

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHESE

La glycoprotéine gE de l'herpèsvirus bovin de type 1 et les nouveaux vaccins marqués

SCHYNTS F., LEMAIRE M., BARANOWSKI E., THIRY E.

Service de Virologie – Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège
B 43 bis, Sart-Tilman – B-4000 Liège, Belgique

RESUME. Des vaccins atténué et inactivé contre la rhinotrachéite infectieuse bovine (infectious bovine rhinotracheitis; IBR) délétés dans le gène codant pour la glycoprotéine gE sont apparus récemment sur le marché. Ils sont destinés à améliorer les plans de contrôle de l'IBR car ils permettent une différenciation sérologique entre animaux vaccinés et animaux infectés naturellement. La glycoprotéine gE de l'herpèsvirus bovin de type 1 (bovine herpesvirus type 1; BHV-1) est présente sur l'enveloppe de ce virus. Elle est non essentielle à la multiplication du BHV-1 et cette caractéristique explique que les virus vaccinaux délétés en gE sont viables *in vitro* et *in vivo*. Cette glycoprotéine joue un rôle dans la propagation du virus de cellule à cellule et dans la neuroinvasion du BHV-1. Les propriétés biologiques et biochimiques de la glycoprotéine gE sont décrites dans cet article. Les vaccins marqués délétés en gE possèdent des caractéristiques d'innocuité et d'efficacité semblables à celles des vaccins préexistant sur le marché. Les avantages et les inconvénients de ce type de vaccin dans le cadre d'un plan de lutte contre l'IBR sont discutés dans la deuxième partie de cet article.

INTRODUCTION

L'herpèsvirus bovin de type 1 (bovine herpesvirus type 1; BHV-1) est un pathogène majeur du bétail causant la rhinotrachéite infectieuse bovine (infectious bovine rhinotracheitis; IBR) et la vulvovaginite infectieuse pustuleuse (infectious pustular vulvovaginitis; IPV). Le BHV-1 partage les caractéristiques de la famille des *Herpesviridae* et s'installe à l'état latent chez l'animal infecté. Il possède des glycoprotéines ancrées à la surface de l'enveloppe virale (Wyler et al., 1989). Actuellement, dix gènes de glycoprotéines ont été localisés dans la séquence génomique du BHV-1 (Schwyzer et Ackermann, 1996). Parmi celles-ci, l'attention se porte actuellement sur la glycoprotéine gE à la suite de l'apparition sur le marché de vaccins marqués délétés dans le gène codant pour cette glycoprotéine. La glycoprotéine gE a été choisie parce qu'elle est non essen-

tielle à la multiplication virale et est suffisamment immunogène. Les nouveaux vaccins délétés dans le gène codant pour la glycoprotéine gE sont des outils importants dans le contrôle de l'IBR au sein de régions à forte prévalence d'animaux séropositifs, comme c'est le cas en Belgique (Lemaire et al., 1994; de Wergifosse et al., 1997). En effet, ils permettent la différenciation entre animaux vaccinés et animaux infectés naturellement. Dans notre pays, de nouvelles dispositions légales rendront obligatoire l'utilisation exclusive des vaccins marqués négatifs en gE pour la prophylaxie et le contrôle de l'IBR.

Cet article a pour but de faire le point des connaissances actuelles sur les caractéristiques biologiques et biochimiques de la glycoprotéine gE. Dans une deuxième partie, il donne une description détaillée de l'innocuité et de l'efficacité des nouveaux vaccins marqués délétés en gE

en insistant sur les avantages et les risques de leur utilisation dans le cadre du contrôle de l'IBR.

LA GLYCOPROTEINE gE DE L'HERPESVIRUS BOVIN DE TYPE 1

Les glycoprotéines de l'herpèsvirus bovin de type 1

Le BHV-1 appartient à la sous-famille des *alphaherpesvirinae* comme l'herpèsvirus simplex de type 1 (HSV-1) et le virus de la maladie d'Aujeszky (PRV). Le matériel génomique des herpèsvirus est constitué d'un ADN bicaténaire enfermé dans une capside de symétrie icosaédrique. La capside est entourée du tégument et d'une enveloppe phospholipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales (Wyler et al., 1989; Roizman, 1996). Le génome du BHV-1 comporte 10 régions codantes corres-

pendant à des glycoprotéines d'enveloppe connues (Schwyzer et Ackermann, 1996). Elles sont dénommées gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, par analogie aux glycoprotéines homologues identifiées chez l'HSV-1. Les glycoprotéines du BHV-1 sont d'une importance capitale. Se situant à la surface du virion, elles sont aptes à établir des interactions entre le virus et la cellule cible. En effet, elles initient l'attachement sur le récepteur cellulaire et la pénétration du virus dans la cellule cible. Elles déterminent donc le tropisme tissulaire et le spectre d'hôte du virus (Thiry et al., 1994).

En parallèle à ce rôle dans l'infection de la cellule, les glycoprotéines du BHV-1 sont indispensables à l'enveloppement et à la sortie du virus. Elles participent à la propagation de l'infection en favorisant le passage du virus des cellules infectées aux cellules saines voisines (Baranowski, 1996).

Le rôle joué par les glycoprotéines du BHV-1 ne se limite pas uniquement à l'attachement, la pénétration, la sortie et la propagation du virus. Les glycoprotéines contiennent des épitopes exprimés à la surface virale, mais également à la surface des cellules infectées (en association au complexe majeur d'histocompatibi-

lité de type 1 (CMH-I) ou de type 2 (CMH-II)). Elles sont donc des cibles importantes contre lesquelles les réponses immunes humorale et cellulaire sont dirigées (Denis et al., 1993, 1994a). Ces propriétés impliquent que les glycoprotéines du BHV-1 soient des composants essentiels des vaccins. De plus, la réponse sérologique dirigée contre ces glycoprotéines est largement mise à profit dans la détection et le diagnostic des bovins infectés.

Les glycoprotéines du BHV-1 ont des fonctions distinctes au cours du cycle de multiplication du virus. Certaines d'entre elles s'associent pour former un complexe lié de façon non covalente, comme par exemple entre les glycoprotéines gE et gI (Whitbeck et al., 1996; Yoshitake et al., 1997) et entre les glycoprotéines gH et gL (Baranowski et al., 1995; Van drunen Littel-Van den hurk et al., 1996). Ces complexes seraient des unités fonctionnelles importantes dans le cycle de multiplication virale.

Une glycoprotéine est soit essentielle, soit non essentielle. Une délétion dans un gène codant pour une glycoprotéine essentielle affecte de manière grave la capacité de multiplication virale et le virus n'est plus viable. En sens inverse, une délétion

dans le gène codant pour une glycoprotéine non-essentielle n'affecte pas de façon majeure le potentiel de multiplication virale et le virus est toujours viable (Thiry et al., 1994; Baranowski et al., 1996).

La glycoprotéine gE fait partie des glycoprotéines non essentielles du BHV-1. Cette propriété est en partie à la base de l'apparition sur le marché de nouveaux vaccins délévés marqués c'est-à-dire composés de virus (atténués ou inactivés) dépourvus de la glycoprotéine gE.

La glycoprotéine gE de l'herpèsvirus bovin de type 1

Le gène codant pour la glycoprotéine gE

Le génome du BHV-1 est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire linéaire d'environ 136 kbp comprenant une unité longue de 104 kbp (U_L) et une unité courte de 10 kbp (U_S). Cette dernière est flanquée de deux zones de séquences répétées de 11 kbp chacune (Internal Repeat (IR) et Terminal Repeat (TR)) (Schwyzer et Ackermann, 1996) (Figure 1). L'analyse du génome du BHV-1 a commencé au début des années 1980 à l'aide d'enzymes de restriction. Des profils et des cartes de restriction du génome du BHV-1

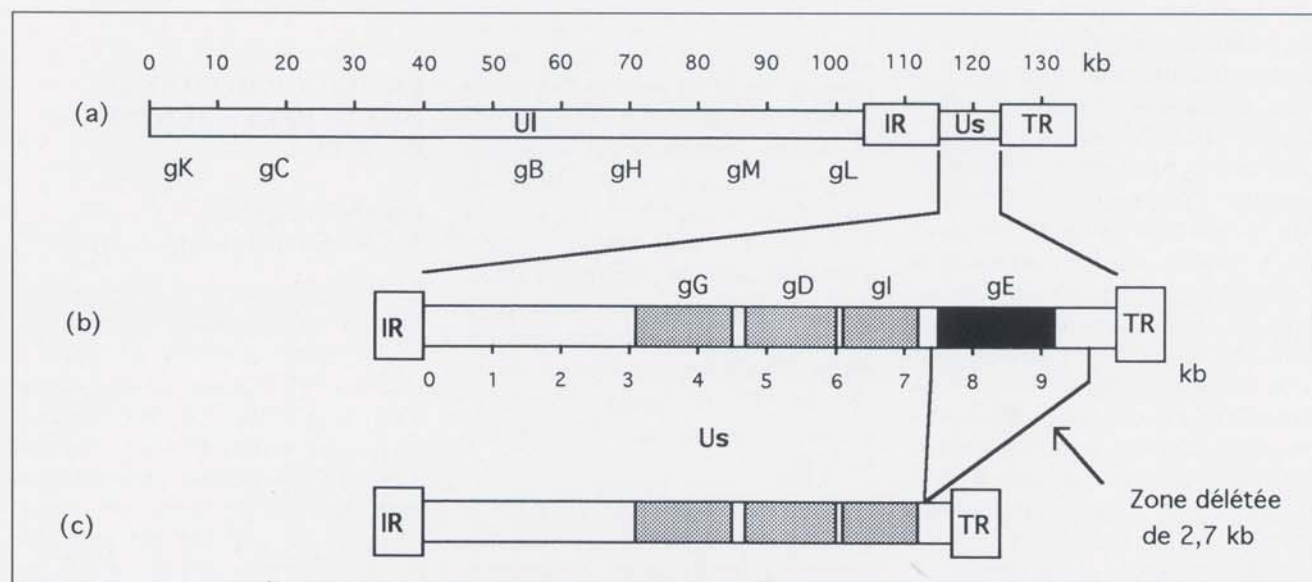


Figure 1

- Le génome du BHV-1 (136 kb) est composé d'une unité longue (U_L , 104 kb), d'une unité courte (U_S , 10 kb) et de deux séquences répétées (Internal Repeat (IR) et Terminal Repeat (TR)) de 11 kb chacune. L'organisation génomique des gènes codant pour des glycoprotéines d'enveloppe localisés dans l'UL est indiquée.
- Organisation génomique des gènes codant pour les glycoprotéines d'enveloppe dont la séquence est localisée au niveau de l' U_S .
- Organisation génomique de la région U_S de la souche vaccinale Difivac du BHV-1 délévée dans le gène codant pour la glycoprotéine gE.

ont pu ainsi être établis (Engels et al., 1981; Mayfield et al., 1983). Depuis lors, des progrès croissants ont été réalisés dans la connaissance du génome du BHV-1 et, récemment, la totalité du génome de la souche de référence Cooper du BHV-1, a été séquencée grâce à une collaboration internationale entre divers laboratoires (Schwyzer, 1995; Schwyzer et al., 1996; Meyer et al., 1997). Les dix régions codant pour des glycoprotéines d'enveloppe ont été localisées et séquencées (Schwyzer et Ackermann, 1996). La région U_S du BHV-1 (souche ST) a été séquencée (Leung-Tack et al., 1994). Huit cadres ouverts de lecture (open reading frames (ORF)) y ont été localisés. L'ORF 7 est situé entre les nucléotides 7644 et 9369 du fragment U_S et code pour une protéine de 575 acides aminés ayant une masse moléculaire prédite de 61175 daltons. La comparaison des séquences en acides aminés de l'ORF 7 avec celle des glycoprotéines connues d'autres *alphaherpesvirinae* a mis en évidence une homologie significative avec les glycoprotéines gE de l'HSV-1 (38,5%), du PRV (38,5%) et de l'herpèsvirus équin de type 1 (EHV-1) (46,7%). Par analogie, l'ORF 7 de la région U_S a été désignée comme codant pour la glycoprotéine gE du BHV-1. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Rebordosa et al. qui ont localisé et séquencé le même gène de la souche FM du BHV-1 (Rebordosa et al., 1994).

Biosynthèse de la glycoprotéine gE

La masse moléculaire apparente de la glycoprotéine gE mature, estimée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), est d'environ 93 kDa (Baranowski et al., 1993), 92 kDa (Whitbeck et al., 1996), 94 kDa (Yoshitake et al., 1997). Il existe une différence importante entre les masses moléculaires apparentes de la glycoprotéine gE établies soit à partir de sa séquence protéique primaire (63 kDa), soit à partir de sa forme mature (93 kDa). Cet état de fait a pu être éclairci par l'hypothèse d'une maturation co- et post-traductionnelle de la protéine nouvellement synthétisée.

Durant celle-ci, des structures oligosaccharidiques lui sont ajoutées. Des inhibiteurs de la N-glycosylation, de la O-glycosylation et des glycosidases ont permis de déterminer la nature des structures oligosaccharidiques constituant la glycoprotéine gE. Elle contient deux oligosaccharides N-liés sensibles à l'endoglycosidase H et il est fort probable que les glycoprotéines gE et gI contiennent également des sites de O-glycosylation (Whitbeck et al., 1996; Yoshitake et al., 1997). La protéine précurseur de 63 kDa subirait une N-glycosylation co-traductionnelle dans le réticulum endoplasmique qui la transforme en une protéine glycosylée riche en mannose d'une masse moléculaire de 85 kDa. Ensuite, cette glycoprotéine précurseur subirait une O-glycosylation et un ajout d'acide sialique au sein de l'appareil de Golgi qui la transformerait en sa forme mature de masse moléculaire de 93 kDa (Baranowski et al., manuscrit en préparation). C'est cette forme glycosylée de la glycoprotéine gE qui est exprimée sur l'enveloppe virale et à la surface des cellules infectées. Enfin, la biosynthèse complète de la glycoprotéine gE semble n'être possible qu'en présence d'un complexe non covalent entre les glycoprotéines gE et gI (Whitbeck et al., 1996). Cependant, un mutant de BHV-1 délété en gI semble être capable de produire une glycoprotéine gE mature retrouvée à la surface du virion (Yoshitake et al., 1997).

Activités biologiques *in vitro* et *in vivo* de la glycoprotéine gE

De façon similaire au PRV, un mutant du BHV-1 délété en gE forme de plus petites plages de lyse en culture de cellules qu'un virus sauvage (Jacobs, 1994). Cette réduction de la taille des plages de lyses suggère ainsi un rôle de la glycoprotéine gE dans la propagation virale de cellule à cellule (Rebordosa et al., 1996) (figure 2).

De nombreuses expériences ont été réalisées, dans le cadre de l'étude de l'HSV-1 et du PRV, afin de déterminer les propriétés biologiques *in vivo* de la glycoprotéine gE. Les glycoprotéines gE des différents *alphaherpesvirinae* sont directement impliquées dans la virulence de cette

sous-famille d'herpèsvirus (Jacobs, 1994). En effet, un mutant de PRV délété en gE inoculé à des porcelets de 3 semaines ne provoque pas de maladie mortelle contrairement à une souche virale sauvage inoculée à des porcelets de même âge (Jacobs et al., 1993). Dans le cas du BHV-1, un mutant de délétion négatif en gE construit par génie génétique (Van Engelenburg et al., 1994) n'a pas induit de signes cliniques chez des veaux de 7 semaines indemnes de BHV-1. L'atténuation virale causée par la délétion de la glycoprotéine gE était apte à elle seule de produire une souche virale non virulente chez ces veaux. De façon similaire, la souche de BHV-1 Difivac, délétée en gE (Zagreb ou Za, produite par Bayer®) utilisée pour la production d'un nouveau vaccin marqué vivant a été testée afin de répondre aux nouvelles exigences européennes relatives à l'enregistrement du médicament immunologique vétérinaire. Les tests d'innocuité effectués sur ce vaccin atténué n'ont révélé aucune réaction secondaire notable chez les animaux vaccinés (Strube et al., 1996). Ces trois exemples montrent clairement que la glycoprotéine gE est impliquée dans la virulence des *alphaherpesvirinae*.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette propriété biologique de la glycoprotéine gE (Jacobs, 1994).

La glycoprotéine gE du PRV interviendrait *in vitro* dans la propagation virale de cellule à cellule et dans la fusion cellulaire entre la cellule infectée et la cellule saine permettant une propagation virale intercellulaire plus rapide (Zsak et al., 1992). En effet, la propagation de l'infection s'effectue non seulement par la libération de particules virales nouvellement formées dans le milieu extracellulaire, mais également par leur passage direct de cellule à cellule. Des travaux plus récents ont montré que la glycoprotéine gE est aussi impliquée dans ce mode de transmission pour le BHV-1 (Rijsewijk et al., 1995; Baranowski, 1996; Rebordosa et al., 1996).

Des mutants de PRV délétés en gE infecteraient sur le site d'infection moins de cellules neuronales que le

virus sauvage, diminuant ainsi la neuroinvasion chez le porc infecté et par là même, la virulence (Jacobs, 1994).

De plus, ces mutants du PRV n'exprimant pas la glycoprotéine gE pourraient être incapables de franchir la synapse neuronale. Des mutants de PRV négatifs en gD qui sont de plus incapables d'exprimer la glycoprotéine gI ou les glycoprotéines gI et gE infectaient un nombre limité de neurones de premier ordre de l'épithélium olfactif et du ganglion trijumeau et étaient de plus incapables d'effectuer un passage trans-neuronal ou d'atteindre le système nerveux central des porcs infectés

(Mulder et al., 1996). Un mutant de PRV négatif en gE avait une capacité moindre d'infecter les neurones de second et de troisième ordres des bulbes olfactifs et des ganglions trijumeaux chez le porc (Mulder et al., 1994). Chez la souris, la délétion de la glycoprotéine gE réduit la propagation du virus de la maladie d'Aujeszky (PRV) dans le système nerveux après inoculation intranasale (Babic et al., 1996). Dans le cas de l'HSV-1, les glycoprotéines gE et gI facilitent la propagation virale d'un neurone à l'autre (Dingwell et al., 1995).

Les glycoprotéines gE et gI pourraient être nécessaires au transport

intraneuronal du virus, ainsi que cela a été démontré chez le porc infecté par le PRV (Kritas et al., 1995).

Finalement, les produits des gènes codant pour les glycoprotéines gE et gI du BHV-1 exprimés dans un PRV recombinant délété en gE et gI peuvent en partie compléter ce défaut de virulence chez le rat, espèce non sensible au BHV-1 (Knapp et Enquist, 1997). Ces résultats suggèrent que les glycoprotéines gE et gI des *alphaherpesvirinae* sont des facteurs intrinsèques de la virulence affectant celle-ci indépendamment du virus et de l'hôte.

L'ensemble de ces études démontre l'importance des propriétés biologiques de la glycoprotéine gE dans la virulence et la neuroinvasion des *alphaherpesvirinae*.

Le complexe gE/gI et son rôle dans le cycle de multiplication de l'herpèsvirus bovin de type 1

Les glycoprotéines gE et gI de l'HSV-1, du virus de la varicelle et du zona (VZV), de l'herpèsvirus félin (FHV-1) forment un complexe non covalent dans les cellules infectées, appelé également hétérodimère (Johnson et Feenstra, 1987; Johnson et al., 1988; Litwin et al., 1992; Mijines et al., 1996). Pour l'HSV-1 et le VZV, cet hétérodimère est capable de lier la fraction Fc des immunoglobulines de type G (IgG) et le facteur C3b du complément (Johnson et al., 1987, 1988; Litwin et al., 1992). Il s'agirait donc d'une stratégie de protection utilisée par le virus afin de détourner la cellule infectée des réactions immunes telles que la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant du complément (ADCC) ou l'activation du complément.

Les deux glycoprotéines homologues forment également un complexe lié de façon non covalente qui peut être mis en évidence par immunoprécipitation chez le PRV (Zuckermann et al., 1988) et le BHV-1 (Whitbeck et al., 1996; Yoshitake et al., 1997). Cependant, aucun récepteur de la fraction Fc des IgG n'a été démontré chez le BHV-1 (Whitbeck et al., 1996).

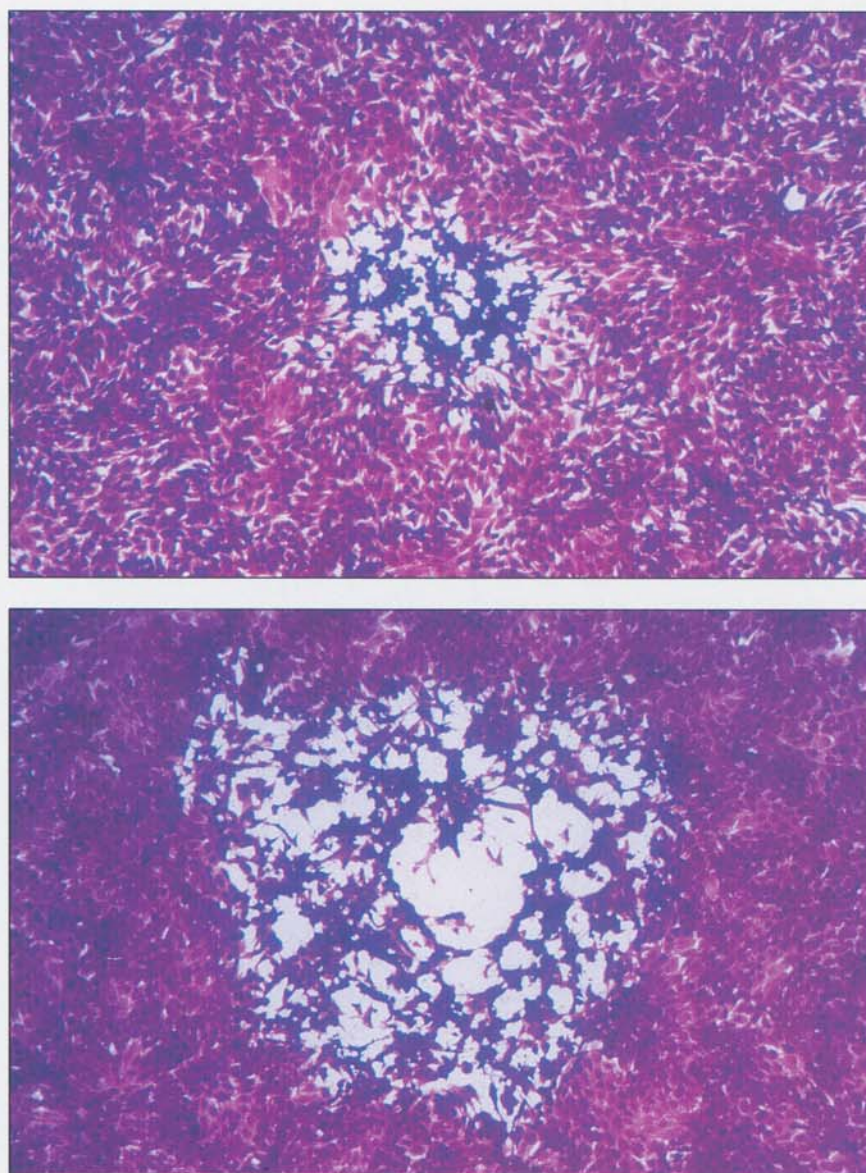


Figure II

Une réduction de la taille des plages de lyse sur cellules MDBK est obtenue suite à l'absence de la glycoprotéine gE, indiquant son rôle dans la propagation virale de cellule à cellule. Figure supérieure: BHV-1 souche ST gE⁻, lac Z⁺. Figure inférieure: BHV-1 souche ST gE⁺. Grossissement: 200 fois. Coloration: cristal violet.

Rôle de la glycoprotéine gE dans l'établissement de la latence, la réactivation et la réexcrétion virale

Le BHV-1 s'installe à l'état latent chez l'animal infecté (Nettleton et Sharp, 1980; Pastoret et al., 1984). Le site de latence actuellement reconnu est le neurone sensitif du ganglion trijumeau ou sacral, suivant le site d'infection primaire (Ackermann et al., 1982; Ackermann et Wyler, 1984). Le virus à l'état latent ne se multiplie pas chez l'animal infecté. Il est néanmoins présent sous forme de génome viral non intégré dans les cellules nerveuses du ganglion régional (trijumeau ou sacral). On parle donc d'infection persistante. Les cellules neuronales infectées n'expriment pas le génome viral. Il n'y a donc pas production de nouvelles particules virales infectieuses ni d'expression de protéines virales bien que le génome viral soit présent au sein de la cellule infectée (Van Engelenburg et al., 1995). Cette état de latence peut être rompu expérimentalement par l'injection répétée de corticostéroïdes comme par exemple la dexaméthasone (Pastoret et al., 1980; Thiry et al., 1983). En fait, toute situation de stress, comme par exemple la parturition ou le transport, peut provoquer la réactivation virale chez l'animal porteur latent (Thiry et al., 1985, 1987). Lors de la latence, une courte région du génome viral est cependant transcrite. Ce transcrit a été mis en évidence dans les ganglions trijumeaux de bovins infectés par le BHV-1 (Kutish et al., 1990). Il a été caractérisé et nommé LR-RNA (Latency-Related RNA). Des expériences menées chez le lapin tendent à prouver que le LR-RNA pourrait jouer un rôle dans la réactivation virale (Rock et al., 1986). En effet, la dexaméthasone aurait un effet régulateur négatif prononcé sur le promoteur du LR-RNA (Jones et al., 1990) permettant ainsi la réactivation virale. Une étude récente suggère que le produit d'expression du gène LR inhibe la progression du cycle cellulaire des cellules nerveuses infectées par le BHV-1. Cette activité augmenterait leur survie (Schang et al., 1996).

De l'ADN de BHV-1 a pu être détecté par amplification génique (Polymerase chain reaction; PCR) au niveau des ganglions trijumeaux de veaux infectés par voie intranasale à l'aide d'une souche sauvage de BHV-1, souche Lam, mais également à l'aide d'une souche délétée en gE par génie génétique (Van Engelenburg et al., 1995). Les *alphaherpesvirinae* délétés en gE de PRV, d'HSV-1 et de BHV-1, peuvent s'établir à l'état latent chez l'animal infecté, mais de façon plus difficile que les virus sauvages homologues (Jacobs, 1994). Cela pourrait être expliqué par les propriétés biologiques *in vivo* de la glycoprotéine gE et particulièrement son rôle dans la neuroinvasion. Une délétion dans le gène codant pour la glycoprotéine gE du BHV-1 n'empêche donc pas son établissement à l'état latent chez l'animal infecté, puisque de l'ADN viral est détecté par PCR sur les ganglions trijumeaux (Van Engelenburg et al., 1995).

Des résultats contradictoires ont été observés quant à la réactivation de souches vaccinales vivantes délétées en gE du BHV-1. Des veaux vaccinés avec une souche délétée en gE obtenue soit par passages successifs en culture de cellules (souche Zagreb) soit par génie génétique et infectés ultérieurement par la souche Lam n'ont pas réexcrété la souche délétée après un traitement intramusculaire de dexaméthasone alors que la souche sauvage était résoluée (Kaashoek et al., 1994, 1996a). Cependant, les protocoles expérimentaux établis par Kaashoek et al. (1994, 1996a) comprenaient une vaccination suivie d'une épreuve virulente avant la réactivation expérimentale. Dans ces deux cas, une éventuelle réexcrétion de la souche vaccinale pouvait donc être masquée par la réexcrétion simultanée de la souche virulente utilisée lors de l'épreuve virulente. L'expérience décisive a été conduite par Straub et al. (1996). Des veaux infectés par le virus vaccinal délété en gE (souche Zagreb) ont présenté une réexcrétion virale après traitement de réactivation à la prednisolone.

LES VACCINS DELETES DANS LE GENE DE LA GLYCOPROTEINE gE

Les vaccins délétés en gE vivant et inactivé

Le premier vaccin contre l'IBR est apparu en 1956 (Kendrick et al., 1956). Depuis cette époque, d'autres vaccins atténués et inactivés ont été développés. Ils ont permis de diminuer les pertes économiques liées au BHV-1 en prévenant les signes cliniques provoqués par cette infection virale. Bien qu'ils protègent cliniquement le bovin infecté, ces différents vaccins n'empêchent pas une souche sauvage de s'installer à l'état latent et ne permettent pas non plus une surveillance épidémiologique suite à l'interférence qu'ils créent sur les dépistages sérologiques de routine. C'est pour cette dernière raison que la recherche s'est orientée ces dernières années vers la production de vaccins délétés marqués permettant une discrimination sérologique entre animaux vaccinés et animaux infectés naturellement. Des mutants du BHV-1 délétés dans une ou plusieurs glycoprotéines non essentielles, comme les glycoprotéines gC, gG, gI, gE, ont été développés (Denis et al., 1996; Kaashoek et al., 1996c) (figure 3).

Partant de la souche Zagreb du BHV-1, il a été possible, par de nombreux passages successifs en culture de cellules, d'obtenir une souche virale formant de petites plages de lyse. Cette souche possédait une délétion de 2,7 kb englobant la totalité du gène codant pour la glycoprotéine gE (Rijsewijk et al., 1993) (figure 1). Baptisée Difivac®, elle est à la base des vaccins marqués développés par les firmes Bayer et Hoechst (Bayovac® et Rhinobovin®).

Une autre souche virale délétée en gE a également été mise au point par génie génétique (Van Engelenburg et al., 1994) et a été testée comme vaccin potentiel (Van Engelenburg et al., 1994; Kaashoek et al., 1996a).

Innocuité et efficacité des vaccins délétés dans le gène de la glycoprotéine gE

Tout nouveau vaccin doit obtenir une autorisation de mise sur le mar-

ché (AMM) avant d'être commercialisé. Pour atteindre cet objectif, les industries pharmaceutiques sont obligées de répondre à des critères stricts d'innocuité et d'efficacité définis par une directive de la Communauté Européenne (Anonyme, 1992).

Innocuité

Les tests d'innocuité sont destinés à mettre en évidence les éventuels effets indésirables liés à l'utilisation d'un vaccin. Les premiers essais d'innocuité effectués sur la souche Zagreb

du BHV-1 ont été menés par Kaashoek et al. (1994, 1995). Les deux préparations vaccinales (vivante et inactivée) ont été administrées à des veaux de 2 à 4 mois indemnes de BHV-1. Le comportement et l'appétit des veaux vaccinés n'ont pas été modifiés. Suite à l'injection sous-cutanée de la préparation vaccinale inactivée, aucune réaction locale au site d'injection n'a pu être observée. L'étude démontre donc que ces préparations vaccinales présentent une bonne innocuité chez de jeunes veaux. Des expériences complémen-

taires ont été réalisées de manière à répondre plus complètement aux exigences européennes relatives aux critères d'innocuité liés à l'enregistrement du médicament immunologique vétérinaire (Strube et al., 1996). L'injection d'une simple dose ou d'une surdose de la préparation vaccinale inactivée n'induisait aucun effet indésirable local ou systémique. L'atténuation de la souche virale était suffisante pour n'induire aucun signe clinique autre qu'un léger jetage nasal après vaccination intranasale chez des veaux de deux semaines ou de trois mois. La souche vaccinale ne présentait pas de réversion vers la virulence à la suite de 5 passages *in vivo* chez des veaux. La vaccination n'altère pas la qualité du sperme de taureaux d'insémination. Aucun effet abortif n'a pu être mis en évidence. Un essai de terrain mené aux Pays-Bas a montré que le vaccin inactivé avait un léger effet négatif sur la production laitière qui a été considéré comme négligeable (Bosch et al., 1997).

La souche délétée en gE obtenue par génie génétique n'est pas virulente chez le veau (Van Engelenburg et al., 1994). Aucune augmentation de température n'a été relevée. Seules de petites lésions de la muqueuse nasale ont été observées. Celles-ci se sont montrées moins fréquentes dans le cas d'un double mutant de délétion dans les gènes codant pour la thymidine kinase et la glycoprotéine gE (TK-, gE-) que dans le cas d'un simple mutant négatif en gE (gE-) (Van Engelenburg et al., 1994). Les scores cliniques observés, suite à l'inoculation de ces deux types de mutants, n'étaient pas significativement différents de ceux de veaux contrôles non inoculés.

Efficacité

Réponse immune envers l'herpèsvirus bovin de type 1

L'infection par le BHV-1 stimule chez le bovin une réponse immune spécifique et non spécifique (Denis et al., 1994a). Les mécanismes de défense non spécifiques se caractérisent par la sécrétion rapide d'interférons de type 1 (IFN α et IFN β) et font intervenir différents types cellulaires, dont les macrophages, les cellules tueuses

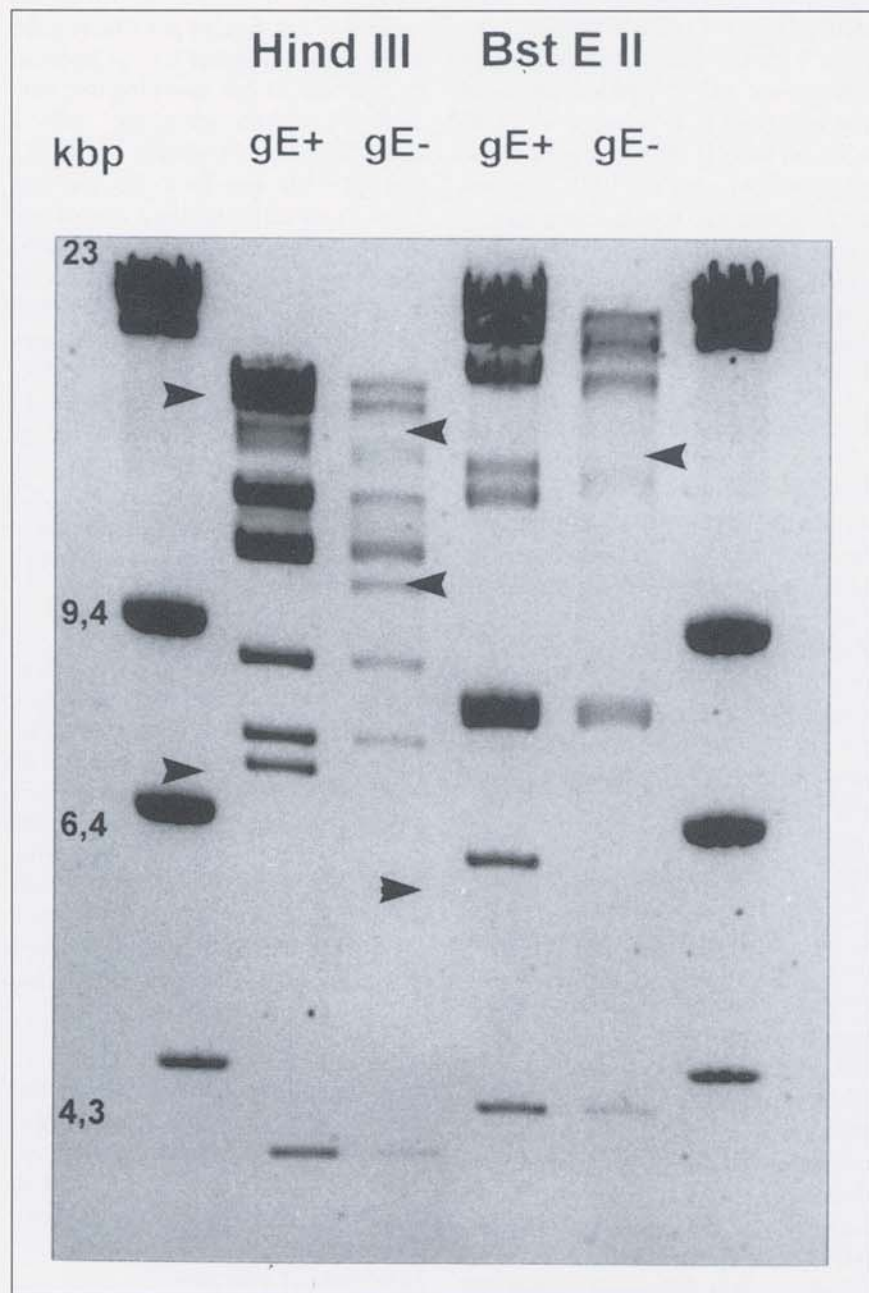


Figure III

Analyse de restriction à l'aide des endonucléases Hind III et BstE II du DNA des souches de BHV-1 ST et ST délétée en gE. Les flèches indiquent les modifications de taille de fragments de restriction dues à la délétion dans la souche ST gE- et à l'insertion de la séquence comprenant une cassette lacZ au niveau de la délétion.

naturelles (natural killer (NK)) et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN). La réponse spécifique est assurée par les lymphocytes B (production d'anticorps spécifiques) et les lymphocytes T (reconnaissance d'antigènes spécifiques présentés par le CMH I et II). Les principaux anticorps neutralisants chez le bovin sont dirigés contre les glycoprotéines gB, gC, gD. Ces anticorps participent également à la lyse des cellules infectées par des mécanismes comme l'activation du complément ou l'ADCC (Collins et al., 1984; Van Drunen Little-van den Hurk et al., 1984; Marshall et al., 1986; Okazaki et al., 1986; Trépanier et al., 1986; Babiuk et al., 1987; Israel et al., 1988). En ce qui concerne la réponse immune de type cellulaire, le bétail infecté possède des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques des glycoprotéines gC et gD (Denis et al., 1993). Des épitopes T ont été définis au sein des glycoprotéines gC et gD (Denis et al., 1994b).

Réponse immune envers la glycoprotéine gE

Les bovins infectés développent une réponse humorale importante envers certaines glycoprotéines du BHV-1. Ces glycoprotéines induisant une forte réponse humorale sont appelées les glycoprotéines majeures par opposition aux glycoprotéines mineures qui induisent une production d'anticorps plus faible. La glycoprotéine gE fait partie des glycoprotéines mineures. Des données concernant le rôle des glycoprotéines non essentielles dans l'induction de la réponse immune à médiation cellulaire du BHV-1 ont été récemment publiées (Denis et al., 1996). Les résultats obtenus n'ont pas pu mettre en évidence de réponse immune cellulaire de type CD4+ envers la glycoprotéine gE du BHV-1.

Efficacité des vaccins délétés dans le gène de la glycoprotéine gE

Les tests d'efficacité permettent d'évaluer la protection conférée par la vaccination. Après vaccination, les animaux sont soumis à une épreuve virulente où les signes cliniques induits par l'épreuve virulente sont comparés chez un groupe d'animaux vaccinés et chez un groupe témoin d'animaux non vaccinés.

Les premiers tests d'efficacité menés sur la souche Zagreb du BHV-1 ont été réalisés par Kaashoek et al. (1994, 1995). Des veaux âgés de 2 à 4 mois ont été vaccinés selon un protocole précis soit à l'aide du vaccin atténué soit du vaccin inactivé. Quatre à cinq semaines après vaccination, l'ensemble des veaux ont été inoculés avec la souche virulente Iowa. Les veaux vaccinés n'ont pas développé de signes cliniques majeurs après épreuve virulente. Un léger jetage nasal, accompagné d'érosions de la muqueuse nasale, a été observé après l'épreuve virulente chez les veaux vaccinés avec la souche vaccinale atténuée. Suite à cette épreuve, tous les veaux vaccinés ont excrété le virus à des titres inférieurs par rapport aux animaux non vaccinés durant une plus courte période de temps. Les veaux vaccinés sont restés séronégatifs envers la glycoprotéine gE jusqu'à l'épreuve virulente, indiquant que la souche Zagreb était un bon candidat pour un vaccin marqué atténué ou inactivé.

Ces tests d'efficacité préliminaires ont été complétés de manière à répondre pleinement aux exigences européennes liées à l'enregistrement du médicament immunologique vétérinaire (Strube et al., 1996).

Une étude récente a prouvé que la préparation vaccinale atténuée, administrée par voie intranasale et intramusculaire à 4 semaines d'intervalle, induisait une meilleure protection que la préparation vaccinale inactivée (Bosch et al., 1996b). En effet, la préparation vaccinale atténuée n'a pas seulement réduit ou supprimé les signes cliniques de la maladie, mais elle a également diminué la quantité de virus excrété dans les sécrétions nasales après épreuve virulente.

L'impact du vaccin inactivé délété en gE sur la circulation et la transmission virale au sein d'un troupeau a été étudiée (Bosch et al., 1996a). La circulation virale a été deux fois moins importante dans les troupeaux vaccinés que dans les troupeaux témoins non vaccinés laissant apercevoir une aide considérable mais non exclusive de ce type de vaccination dans les plans de lutte visant à l'éradication de l'IBR.

Enfin, la souche mutante délétée en gE obtenue par génie génétique (Van Engelenburg et al., 1994) induit une immunité suffisante pour empêcher la maladie, chez des veaux âgés de 7 semaines, après épreuve virulente (Kaashoek et al., 1996a).

Bien que les résultats de ces expériences assurent une bonne innocuité et une bonne efficacité de ce nouveau type de vaccin, d'autres problèmes peuvent apparaître dans le cadre d'un contrôle de l'IBR basé sur l'utilisation des vaccins marqués délétés en gE.

Problèmes liés à la vaccination à l'aide des vaccins délétés en gE

Risque de recombinaison génétique entre souches vaccinale et sauvage

La recombinaison *in vivo* entre différentes souches d'un même herpesvirus a déjà été démontrée (Javier et al., 1986; Henderson et al., 1990, 1991; Dangler et al., 1993; Glazenburg et al., 1994). Dans le cadre du plan de lutte actuel contre l'IBR, ce fait doit être pris en considération. En effet, un animal pourrait être vacciné par voie intranasale à l'aide d'un vaccin atténué délété en gE alors qu'il subit simultanément une infection par une souche virale sauvage de BHV-1. D'autres situations sont envisageables faisant intervenir la présence d'une de ces deux souches à l'état latent. Un épisode de réactivation et réexcrétion de la souche latente pourrait provoquer sa présence au niveau de la muqueuse nasale en même temps qu'une autre souche. La présence simultanée de deux souches virales différentes à l'état latent a déjà été démontrée (Whetstone et Miller, 1989). Ces deux souches peuvent également se multiplier ensemble au niveau de la muqueuse nasale lors d'un épisode de réactivation et réexcrétion. De tels animaux co-infectés pourraient être le siège d'une recombinaison génétique entre les deux souches virales dont le résultat serait l'apparition d'une souche virale virulente n'exprimant pas la glycoprotéine gE. Dans une telle situation, des animaux considérés indemnes d'IBR, c'est-à-dire sérologiquement négatifs envers la glycoprotéine gE, seraient por-

teurs d'une souche virulente de BHV-1. Actuellement, les données concernant ce type de recombinaison génétique sont peu nombreuses dans le cas du BHV-1. Cependant, plusieurs expériences *in vivo* ont été menées sur l'HSV-1 et le PRV. Il a été démontré que deux HSV-1 avirulents, génétiquement différents, pouvaient générer des recombinants léthaux *in vivo* chez la souris (Javier et al., 1986). De même, l'infection de souris avec deux virus PRV délétés, l'un dans le gène codant pour le gène de la thymidine kinase (TK), l'autre dans celui de la ribonucléotide réductase (RR), peuvent générer l'apparition d'une souche sauvage léthale pour les souris co-infectées (Glazenburg et al., 1994). La recombinaison est dépendante des doses virales utilisées lors de l'inoculation. En effet, des doses de 10^2 ou 10^4 unités formant plaque (UFP) de deux mutants PRV avirulents ne permettent pas l'apparition de nouvelles souches recombinantes léthales chez les souris co-infectées. Ce n'est qu'à partir d'inoculum contenant 10^6 UFP ou plus que la présence de virus recombinants a pu être mise en évidence (Glazenburg et al., 1994). D'autre part, une recombinaison génétique ne semble pas être possible lorsque les deux mutants PRV sont inoculés en des endroits différents (Glazenburg et al., 1994). Des expériences antérieures avaient par contre donné des résultats contradictoires, notamment en injectant les virus par voie intramusculaire et intranasale (Henderson et al., 1991; Dangler et al., 1993). Une étude a été menée chez le porc sur la recombinaison *in vivo* de deux souches de PRV, l'une était délétée dans le gène codant pour la TK et la glycoprotéine gE (TK-, gE), l'autre était une souche virulente du PRV (TK+, gE+). Après l'inoculation intranasale de porcs à l'aide de ces deux souches, l'analyse des virus excrétés a montré que 1,3% de ceux-ci (13 sur les 995 analysés) possédaient un phénotype recombinant TK+/gE- (Glazenburg et al., 1994). Cette étude démontre que la recombinaison *in vivo* entre une souche virulente et une souche atténuée du PRV n'est pas un événement rare en conditions expérimentales. Ce phénomène doit encore être étudié pour le BHV-1.

Sensibilité du test de détection des anticorps dirigés contre la glycoprotéine gE

Un test ELISA de compétition (bovine rhinotracheitis virus gE antibody test kit, IDEXX®) a été mis au point de manière à mettre en évidence les anticorps dirigés contre la glycoprotéine gE. Il est le complément indispensable des vaccins marqués délétés en gE afin de pouvoir différencier sérologiquement les animaux vaccinés des animaux infectés. La sensibilité de ce test de détection est d'une importance capitale dans le cadre du contrôle de l'IBR. En effet, s'il manque de sensibilité, il y a un risque d'une proportion non négligeable d'animaux faux négatifs. La sensibilité relative de ce test commercial de détection a été estimée par rapport à la séroneutralisation prise comme test de référence (Perrin et al., 1996). Le test n'identifie pas un nombre significatif de sérums positifs et il faudrait augmenter sa sensibilité dans le cadre de son utilisation en parallèle à une vaccination massive avec les vaccins délétés en gE.

Persistance des anticorps dirigés contre la glycoprotéine gE

Il est important de connaître la durée de vie des anticorps dirigés contre la glycoprotéine gE. En effet, il est indispensable qu'un animal ayant subi une primo-infection par une souche sauvage de BHV-1 conserve le plus longtemps possible des anticorps dirigés contre la glycoprotéine gE de manière à toujours être reconnu comme porteur latent de l'infection. S'il s'avérait que le taux d'anticorps anti-gE de tels animaux infectés latents ne persistait pas toute la vie de l'animal, on se trouverait à nouveau en présence d'animaux faux négatifs porteurs latents du BHV-1 représentant une source possible de contamination non détectable. Peu de données existent à l'heure actuelle concernant la persistance des anticorps produits après infection par le BHV-1. Cela s'explique aisément par la difficulté expérimentale que représente une telle étude. Il faudrait éviter en effet toute contamination externe ou toute réactivation virale spontanée chez des animaux inoculés expérimentalement et ce pour un laps de temps assez long.

Lors d'une étude récente (Kaashoek et al., 1996b), 4 veaux indemnes de BHV-1 et âgés de 1 mois ont été inoculés à l'aide de 2 souches différentes de BHV-1. Ils ont été suivis sérologiquement pendant deux à trois ans de manière à estimer la persistance des anticorps dirigés contre le BHV-1. L'examen sérologique des échantillons a été effectué par séroneutralisation, ELISA de compétition anti-gB (Kramps et al., 1994) et ELISA de compétition anti-gE (Kaashoek et al., 1995). Deux ou trois ans après inoculation ces animaux présentaient toujours des anticorps anti-BHV-1 et notamment des anticorps dirigés contre la glycoprotéine gE. Il semble donc que des animaux infectés porteurs latents possèdent des anticorps contre le BHV-1, dont ceux dirigés contre la glycoprotéine gE, pour une période de temps supérieure ou égale à 2 ou 3 ans.

Cette persistance est expliquée par des stimulations immunes secondaires suite à des accès de réactivation du BHV-1. Cette hypothèse a été confirmée sur des taureaux de centres d'insémination artificielle suivis durant une période de deux ans (Bitsch et al., 1973).

En outre, il ne faut pas que la vaccination à l'aide de vaccins délétés en gE empêche la multiplication du virus sauvage à un point tel que l'animal ne développe pas une réponse sérologique détectable envers la glycoprotéine gE. Cette dernière hypothèse semble peu probable avec les vaccins actuels.

INTERET DES VACCINS DELETES EN gE DANS LE CONTROLE DE LA RHINOTRACHEITE INFECTIEUSE BOVINE

Ces nouveaux vaccins procurent donc un moyen sérologique permettant de différencier les animaux devenus séropositifs par la vaccination, des animaux devenus séropositifs après infection par une souche naturelle du BHV-1. L'utilisation de ces vaccins marqués apporte une aide considérable dans la lutte contre le BHV-1.

Il convient néanmoins d'apporter une réserve importante. Les bovins vaccinés à l'aide d'un vaccin marqué

ne pourront être différenciés des animaux infectés par une souche naturelle du BHV-1 qu'à partir du moment où le vaccin marqué est le seul utilisé pour la vaccination de ces animaux. Dans un contexte d'utilisation massive de ce type de vaccin, ce problème se résoudra de lui-même lorsque tous les bovins vaccinés auparavant avec d'autres vaccins (non marqués) auront disparu du cheptel. En cas d'utilisation conjointe de vaccins conventionnels et marqués, le risque de confusion sera particulièrement élevé.

Dans la première phase d'un tel plan de lutte, il est tout à fait concevable d'utiliser systématiquement des vaccins marqués. A l'échelle de l'exploitation, on arriverait dans le cadre d'un tel plan, après plusieurs années de vaccination, à une situation intermédiaire, où l'ensemble des animaux seraient séropositifs envers le BHV-1 et séronégatifs envers la glycoprotéine gE. Cette situation signifierait que le BHV-1 est éradiqué de l'exploitation où tous les animaux sont protégés par la vaccination (en faisant abstraction d'un défaut de sensibilité du test de détection des anticorps dirigés contre la glycoprotéine gE). L'étape suivante consisterait à arrêter la vaccination et obtenir ainsi de nouvelles générations d'animaux tout à fait séronégatifs. Suite au manque de sensibilité relative du test de détection des anticorps dirigés contre la glycoprotéine gE (Perrin et al., 1996), il faudra donc tenir compte de la présence d'animaux faux gE-négatifs dans l'exploitation. Malheureusement, il est impossible de quantifier le risque d'apparition de tels animaux. Il sera néanmoins nécessaire d'en tenir compte dans les phases ultimes du plan de contrôle dans l'exploitation. D'autre part, l'infection de veaux sous couvert d'une immunité colostrale peut induire une

infection latente par le BHV-1 sans séroconversion. Ces animaux deviennent séronégatifs (faux négatifs) lorsque les anticorps colostraux ont disparu (Lemaire et al., 1995).

Finalement, des veaux ayant reçu du colostrum de mères vaccinées avec un vaccin inactivé délété en gE et infectés en période néonatale développent des anticorps anti-gE. Le risque d'apparition d'animaux faux-négatifs dans cette circonstance épidémiologique est donc faible (Lemaire et al., soumis pour publication).

CONCLUSION

Les connaissances actuelles sur la glycoprotéine gE démontrent son caractère non essentiel dans la multiplication virale, mais indiquent son importance dans la propagation virale de cellule à cellule et dans la neuroinvasion, par analogie aux glycoprotéines gE homologues d'autres herpesvirus.

La pathogénie des souches de BHV-1 délétées en gE n'est pas encore clairement élucidée. De nouvelles études sont indispensables pour comprendre les phénomènes de latence et de réactivation-réexcrétion de ces souches de BHV-1.

Les vaccins délétés en gE possèdent des caractéristiques d'innocuité et d'efficacité semblables à celles des vaccins préexistant sur le marché. Néanmoins, ce marqueur sérologique apporte une aide indéniable dans la mise en place d'un contrôle de l'IBR. Il faudra évaluer plus en détail les risques de leur utilisation dans le cadre du contrôle de cette infection.

La nouvelle génération de vaccins, tout en conservant le marqueur sérologique gE, devra en plus conférer au bovin une protection apte à maîtriser la circulation du BHV-1.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été rédigé dans le cadre de recherches subventionnées par le Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture, Administration Recherche et Développement. Les auteurs tiennent à remercier le Dr G. Meyer et le Prof. J. d'Offay pour leurs multiples conseils, le service du Prof. F. Coignoul pour sa collaboration ainsi que L. Nols, J.P. Georgin et A. Brichaud.

SUMMARY

The glycoprotein gE of bovine herpesvirus type 1 and the new marker vaccines

Attenuated and inactivated gE negative marker vaccines against infectious bovine rhinotracheitis (IBR) are now available. These vaccines are important tools in bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) control programmes because they allow a serological differentiation between vaccinated and naturally infected cattle. BHV-1 glycoprotein gE is present on the viral envelope. It is not essential for virus replication. This explains why gE negative vaccine viruses are still able to replicate both *in vitro* and *in vivo*. The biological and biochemical properties of glycoprotein gE are described in this paper. It is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread and plays a role in neuroinvasion. These marker vaccines exhibit the same safety and efficacy characteristics as the previous vaccines. Advantages and disadvantages of this kind of vaccine are discussed in the second part of the paper.

BIBLIOGRAPHIE

ACKERMANN M., WYLER R. The DNA of an IPV strain of bovine herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.*, 1984, **9**, 53-63.

ACKERMANN M., PETERHANS E., WYLER R. DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, **43**, 36-40.

ANONYME. Directive de la Commission du 20 Mars 1992 (92/18/CEE). *Journal Officiel des Communautés Européennes*, N°L 97/1.

BABIC N., KLUPP B., BRACK A., METTENLEITER T.C., UGO-LINI G., FLAMAND A. Deletion of glycoprotein gE reduces the propagation of pseudorabies virus in the nervous system of mice after intranasal inoculation. *Virology*, 1996, **219**, 279-284.

- BABIUK L.A., L'ITALIEN J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., ZAMB T., LAWMAN J.P., HUGHES G., GILFORD G.A. Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*, 1987, **159**, 57-66.
- BARANOWSKI E. Identification et caractérisation des glycoprotéines gH, gE, gG et gp 42 du bovine herpesvirus 1. Thèse de Doctorat en Biochimie à l'Université de Liège, 1996.
- BARANOWSKI E., DUBUISSON J., PASTORET P.P., THIRY E. Identification of 108K, 93K, and 42K glycoproteins of bovine herpesvirus-1 by monoclonal antibodies. *Arch. Virol.*, 1993, **133**, 97-111.
- BARANOWSKI E., DUBUISSON J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., BABIUK A.L., MICHEL A., PASTORET P.P., THIRY E. Synthesis and processing of bovine herpesvirus-1 glycoprotein H. *Virology*, 1995, **206**, 651-654.
- BARANOWSKI E., KEIL G., LYAKU J., RIJSEWIJK F.A.M., VAN OIRSCHOT J.T., PASTORET P.P., THIRY E. Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. *Vet. Microb.*, 1996, **53**, 91-101.
- BOSCH J.C., FRANKENA K., FRANKEN P., HAGE J.J., DE JONG M.C.M., KAASHOEK M.J., MARIS-VELDHUIS M.A., NOORDHUIZEN J.P.T.M., VAN DER POEL W.H.M., VERHOEFF J., WEERDMEESTER K., ZIMMER J.M., VAN OIRSCHOT J.T. Bovine herpesvirus 1 marker vaccine reduces the incidence of infections. Proceedings du 19^e congrès mondial de buiatrie, Edimbourg, 8-12 juillet 1996a, **1**, 42-44.
- BOSCH J.C., KAASHOEK M.J., KROESE A.H., VAN OIRSCHOT J.T. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. *Vet. Microbiol.*, 1996b, **52**, 223-234.
- BOSCH J.C., FRANKENA K., VAN OIRSCHOT J.T. Effect on milk production of vaccination with a bovine herpesvirus 1 gene-deleted vaccine. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 196-199.
- BITSCH V. On the latency of infectious bovine rhinotracheitis virus infection and its significance, especially with regard to the possibility of controlling infection. In: Latent herpesvirus infections in veterinary medicine. Wittmann G., Gaskell R.M., Rziha H.-J (Eds.), Martinus Nijhoff Publishers, Boston, The Hague, Dordrecht, Lancaster, 1984, 163-170.
- COLLINS J.K., BUTCHER A.C., RIEGEL C.A., MCGRANE V., BLAIR C.D., TERAMOTO Y.A., WINSTON S. Neutralizing determinants defined by monoclonal antibodies on polypeptides specified by bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 1984, **52**, 403-409.
- DANGLER C.A., HENDERSON L.M., BOWMAN L.A., DEEVER R.E. Direct isolation and identification of recombinant pseudorabies virus strains from tissues of experimentally co-infected swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 540-545.
- DE WERGIFOSSE B., LEMAIRE M., PASTORET P.P., THIRY E. Etablissement d'un plan volontaire de contrôle de la rhinotrachéite infectieuse bovine en Région Wallonne de Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 1997, **141**, 185-196.
- DENIS M., SLAOUY M., KEIL G., BABIUK L.A., ERNST E., PASTORET P.P., THIRY E. Identification of different target glycoproteins for bovine herpesvirus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of in vitro stimulation. *Immunology*, 1993, **78**, 7-13.
- DENIS M., KAASHOEK M.J., VAN OIRSCHOT J.T., PASTORET P.P., THIRY E. Quantitative assessment of the specific CD4+ T lymphocyte proliferative response in bovine herpesvirus 1 immune cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1994b, **42**, 275-286.
- DENIS M., SPLITTER G.A., THIRY E., PASTORET P.P., BABIUK L.A. Infectious Bovine Rhinotracheitis (Bovine Herpesvirus 1): Helper T Cells, Cytotoxic T Cells, and NK Cells. In: Cell-mediated immunity in ruminants., Goddeeris B., Morrison W.I. (Eds.), CRC Press, Boca Raton-Ann Arbor-London-Tokyo, 1994a, 157-174.
- DENIS M., HANON E., RIJSEWIJK F.A., KAASHOEK M.J., VAN OIRSCHOT J.T., THIRY E., PASTORET P.P. The role of glycoproteins gC, gE, gI, and gG in the induction of cell-mediated immune responses to bovine herpesvirus 1. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 121-132.
- DINGWELL K.S., DOERING L.C., JOHNSON D.C. Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. *J. Virol.*, 1995, **69**, 7087-7098.
- 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.
- GLAZENBURG K.L., MOORMANN R.J., KIMMAN T.G., GIELKENS A.L., PEETERS B.P. In vivo recombination of pseudorabies virus strains in mice. *Virus Res.*, 1994, **34**, 115-126.
- HENDERSON L.M., KATZ J.B., ERICKSON G.A., MAYFIELD J.E. In vivo and in vitro genetic recombination between conventional and gene-deleted vaccine strains of pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 1656-1662.
- HENDERSON L.M., LEVINGS R.L., DAVIS A.J., STURTZ D.R. Recombination of pseudorabies virus vaccine strains in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 820-825.
- ISRAEL B.A., MARSHALL R.L., LETCHWORTH G.J. Epitope specificity and protective efficacy of the bovine immune response to bovine herpesvirus-1 glycoprotein vaccines. *Vaccine*, 1988, **6**, 349-356.
- JACOBS L. Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other alphaherpesvirinae. *Arch. Virol.*, 1994, **137**, 209-228.
- JACOBS L., MULDER W.A., VAN OIRSCHOT J.T., GIELKENS A.L., KIMMAN T.G. Deleting two amino acids in glycoprotein gI of pseudorabies virus decreases virulence and neurotropism for pigs, but does not affect immunogenicity. *J. Gen. Virol.*, 1993, **74**, 2201-2206.
- JAVIER R.T., SEDARATI F., STEVENS J.G. Two avirulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants in vivo. *Science*, 1986, **234**, 746-748.
- JOHNSON D.C., FEENSTRA V. Identification of a novel herpes simplex virus type 1-induced glycoprotein which complexes with gE and binds immunoglobulin. *J. Virol.*, 1987, **61**, 2208-2216.
- JOHNSON D.C., FRAME M.C., LIGAS M.W., CROSS A.M., STOW N.D. Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *J. Virol.*, 1988, **62**, 1347-1354.
- JONES C., DELHON G., BRATANICH A., KUTISH G., ROCK D. Analysis of the transcriptional promoter which regulates the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 1990, **64**, 1164-1170.
- KAASHOEK M.J., MOERMAN A., MADIC J., RIJSEWIJK F.A., QUAK J., GIELKENS A.L., VAN OIRSCHOT J.T. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*, 1994, **12**, 439-444.
- KAASHOEK M.J., MOERMAN A., MADIC J., WEERDMEESTER K., MARIS-VELDHUIS M., RIJSEWIJK F.A., VAN OIRSCHOT J.T. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine*, 1995, **13**, 342-346.
- KAASHOEK M.J., VAN ENGELBURG F.A., MOERMAN A., GIELKENS A.L., RIJSEWIJK F.A., VAN OIRSCHOT J.T. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet. Microbiol.*, 1996a, **48**, 143-153.
- KAASHOEK M.J., RIJSEWIJK F.A., OIRSCHOT J.T. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Vet. Microbiol.*, 1996b, **53**, 103-110.
- KAASHOEK M.J., RIJSEWIJK F.A., RUULS R.C., KEIL G.M., THIRY E., PASTORET P.P., VAN OIRSCHOT J.T. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI or gE gene. *Vet. Rec.*, 1996c, **139**, 416-421.
- KENDRICK J.W., YORK C.J., MCKERCHER D.J. A controlled field trial of a vaccine for infectious bovine rhinotracheitis. *Proc. U.S. Livestock San. Assoc.*, 1956, **60**, 155-158.

- KNAPP A.C., ENQUIST L.W. Pseudorabies virus recombinants expressing functional virulence determinants gE and gI from bovine herpesvirus 1.1. *J. Virol.*, 1997, 2731-2739.
- KRAMPS J.A., MAGDALENA J., QUAK J., WEERDMEESTER K., KAASHOEK M.J., MARIS-VELDHUIS M.A., RIJSEWIJK F.A., KEIL G., VAN OIRSCHOT J.T. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, 32, 2175-2181.
- KRITAS S.K., NAUWYNCK H.J., PENSART M.B. Dissemination of wild-type and gC-, gE- and gI-deleted mutants of Aujeszky's disease virus in the maxillary nerve and trigeminal ganglion of pigs after intranasal inoculation. *J. Gen. Virol.*, 1995, 76, 2063-2066.
- KUTISH G., MAINPRIZE T., ROCK D. Characterization of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. *J. Virol.*, 1990, 64, 5730-5737.
- LEMAIRE M., PASTORET P.P., THIRY E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, 138, 167-180.
- LEMAIRE M., MEYER G., ERNST E., VANHERREWEGHE V., LIMBOURG B., PASTORET P.P., THIRY E. Latent bovine herpesvirus 1 infection in calves protected by colostral immunity. *Vet. Rec.*, 1995, 137, 70-71.
- LEUNG-TACK P., AUDONNET J.C., RIVIERE M. The complete DNA sequence and the genetic organization of the short unique region (US) of the bovine herpesvirus type 1 (ST strain). *Virology*, 1994, 119, 409-421.
- LITWIN V., JACKSON W., GROSE C. Receptor properties of two varicella-zoster virus glycoproteins, gpI and gpIV, homologous to herpes simplex virus gE and gI. *J. Virol.*, 1992, 66, 3643-3651.
- MARSHALL R.L., RODRIGUEZ L.L., LETCHWORTH G.J. Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. *J. Virol.*, 1986, 57, 745-755.
- MAYFIELD J.E., GOOD P.J., VANOORT H.J., CAMPBELL A.R., REED D.E. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J. Virol.*, 1983, 47, 259-264.
- MEYER G., VLCEK C., PACES V., O'HARA M.K., PASTORET P.P., THIRY E., SCHWYZER M. Sequence analysis of the bovine herpesvirus type 1 genes homologous to the DNA polymerase (UL30), the major DNA-binding protein (UL29) and ICP18.5 assembly protein (UL28) genes of herpes simplex virus. *Arch. Virol.*, 1997, 142, 89-102.
- MIJINES J.D.F., VAN DER HORST L.M., VAN HANKEN M., HORZINEK M.C., ROTTIER P.J.M., DE GROOT R.J. Biosynthesis of glycoproteins E and I of feline herpesvirus: interaction is required for intracellular transport. *J. Virol.*, 1996, 70, 5466-5475.
- MULDER W.A., JACOBS L., PRIEM J., KOK G.L., WAGENAAR F., KIMMAN T.G., POL J.M. Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system. *J. Gen. Virol.*, 1994, 75, 3095-3106.
- MULDER W., POL J., KIMMAN T., KOK G., PRIEM J., PEETERS B. Glycoprotein D-negative pseudorabies virus can spread trans-neuronally via direct neuron-to-neuron transmission in its natural host, the pig, but not after additional inactivation of gE or gI. *J. Virol.*, 1996, 70, 2191-2200.
- NETTLETON P.F., SHARP J.M. Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination. *Vet. Rec.*, 1980, 107, 379.
- OKAZAKI K., HONDA E., MINETOMA T., KUMAGAI T. Mechanisms of neutralization by monoclonal antibodies to different antigenic sites on the bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *Virology*, 1986, 150, 260-264.
- PASTORET P.P., BABIUK L.A., MISRA V., GRIEBEL P. Reactivation of temperature-sensitive and non-temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Infect. Immun.*, 1980, 29, 483-488.
- PASTORET P.P., THIRY E., BROCHIER B., DERBOVEN G., VIN-DEVOGEL H. The role of latency in the epizootiology of infectious bovine rhinotracheitis. In: Latent herpesvirus infections in veterinary medicine. Wittmann G., Gaskell R.M., Rziha H.-J. (Ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Boston, The Hague, Dordrecht, Lancaster, 1984, 221-227.
- PERRIN B., PERRIN M., MOUSSA A., COUDERT M. Evaluation of a commercial gE blocking ELISA test for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet. Rec.*, 1996, 138, 520.
- REBORDOSA X., PINOL J., PEREZ-PONS J.A., LLOBERAS J., NAVAL J., QUEROL E. Mapping, cloning and sequencing of a glycoprotein-encoding gene from bovine herpesvirus type 1 homologous to the gE gene from HSV-1. *Gene*, 1994, 149, 203-209.
- REBORDOSA X., PINOL J., PEREZ-PONS J.A., LLOBERAS J., NAVAL J., SERRA-HARTMANN X., ESPUNA E., QUEROL E. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus. Res.*, 1996, 45, 59-68.
- RIJSEWIJK F.A., KAASHOEK M.J., MADIC J., PAAL H., RUULS R., GIELKENS A.L.J., VAN OIRSCHOT J.T. Characterisation of a DNA rearrangement found in the unique short region of the Za strain of bovine herpesvirus type 1 and the vaccine properties of this strain. Proc. 18^e Int. Herpesvirus Workshop, Pittsburgh, 25-30 juillet 1993, C-67.
- RIJSEWIJK F.A., KAASHOEK M.J., MADIC J., PAAL H., RUULS R., VAN ENGELBURG F., VAN OIRSCHOT J.T. In vivo and in vitro role of the non essential glycoproteins gC, gG, gI, and gE of bovine herpesvirus 1. Abstract, Symposium on IBR and other ruminant herpesvirus infections, European Society for Veterinary Virology, Liège, Belgium, 26-27 juillet 1995, 27.
- ROCK D.L., HAGEMOSER W.A., OSORIO F.A., REED D.E. Detection of bovine herpesvirus type 1 RNA in trigeminal ganglia of latently infected rabbits by in situ hybridization. *J. Gen. Virol.*, 1986, 67, 2515-2520.
- ROIZMAN B. Herpesviridae. In: Fields virology. Fields B.N., Knipe D.M. and Howley P.M.E. (Ed.), Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, 1996, 2220-2230.
- SCHANG L.M., HOSSAIN A., JONES C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. *J. Virol.*, 1996, 70, 3807-3014.
- SCHWYZER M. Sequence analysis of the bovine herpesvirus 1 genome: An exercise in international cooperation. In: Immunobiology of viral infections, Schwyzer M., Ackermann M., Berton G., Kocherhans R., McCullough K., Engels M., Wittek R., Zanoni R. (Ed.), 1995, 108-113.
- SCHWYZER M., ACKERMANN M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Microbiol.*, 1996, 53, 17-29.
- SCHWYZER M., STYGER D., VOGT B., LOWERY D.E., SIMARD C., LABOISSIERE S., MISRA V., VLCEK C., PACES V. Gene contents in a 31-kb segment at the left genome end of bovine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.*, 1996, 53, 67-77.
- STRAUB O.C. Experience with two BHV-1 marker vaccines. Proceedings du 19^e congrès mondial de buiatrie, Edimbourg, 8-12 juillet 1996, 1, 39-41.
- STRUBE W., AUER S., BLOCK W., HEINEN E., KRETZDORN D., RODENBACH C., SCHMEER N. A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Vet. Microbiol.*, 1996, 53, 181-189.
- THIRY E., BROCHIER B., LANSIVAL B., HANTON G., DERBOVEN G., PASTORET P.P. Réactivation du virus de la rhinotrachéite bovine (Bovine herpesvirus 1, BHV-1) non accompagnée de réexcrétion de particules infectieuses, après injection de dexaméthasone, chez des bovins préalablement soumis au test d'hypersensibilité retardée au BHV-1. *Ann. Méd. Vét.*, 1983, 127, 377-381.
- THIRY E., SALIKI J., SCHWERS A., PASTORET P.P. Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation. *Vet. Rec.*, 1985, 116, 599-600.
- THIRY E., SALIKI J., BUBLOT M., PASTORET P.P. Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1987, 10, 59-63.

- THIRY E., BARANOWSKI E., LOMONTE P., VANDERPLASCHEN A., BUBLOT M., DUBUISSON J., PASTORET P.P.: Les glycoprotéines des herpesvirus bovins 1 et 4. In: *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales*. El Hassane Diop P., Kaeckenbeeck A. (Ed.), Universités Francophones, Actualité Scientifique, AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, 1994, 245-257.
- TREPANIER P., MINOCHA H.C., BASTIEN Y., NADON F., SEGUEIN C., LUSSIER G., TRUDEL M. Bovine herpesvirus 1: strain comparison of polypeptides and identification of a neutralization epitope on the 90-kilodalton hemagglutinin. *J. Virol.*, 1986, **60**, 302-306.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., VAN DEN HURK J.V., GILCHRIST J.E., MISRA V., BABIUK L.A. Interactions of monoclonal antibodies and bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) glycoproteins: characterization of their biochemical and immunological properties. *Virology*, 1984, **135**, 466-479.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., KHATTAR S., TIKOO S.K., BABIUK L.A., BARANOWSKI E., PLAINCHAMP D., THIRY E. Glycoprotein H (gH/gp108) and glycoprotein L form a functional complex which plays a role in penetration, but not in attachment, of bovine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.*, 1996, **77**, 1515-1520.
- VAN ENGELBURG F.A., KAASHOEK M.J., RIJSEWIJK F.A., VAN DEN BURG L., MOERMAN A., GIELKENS A.L., VAN OIRSCHOT J.T. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J. Gen. Virol.*, 1994, **75**, 2311-2318.
- VAN ENGELBURG F.A., KAASHOEK M.J., VAN OIRSCHOT J.T., RIJSEWIJK F.A. A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 2387-2392.
- WHETSTONE C.A., MILLER J.M. Two different strains of alpha-herpesvirus can establish latency in the same tissue of host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch. Virol.*, 1989, **107**, 27-34.
- WHITBECK J.C., KNAPP A.C., ENQUIST L.W., LAWRENCE W.C., BELLO L.J. Synthesis, processing, and oligomerization of bovine herpesvirus 1 gE and gI membrane proteins. *J. Virol.*, 1996, **70**, 7878-7884.
- WYLER R., ENGELS M., SCHWYZER M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horse and Pigs*, Wittmann G. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, 1989, 1-72.
- YOSHITAKE N., XUAN X., OTSUKA H. Identification and characterization of bovine herpesvirus-1 glycoproteins E and I. *J. Gen. Virol.*, 1997, **78**, 1399-1403.
- ZSAK L., ZUCKERMANN F., SUGG N., BEN-PORAT T. Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *J. Virol.*, 1992, **66**, 2316-2325.
- ZUCKERMANN F.A., METTENLEITER T.C., SCHREURS C., SUGG N., BEN-PORAT T. Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication. *J. Virol.*, 1988, **62**, 4622-4626.