches virales est représenté : souche K22 (Skare, communication personnelle), souche Cooper (d'après Mayfield *et al.*, 1983).

(85,5 Md) pour la souche K22 (souche IPV) (Mayfield *et al.*, 1983).

Les cartes de restriction et l'étude en microscopie électronique du DNA après dénaturation et réassociation (Farley *et al.*, 1981) révèlent que le génome du BHV 1 est constitué de deux parties: une longue ( $U_L$ ; région unique longue; 66 Md) et une courte (22 Md) composée d'une région unique ( $U_S$ ; 7 Md) et de deux segments de DNA répétés aux deux extrémités de la partie courte, mais dont les séquences de nucléotides sont inversées (inverted repeats; IR). Ces IR présentent une longueur différente pour la souche K22 (7,5 Md) et la souche Cooper (7 Md) (Mayfield *et al.*, 1983) (fig. 2 et 3). Le même type d'arrangement génomique, avec la présence d'IR, existe chez d'autres herpesvirus (fig. 2) et a été démontré la première fois pour l'herpes simplex virus (Sheldrick et Berthelot, 1975). Le segment court peut s'inverser par rapport au segment long: le génome du BHV 1 se présente donc sous la forme de deux isomères, à l'inverse du DNA de l'herpes simplex virus, qui possède quatre formes isomériques: dans ce cas, le segment long possède des IR et peut également s'inverser par rapport au segment court (Roizman, 1979) (fig. 2 et 3).

Le DNA de la souche K22 a été cloné en bactérie: les fragments de DNA résultant de la digestion par l'endonucléase *Hind*III et les fragments obtenus par digestion secondaire à l'aide de *Hind*III de la région D de la carte de restriction *Eco*RI ont été insérés dans le plasmide pBR 322: cette collection de clones renferme 90% du DNA du BHV 1 (Skare *et al.*, 1982).

Les fragments issus de la digestion par *Hind*III du DNA de la souche Cooper (souche IBR) ont également été clonés dans pBR 322: cette étude a permis de dresser les cartes de restriction de cette souche respiratoire (Mayfield *et al.*, 1983).

Des particules défectives interférentes (PDI) de BHV 1 peuvent être obtenues comme pour beaucoup d'autres virus animaux: elles s'accumulent de manière cyclique quand les suspensions virales sont passées de manière continue en culture de cellules. Les virus défectifs contiennent un génome incomplet; ils sont non viables par eux-mêmes et seulement capables de produire des virions de nouvelle génération par coinfection de cellules avec des virus complets (Cuifo et Hayward, 1981). Pour qu'une PDI soit viable, son DNA doit posséder un site initiateur de réplication et sa réplication doit être plus rapide et plus efficace que celle du génome normal (Cuifo et Hayward, 1981). Parmi les PDI de BHV 1 caractérisées, l'une possède un DNA formé de duplications en tandem d'une séquence de 8,5 Md contenant un site *Eco*RI: cette séquence renferme l'IR et une petite région de l' $U_S$ . Une autre PDI présente un génome constitué de deux séquences

non contiguës de l' $U_L$  (portions des segments J et K de la carte de restriction *Hind*III de la souche K22) (Porteous *et al.*, 1982). D'autres PDI ont été étudiées: leurs génomes sont formés de séquences répétées en tandem, représentant à peu près 10% du génome viral. L'examen de cinq PDI différentes montre qu'elles possèdent toutes les cinq des séquences de DNA provenant des IR (Skare *et al.*, 1982).

#### L'analyse du DNA par digestion enzymatique

Cette technique est introduite en 1975 dans l'étude de l'épidémiologie moléculaire des herpesvirus (Hayward *et al.*, 1975; Skare *et al.*, 1975). A ce moment les souches K22 (souche IPV) et Cooper (souche IBR) sont analysées avec l'endonucléase de restriction *Eco*RI (Skare *et al.*, 1975; Summers *et al.*, 1975) et les différences génomiques entre les deux souches sont remarquées (Summers *et al.*, 1975). En 1978, Geder *et al.* (1978) identifient un virus contaminant une culture de cellules humaines transformées par le cytomégalovirus humain: c'est le BHV 1, qu'ils caractérisent notamment par digestion du DNA viral par *Eco*RI.

Depuis 1980, cette technique s'est largement répandue, car elle procure un outil supplémentaire de différenciation des souches de BHV 1 (Pastoret *et al.*, 1980). Elle distingue en effet les souches IPV des autres souches européennes (Engels *et al.*, 1981c), ce qu'aucun marqueur de souche biologique ou immunologique n'avait pu réaliser, et est d'un emploi plus facile que l'électrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide. Diverses endonucléases de restriction sont utilisées dans ce but: *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, *Sac*I, *Bgl*II, *Kpn*I, *Hpa*I (Engels *et al.*, 1981b et c; Ludwig, 1983; Misra *et al.*, 1983a; Rziha *et al.*, 1981; St Jeor *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1982) (fig. 4).

Jusqu'à présent, les autres souches de BHV 1 n'ont pas pu être caractérisées par l'analyse de restriction (Ludwig, 1983; Pauli *et al.*, 1981); même la distinction entre souches IBR et IPV par cette technique fait l'objet de controverses. Nettleton *et al.* (1981) préfèrent classer les souches de BHV 1 selon la ressemblance du profil électrophorétique de leur DNA envers la souche K22 ou la souche Cooper. Plus récemment, une étude exhaustive de ce problème a été réalisée par Misra *et al.* (1983a) sur plus de 100 souches de BHV 1, dont la plupart ont été isolées dans la province canadienne d'Alberta. Aucune corrélation ne peut être mise en évidence entre le profil électrophorétique du DNA et le pouvoir pathogène de la souche examinée. Trois classes et neuf sous-classes sont définies en fonction de l'analyse de restriction. A la classe 1 appartiennent les souches virales du type Cooper

ou les souches identifiées comme IBR par Engels *et al.* (1981c). La classe 2 est la moins représentée. La classe 3 est moins nombreuse que la classe 1 et renferme les souches présentant le même profil que celui de la souche K22 ou des souches IPV selon Engels *et al.* (1981c); cependant, des virus isolés du tractus respiratoire sont rattachés à cette dernière classe.

Comme l'évolution historique de la rhinotrachéite infectieuse bovine est différente en Amérique du Nord et en Europe, il est difficile d'étendre les conclusions de Misra *et al.* (1983a) au continent européen, d'autant plus qu'ils n'ont analysé que six souches européennes de BHV 1, toutes issues de Grande-Bretagne.

Le BHV 1 garde ses caractères génomiques après plusieurs passages en culture de cellules, même après les nombreux passages nécessaires pour produire une souche virale atténuée (Engels *et al.*, 1981a; Misra *et al.*, 1983a).

Le DNA de la souche vaccinale thermosensible *ts* RLB 106 (Zygraich *et al.*, 1974) possède le profil électrophorétique de la classe 1 (Pastoret *et al.*, 1980a; Nettleton *et al.*, 1981 et 1983; Misra *et al.*, 1983a; Thiry *et al.*, 1983a). Dans ce cas, le caractère thermosensible reste le moyen de différenciation le plus aisé.

L'analyse du DNA par les endonucléases de restriction autorise une classification plus exacte des herpesvirus bovins (Ludwig, 1981; 1983): parmi ceux-ci, le BHV 1 peut être clairement distingué de l'herpesvirus caprin (par *Eco*RI, *Hind*III, *Bst*EII), bien que ces deux virus soient

antigéniquement très apparentés (Engels *et al.*, 1983).

C'est une méthode de choix pour suivre au cours du temps l'évolution du BHV 1 dans la population bovine. La rhinotrachéite infectieuse typique (forme IBR) n'est apparue en Europe que dans les années soixante-dix. Auparavant, le virus était responsable d'atteintes génitales (formes IPV), avec des épisodes respiratoires sporadiques. Nettleton *et al.* (1981) constatent que, avant 1976, le DNA des souches isolées en Grande-Bretagne possédait un profil électrophorétique semblable à la souche K22; à partir de cette date, les souches de type Cooper sont apparues en Grande-Bretagne, coïncidant avec les premières épidémies importantes de rhinotrachéite infectieuse bovine. En Suisse, les mêmes observations sont faites (Engels *et al.*, 1981c): l'affection respiratoire due au BHV 1 débute dans ce pays en 1978. Un seul cas de maladie respiratoire est rapporté auparavant, en 1974: la souche isolée à cette occasion présente les caractères de la souche K22.

La stabilité des souches latentes reste un des problèmes soulevés par la latence du BHV 1 chez le bovin (Thiry *et al.*, 1983b). L'analyse de restriction peut, dans ce cas, comparer les génomes de la souche parentale et de la souche réexcrétée par le bovin porteur latent ayant subi un accès de réactivation. Les quelques résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent la stabilité du génome du BHV 1 après passage *in vivo* et installation à l'état latent chez le bovin (Pastoret *et al.*, 1980a;

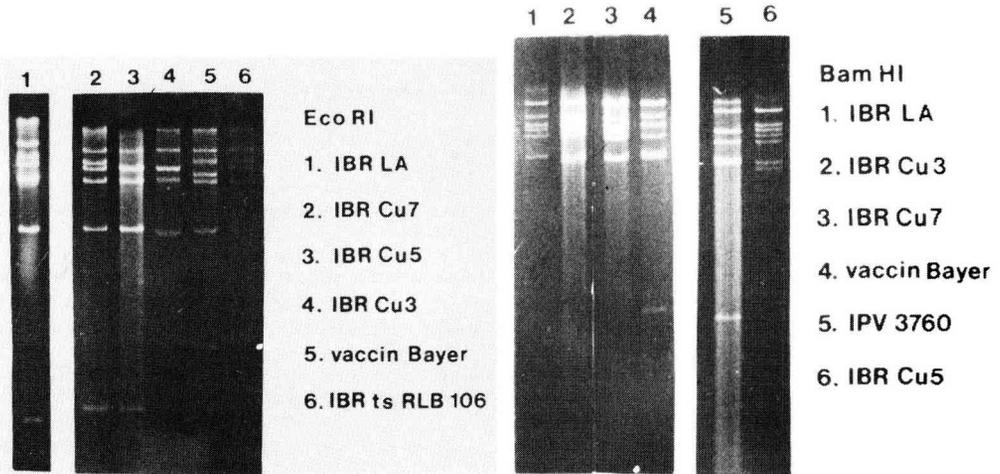


Fig. 4. — Analyse du DNA viral de diverses souches sauvages et vaccinales du Bovine herpesvirus 1 après digestion par les endonucléases *Eco*RI et *Bam*HI.

Thiry *et al.*, 1983b), contrairement à ce qui est décrit pour le SHV 1 (Rziha *et al.*, 1983).

#### Étude du site de latence du BHV 1

Une technique d'hybridation *in situ*, utilisant comme sonde radioactive du DNA extrait de virus purifié, a permis de démontrer la présence du DNA du BHV 1 dans le noyau de cellules de ganglions trijumeaux prélevés chez des bovins infectés de manière latente par le BHV 1 (Ackermann *et al.*, 1982). Cette technique devrait être améliorée par l'emploi de sondes constituées de DNA viral cloné (Pastoret et Ludwig, 1983).

#### Conclusions

L'étude du BHV 1 commence seulement à bénéficier de l'apport des nouvelles techniques: analyse de restriction, obtention d'anticorps monoclonaux, clonage du génome en bactérie. Il faut espérer qu'elles contribuent à une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la rhinotrachéite infectieuse bovine et procurent de nouvelles méthodes de diagnostic.

#### Résumé

Les différentes caractéristiques biochimiques du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovine herpesvirus 1) sont passées en revue: description du virion et méthodes de purification virale, analyse des protéines structurales et non structurales, propriétés de l'acide nucléique viral, analyse du DNA viral par les endonucléases de restriction. Les auteurs insistent sur les méthodes biochimiques qui apportent des éléments nouveaux à l'épidémiologie moléculaire du BHV 1, à la compréhension de sa latence et aux moyens de lutte contre l'infection qu'il provoque.

#### Références

- ACKERMANN M., PETERHANS E., WYLER R., 1982. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 36-40.
- AGUILAR-SETIÉN A., VANDEPUTTE J., PASTORET P.-P., MICHAUX C., PENSART M.B., SCHOENAERS F., 1979. Présence concomitante chez les bovins et les porcs, d'anticorps neutralisant le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovine herpesvirus 1, BHV 1) et celui de la maladie d'Aujeszky (Sus herpesvirus 1, SHV 1), après contact avec le virus homologue. *Ann. Méd. Vét.*, **123**, 275-284.
- BABIUK L.A., ROUSE B.T., 1976. Ribonucleotides in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. *J. Gen. Virol.*, **31**, 221-230.
- BABIUK L.A., ACRES S.D., MISRA V., STOCKDALE P.H.G., de CLERCQ E., 1983. Susceptibility of Bovine herpesvirus 1 to antiviral drugs: in vitro versus in vivo efficacy of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **23**, 715-720.
- BEN PORAT T., RIXON F.J., BLANKENSHIP M.L., 1979. Analysis of the structure of the genome of Pseudorabies virus. *Virology*, **95**, 285-294.
- BLACK D.N., SLACK G., 1972. A comparison of two strains of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **39**, 330-337.
- BOLTON D.C., ZEE Y.C., ARDANS A.A., 1983. Identification of envelope and nucleocapsid proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus per SDS-polyacrylamid gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.*, **8**, 57-68.
- CUIFO D.M., HAYWARD G.S., 1981. Tandem repeat defective DNA from the L segment of the HSV genome. In: Y. Becker. *Herpesvirus DNA, Developments in molecular virology*, vol. 1, chapter 8, p. 107-128. Martinus Nijhoff, The Hague.

La rhinotrachéite infectieuse bovine est un modèle de choix pour l'étude de la latence des herpesvirus: toutes les expériences peuvent en effet se dérouler en système bovin homologue (Pastoret, 1979). L'utilisation des techniques biochimiques les plus récentes est indispensable pour définir le site de latence virale, repérer d'éventuelles altérations du génome viral produites pendant la phase de latence ou détecter des virus recombinants formés durant la latence virale chez des bovins préalablement infectés par deux souches différentes de BHV 1.

L'analyse du DNA viral par les endonucléases de restriction ne révèle que peu de différences entre les souches de BHV 1. Elle reste néanmoins le moyen de caractérisation le plus sensible dont on dispose et est d'une grande valeur pour les études épidémiologiques expérimentales, dans lesquelles les souches virales de départ peuvent être choisies en fonction de leurs différences génomiques.

Accepté pour publication, le 3 janvier 1984.

- DE CLERCQ E., DESCAMPS J., DESOMER P., BARR P.J., JONES A.S., WALKER R.T., 1979. E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. A potent and selective antiherpes agent. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 2947-2951.
- ELION G.B., FURMAN P.A., FYFE J.A., DE MIRANDA P., BEAUCHAMP L., SCHAFFER H.J., 1977. Selectivity of action of an antiherpetic agent 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 5116-5120.
- ENGELS M., MULDER C., WYLER R., LUDWIG H., 1981a. Comparison of the genomes from different strains of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and infectious pustular vulvovaginitis (IPV) and from IPV vaccine strain. *Med. Microbiol. Immunol.*, **169**, 128.
- ENGELS M., STECK F., GALLEY R., WYLER R., 1981b. Comparison of the genomes of 4 IBR and 4 IPV virus strains by restriction analysis using *Hind*III and *Sac*I endonucleases. In: A.J. Nahmias, W.R. Dowdle, R.F. Schinazi, *The human herpesviruses, an interdisciplinary perspective*. p. 590, Elsevier, New York.
- ENGELS M., STECK F., WYLER R., 1981c. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.*, **67**, 169-174.
- ENGELS M., GELDERBLOM H., DARAI G., LUDWIG H., 1983. Goat herpesviruses: biological and physicochemical properties. *J. Gen. Virol.*, **64**, 2237-2247.
- FARLEY J.E., SKARE I.B., SKARE J., 1981. Inverted repeat sequences in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. In: A.J. Nahmias, W.R. Dowdle, R.F. Schinazi, *The human herpesviruses, an interdisciplinary perspective*. p. 590, Elsevier, New York.
- GEDER L., HYMAN R.W., FIGUEROA M., OAKES J.E., ILTIS J.P., DAWSON M.S., RAPP F., 1978. Identification of a herpesvirus isolated from cytomegalovirus-transformed human cells. *J. Virol.*, **27**, 713-724.
- GREGERSEN J.P., 1983. *Bovines herpesvirus 1. Untersuchungen ueber Antigene und ihre Verwandtschaft mit denen des bovinen Herpesvirus 6 sowie Versuche zur molekularbiologischen Differenzierung von IBR- und IPV-viren* Thèse. Freie Universitaet Berlin.
- HAYWARD G.S., FRENKEL N., ROIZMAN B., 1975. Anatomy of herpes simplex virus DNA: strain differences and heterogeneity in the locations of restriction endonuclease cleavage sites. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 1768-1772.
- HENRY B.E., ROBINSON R.A., BAUENHAUER S.A., ATHERTON S.S., HAYWARD G.S., O'CALLAGHAN D.J., 1981. Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. *Virology*, **115**, 97-114.
- LUDWIG H., 1972a. Untersuchungen am genetischen Material von Herpesviren. I. Biophysikalisch-chemische Charakterisierung von Herpesvirus-desoxyribonucleinsäuren. *Med. Microbiol. Immunol.*, **157**, 186-211.
- LUDWIG H., 1972b. Untersuchungen am genetischen Material von Herpesviren. II. Genetische Verwandtschaft verschiedener Herpesviren. *Med. Microbiol. Immunol.*, **157**, 212-238.
- LUDWIG H., 1981. Grouping of bovine herpesviruses. Abstract. *International Workshop on Herpesviruses*, Bologna, Italy, July 27-31.
- LUDWIG H., 1983. Bovine herpesviruses. In: B. Roizman. *The herpesviruses*, vol. 2. Chapter 4, p. 135-214. Plenum Press, New York.
- LUDWIG H.O., BISWAL N., BENYESH-MELNICK M., 1972. Studies on the relatedness of herpesviruses through DNA-DNA hybridization. *Virology*, **49**, 95-101.
- LUDWIG H., STORZ J., 1973. Activation of herpesvirus from normal bovine fetal spleen cells after prolonged cultivation. *Med. Microbiol. Immunol.*, **158**, 209-217.
- MAYFIELD J.E., GOOD P.J., VAN OORT H.J., CAMPBELL A.R., REED D.E., 1983. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J. Virol.*, **47**, 259-264.
- METZLER A.E., ENGELS M., WYLER R., 1983. Comparison of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) strains by SDS-PAGE and restriction enzyme analysis. Abstract. *Eighth International Herpesvirus Workshop*, Oxford, Great-Britain, July 31- August 5.
- MISRA V., BLUMENTHAL R.M., BABIUK L.A., 1981. Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). *J. Virol.*, **40**, 367-378.
- MISRA V., GILCHRIST J.E., WEINMASTER G., QUALTIERE L., VAN DEN HURK S., BABIUK L.A., 1982. Herpesvirus-induced «early» glycoprotein: characterization and possible role in immune cytolysis. *J. Virol.*, **43**, 1046-1054.
- MISRA V., BABIUK L.A., LE Q. DARCEL C., 1983a. Analysis of Bovine herpesvirus-type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Arch. Virol.*, **76**, 341-354.
- MISRA V., NELSON R.C., BABIUK L.A., 1983b. Inhibition of glycosylation of bovine herpesvirus 1 glycoproteins by the thymidine analog (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **23**, 857-865.
- NETTLETON P.F., HERRING A.J., SHARP J.M., HERRING J.A., 1981. Current research into infectious bovine rhinotracheitis in Scotland. *ECC Workshop on bovine infectious rhinotracheitis epidemiology and diagnosis*. INRA, Grignon, France, November 26-27.
- NETTLETON P.F., SHARP J.M., HERRING A.J., 1983. IBR virus excretion after vaccination, challenge and immunosuppression. In: G. Wittmann, R.M. Gaskill, H.J. Rziha. *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine*, p. 191-209, Martinus Nijhoff, The Hague.
- PASTORET P.-P., 1979. *Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovine herpesvirus 1)*. *Aspects biologiques et moléculaires*. Thèse. Université de Liège.

- PASTORET P.-P., AGUILAR-SETIÉN A., SCHOENAERS F., 1978. Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovid herpesvirus 1). *Ann. Méd. Vét.*, **122**, 371-391.
- PASTORET P.-P., BABIUK L.A., MISRA V., GRIEBEL P., 1980a. Reactivation of temperature-sensitive and non-temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Infect. Immun.*, **29**, 483-488.
- PASTORET P.-P., BURTONBOY G., AGUILAR-SETIÉN A., GODART M., LAMY M.E., SCHOENAERS F., 1980b. Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (Bovid herpesvirus 1) from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins. *Vet. Microbiol.*, **5**, 187-194.
- PASTORET P.-P., THIRY E., BROCHIER B., DERBOVEN G., 1982. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann. Rech. Vét.*, **13**, 221-235.
- PASTORET P.-P., LUDWIG H., 1983. Latency of herpesviruses in the ruminant species. In: G. Wittmann, R.M. Gaskell, H.J. Rziha. *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine*, p. 508-511, Martinus Nijhoff, The Hague.
- PAULI G., DARAI G., STORZ J., LUDWIG H., 1981. IBR-IPV viruses: genome structure and disease. *Med. Microbiol. Immunol.*, **169**, 129.
- PAULI G., GREGERSEN J.P., STORZ J., LUDWIG H., 1983. Biology and molecular biology of latent bovine herpesvirus type 1 (BHV-1). In: G. Wittmann, R.M. Gaskell, H.J. Rziha. *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine*, p. 229-239, Martinus Nijhoff, The Hague.
- PLUMMER G., GOODHEART C.R., HENSON D., BOWLING C.P., 1969. A comparison study of the DNA density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. *Virology*, **39**, 134-137.
- PORTEOUS S.T., SKARE J., SKARE I.B., 1982. Analysis of defective interfering particles of Bovine herpesvirus-1. Abstract. *Sixth Cold Spring Harbor meeting on Herpesviruses*, New York, USA, August 31-September 5.
- ROIZMAN B., 1979. The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell*, **16**, 481-494.
- ROIZMAN B., CARMICHAEL L.E., DEINHARDT F., DE THÉ G., NAHMIAS A.J., PLOWRIGHT W., RAPP F., SHELDRICK P., TAKAHASCHI M., WOLF K., 1981. Herpesviridae, definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology*, **16**, 201-217.
- ROIZMAN B., MORSE L.S., 1978. Human herpesvirus 1 as a model of regulation of herpesvirus macromolecular metabolism: a review. In: G. de Thé, W. Henle, F. Rapp. *DNA of herpesviruses, viral antigens, cell-virus interaction. Oncogenesis and herpesviruses*, vol. 3, part 1. p. 269-297, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- RUSSEL W.C., CRAWFORD L.V., 1964. Properties of the nucleic acids from some herpes group viruses. *Virology*, **22**, 288-292.
- RZIHA H.J., DÖLLER P.C., BACHMANN D.P.A., 1981. Comparison of the DNA of various Bovid herpesvirus type 1 (BHV-1) isolates (IBR/IPV) by restriction enzyme analysis. *Med. Microbiol. Immunol.*, **169**, 127.
- RZIHA H.J., OHLINGER V., WITTMANN G., 1983. Alteration of the pseudorabies virus genome after in vivo passage. Abstract. *Eighth International Herpesvirus Workshop*, Oxford, Great-Britain, July 31-August 5.
- ST JEOR S., SEAL B., TAYLOR R., 1982. Characterization of infectious bovine rhinotracheitis virus isolates. Abstract. *Sixth Cold Spring Harbor Meeting on Herpesviruses*, New York, USA, August 31-September 5.
- SCHWERS A., PASTORET P.-P., VINDEVOGEL H., LEROY P., AGUILAR-SETIÉN A., GODART M., 1980. Comparison of the effect of trisodium phosphonoformate on the mean plaque size of pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *J. Comp. Pathol.*, **90**, 625-633.
- SHELDRICK P., BERTHELOT N., 1975. Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 667-678.
- SKARE J., SUMMERS W.P., SUMMERS W.C., 1975. Structure and function of herpesvirus genomes. I. Comparison of five HSV-1 and two HSV-2 strains by cleavage of their DNA with *EcoRI* restriction endonuclease. *J. Virol.*, **15**, 726-732.
- SKARE J., 1979. Restriction mapping of infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. Abstract. *Fourth Cold Spring Harbor meeting on Herpesviruses*, New York, USA, August 28-September 2.
- SKARE J., SULLIVAN N., SKARE I.B., 1982. Cloning of bovine herpesvirus-1 DNA and localization of sequences in defective genomes. Abstract. *Sixth Cold Spring Harbor meeting on Herpesviruses*, New York, USA, August 31-September 5.
- SKLYANSKAYA E.I., ITKIN Z.B., GOFMAN Y.P., KAVERIN N.V., 1977. Structural proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Acta Virol.*, **21**, 273-279.
- STERZ H., LUDWIG H., ROTT R., 1973/1974. Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mammillitis virus. *Intervirology*, **2**, 1-13.
- SUMMERS W.C., FICKEL T., SKARE J., SUMMERS W.P., WAGNER M., 1975. Use of restriction endonucleases to analyse the DNA of herpesviruses. In: G. de Thé, M.A. Epstein, H. Zur Hausen. *Oncogenesis and herpesviruses* vol 2. p. 139-143, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- TALENS L.T., ZEE Y.C., 1976. Purification and buoyant density of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **151**, 132-135.
- TAYLOR R.E.L., SEAL B.S., ST JEOR S., 1982. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the soft-shelled tick *Ornithodoros coriaceus*. *Science*, **216**, 300-301.

- THIRY E., PASTORET P.-P., BROCHIER B., KETTMANN R., BURNY A., 1983a. Différenciation de souches du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovine herpesvirus 1) par l'analyse du DNA viral après digestion par l'endonucléase de restriction *EcoRI*. *Ann. Méd. Vet.*, **127**, 29-36.
- THIRY E., PASTORET P.-P., KETTMANN R., BURNY A., 1983b. Use of restriction analysis for the study of Bovid herpesvirus 1 latency. In: G. Wittmann, R.M. Gaskill, H.J. Rziha. *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine*, p. 251-256, Martinus Nijhoff, The Hague.
- THIRY E., VINDEVOGEL H., LEROY P., PASTORET P.-P., SCHWERS A., BROCHIER B., ANCIAUX Y., HOYOIS P., 1983c. *In vivo* and *in vitro* effect of acyclovir on pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *Ann. Rech. Vét.*, **14**, 239-245.
- TOUSIMIS A.J., HOWELLS W.V., GRIFFIN T.P., PORTER R.P., CHEATHAM W.J., MAURER F.D., 1958. Biophysical characterization of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99**, 614-616.
- VALICEK L., SMID B., 1976. Envelopment and the envelopes of infectious bovine rhinotracheitis virus in ultrathin sections. *Arch. Virol.*, **51**, 131-140.
- VAN DEN HURK S., VAN DEN HURK J.V., MISRA V., BABIUK L.A., 1983. Monoclonal antibodies specific for bovine herpesvirus type-1 glycoproteins. Abstract. *Eighth International Herpesvirus Workshop*, Oxford, Great-Britain, July 31-August 5.
- WEINMASTER G.A., MISRA V., Mc GUIRE R., BABIUK L.A., DE CLERQ E., 1982. Bovid herpesvirus type-1 (infectious bovine rhinotracheitis virus)-induced thymidine kinase. *Virology*, **118**, 191-201.
- ZYGRAICH N., LOBMANN M., VASCOBOINIC E., BERGE E., HUYGELEN C., 1974. *In vivo* and *in vitro* properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.*, **16**, 328-335.