

LE VIRUS DE LA RHINOTRACHEITE INFECTIEUSE BOVINE *(Bovid herpesvirus 1)*

**ASPECTS BIOLOGIQUES
ET MOLECULAIRES**

Paul-Pierre PASTORET

Faculté de Médecine Vétérinaire
UNIVERSITE DE LIEGE

1979

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade d'agrégé
de l'enseignement supérieur.

A Martine, Philippe et Vanessa;
à mes parents et beaux-parents.

Thèse présentée pour l'obtention du grade d'agrégé de l'enseignement supérieur.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Virologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, sous la direction du Professeur F. Schoenaers.

LE VIRUS DE LA RHINOTRACHEITE INFECTIEUSE BOVINE

(BOVID HERPESVIRUS 1) : ASPECTS BIOLOGIQUES ET

MOLECULAIRES.

48.025



PASTORET Paul-Pierre

1979

I. REMER

II. LIM

III. 1°

A.

"Ce qui nous attire, c'est l'harmonie inhérente à tout ce qui vit et il serait absolument ascientifique et même mensonger de le nier. La description ou reproduction strictement objective d'un animal ou d'une plante s'écarterait résolument de la vérité si elle ne rendait pas compte de leur beauté. Bien sûr, si nous décrivons ou reproduisons la forme d'un os, d'une nageoire ou d'une aile d'oiseau, notre but n'est pas d'exprimer la beauté de cette forme, nous ne devons pas altérer si peu que ce soit la vérité pour satisfaire notre sensibilité purement artistique. D'un autre côté, la reproduction de cette vérité ne serait pas entièrement conforme si la beauté de l'objet n'y était également exprimée".

Konrad Lorenz

L'année de l'oie cendrée, Stock, 1978.

B.

1978.

I. REMERCIEMENTS	13
II. LIMINAIRE	17
III. 1° PARTIE : LE VIRUS DE LA RHINOTRACHEITE INFECTIEUSE BOVINE (BOVID HERPESVIRUS 1, BHV1)	19
A. REVUE DE LA LITTERATURE.....	21
Plan 1° Historique	22
2° Propriétés morphologiques et nomenclature.	23
3° Propriétés biophysiques et résistance	24
4° Propriétés biologiques et multiplication..	25
5° Inhibition de la multiplication	27
6° Les mutants thermosensibles	28
7° Propriétés biochimiques a) acide nucléique	28
b) protéines	30
8° Propriétés antigéniques	30
9° Comparaison du BHV1 avec les autres virus herpétiques	30
10° Variabilité du BHV1	32
B. ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES BIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DU BHV1	35
1° Introduction	36
2° Isolement, titrage et clonage du BHV1 sur cellules MDBK	36
2. 1 Introduction	36
2. 2 Matériel et méthodes	37
a) Les cellules	37
b) Isolement des souches sauvages du BVH1 et identification	37
c) Titrages du BHV1	38
d) Clonage du BHV1	38
2. 3 Résultats	39
a) Isolement et identification des souches sauvages de BHV1	39

b) Titrage et clonage du BHV1.....	39
2. 4 Conclusions et discussion	39
3° Les marqueurs biologiques du BHV1	39
3. 1 Dimensions des plages de souches sauvages et réactivées	39
3. 1. 1 Introduction	39
3. 1. 2 Matériel et méthodes	40
a) Souches de BHV1 utilisées	40
b) Obtention des plages et mesure de leur taille	41
c) Tests statistiques	41
3. 1. 3 Résultats	42
a) Première comparaison	42
b) Seconde comparaison	45
3. 1. 4 Conclusions et discussion	47
3. 2 Comparaison des souches sauvages d'après leur sensibilité au phosphonoformate.	49
3. 2. 1 Introduction	49
3. 2. 2 Matériel et méthodes	50
a) Souches virales utilisées	50
b) Cellules utilisées	50
c) Production et mesure des plages	51
d) Tests statistiques utilisés ...	51
3. 2. 3 Résultats	52
a) Normalité	52
b) Variance	53
c) Réduction de la taille des plages induite par le phosphonoformate	54
3. 2. 4 Conclusions et discussion	54
4° Quelques propriétés biochimiques du BHV1..	55
4. 1 Concentration et purification du BHV1	55
4. 1. 1 Introduction	55
4. 1. 2 Matériel et méthodes	56
a) Production du BHV1	56
b) Titrages et mesures	56
c) Marquage radioisotopique du BHV1 et mesure de la radioactivité..	56

.....	39	d) Procédé de purification et	
.....	39	de récolte du virus purifié....	57
.....	39	e) Détermination de la densité du	
		BHV1 en chlorure de césium	58
.....	39	f) Mesure de l'inactivation du BHV1	
.....	39	en chlorure de césium	58
.....	40	g) Estimation de la pureté des	
.....	40	échantillons	58
sure		4. 1. 3 Résultats	58
.....	41	a) Libération du BHV1 par les	
.....	41	cellules MDBK infectées	58
.....	42	b) Résultats de la purification ..	60
.....	42	c) Densité des particules du BHV1	
.....	45	en CsCl	62
.....	47	d) Inactivation du BHV1 en CsCl ..	62
d'après		4. 1. 4 Conclusions et discussion	63
mate. 49		4. 2 Les polypeptides de structure du BHV1	
.....	49	et leur utilisation dans la comparaison	
.....	50	de différentes souches entre elles ..	65
.....	50	4. 2. 1 Introduction	65
.....	50	4. 2. 2 Matériel et méthodes	65
plages 51		a) Souches de BHV1 utilisées	65
s ... 51		b) Electrophorèse en tubes et	
.....	52	dénaturation des particules ...	66
.....	52	c) Electrophorèse en slab-gels	
.....	53	(gels plats).....	67
plages		d) Formation de gels en gradient	
rmate 54		de concentration	68
.....	54	e) Détermination des poids molécu-	
HV1.. 55		lares des polypeptides	68
BHV1 55		f) Analyse d'un gel en tube après	
.....	55	électrophorèse de virus marqué. 69	
.....	56	g) Technique de fluorographie	70
.....	56	4. 2. 3 Résultats	71
.....	56	a) Nombre et poids moléculaire des	
u BHV1		polypeptides de structure du BHV1	
ité.. 56		(souche de référence IBR/LA)... 71	
		b) Comparaison de différentes souches	
		de BHV1 entre elles	74

4.2. 4 Conclusions et discussion	76
5° Conclusions générales de l'étude de quelques propriétés biologiques et biochimiques du BHV1	77
IV. 2° PARTIE : LA RHINOTRACHEITE INFECTIEUSE BOVINE :	
L'INFECTION, LA LATENCE, LA REACTIVATION..	79
A. REVUE DE LA LITTERATURE	81
Plan 1° Histoire naturelle	82
2° Formes cliniques et pathogénie	85
3° Transmission, épizootiologie et prophylaxie	91
4° Latence et récurrence du BHV1 a) la latence	96
b) la récurrence	98
5° Observations cliniques en Belgique	99
B. ETUDES SUR L'EXCRETION, LA LATENCE, LA REACTIVATION ET LA REEXCRETION DU BHV1	103
1° Introduction	104
2° Mesure de l'excrétion du BHV1 et évolution des anticorps neutralisants	104
2. 1 Introduction	104
2. 2 Matériel et méthodes	105
a) Souches virales	105
b) Cellules	105
c) Séroneutralisation	105
d) Animaux	105
e) Prélèvements réalisés, examen clinique	106
f) Dénombrement des particules physiques	106
g) Titrage des particules formant plaque	106
2. 3 Résultats	106
a) Titrage des particules infectieuses et physiques	106
b) Evolution des anticorps neutralisants	108
c) Examen clinique	108
2. 4 Conclusions et discussion	108
3° Effet de la dexaméthasone sur la latence du BHV1	109
3. 1 Chez les animaux inoculés à l'aide d'une souche sauvage.....	109

..... 76
quelques
s du
..... 77
ON.. 79
..... 81
..... 82
..... 85
axie 91
ence 96
urrence98
..... 99
TION
... 103
... 104
ion
.. 104
... 104
... 105
... 105
... 105
... 105
... 105
... 106
... 106
plage106
.....106
uses
... 106
i-
... 108
... 108
... 108
e
...109
d'une
.. 109

3. 1. 1 Introduction	109
3. 1. 2 Matériel et méthodes	110
a) Techniques virologiques	110
b) Préparation de l'antigène viral destiné à la réaction d'hyper- sensibilité retardée	110
c) Test d'hypersensibilité retar- dée	111
d) Animaux	111
e) Premier traitement par la dexaméthasone	111
f) Deuxième traitement des mêmes animaux à l'aide de dexaméthasone	112
g) Troisième traitement des mêmes animaux à l'aide de dexaméthasone	112
3. 1. 3 Résultats	112
a) Réexcrétion expérimentale après le premier traitement par de la dexaméthasone	112
b) Réexcrétion expérimentale après le deuxième traitement à l'aide de dexaméthasone	114
c) Réexcrétion expérimentale après le troisième traitement à l'aide de dexaméthasone	115
3. 1. 4 Conclusions et discussion	118
3. 2 Chez des animaux inoculés avec des souches atténuées	120
3. 2. 1 Introduction	120
3. 2. 2 Matériel et méthodes	121
a) Cellules et virus	121
b) Animaux	122
c) Isolement et titrage du virus	123
d) Séroneutralisation	124
e) Réaction de cytotoxicité à médiation cellulaire, dépendante des anticorps (ADCC)	124

f) Test de transformation lympho- blastique	124
g) Analyse de l'ADN des isolements de BHV1 après digestion par enzymes de restriction	125
3. 2. 3 Résultats	125
a) Effet de la dexaméthasone sur les paramètres hématologiques..	125
b) Réactivation des souches vacci- nales et caractérisation des souches réactivées	127
c) Etat immunitaire des animaux avant et après les réactiva- tions	129
d) Effet d'un traitement par la dexaméthasone chez des animaux vaccinés (ts) et inoculés par la suite avec une souche sauvagel	131
3. 2. 4 Conclusions et discussion	131
4° Effet de la cyclophosphamide sur la latence du BHV1	134
4. 1 Introduction	134
4. 2 Matériel et méthodes	135
a) Animaux	135
b) Souches virales et cellules utilisées	135
c) Caractérisation des souches réisolées	136
d) Infection expérimentale	136
e) Traitement par la cyclophosphamide	136
f) Traitement par la dexaméthasone ..	137
4. 3 Résultats	137
a) Infection expérimentale	137
b) Traitement par la cyclophospha- mide	138
b.1 Titrage des particules physiques et infectieuses	138
b.2 Examen clinique	138
b.3 Examens hématologiques et séroneutralisation	139
c) Traitement par la dexaméthasone	140

pho-
 124
 ements
 ar
 125
 125
 sur
 ques..125
 vacci-
 des
 127
 aux
 va-
 129
 la
 imaux
 par
 sauvage131
 131
 latence
 134
 134
 135
 135
 135
 136
 136
 hamide 136
 one ..137
 137
 137
 ha-
 138
 physiques
 138
 138
 t
 139
 one 140

c. 1 Titrage des particules	
physiques et infectieuses ..	140
c. 2 Examen clinique	142
c. 3 Examens hématologiques et	
séroneutralisation	142
4. 4 Conclusions et discussion	142
5° Conclusions générales des études sur	
l'excrétion, la latence, la réactivation	
et la réexcrétion du BHV1	144
V. RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES	145
VI.BIBLIOGRAPHIE	151

I. REMERCIEMENTS .

Mes remerciements s'adressent en tout premier lieu à feu le Professeur F. SCHOENAERS, mon patron, trop tôt disparu. J'ai envers lui une immense gratitude car il m'a donné les moyens de poursuivre ce travail, m'a prodigué ses conseils en cours d'élaboration et m'a inébranlablement soutenu dans cette entreprise. Je lui dois aussi d'avoir rencontré, en sa personne, un esprit droit et logique, qui savait prendre une décision et s'y tenir, accorder sa confiance sans l'abandonner. Un esprit enthousiaste mais tolérant, passionné mais rigoureux.

Ma reconnaissance va au Professeur E. BETZ, Recteur de l'Université de Liège, pour m'avoir donné le goût de poursuivre; qu'il sache que le sentiment d'appartenir à la grande Université qu'il dirige a toujours été pour moi un stimulant et un réconfort. Je remercie également le Doyen A. LOUSSE et l'ensemble de la Faculté de Médecine vétérinaire qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Toute ma gratitude va à L.A. BABIUK qui m'a chaleureusement accueilli dans son laboratoire de Virologie du département de Microbiologie de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de la Saskatchewan à Saskatoon, Canada. Il m'a donné accès à de nombreuses techniques et l'occasion de vivre plusieurs mois dans une cordiale atmosphère d'émulation scientifique. J'ai ainsi pu pleinement apprécier son inaltérable enthousiasme communicatif, son efficacité, sa vivacité d'esprit et sa prodigieuse capacité de travail. Je remercie tout autant V. MISRA, P. GRIEBEL et les autres membres du département pour l'aide qu'ils m'ont apportée et leurs témoignages de sympathie.

J'ai heureusement pu bénéficier de conseils avisés en effectuant un séjour chez L.E. CARMICHAEL du James A. BAKER Institute for Animal Health de Cornell University, U.S.A., chez H. LUDWIG de l'Université de Berlin et M.E. LAMY de l'Université catholique de Louvain; je les en remercie vivement.

Je me dois également de remercier chaleureusement tous ceux qui ont directement participé au travail entrepris au laboratoire de

Virologie de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège et qui, pour certains, sont devenus depuis mes collaborateurs. J'ai toujours été très sensible à leur prévenance et leur gentillesse qui n'ont d'égale que leur ardeur au travail. Ils m'ont apporté une aide inestimable et un précieux encouragement. C'est ainsi que je remercie tout particulièrement Lise DAGENAIS, Anne SCHWERS, Martine GODART, Pierre JETTEUR, Etienne THIRY et Frans HENDRIKS. Je mentionnerai séparément Alvaro AGUILAR-SETIEN, de nationalité mexicaine, qui m'honore de son amitié.

Un travail scientifique, aussi modeste soit-il, ne peut être mené à bien sans le concours de nombreuses personnes, surtout s'il fait appel à des techniques très diverses ou fort spécialisées. J'ai eu la chance de bénéficier du concours de nombreux services de la Faculté de Médecine vétérinaire ou d'ailleurs. Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble du service de Génétique dirigé par R. HANSET, chez qui j'ai toujours trouvé une grande ouverture d'esprit, beaucoup de compréhension, de la bonne humeur, ainsi qu'une aide zélée, compétente et efficace. Je remercie tout particulièrement P. LEROY, Ch. MICHAUX, J. CARLEER, A. BREULS de TIECKEN et S. CESA. Je me dois tout autant de remercier M. ANSAY qui m'a initié aux techniques d'électrophorèse des protéines et J.M. GODEAU qui m'a ouvert les portes des laboratoires de biologie moléculaire de l'Université Libre de Bruxelles ; A. KAECKENBEECK pour tout ce qui touche aux animaux.

Au sein de la Faculté, j'ai souvent fait appel à la compétence de mon ami H. VINDEVOGEL et à l'inlassable dévouement de J.F. BEKKERS et de F. ECTORS qui m'ont permis d'aborder les techniques de marquage radioisotopique, ainsi que S. JACOVljeVIC, L. LASSOIE et N. GRAVE pour l'autoradiographie; je les en remercie vivement.

Mon estime et ma sympathie vont à G. BURTONBOY et D. DEKEGEL pour leur excellent travail de microscopie électronique, à R. STROBBE de l'Institut National de Recherches Vétérinaires pour la centrifugation analytique, à J. CONTENT de l'Institut Pasteur du Brabant pour la technique de fluorographie.

Beaucoup d'autres m'ont encore aidé et si, par mégarde, j'ai omis de les mentionner qu'ils soient cependant assurés de ma reconnaissance.

Ma reconnaissance s'adresse encore aux étudiants de l'Office des

cours de
dévouement

Enfin
pour leur
privations
d'exprimer
leur souti
et mes be
filials se
et leur so

Ces recher
National
ragement
Commission
Que les pe
en m'accor

cours de la Faculté ainsi qu'à Marie-Christine GERARD pour leur dévouement au cours de l'élaboration du manuscrit.

Enfin je remercie ma famille, Martine, Philippe et Vanessa, pour leur extraordinaire patience, leur affectueux soutien et les privations qu'ils ont su supporter sans rechigner. Il est difficile d'exprimer les sentiments sans nuance que j'éprouve à leur égard; leur soutien moral a été déterminant. Je désire associer mes parents et mes beaux-parents à ces remerciements pour leur exprimer mes filials sentiments de reconnaissance envers leur compréhension et leur soutien.

Ces recherches n'auraient pas été possibles sans l'appui du Fonds National de la Recherche Scientifique, de l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture et de la Commission Administrative du Patrimoine de l'Université de Liège. Que les personnalités de ces fondations, qui m'ont fait confiance en m'accordant un appui financier, soient assurées de mon dévouement.

II. LIMINAIRE.

La rhinotrachéite infectieuse bovine est une maladie respiratoire du bétail qui a été décrite aux Etats-Unis vers les années 1950; elle peut être grave et son apparition entraîner des pertes économiques très importantes dans une exploitation.

La vulvovaginite infectieuse pustuleuse est une maladie vénérienne du bétail connue en Europe de longue date.

Ces deux affections sont actuellement regroupées, car on a constaté que leurs agents étiologiques, un virus du groupe des Herpes (*Herpetoviridae*) sont identiques; il est actuellement connu sous le nom de *Bovid Herpesvirus 1* (BHV 1).

Cet agent peut être à l'origine de nombreuses autres formes cliniques, ce qui a amené de nombreux chercheurs à tenter de différencier les souches responsables de ces diverses entités; de découvrir des critères objectifs de séparation (marqueurs).

D'autre part, le BHV 1 partage avec nombre d'autres représentants de son groupe, une propriété biologique essentielle : il peut demeurer à l'état latent chez les animaux après les avoir infectés.

La réactivation du virus latent peut être provoquée par divers stimuli, dont l'emploi des glucocorticoïdes (dexaméthasone). La vaccination contre la rhinotrachéite infectieuse bovine est apparue très tôt dans l'histoire de la maladie et l'on dispose actuellement de vaccins préparés à l'aide de souches atténuées.

La multiplicité des formes cliniques, la latence du virus, l'utilisation de souches vaccinales atténuées, ne facilitent pas la tâche de l'épizootiologiste ou du chercheur. Les techniques mises en oeuvre jusqu'à ce jour pour tenter de différencier les souches ne l'ont qu'imparfaitement permis.

Nous avons cherché à caractériser par des marqueurs biologiques ou biochimiques les différentes souches de BHV 1, qu'elles soient sauvages ou qu'il s'agisse de souches modifiées en vue de les utiliser comme vaccin, réactivées ou non.

Certaines souches ont ensuite été utilisées pour l'étude de la latence et de la réactivation du virus par la dexaméthasone. Plus précisément,

l'étude du site de la latence, du mécanisme qui induit la réactivation
et du contrôle exercé par le système immunitaire sur la réexcrétion.

III. 1

vation
ion.

III. 1° PARTIE : LE VIRUS DE LA RHINOTRACHEITE INFECTIEUSE
BOVINE (BOVID HERPESVIRUS 1, BHV1).

Plan

1°) Historique

2°) Propriétés

3°) Propriétés

4°) Propriétés

5°) Inhibition

6°) Les manifestations

7°) Propriétés

8°) Propriétés

9°) Comparaison

10°) Variations

"En résumé, les passions politiques présentent aujourd'hui un degré d'universalité, de cohérence, d'homogénéité, de précision, de continuité, de prépondérance par rapport aux autres passions, inconnu jusqu'à ce jour; elles prennent une conscience d'elles-mêmes qu'on ne leur avait point vue; certaines d'entre elles, mal avouées jusqu'ici, s'éveillent à cette conscience et s'ajoutent aux anciennes; d'autres deviennent plus purement passionnelles que jamais, possèdent le cœur de l'homme en des régions morales où elles n'atteignaient pas, prennent un caractère de mysticité qu'on ne leur voyait plus depuis des siècles; toutes enfin se munissent d'appareils idéologiques par lesquels elles se clament à elles-mêmes, au nom de la science, la suprême valeur de leur action et sa nécessité historique. En surface comme en profondeur, en valeurs spatiales comme en force interne, les passions politiques atteignent aujourd'hui à un point de perfection que l'histoire n'avait pas connu. L'âge actuel est proprement l'âge du politique".

Julien Benda

La trahison des clercs.

A. REVUE DE LA LITTÉRATURE.

Plan

- 1°) Historique.
- 2°) Propriétés morphologiques et nomenclature.
- 3°) Propriétés biophysiques et résistance.
- 4°) Propriétés biologiques et multiplication.
- 5°) Inhibition de la multiplication.
- 6°) Les mutants thermosensibles.
- 7°) Propriétés biochimiques a) acide nucléique.
 b) protéines.
- 8°) Propriétés antigéniques.
- 9°) Comparaison du BHV 1 avec les autres virus herpétiques.
- 10°) Variabilité du BHV 1.

1°) Historique.

La rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) est une maladie contagieuse qui affecte principalement les bovins. Elle se caractérise essentiellement par une rhinotrachéite exsudative s'étendant jusqu'aux grosses bronches; les complications bactériennes peuvent entraîner des répercussions pulmonaires et aggravent le cours de la maladie. La rhinotrachéite n'est cependant qu'une des manifestations cliniques, mais, sans doute, la plus importante.

La maladie, sous cette forme respiratoire, a été décrite au début des années 1950 aux Etats-Unis (Schroeder et Moys, 1954; Mc Kercher et al., 1954; Jensen et al., 1955; Miller, 1955; York, 1968; Gilbert et Saurat, 1970; Mc Kercher, 1973; Kahrs, 1977; Gibbs et Rweyemamu, 1977a); Mc Intyre (1954) puis Chow et al. (1955) la transmettent expérimentalement à d'autres bovins, démontrant ainsi son caractère infectieux.

L'isolement de l'agent causal, un virus, est ensuite réalisé (Madin et al., 1956; York et al., 1957); à partir de ce moment l'étude de la maladie entre dans une ère nouvelle.

Les premiers essais d'immunisation ne tardent pas à suivre (Kendrick et al., 1956; York et Schwartz, 1956; Brown et Cabasso, 1957; Cabasso et Brown, 1958; Gillespie et al., 1957; Baker et al., 1958; Schwarz et al., 1957; Brown et Chow, 1959).

La classification du virus parmi les virus herpétiques, n'est intervenue que plus tardivement (Armstrong et al., 1961; Knocke et Liess, 1961) après que le groupe des Herpes eût lui-même été défini (Wildy et al., 1960).

La vulvovaginite infectieuse pustuleuse (IPV) est une maladie vénérienne du bétail connue depuis longtemps en Europe. D'après Kokles (1967), ce serait Büchner qui en aurait fait la première description en 1841; en 1894, Trommsdorf la définit comme entité sous le nom de Bläschenausschlag qu'elle sera seule à porter désormais. Son étiologie virale est démontrée en 1928 par Reisinger et Reimann, qui transmettent la maladie par filtrat.

La maladie avait déjà été décrite en 1895 aux Etats-Unis (Steddom, 1895; d'après Kendrick et al., 1958) et y existait donc avant l'apparition de la rhinotrachéite infectieuse bovine, ou, à tout le moins,

coexistait avec elle (Kendrick et al., 1958).

L'isolement du virus date de 1958 (Kendrick et al., 1958; Greig et al., 1958), et son identité antigénique avec le virus responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) a été rapidement démontrée (Gillespie et al., 1959; Wagner et Gillespie, 1959) et confirmée (Mc Kercher et al., 1959); par la suite, Mc Kercher (1963) a établi l'identité antigénique du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine avec trois isolements de l'ancienne "Bläschenausschlag", dont un provenait de Belgique (Bouters et al., 1960).

Gillespie et al. (1959) ont par ailleurs comparé le pouvoir pathogène des virus IBR et IPV chez le bovin; tous deux se comportent de la même façon, s'ils sont inoculés par la même voie, la seule différence étant l'absence de jetage lorsque le virus IPV est administré par la voie intranasale; le virus émis est alors cent fois moins abondant.

Pour certains, l'apparition de la forme respiratoire de la maladie serait due aux modifications des structures de l'élevage, survenues aux Etats-Unis (Feedlots, unités intensives d'engraissement) et plus tardivement en Europe (Gilbert et Saurat, 1970); elle est classée par Mayr (1976) dans son "Crowding disease Komplex".

Un comité international (Roizman et al., 1973; Roizman et Furlong, 1974) a proposé une nomenclature des virus herpétiques; celui de la rhinotrachéite infectieuse bovine y porte le nom de *Bovid herpesvirus 1* (BHV 1).

2°) Propriétés morphologiques et nomenclature.

Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine partage les caractères morphologiques du groupe herpétique, ainsi qu'ils ont été primitivement définis par Wildy et al. (1960) et précisés ultérieurement. Ce n'est cependant qu'en 1961 qu'Amstrong et al. le rattachent définitivement au groupe des Herpes, suivant en cela les suggestions de Knocke et Liess (1961). Les caractères des virus herpétiques ont fait l'objet de revues bien documentées (Roizman, 1969; Watson, 1973; Roizman et Furlong, 1974; Colbère, 1975); celle de Martin (1976) plus récente, est consacrée aux Herpesvirus d'intérêt vétérinaire.

La description a été progressivement affinée (Almeida et al., 1978) et montre une grande unité dans le groupe.

La taille des particules complètes du BHV 1 avait été, dès 1958 (Tousimis et al.), estimée voisine de 150 nm, par des méthodes biophysiques.

Ce virus est constitué d'une nucléocapside de symétrie cubique (Watrach et Bahnemann, 1966; Cruickshank et Berry, 1965; Schulze et al., 1964), comportant 162 capsomères, d'une taille de 108 nm. Les capsomères ont un diamètre inférieur à 10 nm et sont parcourus, selon leur axe longitudinal, par un canal de 3,5 à 4 nm de diamètre. La nucléocapside contient le coeur (Bocciarelli et al., 1965, 1966) qui protège l'acide nucléique; elle est séparée de l'enveloppe par un tégument de nature encore imprécise. L'enveloppe porte des projections, à sa surface (Smid et al., 1977; Valicek et Smid, 1976).

3°) Propriétés biophysiques et résistance.

Comme les virus enveloppés, le BHV 1 est sensible à l'éther, à l'alcool et à l'acétone (Rouhandeh et al., 1967; Griffin et al., 1958; Andrewes et Horstmann, 1949; Feldman et Wang, 1961). A un pH égal ou légèrement supérieur à 7, sa survie est relativement bonne à basse température, mais décroît rapidement à 37° C (Griffin et al., 1958; Stevens et Groman, 1963; Bartha et al., 1969; Stojkovic-Atanackovic, 1967; Hahnefeld et al., 1963).

In vitro, le BHV 1 est inactivé par l'addition de nombreux composés (Bahnemann, 1976; Straub, 1965).

Donaldson et Ferris (1976) et Elazhary et Derbyshire (1979) ont étudié sa survie en aérosol, en relation avec l'humidité relative, et démontré sa sensibilité aux effets de surface, qui expliquerait que ce virus résiste mal dans le milieu extérieur.

Bagust (1972) détermine la densité de flottation des particules du BHV 1 en chlorure de Césium et établit que sa valeur moyenne est de 1,251 g/cm³; il ne trouve aucune différence entre les quatre souches étudiées, parmi lesquelles figure la souche neurotrope N569. Talens et Zee (1976) ont déterminé la densité de flottation par centrifugation

en tartrat

4°) Propri

Le BH
mammifères
Crandell,
1963) il e
de certain
tieuse bov
le cas des
Crandell e
Schwarz et
lignée cont
plagiodon)

Le virus pe
mais ne s'y

propage pas
d'embryon d

Les ce
les lignées
qui en déri
cultures d'
Kiesel, 197

controversé
plus sensib

En cul
caractérisé
syncytia

Son mode de
de même que
1959; Gusta
herpesvirus
le BHV1 et
cellule infé
multiplicat

78)
1958
Watrach
1964),
es ont
longi-
de
'acide
ture
ce
alcohol
drewes
èrement
ure,
t
sés
étudié
émonté
rus
du
t de
ches
Talens
ugation

en tartrate de K, et lui assignent une valeur de $1,22 \text{ g/cm}^3$.

4°) Propriétés biologiques et multiplication.

Le BHV 1 se développant sur une grande variété de cellules de mammifères (Michalski et al., 1976; York et al., 1957; Cheatham et Crandell, 1957; Cabasso et al., 1957; Orsi et Cabasso, 1958; Rouhandeh, 1963) il est impossible d'en donner une revue exhaustive. Les cellules de certaines espèces qui sont peu sensibles à la rhinotrachéite infectieuse bovine, supportent très bien la multiplication du virus; tel est le cas des cellules de mouton et du chat (Ba-Vy et Perreau, 1964; Crandell et al., 1973), des cellules porcines (Kasza et al., 1972 Schwarz et al., 1958; Pensaert, communication personnelle), d'une lignée continue issue du dauphin (Dolphin kidney NBL-10, *Stenella plagiodon*) (ATCC, 1972).

Le virus peut envahir *in vitro* des cellules de moustique (*Aedes aegypti*), mais ne s'y multiplie pas (Belloncik et Devauchelle, 1976). Il ne se propage pas dans l'oeuf embryonné ni dans des cultures de fibroblastes d'embryon de poulet.

Les cellules bovines (Pospisil et al., 1975; Ludwig et al., 1969), les lignées diploïdes (Mirchamsy et al., 1977) et les lignées continues qui en dérivent sont très sensibles au virus, ainsi que certaines cultures d'organes (Nelson, 1974; Shroyer et Easterday, 1968; Rossi et Kiesel, 1977). La sensibilité des macrophages bovins est quelque peu controversée (Rossi et Kiesel, 1977); les macrophages foetaux sont plus sensibles que ceux provenant des adultes.

En culture cellulaire, le BHV1 détermine un effet cytopathogène caractérisé par la formation d'inclusions intranucléaires et de petits syncytia (Cheatham et Crandell, 1957; Stevens et Chow, 1959). Son mode de réplication est très similaire à celui des autres herpesvirus, de même que sa maturation (Joklik et Zweerink, 1971; Crandell et al., 1959; Gustafson, 1973). On a cependant coutume de distinguer les herpesvirus du groupe A (Hahnefeld et al., 1965), auquel appartient le BHV1 et ceux du groupe B qui restent étroitement associés à la cellule infectée. Les corpuscules denses qui apparaissent en cours de multiplication de certains virus du groupe B, comme le virus

cytomégalyie humaine (Talbot et Almeida, 1977; Craighead et al., 1972; Iwasaki et al., 1973; Mc Gavran et Smith, 1965; Smith et de Harven, 1973) n'apparaissent qu'en quantité limitée et avec une répartition différente (Nii et Yasuda, 1976; Valicek et Smid, 1976) pour les virus du groupe A. Ceci pourrait s'expliquer par un meilleur rendement dans l'assemblage d'un virus comme le BHV1 par rapport à celui d'un virus cytomégalyie (Smith et de Harven, 1978).

Le BHV1 ne peut pénétrer dans la cellule s'il est privé de son enveloppe, ce qui suggère une pénétration par fusion avec la membrane cytoplasmique. L'enveloppe jouerait un triple rôle : de protection, d'ancrage, et de médiateur dans la dissolution de la membrane.

La cinétique de sa reproduction a fait l'objet de plusieurs études (Liess et al., 1960; Schimmelpfennig et Liess, 1961; Schulze et al., 1963; Jasty et Chang, 1969; Theil et al., 1971; Jasty et al., 1972a; Zee et Talens, 1971, 1972; Smid et al., 1977; Stevens et Groman, 1963, 1964; De Pauli et Sabina, 1972).

L'ensemble des événements s'ordonne plus ou moins comme suit : pendant la première phase dite de latence ou d'éclipse (de 0 à 6 heures), on ne peut pas détecter de multiplication virale, bien que la reproduction soit entamée puisque des antigènes viraux apparaissent au niveau de l'enveloppe nucléaire (4 heures); suit une phase logarithmique (de 7 à 15 heures) pendant laquelle le titre de virus intracellulaire augmente exponentiellement et l'inclusion intranucléaire s'étend jusqu'à remplir le noyau; pendant la phase suivante, dite stationnaire, (16 à 32 heures), le virus extracellulaire augmente exponentiellement; la dernière phase dite de déclin, s'étend de la 24ème à la 36ème heure, et voit le titre de virus intracellulaire décroître, alors que le titre de virus extracellulaire demeure stationnaire (Jasty et Chang, 1969). D'après Zee et Talens (1972), les premiers événements de la multiplication seraient plus précoces; les premières ébauches de nucléocapsides apparaîtraient dans le noyau vers la 4ème heure, et des nucléocapsides nues dans le cytoplasme, de 6 à 8 heures après l'infection. Les avis diffèrent quant au mode d'acquisition de l'enveloppe. Pour les uns, le virus l'acquiert par bourgeonnement à partir du feuillet interne de la membrane nucléaire modifiée (Jasty et Chang, 1971), et il en serait de même pour les nucléocapsides libres retrouvées dans le cytoplasme.

Pour d'au
membrane
de la mem
ne se fai
(1976), c
hétérogén
La libéra
tion du r
et al., 19
D'après C
lité au h
ture memb
de la mem
Golgi. Le
tubulaire
D'après S
prétation
nisme dans
obtenus p
Toutes les
même lors
d'une fort
La reprodu
ou en leu

5°) Inhibi

De no
ont été pr
rents mode
la thymidi
ressemblan
sous forme
al., 1977)
D'autres c
qu'après m

Pour d'autres, les nucléocapsides cytoplasmiques libres s'entourent d'une membrane vacuolaire d'origine cytoplasmique (Zee et Talens, 1972), ou de la membrane plasmique (Chia et Savan, 1974). Aucun enveloppement ne se fait au niveau de la membrane plasmique. D'après Valicek et Smid (1976), ces différents modes d'enveloppement, seraient à l'origine d'une hétérogénéité de la population de virus produite.

La libération du virus se ferait peut-être à l'occasion d'une modification du réticulum endoplasmique cellulaire (Chia et Savan, 1974; Jasty et al., 1972a; Zee et Talens, 1972).

D'après Chia et Savan (1974), l'enveloppement du virus se ferait en réalité au hasard dès que la nucléocapside entre en contact avec une structure membranaire quelconque, que ce soit le feuillet interne ou externe de la membrane nucléaire, ou qu'elle appartienne à l'appareil de Golgi. Le virion formé serait libéré en passant au travers du système tubulaire cytoplasmique, ou par exocytose.

D'après Silva et al. (1973) qui ont utilisé des cellules MDBK, l'interprétation de la séquence des événements démontre un certain asynchronisme dans l'infection, qui permet d'expliquer les résultats discordants obtenus par divers expérimentateurs pour le BHV1.

Toutes les cellules ne montrent pas les mêmes altérations au même moment, même lorsqu'elles sont préalablement synchronisées et infectées à l'aide d'une forte dose de virus (one-step growth).

La reproduction du BHV1 est très sensible à un déficit en arginine ou en leucine (de Pauli et Sabina, 1972).

5°) Inhibition de la multiplication.

De nombreux composés inhibant la réplication des virus herpétiques ont été proposés; FOX (1977) en donne une liste ainsi que leurs différents modes d'action. Parmi ces substances, figurent les analogues de la thymidine tels que l'IUDR (5-Iodo-2'-deoxyuridine), qui par sa ressemblance avec la thymidine s'y substitue dans la molécule d'ADN, sous forme d'iodouracile (Smith, 1963; Smith et Dukes, 1964; Cohen et al., 1977).

D'autres composés tels que cytosine et adénine arabinoside, n'agissent qu'après modification par un enzyme d'origine virale, ce qui les rend

moins cytotoxiques (Gentry et Aswell, 1975; Doberson et al., 1976; Roubal, 1977; Falcon et Jones, 1977). Des molécules antiherpétiques dérivées de l'acide phosphonoacétique (PAA) ou phosphonoformique (PFA) et de découverte plus récente, doivent leur action virostatique à l'inhibition de l'ADN-polymérase viro-induite (Overby et al., 1974; Mao et al., 1975; Mao et Robishaw, 1975; Helgstrand et Oberg, 1978). Enfin, la multiplication peut être perturbée en inhibant la glycosylation des protéines (Ludwig et al., 1974; Courtney, 1976; Schmidt et al., 1976; Knowles et Person, 1976).

L'administration aux cultures cellulaires d'inhibiteurs de la synthèse de l'ADN, empêche la formation de BHV1 infectieux (Stevens et Groman, 1964; Jasty et al., 1972b; Lillie et Mohanty, 1968; Persechino et Orfei, 1965; Hahnefeld et Hahnefeld, 1964; Jasty et Chang, 1970; Sabina, 1965); c'est ainsi que la réplication du BHV1 est inhibée par le 5-Mercaptométhyl-2'-deoxyuridine, la 5-iododeoxyuridine et la cytosine-arabinoside (Gupta et al., 1975). Le phosphonoformate est également actif *in vitro* contre le BHV1 (Helgstrand et al., 1978; Schweser et al., 1980 a et b).

6°) Les mutants thermosensibles.

Les mutants thermosensibles de virus herpétiques sont souvent utilisés (Schaffer, 1975), les uns pour des études de génétique moléculaire (Schaffer et al., 1978; Esparza et al., 1976), les autres pour préparer des vaccins. C'est à Zygraich et Collaborateurs (1974 a et b; 1975), que revient le mérite de la première utilisation d'un mutant ts du BHV1 à des fins vaccinales.

7°) Propriétés biochimiques.

a) Acide nucléique.

La démonstration que l'acide nucléique du BHV1 est de l'ADN a été faite initialement par l'emploi de techniques d'inhibition de la réplication (Hahnefeld et Hahnefeld, 1964).

Babiuk et Rouse (1976a) ont récemment découvert des ribonucléotides

associés à
pareille di
(Hirsch et
la réplikat
Russell et
1,730 g/ml,
centrifugat
différent d
lui sont at
Ludwig (197
Comme les a
de flottati
par contre,
valeur nett

La fix
(Langenberg
l'examen au
tore non co
Des inform
l'emploi des
ont étudié
de culture
duits de la
Eco RI ont
et l'Herpes
moléculaire
Pareilles m
différences

La for
le pourcent
du virus en
280 nm donn
on peut don
lors estim
dans les pa

associés à l'ADN viral par une liaison covalente au sein du virion; pareille disposition a également été décrite pour l'Herpes simplex (Hirsch et Vonka, 1974). Ce brin d'ARN pourrait jouer un rôle dans la réplication de l'ADN (Biswal et al., 1974; Murray et Biswal, 1974). Russell et Crawford (1964), attribuent à l'ADN du BHV1, une densité de 1,730 g/ml, et un poids moléculaire de 56.10^6 daltons, estimé par centrifugation. Le pourcentage de Guanine + Cytosine de 71 % est très différent de celui de l'ADN cellulaire; des valeurs similaires (72 %) lui sont attribuées par Plummer et al. (1969), Graham et al. (1972), Ludwig (1972 a et b) et Black et Slack (1972).

Comme les auteurs précédents, Geder et al. (1978) trouvent une densité de flottation égale à 1,730 g/cm³, ce qui correspond à 71,5 % de G + C, par contre, ils assignent à l'ADN un poids moléculaire de 96.10^6 daltons, valeur nettement supérieure à celle précédemment décrite.

La fixation de l'acide nucléique du BHV1 à l'aide d'acide chromique (Langenberg et Sharpee, 1978) permet de mieux l'observer lors de l'examen au microscope électronique; il se présente alors comme un tore non collabé, ou comme un treillis, au centre de la particule. Des informations supplémentaires sur l'ADN ont été obtenues grâce à l'emploi des enzymes de restriction. C'est ainsi que Geder et al. (1978) ont étudié l'ADN du virus HMCV (Hershey Medical Center Virus), contaminant de culture de cellules humaines, qui s'est avéré être du BHV1. Les produits de la digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction (endonucléase) *Eco* RI ont été comparés à ceux obtenus pour le virus cytomégalique humain et l'Herpes simplex types 1 et 2; ils en diffèrent par leurs poids moléculaires et les quantités molaires relatives. Pareilles mesures effectuées par Skare et al. (1975), n'accusent que des différences mineures, sans doute imputables aux souches utilisées.

La formule de Warburg et Christian (1941) a permis de calculer le pourcentage relatif d'acide nucléique dans la particule. L'analyse du virus en centrifugation analytique aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm donne respectivement 0,656 DO à 260 nm, et 0,544 DO à 280 nm; on peut donc obtenir la valeur $E_{280}/E_{260} = 0,830$. Nous pouvons dès lors estimer à ± 6 %, le pourcentage d'acide nucléique contenu dans les particules purifiées.

b) Protéines.

Parmi les protéines non-structurelles, une ADN-polymérase viro-induite a été particulièrement étudiée, et est décrite pour de nombreux herpesvirus. Elle diffère de l'ADN-polymérase cellulaire : ainsi, l'activité ADN-polymérasique des cellules rénales bovines infectées par le BHV1 est plus thermostable que celle des cellules non infectées (Stevens et Jackson, 1967). Rien d'autre n'est actuellement connu sur les protéines non-structurelles du BHV1.

Les protéines de structure des virus herpétiques ont fait l'objet de revues critiques relativement récentes (O'Callaghan et Randall, 1976).

La première description des protéines de structure du BHV1 date de 1975, et émane de notre laboratoire (Pastoret et al., 1975). Depuis lors, Sklyanskaya et al. (1977) y ont reconnu dix-huit protéines de structure, dont huit glycosylées.

8°) Propriétés antigéniques.

L'étude de la structure antigénique du BHV1 est à peine entamée (Darcel le Q., 1977; Darcel le Q. et al., 1978); il se placerait à la limite du premier neutroséron défini par Honess et Watson (1977).

9°) Comparaison du BHV1 avec les autres virus herpétiques.

Les techniques les plus variées ont été utilisées pour comparer les divers herpesvirus entre eux. Nahmias (1972) a même tenté de les regrouper selon leurs aspects pathologiques et biologiques. Les teneurs en Guanine + Cytosine ont été comparées (Plummer et al., 1969; Roizman et Furlong, 1974; Goodheart et Plummer, 1975; Russel et Crawford, 1964);

il est apparu que le BHV1 se rapproche le plus du virus de la maladie d'Aujeszky.

L'étude par hybridation des acides nucléiques (Kieff et al., 1972; Ludwig et al., 1972; Ludwig, 1972 a et b; Bronson et al., 1972; Sterz et al., 1974), montre que le BHV1 d'une part, et les virus de la maladie d'Aujeszky ou de la mamillite bovine d'autre part, ne possèdent que peu de séquences homologues. La comparaison des polypeptides de structure (Killington et al., 1977) met en évidence des similitudes dans le nombre, la taille et la complexité générale des différents polypeptides, mais aucun polypeptide n'a la même mobilité électrophorétique dans tous les virus examinés.

Le BHV1 semble se rapprocher le plus du virus de la maladie d'Aujeszky en ce qui concerne la taille et la complexité des polypeptides révélés par électrophorèse (Stevely, 1975; Sklyanskaya et al., 1977). En outre, un même polypeptide non structural est commun à plusieurs herpesvirus (Honess et al., 1978).

Si la fixation du complément révèle des réactions croisées entre le BHV1 et le virus de la rhinopneumonie équine (*Equid herpesvirus 1*) les deux virus sont clairement distincts par la séroneutralisation de leur pouvoir infectieux (Carmichael et Barnes, 1961; Plummer, 1964). Blue et Plummer (1973), découvrent par immunofluorescence réalisée dans des cellules infectées, un antigène commun à plusieurs herpesvirus dont le BHV1; par la même technique, Evans et al. (1972) révèlent l'existence d'une communauté antigénique entre le virus de la maladie de Marek (*Phasianid Herpesvirus 2*), celui d'Epstein-Barr (*Human Herpesvirus 4*), celui de la rhinotrachéite infectieuse bovine; ils observent (1973) une réaction croisée du BHV1 avec l'Herpesvirus Saimiri (*Cebid Herpesvirus 2*), l'herpes simplex type 1 (*Human Herpesvirus 1*) et le virus de la maladie d'Aujeszky. Wellemans et Leunen (1973) et Wellemans (1975) utilisant la réaction de la fixation du complément, signalent des communautés antigéniques entre divers virus herpétiques dont le BHV1, le virus de la maladie d'Aujeszky, l'herpesvirus bovin type 3 de la classification de Gibbs et Rweyemamu (1977b)(prototype souche MOVAR) et celui de la rhinopneumonie équine. Enfin, Aguilar-Setién et collaborateurs (1979a, c, d, 1980a et b) décrivent une réaction sérologique croisée entre le BHV1 et le virus de la maladie d'Aujeszky, chez le bovin. Les communautés antigéniques observées entre virus

herpétiques différents peuvent être liées à des antigènes non structuraux (Morgan, 1977).

10°) Variabilité du BHV1.

L'exploration de la variabilité offre un double intérêt; tout d'abord tenter d'associer des signes cliniques à une souche particulière, ensuite trouver des "marqueurs" pour les souches, notamment vaccinales (Klingeborn et Dinter, 1972; Bowling et al., 1969).

Les nombreuses tentatives de différencier les souches des deux principales formes cliniques de la maladie provoquée par le BHV1 (IBR et IPV) et accessoirement d'autres souches entre elles, se sont inspirées des critères et des techniques employés pour séparer les types 1 et 2 de l'herpes simplex (*Human herpesvirus 1 et 2; Herpes hominis 1 et 2*). Beaucoup d'auteurs ont conclu à l'identité des souches de BHV1 isolées des différentes entités cliniques (Gillespie et al., 1959; Wagner et Gillespie, 1959; Mc Kercher, 1964 a et b; Mc Kercher et al., 1959; Mc Kercher, 1963; Mohanty et Lillie, 1970; Liess et al., 1960). Grinyer et al. (1962) n'ont observé aucune différence en ce qui concerne le développement intracellulaire de diverses souches. Black et Slack (1972) comparant une souche neurotrope avec une autre isolée de l'appareil respiratoire, ont démontré que la composition en bases de leurs acides désoxyribonucléiques était identique (G + C = 72 %). Par contre, Bagust (1972) a démontré que la souche N569, isolée d'un cas d'encéphalite, produit sous agar des plages significativement plus petites. Le même procédé ne permet pas de différencier les autres souches entre elles (Buening et Gratzek, 1967; Bagust, 1972; Jetteur et al., 1979; Mc Kercher, 1964). Straub et al. (1964), puis Matheka et Straub (1972) ont pu séparer l'IBR de l'IPV par électrophorèse de zone (Matheka et Geiß, 1965), mais non par ultracentrifugation. Il est à remarquer que Brányik et al. (1977) distinguent plusieurs sous-populations de virus de la maladie d'Aujeszky (*Sus herpesvirus 1*) selon leur point isoélectrique.

A l'instar de certaines souches du virus de la maladie d'Aujeszky (Bartha et al., 1969), certaines souches atténuées résisteraient mieux que les souches sauvages à l'action de la chaleur et de la trypsine.

n structurels

Des variations antigéniques entre souches peuvent également être observées, principalement par l'emploi de la technique de cinétique de neutralisation (Buening et Gratzek, 1967; Gratzek et al., 1966b; Crandell, 1972; House, 1972; Potgieter et Maré, 1974).

; tout
particulière,
vaccinales

ux princi-
IBR et IPV)

irées des
et 2 de
et 2).

W1 isolées
agner et
1959;

D). Grinyer
erne le

Slack (1972)
ppareil

urs acides
ntre,
d'encépha-
etites.

ches entre
, 1979;
raub (1972)

theka et
arquer que
de virus
isoélec-

szky
ent mieux
ypsine.

B. ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES BIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DU BHV1.

Plan.

- 1°) Introduction.
- 2°) Isolement, titrage et clonage du BHV1 sur cellules MDBK.
- 3°) Les marqueurs biologiques du BHV1 :
 - 3.1 Dimensions des plages de souches sauvages et réactivées.
 - 3.2 Comparaison des souches sauvages d'après leur sensibilité au phosphonoformate.
- 4°) Quelques propriétés biochimiques du BHV1.
 - 4.1 Concentration et purification du BHV1.
 - 4.2 Les polypeptides de structure du BHV1 et leur utilisation dans la comparaison de différentes souches entre elles.
- 5°) Conclusions générales de l'étude de quelques propriétés biologiques et biochimiques du BHV1.

1°) Introduction.

Diverses propriétés ont été exploitées pour tenter de différencier les souches du BHV1. Il apparaît que pour les souches sauvages, seule la technique de comparaison des plages permet de distinguer les souches encéphalitogènes de l'ensemble des autres et, parmi les souches vaccinales, seul un mutant ts peut être reconnu. Rien n'est connu au sujet des propriétés des souches réactivées.

Nous avons tout d'abord utilisé la taille des plages pour différencier les souches encéphalitogènes des autres souches et appliqué cette technique à l'étude des souches réactivées.

Ensuite, d'autres marqueurs ont été utilisés tels la sensibilité à un inhibiteur de l'ADN-polymérase viro-induite, la structure polypeptidique, l'électrophorèse des brins d'ADN après digestion par des endonucléases en collaboration avec V. MISRA et L.A. BABIUK du laboratoire de Virologie de l'Université de la Saskatchewan au Canada.

2°) Isolement, titrage et clonage du BHV1 sur cellules MDBK.

2.1. Introduction.

Pour la plupart des recherches sur le BHV1, les cellules MDBK ont été choisies en vue d'uniformiser les conditions de travail. Les cellules MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) sont en effet une lignée continue dérivée par Madin et Darby, en 1958, de rein de bovin adulte (American Type Culture Collection (1972)), d'une grande sensibilité au BHV1 et de culture relativement aisée. Cette lignée se distingue des autres lignées continues d'origine bovine, notamment par ses caractères isoenzymatiques (Carleer et al., 1979).

Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine est apte à former des plages sous agar (Rouhandeh et Werder, 1961; Hahnefeld et Hahnefeld, 1962; Sabina et Parker, 1963; Pastoret et al., 1978a) et comme d'autres virus (Hotchin, 1955; Tytell et Neuman, 1963) sous carboxyméthylcellulose (Mondino et al., 1964) ou antisérum (Stevens et Groman, 1964; Zuffa et al., 1976). Il est ainsi possible de le cloner, de le titrer (Stevens et Groman, 1963; Pastoret et al., 1978b), et d'étudier l'action

de certains composés (Kelling et al., 1976).

Nous décrivons ci-après comment les techniques de culture, de titrage et de clonage du BHV1 ont été standardisées.

2.2. Matériel et méthodes.

a) Les cellules.

Les cellules MDBK (FLOW) sont entretenues en bouteilles de Roux, dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium), solution saline tamponnée de Earle, Acides aminés non-essentiels, 0,85 µg/ml de bicarbonate de Na, 10 % de sérum foetal de veau, 100 U.I. de pénicilline/ml, 10 µg/ml de streptomycine. Le nombre moyen de cellules obtenues à confluence, dans une bouteille de Roux en verre d'environ 200 cm² de surface, est de 40.10⁶.

b) Isolement des souches sauvages du BHV1 et identification.

L'échantillon est inoculé à des cultures cellulaires confluentes qui sont observées pendant 1 semaine. Le deuxième passage en culture cellulaire se fait au moyen du surnageant de la culture du premier passage, centrifugé à 3000 rpm pendant 15 minutes (centrifugeuse Sorvall, GLC-1) et filtré à travers une membrane (porosité : 0,45 µ; Millipore). La suspension virale ainsi obtenue est examinée au microscope électronique après préparation selon la méthode de pseudoréplique préconisée par Smith (1967). Le contraste de la coloration négative est obtenu grâce à une solution de 2 % d'acide phosphotungstique amenée à pH 7 par addition de quelques gouttes d'hydroxyde de potassium normal. La dernière étape de caractérisation consiste en une épreuve de neutralisation par un sérum anti BHV1, selon la technique de la réduction du nombre des plages (Hoskins, 1967). Le sérum anti BHV1 de référence a été obtenu chez le lapin, par injections intraveineuses successives de BHV1 (souches IBR/Los Angeles) mis en suspension semi-purifié, dans du PBS. Son activité calculée en utilisant

la technique de séroneutralisation de Jenny et Wessman (1973), est de 1.73 ($\log_{10}$) contre 450 TCID₅₀ % de BHV1. Utilisé à la dilution 1/2, il neutralise généralement plus de 100.000 particules infectieuses des souches testées.

c) Titrage du BHV1.

Pour titrer le nombre de particules infectieuses dans une suspension de BHV1, la technique des unités formant plaque ou P.F.U. (Plaque Forming Units) est utilisée; la teneur en virus infectieux est dès lors exprimée en PFU/ml. La suspension virale à titrer est diluée de 10 en 10 et chaque dilution est inoculée à une boîte de Pétri, toujours sous un même volume. En général, la gamme des dilutions va de 10^{-2} jusqu'à 10^{-6} , mais cela peut varier selon le but poursuivi.

Après 1 heure d'adsorption à 37° C, sous atmosphère contrôlée, le milieu liquide est aspiré pour être remplacé par un milieu nutritif rendu semi-solide par addition de carboxyméthylcellulose (C.M.C.) ou d'agarose. Après obtention de plages lisibles, les cellules sont fixées puis colorées. Chaque fois, trois dilutions successives sont lues pour vérifier la relation de linéarité. Si un titrage très précis est nécessaire, on utilise 10 boîtes par dilution, et on calcule la moyenne. Le dénombrement se fait à l'oeil nu pour la méthode sous CMC et, au microscope inversé (Leitz), pour celle sous agarose.

d) Clonage du BHV1.

Pour cloner une souche de BHV1, la population virale de départ est traitée comme pour un titrage sous agarose. On choisit ensuite la boîte de Pétri inoculée avec la dilution de la suspension virale qui offre le plus petit nombre de plages. Les plages parfaitement isolées sont repérées, délimitées à l'aide d'un crayon marqueur, puis prélevées au travers de la gélose à l'aide d'une seringue. A chaque reprise, cinq plages sont prélevées et réensemencées séparément sur cellules MDBK. Les 5 populations virales ainsi obtenues sont ensuite traitées de même à deux reprises.

2.3. Résu

a) Isolem

Le B
gène marqu
étude pos
et sont n
des souche
décrite u

b) Titrag

Les
sous carb

2.4. Conc

Les
titrage e
utilisées
La carbox
n'autoris
le clonag

3°) Les m

3.1. Dime

3.1.1. In

Les
rences dan
me marque
et Ueba,
souches au

2.3. Résultats.

a) Isolement et identification des souches sauvages de BHV1.

Le BHV1 produit en culture de cellules MDBK un effet cytopathogène marqué et caractéristique. Toutes les souches utilisées dans cette étude possèdent l'aspect morphologique caractéristique des Herpesviridae, et sont neutralisées par l'immunsérum de référence. L'origine clinique des souches isolées et utilisées dans le cadre de cette thèse sera décrite ultérieurement.

b) Titration et clonage du BHV1.

Les titres obtenus par les méthodes de titration sous agarose ou sous carboxyméthylcellulose ne diffèrent pas significativement.

2.4. Conclusions et discussion.

Les cellules MDBK conviennent parfaitement pour l'isolement, le titrage et le clonage du BHV1 et toutes les souches sauvages de BHV1 utilisées dans cette étude ont été formellement identifiées. La carboxyméthylcellulose a été abandonnée au profit de l'agarose qui, n'autorisant qu'une faible diffusion des particules, permet ainsi le clonage.

3°) Les marqueurs biologiques du BHV1.

3.1. Dimensions des plages de souches sauvages et réactivées.

3.1.1. Introduction.

Les caractéristiques des plages peuvent être associées à des différences dans la virulence (Carmichael et Medici, 1978) et être utilisées comme marqueurs biologiques permettant l'identification des souches (Kimura et Ueba, 1978). Par la comparaison des plages, on a pu distinguer des souches au sein des diverses espèces d'herpesvirus, notamment l'herpes

simplex (Rapp, 1963; Schneweis et al., 1972; Lowry et al., 1971; Munk et Ludwig, 1972; Lancz, 1974; Cassai et al., 1975/76; Shinkai, 1975; Pavan et Ennis, 1977), l'herpes équin type 1 (Borgen, 1970, 1972), le virus de la maladie d'Aujeszky (Tokumaru, 1957; Skoda et Jamrichová, 1965; Skoda et Jakubik, 1974; Lomniczi, 1974), l'herpes canin (Carmichael et Medic, 1978) et celui de la maladie de Marek (Cho, 1976).

En ce qui concerne le BHV1, seule une souche isolée d'un cas d'encéphalite formait des plages plus petites que les souches isolées d'autres cas cliniques (Bagust, 1972; Buening et Gratzek, 1967; Mc Kercher, 1964 a et b). Nous avons par conséquent cherché à vérifier si les souches isolées d'encéphalite en Belgique présentaient le même caractère.

La même technique de comparaison de la moyenne des plages a ensuite été utilisée pour comparer des souches sauvages conventionnelles avec des souches réexcrétées par des bovins après injection de dexaméthasone, dans le but de savoir si les relations que le BHV1 entretenait avec l'organisme pendant la période de latence peut le modifier de ce point de vue. Pour ce faire, six souches dont certaines caractéristiques étaient connues ont été utilisées.

3.1.2. Matériel et méthodes.

a) Souches de BHV1 utilisées.

- 1°) Souche internationale de référence Los Angeles (IBR/LA), d'origine respiratoire, qui nous a aimablement été fournie par le Prof. D.G. Mc Kercher de Davis, Californie, USA.
- 2°) Souches que nous avons clonées à partir du matériel suivant :
 - IBR/Cu5 provenant d'un cas de maladie respiratoire typique (Pastoret et al., 1978 a et b);
 - IBR/92/2/W et IBR/89/4/W provenant de deux cas d'encéphalite chez le veau et isolées par le Dr. G. Wellemans (Institut National de Recherches Vétérinaires, Belgique).
- 3°) Souches réactivées suivantes :
 - Souche IBR/Dexa T1 J06.

Elle provient du mucus nasal du taurillon inoculé avec la souche IBR/Cu5 (voir plus loin) et soumis à la première série d'injections répétées de dexaméthasone. L'isolement a été pratiqué au sixième

jour
- Souche
huitième
dexaméthasone
souche
- Souche
infect
(Aguil)
Cette
d'anti
lisant

b) Obtention

Les cultures
confluence
drillé (Lun)
sous agarose
contrôlée.
sa, puis su
souches son
contenant c
épreuves sc
mesurées à
préalableme

c) Tests st

- Test d
Pour c
100 ou
d'asym
- Analyse
L'infl
une ana

jour après le début du traitement.

- Souche IBR/Dexa G3 J06,07,08, isolée les sixième, septième et huitième jours après le début de la troisième série d'injections de dexaméthasone, du mucus nasal de la génisse inoculée avec la souche IBR/Cu5.

- Souche IBR/Al1, isolée du mucus nasal d'une génisse naturellement infectée et soumise à des injections répétées de dexaméthasone (Aguilar-Setién et al., 1979b).

Cette génisse avait réagi positivement à l'injection intradermique d'antigènes du BHV1, mais était dépourvue d'anticorps neutralisant celui-ci.

b) Obtention des plages et mesure de leur taille.

Les cellules utilisées, de la lignée MDBK, sont cultivées, jusqu'à confluence dans des boîtes de Pétri de 30 mm de diamètre, à fond quadrillé (Lux scientific corporation), puis inoculées comme pour un titrage sous agarose et ensuite incubées pendant 5 jours à 37° C, en atmosphère contrôlée. Elles sont enfin fixées au formol, colorées au May-Grünwald-Giemsa, puis surcolorées avec du Giemsa seul. Les dilutions des différentes souches sont inoculées et fixées exactement en même temps. Les cultures contenant ordinairement de 20 à 50 plages sont photographiées. Les épreuves sont tirées à l'agrandissement final de 25 x, et les plages sont mesurées à l'aide d'un planimètre Ott/Kempton, le périmètre étant préalablement rectifié.

c) Tests statistiques.

- Test de normalité.

Pour chaque souche, la normalité de la distribution de la surface de 100 ou 50 plages prises au hasard a été vérifiée par les tests d'asymétrie (g_1) et d'aplatissement (g_2).

- Analyse de variance - test de Duncan (1955).

L'influence de la souche sur la taille des plages a été étudiée par une analyse de variance à un critère de classification.

Deux comparaisons ont été réalisées :

- la première entre les souches IBR/LA, IBR/Cu5, IBR/92/2/W, IBR/89/4/W;
- la seconde entre les souches IBR/LA, IBR/92/2/W, IBR/Cu5, IBR/Dexa/T1J06, IBR/Dexa G3J0678, IBR/A11.

Résultats.

a) Première comparaison :

Le tableau 1 donne les résultats de la vérification de la normalité des populations échantillonnées.

Tableau 1.

Vérification de la normalité des populations échantillonnées pour la première comparaison.

<u>Souche</u>	<u>n</u>	<u>x</u>	<u>s</u>	<u>tg₁</u>	<u>tg₂</u>
IBR/LA	100	2,212	1,024	3,136	0,884
IBR/Cu5	100	2,417	1,091	2,875	0,625
IBR/92/2/W	100	1,12	0,779	6,452	5,14
IBR/89/4/W	100	2,278	1,203	3,268	1,664

La figure 1
IBR/92/2/W,
des plages,
souches et t
de la taille
Par contre,
et cette tra
quatre souch
Le tableau 2

Tableau 2.

Résultats de
première com

Source

Entre les so
Dans les sou

L'hypothèse
lation est r
montre que l
des plages s
souches (P <
ne présentent
présente des
souches étud
La souche IB
Belgique, ne
référence IB

Conclusions

La technique
d'une façon
marqueur "pe
elles.

La figure 1 donne respectivement pour les souches IBR/LA, IBR/Cu5, IBR/92/2/W, IBR/89/4/W, l'histogramme de la répartition des tailles des plages. On constate une forte asymétrie à droite pour les quatre souches et un phénomène de pic pour la souche 92/2/W. La répartition de la taille des plages ne suit donc pas une distribution normale. Par contre, la racine carrée des données est distribuée normalement et cette transformation réduit fortement la variation dans chacune des quatre souches étudiées, ce qui vérifie l'hypothèse d'homoscédasticité. Le tableau 2 donne les résultats de l'analyse de variance.

Tableau 2.

Résultats de l'analyse de variance sur les données transformées de la première comparaison.

Source	dl	somme des carrés	variance	test de F.
Entre les souches	3	16.6882	5,5627	43,07
Dans les souches	396	51.1449	0,1292	

L'hypothèse nulle que ces quatre souches sont tirées d'une même population est rejetée ($P < 0.001$). L'application du test de Duncan (1955) montre que la souche 92/2/W est la seule à présenter une taille moyenne des plages significativement différente de celle des trois autres souches ($P < 0.001$). Les moyennes des souches IBR/LA, IBR/Cu5, 89/4/W ne présentent donc pas de différences significatives. La souche 92/2/W présente des plages significativement plus petites que celles des autres souches étudiées.

La souche IBR/Cu5 isolée d'un cas de maladie respiratoire typique en Belgique, ne diffère pas sur ce point de la souche internationale de référence IBR/LA, elle-même isolée d'un cas de maladie respiratoire.

Conclusions et discussion.

La technique que nous avons mise au point permet donc de distinguer d'une façon relativement simple certaines souches et d'attribuer un marqueur "petites plages" (Ormerod et Jarrett, 1978) à l'une d'entre elles.

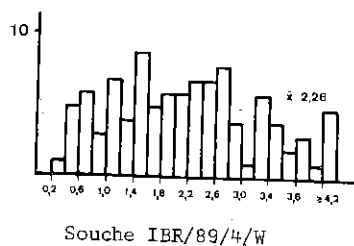
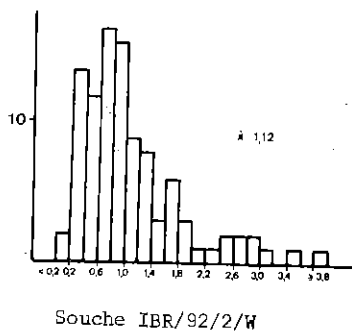
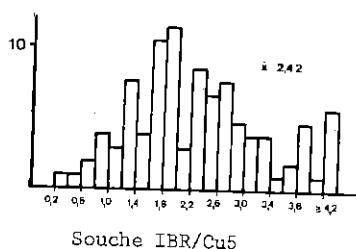
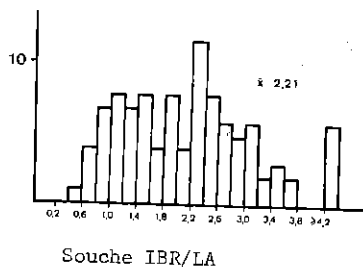


Figure 1.

Histogramme de la répartition de la taille des plages (données non transformées) lors de la première comparaison.

b) Seconde

- Vérific

La so

(tableau 3

(figure 2)

Tableau 3.

Vérificati

pour la se

Souche

IBR/LA

IBR/92/2/W

IBR/Cu5

IBR/DexaT1

IBR/DexaG3

IBR/A11

La normalis

carrée des

- Variance

L'analyse

souche sur

tableau 4)

b) Seconde comparaison.

- Vérification de la normalité des populations échantillonnées.

La souche 92/2/W s'écarte franchement d'une distribution normale (tableau 3), les souches IBR/Cu5 et A11 s'en écartent légèrement (figure 2).

Tableau 3.

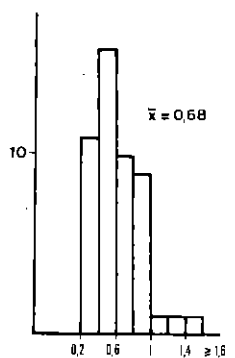
Vérification de la normalité des populations échantillonnées
pour la seconde comparaison.

Souche	n	$\bar{x}$	s	tg_1	tg_2
IBR/LA	50	2,626	1,108	0,381	1,011
IBR/92/2/W	50	1,002	0,642	7,320	10,257
IBR/Cu5	50	2,400	0,809	2,331	3,799
IBR/DexaT1J06	50	1,686	0,525	0,913	0,251
IBR/DexaG3J0678	50	2,332	0,750	0,090	0,142
IBR/A11	50	0,682	0,296	3,406	2,229

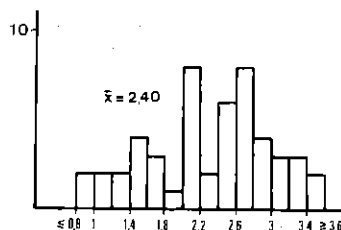
La normalité des distributions est obtenue en prenant la racine carrée des données.

- Variance.

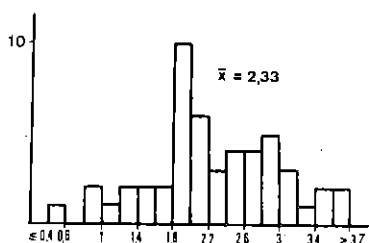
L'analyse de variance montre que l'hypothèse d'absence d'effet de la souche sur la taille des plages doit être rejetée ($P < 0.001$, tableau 4).



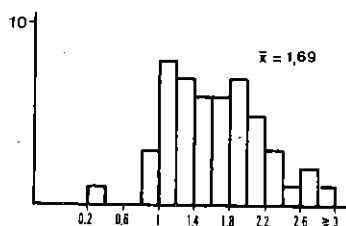
Souche IBR/A11



Souche IBR/Cu5



Souche IBR/DexaG3J0678



Souche IBR/Dexa/T1J06

Figure 2.

Histogramme de la répartition de la taille des plages (données non transformées) lors de la seconde comparaison.

Tableau 4.

Résultats

la seconde

Source

Entre les

Dans les

L'applica

l'analyse

seules les

fèrent pa

la souche

vement de

plus rédu

pas de di

contre, e

et IBR/De

les autre

inférieure

Conclusion

La te

guer d'un

d'attribu

à l'une d

Tableau 4.

Résultats de l'analyse de variance sur les données transformées de la seconde comparaison.

Source	dl	somme des carrés	Variance	test de F
Entre les souches	5	26,1058	5,2212	74,217
Dans les souches	294	20,683	0,0704	

L'application du test du Duncan (1955) à partir des résultats de l'analyse de variance montre que parmi les six souches étudiées, seules les moyennes des tailles des plages des souches 1,3,5, ne diffèrent pas significativement entre elles ($P < 0.05$). Comme précédemment, la souche 92/2/W, isolée d'un cas d'encéphalite, s'écarte significativement des deux autres en présentant une moyenne de surfaces nettement plus réduite. L'analyse statistique de la taille des plages ne permet pas de distinguer la souche IBR/Cu5 de la souche IBR/Dexa G3J0678, par contre, elle montre une différence sensible entre les souches IBR/Cu5 et IBR/Dexa T1J06. La souche A1 1 diffère significativement de toutes les autres souches et présente même une surface moyenne de plage inférieure à celle de la souche 92/2/W.

Conclusions et discussion.

La technique que nous avons mise au point permet donc de distinguer d'une façon relativement simple certaines souches sauvages et d'attribuer un marqueur "petites plages" (Ormerod et Jarrett, 1978) à l'une d'entre elles (IBR/92/2/W).

Etudiant, selon les mêmes critères, quatre souches du BHV1 dont aucune, il est vrai, n'était isolée de cas d'encéphalite, Buening et Gratzek (1967) n'ont pu déceler aucune différence; par contre, Bagust (1972) est ainsi parvenu à distinguer la souche N569, isolée du cerveau d'un veau mort de méningoencéphalite (French, 1962) et présentant une neurovirulence extrême (Hall et al., 1966).

Nos résultats sont en accord avec ceux des auteurs précédents, puisque nos souches ne diffèrent pas entre elles, à l'exception d'une isolée d'un cas d'encéphalite. Il est remarquable de constater que celle-ci possède le même caractère "petites plages" que la souche N569 isolée en Australie; l'autre souche isolée d'encéphalite ne présente pas ce caractère.

Les résultats de la comparaison entre la souche IBR/Cu5 et deux autres (IBR/Dexa T1J06 et IBR/Dexa G3J0678) isolées après traitement à la dexaméthasone de deux bovins primitivement inoculés avec cette même souche IBR/Cu5, sont plus difficiles à interpréter, car l'une des deux dernières ne diffère pas significativement de la souche initiale, alors que l'autre donne des plages significativement plus petites.

Si l'on ne peut exclure formellement la possibilité d'une contamination du taurillon par une souche étrangère, cette hypothèse est fort peu vraisemblable. La possibilité que la souche IBR/Cu5 ait pu être modifiée par son installation à l'état latent chez l'animal doit donc être prise en considération, ce qui poserait, le cas échéant, le problème

de l'emploi
La souche
elle présente
de la souche
être typique
Jetteur et
injection
de la taille
Nous avons
souches variées
davantage
vacciner les
passages.
D'ailleurs,
provenant de
Ashe et Sch
parmi les s
labial chez
légères mod
enzymes de
même région

3.2. Comparaison noform

3.2.1. Introduction

Le phos
sont des mo
doivent leu
l'ADN-polym
tion généra
mécanisme d
polymérase
Tous les he

de l'emploi de pareil "marqueur" pour l'étude de la latence du BHV1. La souche Al 1 diffère significativement de toutes les autres souches; elle présente même une moyenne de taille de plaque inférieure à celle de la souche 92/2/W, alors que le caractère "petites plages" semblait être typique des souches isolées de cas d'encéphalites (Bagust, 1972; Jetteur et al., 1979). Le fait que cette souche a été isolée après injection de dexaméthasone, pourrait également expliquer la réduction de la taille moyenne des plages.

Nous avons d'autre part observé (observations non publiées) que les souches vaccinales de BHV1 obtenues dans les mêmes conditions forment davantage et de plus grands syncytia que les souches utilisées pour vacciner les mêmes animaux. Ce caractère disparaît après quelques passages.

D'ailleurs, Saxegaard (1966) a montré que les souches de virus IPV provenant de porteurs subcliniques sont plus difficiles à isoler et Ashe et Scherp (1965) observent une légère variabilité antigénique parmi les souches isolées d'accès récurrents successifs d'herpes labial chez l'homme, tandis que Lonsdale et al. (1978) trouvent de légères modifications dans les profils d'analyse de l'ADN clivé par des enzymes de restriction et provenant de différents isollements d'une même région anatomique d'un même individu.

3.2. Comparaison des souches sauvages d'après leur sensibilité au phosphonoformate.

3.2.1. Introduction.

Le phosphonoacétate disodique et le phosphonoformate trisodique sont des molécules de découverte récente, de faible cytotoxicité, qui doivent leur activité anti-herpétique à l'inhibition spécifique de l'ADN-polymérase viro-induite (Stenberg et Larsson, 1978) (cfr introduction générale). Cette inhibition s'exerce vraisemblablement par un mécanisme d'interférence avec un site de liaison pyrophosphate de la polymérase (Oberg et Helgstrand, 1978).

Tous les herpesvirus testés jusqu'à présent, dont le BHV1, sont sensibles

à ces composés, mais l'apparition de souches résistantes a été décrite chez certains d'entre eux. Cette résistance est héréditaire et on peut la faire apparaître par passages répétés d'une souche sensible en présence de phosphonoformate, même après clonage (Svennerholm et al., 1979).

Cherchant à savoir si les souches du BHV1 isolées, soit de maladie respiratoire (IBR), soit de vulvovaginite (IPV) ou d'encéphalite, se distinguent par leur sensibilité au phosphonoformate, nous avons étudié l'effet de ce composé sur la taille des plages produites sous agarose.

3.2.2. Matériel et méthodes.

a) Souches virales utilisées.

- La souche internationale de référence IBR/LA (non clonée).
- La souche IBR/Cu5.
- La souche 92/2/W.
- La souche IPV/Ak, aimablement fournie par le Dr Akkermans J.P.W.M., du Centraal Diergeneeskundig Instituut de Rotterdam (Pays-Bas). Cette souche a été isolée d'un cas de balanoposthite survenu dans un centre d'insémination artificielle, avant qu'aucune maladie respiratoire due au virus IBR ait été diagnostiquée dans ce pays.
- La souche IPV/W/3760, aimablement fournie par le Dr Wellemans de l'I.N.R.V. et isolée en Belgique, en 1958, d'un cas typique de maladie génitale, alors que les formes respiratoires de la maladie n'étaient pas encore signalées dans le pays. Elle a subi quelques 100 passages sur cellules foetales bovines.
- La souche IPV/W/2144, aimablement fournie par le Dr Wellemans, après son deuxième passage. Cette souche a été isolée d'un cas de maladie génitale survenue au centre d'insémination de Hasselt en 1966.

Ces cinq dernières souches ont toutes été clonées.

b) Cellules utilisées.

Les cellules de la lignée GBK (Georgia Bovine Kidney) nous ont aimablement été fournies par le Prof. Babiuk de l'Université de Saskatchewan, Saskatoon, Canada.

Elles son
Earle's
aminés na
streptomy
sérum fo

c) Produit

Les
(30 mm de
Saline) e
10, en su
elles son
et 2 % d
formate
Après 5
5 % de C
May-Grün
présenta
précédem
d'après

d) Tests

1) Test

La
vérifiée

2) Analy

L'i
au milie
Pour dét
une rédu
a été ut
plage po

3) Test

Une
sur la t

Elles sont entretenues dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium), Earle's BSS, bicarbonate réduit (0.85 µg/ml), additionné d'acides aminés non-essentiels (N.E.A.A.), de pénicilline (100 U.I./ml) de streptomycine (10 µg/ml), de natamycine (3 µg/ml) et de 10 % de sérum foetal de veau (Eurobio).

c) Production et mesure des plages.

Les cellules GBK, cultivées jusqu'à confluence en boîtes de Pétri (30 mm de diamètre), sont rincées à l'aide de PBS (Phosphate Buffered Saline) et inoculées au moyen de 0,2 ml de dilutions virales de raison 10, en suspension dans du MEM. Après une heure de contact à 37° C, elles sont recouvertes de milieu MEM contenant 1 % d'agarose (Indubiose) et 2 % de sérum foetal de veau. Ce milieu est additionné de phosphonoformate aux concentrations suivantes : 0,100 et 500 µM/ml. Après 5 jours d'incubation à 37° C, sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂, les cellules sont fixées à l'aide de formol et colorées au May-Grünwald-Giemsa (Jetteur et al., 1979). Les boîtes de Pétri présentant en moyenne de 20 à 50 plages sont analysées selon la méthode précédemment décrite, en calculant la taille moyenne des plages d'après la dimension de 50 plages.

d) Tests statistiques utilisés.

1) Test de normalité.

La normalité de la distribution de la surface des plages a été vérifiée par les tests d'asymétrie et d'aplatissement.

2) Analyse de variance.

L'influence de l'addition de doses croissantes de phosphonoformate au milieu a été étudiée par une analyse de variance à un critère. Pour déterminer les concentrations de phosphonoformate qui produisent une réduction significative de la surface des plages, le test de t a été utilisé en comparant (deux à deux) les moyennes de surface de plage pour chaque dose de phosphonoformate.

3) Test d'interaction.

Une interaction éventuelle entre la souche et le phosphonoformate sur la taille des plages a été recherchée par un test de F.

3.2.3. Résultats.

La moyenne et la déviation standard de la taille des plages produites par les différentes souches étudiées sont données par le tableau 5.

Tableau 5.

Moyenne et déviation standard de la surface des plages produites par le BHV1 à différentes concentrations de phosphonoformate.

Souche	Paramètres	μM Phosphonoformate/ml		
		0	100	500
IBR/LA	$\bar{x}$	6.901	1.481	1.202
	S	0.501	0.114	0.107
IBR/Cu5	$\bar{x}$	4.615	0.835	
	S	0.352	0.057	
IBR/92/2/W	$\bar{x}$	3.547	1.004	
	S	0.223	0.101	
IPV/Ak	$\bar{x}$	5.827	2.637	
	S	0.600	0.230	
IPV/W/2144	$\bar{x}$	7.156	3.396	
	S	0.406	0.249	
IPV/W/3760	$\bar{x}$	2.319	1.161	
	S	0.235	0.110	

a) Normalité.

Les populations de plages produites par les souches du BHV1 ne sont pas toutes distribuées normalement en présence de 100 μM /ml de phosphonoformate, toutefois la racine carrée des données suit une distribution normale, ce qui autorise l'analyse de variance. A la concentration de 500 μM /ml de phosphonoformate, la réduction du titre infectieux est telle qu'il ne subsiste plus un nombre de plages suffisant pour permettre l'analyse statistique des données, excepté pour la souche IBR/LA.

b) Variance

L'ad
moyenne d
Le test d
de la sur
(p < 0,00
l'analyse
n'observe

b) Variance.

L'addition de phosphonoformate au milieu influence la taille moyenne des plages de chacune des 6 souches étudiées ($p < 0,001$). Le test de t démontre pour chaque souche une importante réduction de la surface des plages en présence de 100 $\mu\text{M/ml}$ de phosphonoformate ($p < 0,001$). Dans le cas de IBR/LA, seule souche permettant encore l'analyse à une concentration de 500 $\mu\text{M/ml}$ en phosphonoformate, on n'observe plus de réduction significative.

plages
par le

uites
e.

500
1.202
0.107

BHV1 ne
 $\mu\text{M/ml}$ de
it une dis-
A la concen-
itre infec-
suffisant
our la

c) Réduction de la taille des plages induite par le phosphonoformate.

Des différences significatives sont observées dans le comportement des différentes souches en présence de phosphonoformate ($p < 0.001$). Les résultats semblent indiquer que les six souches étudiées diffèrent toutes entre elles par leur sensibilité au phosphonoformate. Cependant, si l'on compare la réduction de la taille moyenne des plages en présence de 100 $\mu\text{M/ml}$ de phosphonoformate (figure 3), on observe que pour les trois souches IPV (Ak; W/3760; W/2114), la réduction est de l'ordre de 50 %, alors que pour les deux souches d'origine respiratoire (IBR/LA; IBR/Cu5), elle est de l'ordre de 80 %. La souche encéphalitique 92/2/W se situe entre ces deux groupes avec une réduction de 71.7 %.

3.2.4. Conclusions et discussion.

Toutes les souches du BHV1 étudiées sont sensibles au phosphonoformate. Ceci confirme les résultats obtenus par Helgstrand et al. (1978), ainsi que ceux que nous avons antérieurement rapportés pour la souche IBR/LA (Schwers et al., 1980). La taille moyenne des plages diminue déjà en présence de 100 $\mu\text{M/ml}$ de phosphonoformate.

Il existe cependant des différences significatives de sensibilité entre les différentes souches étudiées. En effet, la réduction de la taille moyenne des plages est nettement plus importante pour les deux souches respiratoires Cu5 et LA et à un moindre degré pour la souche encéphalitique 92/2/W, que pour les trois souches IPV (Ak; W/3760; W/2144). On est dès lors en droit de conclure que les trois souches IPV sont moins sensibles au phosphonoformate que les souches Cu5 et 92/2/W. La souche LA se comporte de façon quelque peu contradictoire, puisqu'elle est sensible à de faibles doses de phosphonoformate (réduction importante de la taille des plages dès 100 $\mu\text{M/ml}$), mais n'est guère influencée par une augmentation de la concentration en phosphonoformate, puisque l'addition de 500 $\mu\text{M/ml}$ ne modifie plus guère la taille moyenne des plages.

Les résultats obtenus permettent de distinguer le groupe des souches IPV par rapport aux autres souches; les souches IPV semblent en effet se comporter de manière remarquablement similaire en présence de phosphonoformate.

Le fait qu'il y ait d'importantes différences dans le comportement des souches étudiées vient à l'appui d'une action directe du phosphonofomate sur la multiplication du virus et non par l'intermédiaire d'une action sur les cellules qui rendrait celles-ci incapables de le multiplier. Reno et collaborateurs (1978) ont d'ailleurs décrit des différences dans le comportement de différentes souches du virus herpétique du dindon (*Turkey herpesvirus 1*) vis-à-vis du même composé, certaines d'entre elles étant parfaitement résistantes.

4°) Quelques propriétés biochimiques du BHV1.

4.1. Concentration et purification du BHV1.

4.1.1. Introduction.

Dans le but de poursuivre des études biochimiques sur le BHV1, nous avons choisi de nous adresser au virus extracellulaire, essentiellement pour faciliter la purification des particules et parce que, comme celle de l'herpes simplex (Watson et al., 1964), la multiplication du BHV1 est fort productive. La nécessité de l'obtenir à très haut titre, nous a amené à étudier le cycle de production du BHV1 extracellulaire par les cellules MDBK. Pareille étude avait déjà été poursuivie sur des cellules MDBK par Stevens et Groman (1963) et par d'autres en utilisant des substrats cellulaires différents (Jasty et Chang, 1969; Hahnefeld et al., 1965). Aucun ne s'est cependant soucié de connaître la proportion des particules physiques et des particules infectieuses émises, alors qu'il s'agit d'un renseignement important. On sait en effet que l'entraînement du BHV1 (Burtonboy, 1978) peut modifier le rapport existant entre ces deux types de particules.

D'autre part la technique de purification du BHV1 extracellulaire utilisée comporte une étape de centrifugation à l'équilibre en chlorure de césium (CsCl) qui permet de déterminer la densité des particules virales (Fritsch, 1975; Ifft et al., 1961).

4.1.2. Matériel et méthodes.

a) Production du BHV1.

Les cellules MDBK cultivées en bouteilles de Roux en matière plastique, de 75 cm² de surface, sont rincées à l'aide de PBS (Phosphate Buffered Saline) et inoculées avec du BHV1 à raison de 5 P.F.U. par cellule. Après une incubation de 1 heure à 37° C, les cellules sont rincées de même et recouvertes de milieu MEM dépourvu de sérum foetal. Elles sont ensuite incubées à 37° C pendant 48 heures, jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathogène complet. Le surnageant de la culture est alors récolté et clarifié par une centrifugation de 10 minutes, à 3000 rpm, dans une centrifugeuse Sorvall GLC-1 (étape 2); le surnageant ainsi obtenu constitue la suspension virale de départ. Pour étudier l'évolution de la production, les échantillons prélevés ont été centrifugés à 2000 rpm, pendant 15 minutes (centrifugeuse Sorvall GLC-1), avant d'être titrés.

b) Titrages et mesures.

Le titre infectieux est déterminé par dénombrement des plages formées sous agarose à 1 %.

Les particules physiques sont dénombrées au microscope électronique, après coloration négative, selon la méthode de Smith (1967), sur photographie, à un agrandissement de 15.000 x (Burtonboy, 1978). La quantité de protéines totales est estimée par la méthode de Lowry (1951).

c) Marquage radioisotopique du BHV1 et mesure de la radioactivité.

Cinq heures après la fin de la période de contact, le milieu usuel (MEM dépourvu de sérum foetal) est remplacé par du milieu MEM contenant 5 microcuries/ml d'un mélange d'acides aminés tritiés ou d'hydrochlorure de glucosamine tritiée (Radio Chemical Centre Amersham), selon qu'il s'agit de marquer l'ensemble des protéines ou les glycoprotéines.

Pour mesurer la radioactivité, à 1 ml d'échantillon marqué, on ajoute 1 ml d'une solution d'albumine bovine (Bovine serum albumin; 200 µg/litre) et 2 ml d'une solution (10 %) d'acide trichloracétique.

Le précipité contenant les protéines est recueilli sur une membrane Millipore HA (0,45 μ , 25 mm de diamètre) et rincé trois fois avec une solution (5 %) d'acide trichloracétique. Le filtre est alors déposé dans un récipient pour scintillation liquide et y est maintenu pendant une nuit à 37° C. On y ajoute ensuite 10 ml de liquide de scintillation (Permablend III, 5,5 g/l Toluene, Packard); après stabilisation, la radioactivité de l'échantillon est mesurée (compteur β) pendant 10 minutes (Kobayashi et Maudsley, 1969).

d) Procédé de purification et de récolte du virus purifié.

La méthode de purification combine des centrifugations différentielles en milieu homogène, avec une centrifugation isopycnique à l'équilibre dans une solution de chlorure de césium. La suspension virale de départ est tout d'abord centrifugée à 8000 g, pendant 30 minutes (étape 3), dans un rotor à angle fixe (30 ml/tube; centrifugeuse Omikron de la firme Martin Christ). Le surnageant est alors recentrifugé pendant 60 minutes à 120.000 g. Le culot obtenu est remis en suspension dans 100 ml de PBS (étape 4) et centrifugé pendant 60 minutes à 120.000 g. Le nouveau culot est repris dans 100 ml d'eau distillée (étape 5) et centrifugé, toujours dans le même rotor, pendant 60 minutes à 140.000 g. Le dernier culot ainsi obtenu est remis en suspension dans 3 ml d'eau distillée ou dans 3 ml d'un tampon Tris HCl (10^{-2} M, pH 7,4) (étape 6). La centrifugation isopycnique à l'équilibre en chlorure de césium est réalisée comme suit. Une quantité adéquate de CsCl est dissoute dans de l'eau distillée selon la technique de Fritsch (1975). Chaque ml de la suspension virale obtenue après la dernière centrifugation en milieu homogène est ensuite mélangé à la solution de chlorure de césium, le mélange final atteignant une densité de 1,26 g/cm³ sous un volume total de 5 ml. Des tubes de 5 ml, en nitrate de cellulose (Beckman), remplis de ces suspensions sont centrifugés dans un rotor à angle variable (SW 50.1, Beckman), à 100.000 g pendant 30 heures à 4°C. Après centrifugation, 10 aliquots sont séparés sous pression (pompe péristaltique LKB), pour chaque tube, au moyen d'un appareil universel de fractionnement Beckman. La densité des fractions est mesurée à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe.

e) Détermination de la densité du BHV1 en chlorure de césium.

La technique de centrifugation analytique en chlorure de césium a été appliquée à la souche IBR/LA (Strobbe et al., 1977).

f) Mesure de l'inactivation du BHV1 en chlorure de césium.

Afin d'apprécier l'action du CsCl sur le pouvoir infectieux du BHV1, à la concentration utilisée pour sa purification, du virus a été préparé et maintenu à 4° C, respectivement en suspension dans de l'eau distillée et dans de l'eau distillée additionnée de CsCl de façon à obtenir une densité de 1,26 g/cm³. Des échantillons de chacune des suspensions ont ensuite été prélevés à intervalles déterminés et traités pour le dénombrement des particules formant plaque.

g) Estimation de la pureté des échantillons.

La pureté des échantillons destinés à une analyse biochimique est établie par microscopie électronique.

Résultats.

a) Libération du BHV1 par les cellules MDBK infectées.

La figure 3 montre la production de BHV1 extracellulaire par les cellules MDBK, aux heures 12, 24, 36 et 48 après inoculation de 5 P.F.U./cellule. Connaissant le nombre de cellules par bouteille de Roux, on peut ainsi calculer que chaque cellule MDBK produit en moyenne 10 P.F.U.

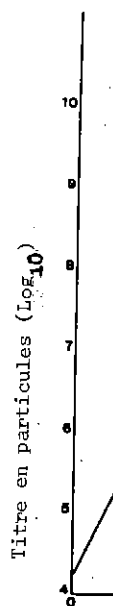


Fig. 3

et 3000
pour 30
sont en
microsc

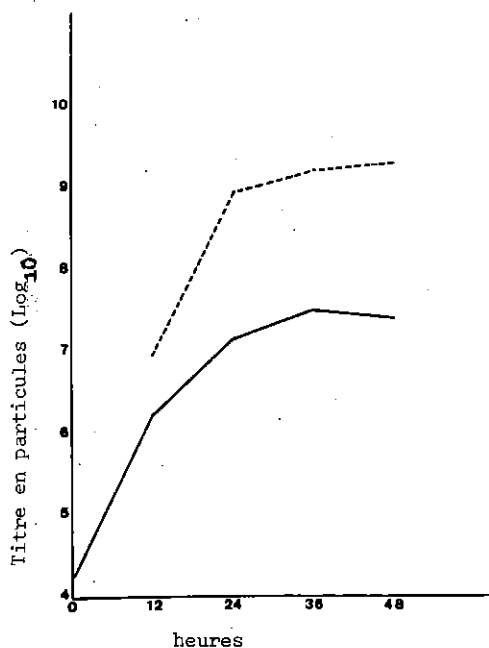


Fig. 3 : Production de virus IBR/LA extracellulaire par les cellules MDBK.

----- : particules physiques.
 ————— : particules infectieuses exprimées en PFU.

et 3000 particules physiques, c'est-à-dire une particule infectieuse pour 300 particules physiques, en fin de production. Ces particules sont en majorité des particules enveloppées, comme le montre la microscopie électronique.

Le rapport particules infectieuses/particules physiques se modifie en cours de production : on compte en effet, pour une particule infectieuse, 4 particules physiques à 12 h, 50 à 24 et 36 heures et 74 à 48 heures (Tableau 6).

Les particules physiques ne sont décelables qu'à partir de la 12ème heure et ce en quantité déjà appréciable.

Tableau 6.

Production de BHV1 extracellulaire par les cellules MDBK.

Heure	Particules infectieuses (PFU)	Particules physiques (PP)	PP/PFU	PFU/PP
0	10^4	/		
12	$2.5 \cdot 10^6$	10^7	4	25 %
24	$2 \cdot 10^7$	10^9	50	2 %
36	$5.5 \cdot 10^7$	$2.8 \cdot 10^9$	50	2 %
48	$4.5 \cdot 10^7$	$3.3 \cdot 10^9$	74	1.3 %

b) Résultats de la purification.

Au terme des étapes de centrifugation différentielle, le virus est concentré 17 fois. On retrouve 16,5 % du nombre initial des particules infectieuses et 12,5 % des particules physiques, alors que la quantité de protéine est réduite à moins de 1 % de ce qu'elle était au départ (Tableau 7).

Tableau

Activité

différentielle

Etape

1

2

3

4

5

6

Légende

Etape 1

Etape 2

Etape 3

Etape 4

Etape 5

Etape 6

Les résultats

de césium

l'aide de

On ne trouve

rassemblés

L'examen

ratiométriques

physiques

toutes les

Tableau 7.

Activité des préparations virales à chaque étape des centrifugations différentielles.

<u>Etape</u>	<u>PFU/ml</u>	<u>PP/ml</u>	<u>Quantité de protéines µg/ml</u>	<u>Rapport PFU/PP</u>
1	$2.25 \cdot 10^7$	/	515	/
2	$1.5 \cdot 10^7$	$4.4 \cdot 10^9$	375	1/300
3	$1.5 \cdot 10^7$	/	340	/
4	$2 \cdot 10^7$	/	17	/
5	$5.5 \cdot 10^6$	$2.4 \cdot 10^9$	14	1/500
6	$2.5 \cdot 10^8$	$5.5 \cdot 10^{10}$	375	1/200

Légende du tableau.

Etape 1 : phase liquide avant toute centrifugation.

Etape 2 : suspension virale de stock.

Etape 3 : surnageant après 8000 g pendant 30 minutes.

Etape 4 : culot remis en suspension dans 100 ml de PBS.

Etape 5 : culot remis en suspension dans 100 ml d'eau distillée.

Etape 6 : culot remis en suspension dans 2 ml d'eau distillée.

Les résultats obtenus après une centrifugation isopycnique en chlorure de césium sont donnés par le tableau 8, pour des virus marqués à l'aide d'acides aminés tritiés.

On ne trouve plus aucune particule infectieuse de BHV1. Le virus est rassemblé en une bande floue recueillie avec les 7ème et 8ème fractions. L'examen en microscopie électronique atteste de la pureté des préparations de BHV1 enveloppé contenues dans la fraction 7; les particules physiques observées après centrifugation isopycnique sont presque toutes pénétrées par le produit de contraste.

Tableau 8.

Caractéristiques des fractions recueillies après centrifugation isopycnique d'un échantillon de BHV1 en CsCl.

Numéro de la fraction	PP/ml	Quantité de protéines $\mu\text{g/ml}$	Radioactivité dpm/ml	Densité g/cm^3
1	10^6	/	56 200	1,38
2	10^6	90	40 800	1,34
3	$1,8 \cdot 10^7$	60	35 700	1,315
4	$3,6 \cdot 10^8$	385	34 400	1,29
5	$1,18 \cdot 10^9$	60	68 200	1,28
6	$5,73 \cdot 10^9$	117	121 400	1,27
7	$8,47 \cdot 10^9$	90	84 900	1,26
8	$6,5 \cdot 10^9$	205	252 900	1,25
9	$3 \cdot 10^9$	175	127 000	1,23
10	$1,23 \cdot 10^9$	175	110 500	1,22

5 ml sont recueillis en 10 aliquots de 0,5 ml.

La fraction 1 est située au fond du tube.

L'échantillon à purifier contenait :

$1,4 \cdot 10^{10}$ particules physiques; 595 μg de protéines; 915 900 dpm de radioactivité.

c) Densité des particules de BHV1 en CsCl.

L'analyse par centrifugation analytique en chlorure de césium assigne au virus une densité de $1,250 \text{ g/cm}^3$, avec des valeurs extrêmes de 1,233 et de 1,259, et permet en outre de constater que la population de virus purifié est très homogène.

d) Inactivation du BHV1 en CsCl.

La figure 4 rassemble les résultats de l'essai comparatif.

L'inactivation du BHV1 à la concentration de CsCl utilisée pour sa centrifugation isopycnique, est très rapide.

Log₁₀ P.F.U./ml

Figure 4 :

4.1.4. Con

Notre
lulaire et
gène, en q
structure.
En effet,
matériel p
fier par u
et une pure

En co
physiques e
doit sans d
cules infec

ation

Densité
g/cm³

1,38
1,34
1,315
1,29
1,28
1,27
1,26
1,25
1,23
1,22

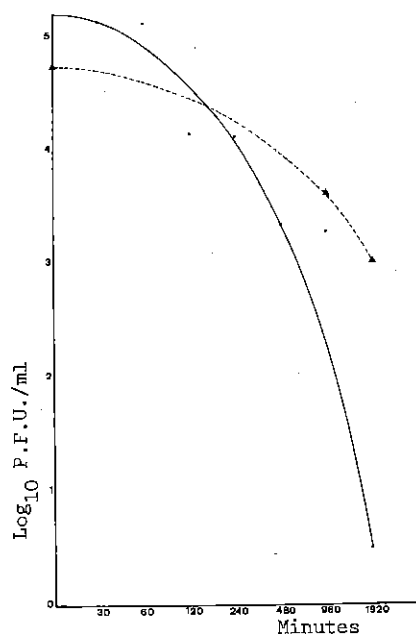


Figure 4 : Décroissance du pouvoir infectieux du BHV1.

— : en CsCl à 4° C.

----- : en eau distillée à 4° C.

0 dpm de

e césium
urs extrêmes
la popula-

4.1.4. Conclusions et discussion.

Notre méthode de production et de purification du BHV1 extracellulaire et enveloppé, permet de l'obtenir hautement purifié et homogène, en quantité suffisante pour l'étude des polypeptides de structure.

En effet, en évitant l'extraction cytoplasmique, on opère sur un matériel plus homogène (Roizman et Furlong, 1974), que l'on peut purifier par une méthode simple, tout en atteignant un rendement suffisant et une pureté supérieure.

En cours de production, l'évolution du rapport entre particules physiques et infectieuses, qui se fait au détriment de ces dernières, doit sans doute être attribuée à l'inactivation des premières particules infectieuses libérées. Dans cette hypothèse, la libération des

pour sa

particules infectieuses en fin de production ne suffit plus à compenser la perte qui résulte de l'inactivation.

Comme les autres auteurs n'avaient observé que la production des particules infectieuses, ils en avaient conclu que la production atteint son acmé dès la 36ème heure; en réalité, elle continue au-delà, ainsi qu'en témoigne l'augmentation du nombre de particules physiques, entre la 36ème et la 48ème heure, mais il semble bien que la production de particules physiques soit à son apogée à ce moment. Comme les autres auteurs, nous obtenons le pouvoir infectieux maximal entre 36 et 48 heures.

Le fait que les particules physiques ne sont pas observées avant la 12ème heure qui suit l'inoculation, est sans conteste imputable au seuil de sensibilité de la microscopie électronique qui est de l'ordre de 10^6 particules physiques/ml (Pastoret et al., 1976; Burtonboy, 1978).

La perte du pouvoir infectieux en fin de centrifugation isopycnique et le fait que les particules physiques observées à ce stade sont presque toutes pénétrées par le produit de contraste signifie que notre procédé de purification endommage l'enveloppe et la nucléocapside, comme Roizman et Furlong (1974) l'ont suggéré pour les herpesvirus, et comme le montre la rapide décroissance du pouvoir infectieux du BHV1 dans une solution de chlorure de césium.

La densité observée en CsCl est très proche de celle que rapporte Bagust (1972), alors que la durée de centrifugation que nous avons choisie est beaucoup plus longue que celle retenue par ce dernier auteur (Roizman, 1969).

La centrifugation analytique en CsCl permet en outre d'observer l'homogénéité de la population de BHV1 obtenue après centrifugation isopycnique à l'équilibre.

La pureté du virus obtenu est vérifiée par l'augmentation du rapport particules physiques/protéines et par l'examen en microscopie électronique.

4.2. Les
la co

4.2.1. Int

Comme
de séparer
de cherche
virus. Le
d'acide nu
de ces deu
Nous nous
structure
che IBR/Lor
de référen
du bétail.
Ensuite, la
parée; des
(IBR et IPV
techniques
Angeles ont
à une étude

4.2.2. Maté

a) Souches

1°) Souche
2°) Souche
3°) Souche
respirat
sous ag
4°) Souche
5°) Souche
6°) Souche
7°) Souche
dexaméth
souche I

4.2. Les polypeptides de structure du BHV1 et leur utilisation dans la comparaison de différentes souches entre elles.

4.2.1. Introduction.

Comme les techniques utilisées jusqu'à présent ne permettent pas de séparer l'ensemble des souches du BHV1, il paraissait plus indiqué de chercher des marqueurs au niveau de la structure biochimique du virus. Le virus étant constitué d'un assemblage de protéines et d'acide nucléique les efforts peuvent se porter sur l'un ou l'autre de ces deux constituants.

Nous nous sommes attachés dans un premier temps à l'étude de la structure polypeptidique du BHV1. Le choix s'est porté sur la souche IBR/Los Angeles, parce qu'elle représente la souche internationale de référence et qu'elle a été isolée d'un cas de maladie respiratoire du bétail.

Ensuite, la structure polypeptidique de plusieurs souches a été comparée; des souches sauvages isolées des deux entités cliniques majeures (IBR et IPV), ainsi qu'une souche réexcrétée. A cette fin, les techniques initialement utilisées pour étudier la structure du BHV1/Los Angeles ont été abandonnées au profit d'autres qui se prêtent mieux à une étude comparative.

4.2.2. Matériel et méthodes.

a) Souches de BHV1 utilisées.

- 1°) Souche IBR/Los Angeles.
- 2°) Souche IBR/Cu5.
- 3°) Souche IBR/Cu7, isolée par nos soins, en 1977, d'un cas de maladie respiratoire typique associée à des mortalités néonatales; clonée sous agarose.
- 4°) Souche IPV/Ak.
- 5°) Souche IPV/Wellemans/3760.
- 6°) Souche IPV/Wellemans/2144.
- 7°) Souche IBR/Cu5/T1J06, isolée après une première injection de dexaméthasone chez un bovin inoculé expérimentalement avec la souche IBR/Cu5 et clonée sous agarose.

Les diverses souches ont été produites, marquées et purifiées, comme précédemment décrit. Le virus était utilisé soit tel que, soit après marquage avec des acides aminés tritiés ou de la glucosamine tritiée ; pour la détermination du poids moléculaire des polypeptides, les résultats obtenus à l'aide de plusieurs lots de virus IBR/LA purifié ont été comparés entre eux.

b) Electrophorèse en tubes et dénaturation des particules.

Pour la détermination des poids moléculaires, l'électrophorèse en tubes a été utilisée, telle que décrite par Spear et Roizman (1972), Laemmli (1970), Dimmock et Watson (1969).

L'appareil utilisé (Pleuger) permet de faire migrer conjointement, 8 échantillons différents dans des tubes séparés, remplis d'un gel de résolution (main gel) de 100 mm de long, surmonté d'un gel d'empilement (Stacker gel) de 25 mm.

Le procédé d'électrophorèse combine la méthode discontinue proposée par Davis (1964) avec la dénaturation des protéines par le SDS (ici Sodium Lauryl Sulfate au lieu de Sodium Dodecyl Sulfate). Brièvement, la solution à partir de laquelle le gel de définition est polymérisé, contient : 0.375 M Tris-hydrochloride (pH 8.8); 0,1 % de sodium lauryl sulfate; 0,03 % (v/v) de N,N,N',N'-Tetraméthyl-éthylène-diamine; 0,05 % (p/v) de persulfate d'ammonium.

Les concentrations d'acrylamide utilisées sont de 6 %, 8.5 %, 10 %, 12 %, en maintenant un rapport de 1/40 entre le bis-acrylamide et l'acrylamide.

Très souvent, le N,N,N',N'-Tetraméthyl-éthylènediamine est remplacé par 0.1 (v/v) de 3-Diméthylaminopropionitril; d'autre part, la concentration en persulfate d'ammonium est parfois augmentée.

Le gel d'empilement est constitué de : 0.125 M Tris-hydrochloride, pH 7.0; 0.1 % de sodium lauryl sulfate; 0.03 % (v/v) de N,N,N',N'-Tétraméthyl-éthylènediamine ou 0.1 % (v/v) de 3-Diméthylaminopropionitril; 0.1 % (p/v) de persulfate d'ammonium; 3 % d'acrylamide; 0.08 % de bis-acrylamide.

Les tubes en verre utilisés ont une longueur totale de 150 mm; un diamètre intérieur de 6 mm et extérieur de 8 mm; ils sont siliconés intérieurement. L'extrémité inférieure du gel de définition et l'extrémité supérieure du gel d'empilement baignent dans un tampon d'électrode à pH 8.5 contenant 0.025 M Tris; 0.192 M glycine et 0.1 % de sodium

lauryl sulfate.

Avant l'électrophorèse, les suspensions de virus à analyser sont dialysées contre de l'eau distillée, à 4° C, pendant une nuit, s'il en est besoin pour éliminer le CsCl. Elles sont ensuite dénaturées, en l'absence d'inhibiteur de protéase comme le PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride), à l'aide d'urée 8M, de sodium lauryl sulfate à 10 % et de mercaptoéthanol pour se mettre en conditions réductrices (Hardwick et Bussell, 1978); ensuite, elles sont chauffées pendant 15 minutes à 60° C, ou bouillies pendant 2 minutes à 100° C. Après dénaturation, on y ajoute systématiquement une solution de bleu de bromophénol (0.05 %) dans du saccharose (50 %).

Le dépôt des échantillons sur le gel d'empilement se fait, au travers du tampon d'électrophorèse, à l'aide d'une pipette Pasteur. L'électrophorèse se déroule sous un ampérage constant de 3 mA/tube pendant le passage au travers du gel d'empilement, et de 5mA/tube, lors du passage au travers du gel de définition; elle est interrompue lorsque le bleu de bromophénol parvient à environ 1 cm du bord inférieur du gel. Le gel est ensuite extrait extemporanément de chaque tube, grâce à une pression d'air exercée au-dessus du gel, à l'aide d'une seringue; aussitôt après, la longueur totale du gel de définition est mesurée et, par rapport au départ de ce dernier, le déplacement du front de la bande de bleu de bromophénol.

Le gel d'empilement est séparé avec précaution du gel de définition et ce dernier est immédiatement plongé dans le fixateur. Le gel est ensuite coloré dans une solution de bleu de Coomassie (Fazekas de St. Groth et al., 1963), pendant 2 heures à 37° C, après quoi il est progressivement décoloré par trempages successifs dans des solutions décolorantes jusqu'à ce qu'il soit à nouveau translucide. Les gels décolorés sont alors maintenus dans un bain de fixation jusqu'au moment de la lecture.

c) Electrophorèse en Slab-gels (gels plats).

Pour l'électrophorèse en gel plat, une cuve d'électrophorèse Biorad a été utilisée (Dual vertical Slab gel electrophoresis cell, modèle 221); elle permet d'obtenir des gels de 140 sur 280 mm. Avant polymérisation du gel, les plaques de verre sont siliconées, puis placées avec un écartement de 1,5 mm et surmontées d'un peigne à 10 trous, accordant ainsi un volume de 150 µl pour chaque échantillon.

Le gel de définition a une hauteur d'environ 250 mm et est surmonté d'un gel d'empilement. L'électrophorèse se déroule comme précédemment décrit, sous 30 mA pour un gel; en outre, le gel est refroidi à 10° C pendant toute la durée de la migration. Lorsque le bleu de bromophénol arrive à 30 mm du bord inférieur du gel, l'électrophorèse est interrompue et le gel est détaché des deux lames de verre et rapidement placé dans un bain de fixation. La coloration et la décoloration des gels, s'opère comme lors de l'électrophorèse en tube. Après fixation et coloration les gels sont séchés, sous vide, dans un appareil de la firme Biorad (Gel slab dryer, modèle 224).

Les gels de définition utilisés pour la comparaison des souches contiennent 10 % d'acrylamide + diallyltartardiamide, ou un gradient de concentration allant de 7 à 20 %.

d) Formation des gels en gradient de concentration.

Pour ce type de gels, l'agent de liaison utilisé était du diallyltartardiamide (Anker, 1970; Stevely, 1975; Heine et al., 1974).

Le gel obtenu après polymérisation, présente un gradient de concentration en acrylamide, allant de 7 % à 20 % et contient : 0.375 M Tris-hydrochloride, pH 8.8; 0.1 % SLS; 0.04 % (v/v) N,N,N',N'-Tetraméthyléthylène-diamine; 0.04 % (p/v) de persulfate d'ammonium pour une solution de 7 % d'acrylamide (ou 0.02 % de persulfate d'ammonium pour une solution de 20 % d'acrylamide). On maintient un rapport de 1/27 entre le diallyltartardiamide et l'acrylamide. On ajoute 1 % de glycérol à la solution de 7 % d'acrylamide et 5 % à la solution de 20 %.

Le gel d'empilement est constitué de : 0.125 M Tris-hydrochloride, pH 7.0; 0.1 % de SLS; 0.2 % (p/v) N,N,N',N'-Tetraméthyléthylène-diamine; 0.2 % (p/v) de persulfate d'ammonium; 3 % d'acrylamide; 0.08 % de bis-acrylamide.

Le tampon d'électrode à pH 8.5, contient : 0.025 M Tris; 0.192 M glycine; 0.1 % SLS.

e) Détermination des poids moléculaires des polypeptides.

1°) Marqueurs moléculaires utilisés.

Au début, deux marqueurs moléculaires principaux, provenant du laboratoire de Biologie moléculaire de l'Université Libre de Bruxelles,

à Rhôdes-St-Genèse, ont été utilisés, il s'agissait de catalase (P.M. : 60 000 daltons) et de myosine de porc (P.M. : 220 000 daltons) et par la suite, les marqueurs moléculaires de la firme Boehringer (Combithek), complétés par de la myosine de porc.

Les marqueurs fournis par le Combithek sont :

l'inhibiteur de trypsine du soja (TI, trypsin inhibitor, P.M. : 21 500 daltons); l'albumine sérique bovine (BSA, P.M. : 68 000 daltons); l'ARN-polymérase extraite d'*Escherichia coli*, sous-unité α (P.M. : 39 000 daltons), sous-unité β (P.M. : 155 000 daltons), sous-unité β' (P.M. : 165 000 daltons).

Les marqueurs sont utilisés à raison de 5 ou 10 μ l de chacun, par échantillon. Les marqueurs de poids moléculaire de la firme BDH (Molecular weight for SDS polyacrylamide gel electrophoresis) se sont révélés moins satisfaisants à l'usage.

2°) Méthode de détermination.

Les poids moléculaires des différents polypeptides ont été déterminés par la méthode mise au point par Shapiro et al. (1967), Weber et Osborn (1969) et Dunker et Rueckert (1969); la migration relative de chacun d'eux est calculée par rapport à celle du marqueur bleu de bromophénol et comparée à celles des protéines choisies comme marqueurs. Les déterminations ont été faites pour quatre concentrations d'acrylamide (6 %, 8,5 %, 10 %, 12 %) et douze mesures différentes ont été faites dans chaque cas et à chaque concentration.

Les poids moléculaires ont été établis à partir des résultats obtenus dans des gammes et à des concentrations d'acrylamide dans lesquelles on obtient une relation linéaire entre les poids de certains marqueurs.

Pour calculer la mobilité relative d'une sous-unité protéique, on applique la formule (Weber et Osborn, 1969) :

$$\text{Mobilité} = \frac{\text{Distance de migration des protéines}}{\text{Longueur du gel après décoloration}} \times$$

$$\frac{\text{Longueur du gel avant coloration}}{\text{Distance de migration du bleu de bromophénol}}$$

f) Analyse d'un gel en tube après électrophorèse de virus marqué.

Les gels sont analysés selon une technique décrite par Content et Duesberg (1970). Ils sont découpés en rondelles de 2 mm d'épaisseur, qui sont introduites dans des pots destinés au compteur à scintillation

et additionnées de 2 ml de Soluène 350 de la firme Packard.
Après 48 heures de contact à température ordinaire, on ajoute 10 ml de liquide scintillant (Permablend III, 5,5 g/l Toluène, Packard). Le comptage se fait après un séjour de 24 heures dans l'obscurité. Les résultats exprimés en nombre de coups par 10 minutes, sont transformés en nombre de doses par minute (dpm).

g) Technique de fluorographie

La lecture des gels plats chargés d'échantillons marqués au tritium se fait par fluorographie (Bonner et Laskey, 1974; Laskey et Mills, 1975).

Le principe est de remplacer progressivement l'eau contenue dans le gel par du DMSO (Diméthylsulfoxyde) dans lequel le PPO (2,5-Diphényloxazole) est soluble. En fin d'opération, on laisse le gel macérer dans une solution de DMSO contenant du PPO et on fait ensuite précipiter le PPO à l'intérieur du gel en plongeant celui-ci dans de l'eau distillée. Ceci fait, le gel est séché.

On améliore l'enregistrement photographique en exposant au préalable le film à un bref éclair de flash en lumière monochromatique (sensibilisation). Cette pré-exposition augmente la sensibilité du film et corrige le défaut de linéarité de la relation entre la radioactivité de l'échantillon et l'absorbance de l'image photographique.

Pour la fluorographie, on utilise des films Agfa-Gevaert Curix RP2 (18 x 24) (X-ray film) et l'on recourt éventuellement à un écran renforceur Cawo (Rapid, 18 x 24). Au bout d'une exposition moyenne de 120 heures à - 70° C et développement, les bandes correspondant aux polypeptides apparaissent en noir sur le fond bleuté du film. L'absorbance des différentes bandes peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à scanning Gilford.

4.2.3. 1

a) Nomb

BHV1

Le

diffère

Tableau

Poids m

concent

Identit

polype

VP1

VP2

VP3

VP4

VP5

VP6

VP7

VP8

VP9

VP10

VP11

VP12

VP13

VP14

VP15

VP16

VP17

VP18

VP19

VP20

4.2.3. Résultats.

a) Nombre et poids moléculaire des polypeptides de structure du BHV1 (souche de référence IBR/LA).

Le tableau 9 donne la valeur moyenne du poids moléculaire des différents polypeptides, selon la concentration du gel.

Tableau 9.

Poids moléculaires des polypeptides de structure du BHV1 selon la concentration du gel en polyacrylamide.

Identité des polypeptides	Poids moléculaires ($\times 10^{-3}$ daltons) dans :			
	Gels à 12 %	Gels à 10 %	Gels à 8,5 %	Gels à 6 %
VP1	/	/	275	/
VP2	/	/	256	/
VP3	/	/	/	180
VP4	150	150	/	145
VP5	140	138	139	120
VP6	122	120	120	100
VP7	104	99	99	82
VP8	99	89	91	77
VP9	95	85	86	73
VP10	91	82	83	/
VP11	82	79	76	/
VP12	68	68	68	/
VP13	/	65	66	/
VP14	62	60	64	/
VP15	54	53	57	/
VP16	53	52	55	/
VP17	43	43	44	/
VP18	41	/	/	/
VP19	38	35	35	/
VP20	33	32	30	/
VP21	31	28	28	/

Aucune concentration ne permet une estimation très précise du poids moléculaire des polypeptides de grande taille, car le seul marqueur de haut poids moléculaire est la myosine de porc (P.M. = 220.000 daltons). Comme la gamme des poids moléculaires est très étendue, c'est le gel de 8,5 % qui permet la meilleure détermination de l'ensemble des polypeptides de structure du BHV1; les gels à 6 % conviennent bien pour la zone supérieure à 150.000 daltons et ceux contenant 12 %, pour la zone située en-deça de 68.000. Les polypeptides reconnus sont désignés par le sigle VP (Viral Polypeptide), et ont été numérotés de 1 à 21. Avec des gels autorisant une meilleure définition, on peut éventuellement subdiviser le polypeptide VP11 en trois sous-unités désignées comme suit : VP11 a, b, c. La somme des poids moléculaires de ces différents polypeptides est de 2.043.000 daltons. La figure 5 illustre la répartition des différents polypeptides du virus IBR/LA dans un gel de 10 % et le tableau 10 groupe leurs poids moléculaires et indique s'ils sont ou non glycosylés.

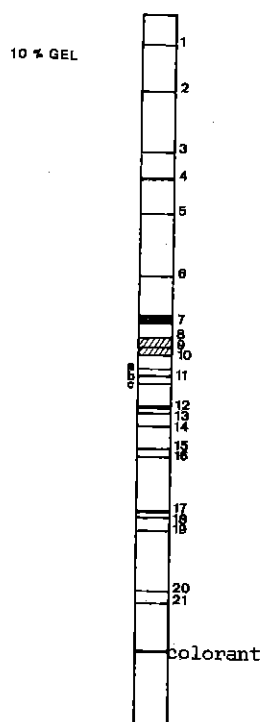


Figure 5 : Répartition schématique des différents polypeptides du virus IBR/LA, dans un gel de 10 %.

Tableau

Liste

du virus

Polypep

VP1
VP2
VP3
VP4
VP5
VP6
VP7
VP8
VP9
VP10
VP11
VP12
VP13
VP14
VP15
VP16
VP17
VP18
VP19
VP20
VP21

Si l'on
aminés t
on disti
molécula
L'électr
que le p
l'ensem

Tableau 10.

Liste des poids moléculaires des différents polypeptides de structure du virus IBR/LA (exprimés en daltons).

Polypeptide	Poids moléculaire	Polypeptides glycosylés (+)
VP1	275 000	+
VP2	256 000	
VP3	180 000	
VP4	150 000	
VP5	139 000	
VP6	120 000	+
VP7	99 000	
VP8	90 000	
VP9	86 000	+
VP10	83 000	+
VP11	76 000	+
VP12	68 000	+
VP13	66 000	+
VP14	62 000	
VP15	54 000	+
VP16	53 000	+
VP17	43 000	+
VP18	41 000	
VP19	38 000	
VP20	33 000	
VP21	31 000	

Si l'on compare, en fluorographie, le virus IBR/LA marqué aux acides aminés tritiés et le même virus marqué à l'aide de glucosamine tritiée, on distingue 10 polypeptides glycosylés dont un de très haut poids moléculaire (275.000 daltons).

L'électrophorégramme de l'ensemble des polypeptides permet d'estimer que le polypeptide majeur du virus (VP7) représente 14,21 % de l'ensemble des protéines, alors que la VP4 intervient pour 2,64 %.

b) Comparaison de différentes souches de BHV1 entre elles.

La figure 6 illustre la comparaison entre 3 souches isolées de maladie respiratoire (IBR/Cu5; IBR/Cu5/T1J06; IBR/Cu7), et 3 souches isolées de formes génitales (IPV/Wellemans/3760; IPV/Ak; IPV/Wellemans/2144) après marquage à l'aide d'acides aminés tritiés et électrophorèse sur gel d'acrylamide-diallyltartardiamide à 10 %. De cette comparaison, il apparaît que les souches isolées du tractus respiratoire (IBR) sont identiques entre elles et identiques à la souche Los Angeles. Les souches isolées du tractus génital (IPV) sont également semblables entre elles.

Les différences observées entre les souches de type IBR et celles de type IPV intéressent le polypeptide VP7, et le couple des glycopolypeptides VP12 et 13. VP7 est plus léger dans les souches IPV, alors que les glycopolypeptides VP12 et 13 sont plus lourds dans ces mêmes souches.

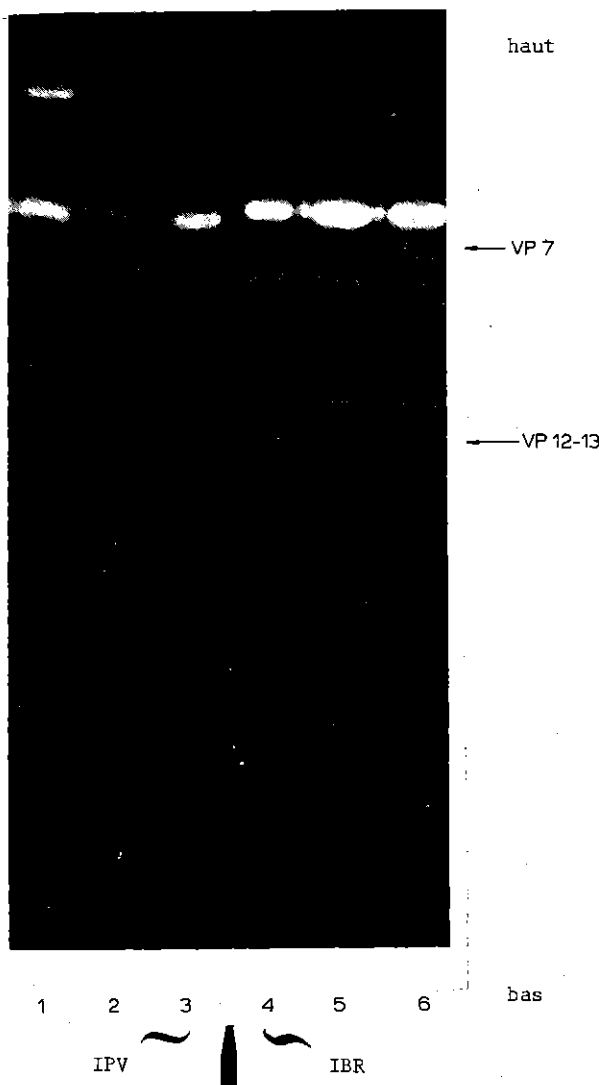
La souche IBR/Cu5, utilisée pour inoculer un bovin, et la souche IBR/Cu5/T1J06 réisolée chez le même animal après injection de dexaméthasone, ne diffèrent pas.

1 2
IPV

e maladie
isolées de
144) après
ur gel
on, il
sont
Les
ables

lles de
copoly-
, alors
s mêmes

che
dexamé-



haut

Figure 6.

Comparaison entre les
polypeptides de souches
IPV et IBR du BHV1.

1) IPV/W /3760.

2) IPV/Ak.

3) IPV/W /2144.

4) IBR/Cu5.

5) IBR/Cu5/T1J06.

6) IBR/Cu7.

Marquage aux acides
aminés tritiés; gel
d'acrylamide-diallyl-
tartardiamide 10 % et
fluorographie.

bas

4.2.4. Conclusions et discussion.

La répartition générale des poids moléculaires des polypeptides de structure du BHV1 souche Los Angeles (IBR/LA) est fort similaire à celle qui est décrite pour les autres *Herpetoviridae* étudiés à ce jour, mais se rapproche le plus de celle du virus de la maladie d'Aujeszky (*Sus herpesvirus 1*) (Stevely, 1975).

Seuls 21 polypeptides de structure peuvent être identifiés, bien que les techniques employées permettent une très bonne résolution. Fazekas de St Groth et ses collaborateurs (1963) estiment qu'un polypeptide apparaîtra encore coloré par le bleu de Coomassie, s'il correspond plus ou moins à 1 µg de protéine. Comme 100 ou 200 µg de protéines sont appliqués par gel, il faudra que le polypeptide de structure représente de 1/2 à 1 % des protéines totales, pour qu'il puisse être inventorié.

Selon la région des poids moléculaires à déterminer, le choix se porte sur des valeurs obtenues avec des gels de concentrations différentes, ceux de 12 % présentant la meilleure définition (Blatter et al., 1972; Kitano, 1977). Pour le BHV1, les gels de 8,5 % et de 10 % fournissent le plus d'informations utilisables, mais les gels de 6 % sont utiles par suite de la présence de polypeptides de haut poids moléculaire. Le rapport entre la somme totale des poids moléculaires des différents polypeptides et la quantité d'information génétique contenue dans l'acide nucléique du virus, est encore difficile à établir, car des valeurs très différentes sont proposées pour le poids moléculaire de l'acide désoxyribonucléique viral.

De la comparaison entre les polypeptides de structure de différentes souches du BHV1, individualisés par électrophorèse en gel d'acrylamide, il apparaît que les souches isolées du tractus respiratoire (IBR) sont identiques entre elles et identiques à la souche Los Angeles. Les souches isolées du tractus génital (IPV) sont également semblables entre elles (Pastoret et al., 1978d, 1980b). Les souches de virus IBR se distinguent des souches IPV, principalement par les poids moléculaires des glycopolypeptides VP12 et 13 et de la VP7.

La souche IBR/Cu5 utilisée pour inoculer un bovin et la souche IBR/Cu5/T1J06, réisolée chez le même animal après injection de dexaméthasone, ne diffèrent pas. L'installation de la souche IBR/Cu5 à l'état latent n'a donc pas modifié les caractères électrophorétiques de ses

polypeptides.

La souche IPV/Wellemans/3760ne diffère pas des deux autres souches génitales, malgré le grand nombre de passages qu'elle a subi en culture de cellules.

Les différences, relativement mineures mais nettes et reproductibles, observées entre les souches IBR et IPV, sont en accord avec les résultats de comparaison de ces souches obtenus par d'autres méthodes et signalés dans la littérature. En effet, la plupart des méthodes, en dehors de la cinétique de neutralisation, l'électrophorèse des particules en gradient, et l'inoculation aux bovins, ont eu pour effet de rapprocher les deux types de souches plutôt que de les séparer. Les différences observées ne pouvaient donc qu'être mineures. Il n'est pas étonnant que la différence principale se situe au niveau d'un couple de glyco-polypeptides, car ils font partie de l'enveloppe qui est la structure la plus variable du virion.

5°) Conclusions générales de l'étude de quelques propriétés biologiques et biochimiques du BHV1.

L'ensemble des techniques mises en oeuvre a permis de mettre en évidence plusieurs différences entre les souches. En effet, les souches de type IBR et IPV diffèrent à la fois par leurs polypeptides de structure et par leur sensibilité à un inhibiteur de l'ADN-polymérase viro-induite, le phosphonoformate. Les souches encéphalitogènes peuvent être séparées des autres souches sauvages par la taille moyenne de leurs plages. Il existe en outre une souche atténuée, le mutant ts, facilement identifiable *in vitro*.

La souche réactivée qui a été analysée n'avait pas subi de modification par rapport à la souche primitivement utilisée pour infecter l'animal, si l'on s'en tient aux polypeptides de structure. Par contre, les résultats de l'analyse de la taille des plages de souches réactivées sont plus difficiles à interpréter, car discordants, et l'on ne peut exclure une modification de ce caractère après installation d'une souche sauvage à l'état latent. Ce type de marqueur semble donc devoir être rejeté pour l'identification des souches réactivées.

Aucune des techniques utilisées jusqu'à présent ne permet cependant de séparer l'ensemble des souches entre elles. Il est pourtant

indispensable de posséder des marqueurs stables des souches, si l'on veut étudier leur persistance chez l'animal, leur réactivation et leur dispersion dans le milieu.

IV. 2° P.

IV. 2° PARTIE : LA RHINOTRACHEITE INFECTIEUSE BOVINE :
 _____ L'INFECTION, LA LATENCE, LA REACTIVATION.

Plan

1°) Histo

2°) Formes

3°) Transm

4°) Latenc

5°) Observ

"En fait, le penseur reste partagé entre une pratique sordide et une théorie prétentieuse, mais il ne s'en aperçoit plus, sa théorie s'évertue à rendre l'Etat intelligent et plus l'Etat est malin, plus l'homme est bête".

André Glucksmann

La cuisinière et le mangeur
d'hommes.

A) REVUE DE LA LITTÉRATURE.

Plan

- 1°) Histoire naturelle.
- 2°) Formes cliniques et pathogénie.
- 3°) Transmission, épizootiologie et prophylaxie.
- 4°) Latence et récurrence du BHV1 a) la latence;
 b) la récurrence.
- 5°) Observations cliniques en Belgique.

1°) Histoire naturelle.

Ce sont les bovins qui paient le plus lourd tribut à la maladie, mais bien d'autres espèces sont réceptives. Ainsi, la chèvre semble faire une maladie sans gravité (Van Houveling, 1966; Maurice et Provost, 1970) à l'encontre des opinions émises par Mc Kercher et al. (1958) et Mohanty et al. (1972); Zwick et Gminder (1913) et plus tard Witte (1933) retransmettent la vulvovaginite chez cette espèce. Des anticorps ont en outre été détectés au cours d'une enquête sérologique au Kenya (Jessett et Rampton, 1975), résultats qui n'ont pas été confirmés en Europe (Kokles, 1977). Un herpesvirus sérologiquement distinct du BHV1, le *Caprine herpesvirus 1* a été isolé d'une maladie respiratoire de la chèvre (Saito et al., 1974; Berrios et Mc Kercher, 1975).

Le mouton serait sensible à l'inoculation par voie génitale (Zwick et Gminder, 1913); Kokles (1977) au cours d'une enquête sérologique, ne trouve pas d'anticorps chez cette espèce, alors que Trueblood et al. (1978) en isolent le BHV1.

La réceptivité du porc reste discutée. En effet, les expériences de retransmission de la maladie échouent régulièrement (Zwick et Gminder, 1913; Witte, 1933; Mc Kercher et al., 1958; Dawson et al., 1962); seule l'inoculation intraveineuse fait apparaître des anticorps (Woods et al., 1968) en faible quantité; les enquêtes sérologiques n'en démontrent que rarement chez le porc (Nelson et al., 1972; Dedek et al., 1977; Kokles, 1977; Afshar et Tadjbakhsh, 1970), pas chez le sanglier (*Sus scrofa*) (Kokles, 1977), ni chez d'autres espèces voisines telles que le potamochère (*Potamochoerus porcus*) et l'hylochère (*Hylochoerus meinertzhageni*) (Hedger et Hamblin, 1978); Rweyemamu (1974) en trouve cependant chez le phacochère (Warthog, *Phacochoerus aethiopicus*). D'autre part, Onstad et Saxegaard et Saxegaard et Onstad (1967) ont, semble-t-il, isolé le virus lors de maladie génitale chez le porc et Derbyshire et Caplan (1976) l'ont isolé de porcelets mort-nés; l'inoculation intranasale de cette dernière souche à trois porcelets, ne provoqua ni maladie, ni réponse sérologique, alors qu'elle produisit une maladie respiratoire typique chez un veau dépourvu de colostrum.

L'identité du virus de la vulvovaginite pustuleuse des bovins et de celui de l'exanthème coïtal des équidés a longtemps été admise (Gilbert et Saurat, 1970). Il s'agit cependant de deux entités différentes.

Le cheval, contrairement aux affirmations de Zwick et Gminder (1913), n'a pas pu être infecté par Mc Kercher et al. (1958), au moyen du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine; d'après Kokles (1967), la contamination naturelle des équins par des bovins infectés n'a jamais été signalée. Si Afshar et Tadjbakhsh trouvent des anticorps précipitant le BHV1 dans le sérum de certains chevaux, cette trouvaille doit être interprétée avec une certaine prudence, car le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*) et celui de la rhinopneumonie équine (*Equid herpesvirus 1*), présentent une communauté antigénique (Carmichael et Barnes, 1961; Wellemans, 1975), mise en évidence par une réaction d'immunoprécipitation ou de fixation du complément, alors qu'une réaction de séroneutralisation démontre qu'il s'agit bien d'entités distinctes; Kokles (1977) n'a trouvé d'anticorps neutralisant le BHV1 dans aucun des 586 sérums de chevaux qu'il a examinés. Le rôle éventuel du BHV1 dans la fluxion périodique du cheval (Gibbs et Rweyemamu, 1977a; Marolt et al., 1963; Marolt et Brudnjak, 1965) doit être interprété avec les mêmes réserves.

Les carnivores domestiques et les animaux de laboratoire semblent réfractaires (Gilbert et Saurat, 1970; Persechino et al., 1965; Armstrong et al., 1961) à l'exception peut-être du lapin (Persechino et al., 1965; Armstrong et al., 1961; Bwangamoi et Kaminjolo, 1973; Kelly, 1977; Faye et al., 1975) sous certaines conditions.

Le BHV1 a été isolé chez le vison (*Mustela vison*) et le furet (*Mustela furo*) (Porter et al., 1975) probablement contaminés par la nourriture; la transmission expérimentale est réalisable chez le furet (Smith, 1978).

Au cours d'une enquête sérologique portant, en Allemagne, sur une impressionnante série d'espèces tant domestiques que sauvages, Kokles (1977) relève des taux significatifs d'anticorps spécifiques chez le cerf (*Cervus elaphus*) et le chevreuil (*Capreolus capreolus*), observation qui est confirmée par Lawman et al. (1978), en Angleterre, pour le cerf, alors qu'ils n'en trouvent pas chez le renne (*Rangifer tarandus*), l'élan (*Alces alces*) et le daim (*Dama dama*). L'infection semble donc exister chez le cerf et le chevreuil, mais sa fréquence y est faible. En Europe, les animaux sauvages ne paraissent donc pas constituer un important réservoir de la maladie. La même situation prévaut en Amérique du Nord (Kahrs, 1977). Chow et Davis (1964) et Stauber et al. (1977) relatent cependant une haute fréquence d'anticorps anti BHV1 chez le mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*), espèce qui

a aussi pu être infectée expérimentalement. La recherche des anticorps chez l'original (*Alces alces*), le renne (*Rangifer tarandus*), le whitetail deer (*Odocoileus virginianus*), l'antilope pronghorn (*Antilocapra americana*) n'en décèle que dans ces deux dernières espèces (Thorsen et Henderson, 1971; Bolton et Murray, 1964; Friend et Halterman, 1967; Kahrs et al., 1964; Barrett et Chalmers, 1975); Hoff et al. (1973) ont isolé le virus chez l'antilope pronghorn. En Afrique, la situation est probablement différente, si on en juge par une incidence très élevée d'anticorps observée chez le buffle (*Syncerus caffer*), l'élan du Cap (*Taurotragus oryx*) et le gnou (*Connochaetes taurinus*) et moindre chez d'autres bovidae (*Tragelaphus strepsiceros*; *Kobus ellipsiprymnus*; *Kobus leche*; *Kobus kob*; *Redunca arundinum*; *Hippotragus niger*; *Hippotragus equinus*; *Damaliscus korrigum*; *Alcelaphus buselaphus*; *Aepyceros melampus*; *Gazella thomsoni*); assez curieusement, l'hippopotame (*Hippopotamus amphibius*) est fréquemment porteur d'anticorps (Kaminjolo et Paulsen, 1970; Rweyemamu, 1970, 1974; Rampton et Jessett, 1976; Hedger et Hamblin, 1978), mais jusqu'à présent le virus n'a pas été isolé dans cette espèce. Karstad et al. l'ont par contre trouvé chez le gnou (1974). L'absence d'anticorps chez d'autres bovidae examinés peut s'expliquer par le peu d'échantillons de sérum disponibles. Maré (1971) n'a pas pu reproduire la maladie chez l'Elan du Cap (*Taurotragus oryx*). Les seules lésions observées dans la faune sauvage africaine sont celles de vulvo-vaginite et, malgré la large diffusion du virus dans la nature, aucune forme respiratoire de la maladie n'est décrite. Cette observation est en faveur de l'hypothèse selon laquelle la forme respiratoire est plus récente et serait apparue après modification de l'écologie normale des animaux. En Australie, le virus a été isolé du prépuce de trois buffles d'eau (*Bubalus bubalis*) (St Georges et Philpott, 1972) et des anticorps n'ont pas été décelés chez des daims en Tasmanie (Munday, 1966).

L'homme est réfractaire à la maladie; le fait de trouver parfois des anticorps précipitants (Afshar et Tadjbakhsh, 1970) chez certains individus pourrait être imputé à des communautés antigéniques parmi les *herpetoviridae*. Kokles (1977), par une réaction de neutralisation, n'en a jamais trouvé chez l'homme. En outre, la maladie ne semble pas tellement répandue parmi le bétail en Iran (Hazrati et Amjadi, 1975), pays où ces anticorps précipitants ont été décelés.

Il est remarquable de constater que l'on trouve des anticorps neutralisants essentiellement chez des espèces appartenant à la famille des Bovidae et à des familles apparentées (cervidés, hippopotamidés). La réceptivité à cette maladie semble dès lors essentiellement se limiter à l'ordre des Artiodactyles avec une affinité particulière pour la tribu des bovinés. Chez au moins deux de ces espèces, le bétail domestique (*Bos taurus*) et le gnou (*Connochaetes taurinus*), le virus peut demeurer à l'état latent (Karstad et al., 1974; Nahmias, 1974). Il est dès lors à notre sens plus logique de consacrer l'appellation de *Bovid herpesvirus 1* (Roizman et al., 1973) pour le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine, plutôt que celle de *Bovine herpesvirus 1* proposée par certains auteurs et qui aurait un sens plus restrictif (famille Bovinae). Le BHV1 est donc naturellement inféodé aux bovins.

Ce tour d'horizon des espèces infectées montre à suffisance que le virus est universellement répandu (Straub, 1978).

En Belgique, le BHV1 a été isolé pour la première fois par Bouters et al. en 1960, d'une forme génitale de la maladie, fort répandue (Boeckx et al., 1968). Wellemans ne signale, en 1969, aucune séroconversion vis à vis du virus IBR, mais l'observe en 1970, dans des troupeaux de bovins atteints de troubles respiratoires. Il est, pour la première fois, fait mention de la maladie sous sa forme respiratoire en 1972 (Pensaert et al., 1972; Demeurichy et Pensaert, 1972; Wellemans et Leunen, 1973); à la même époque (1972), nous isolions nos premières souches (résultats non publiés). Depuis lors, la maladie s'est répandue dans le pays (Wellemans, 1975; Wellemans et al., 1977), et dans les pays limitrophes (Martel et al., 1976; Van Bekkum et Straver, 1975; Muurling et al., 1976; Straub, 1975; Mayr, 1978).

2°) Formes cliniques et pathogénie.

La rhinotrachéite et la vulvovaginite pustuleuse sont les deux expressions cliniques les plus anciennement connues de la maladie, cependant beaucoup d'autres manifestations ont été décrites (Gilbert et Saurat, 1970; Kokles, 1967; Mc Kercher, 1973; Kahrs, 1977; Gibbs et Rweyemamu, 1977a). Les animaux de tout âge peuvent être affectés,

mais l'éclosion de la maladie naturelle dépend de facteurs multiples (Kahrs, 1977), comme la souche de virus, la dose, la voie d'exposition, le status immunologique des animaux exposés; comme celui-ci varie notamment en fonction de l'âge, la maladie aura parfois tendance à affecter préférentiellement certaines catégories d'animaux.

Le fœtus doit très rarement faire une infection inapparente, car il est généralement très sensible (Kendrick, 1973a; Owen et al., 1964) et fait une forme aiguë et généralisée, presque toujours fatale, conduisant à un avortement qui n'est pas nécessairement associé à une inflammation placentaire (Kennedy et Richards, 1964; Molello et al., 1966; Kendrick et al., 1971; Miller, 1977). On ne trouve que rarement dans le sérum fœtal bovin des anticorps dirigés contre le BHV1 (Kniazeff et al., 1967; Massip et al., 1974; Solberg, 1975; Kahrs et al., 1971) et ceci ne s'explique qu'en partie par un défaut de réponse du fœtus (Gibson et Zemjanis, 1973; Kendrick et Osburn, 1973; Kendrick, 1973b). De même, le virus est rarement isolé du sérum fœtal (Hubbert et al., 1972; Kniazeff et al., 1975; Calafat et al., 1976), mais Ludwig et Storz (1973) sont parvenus à démasquer du BHV1 dans des cellules spléniques fœtales et concluent à la possibilité d'infections latentes.

L'inoculation expérimentale du fœtus par voie intrautérine, d'une souche sauvage est toujours mortelle (Kendrick, 1973a) alors que l'inoculation même parentérale de la mère ne conduit pas toujours au même résultat, car le placenta pourrait jouer un rôle d'écran (Kendrick et al., 1971; Owen et al., 1968a; Durham, 1974). Dans les exploitations, l'infection des vaches gestantes détermine des avortements que l'on peut reproduire expérimentalement par inoculation intranasale (Chow et al., 1964; Straub, 1966; Sattar et al., 1967). L'absence de virémie décrite par les premiers auteurs (Mc Kercher et Wada, 1964) avait rendu suspectes les premières observations. En réalité, il y a bien une virémie transitoire pendant laquelle le virus est véhiculé en association avec les leucocytes et disséminé dans l'ensemble de l'organisme, mais sans nécessairement créer de localisations secondaires. En fait, la fréquence des avortements lors de maladie naturelle dépend de nombreux facteurs, dont l'état immunitaire des mères qui doivent être pleinement réceptives (York, 1968), puisque l'infection du fœtus intervient pendant la période de virémie, avant l'apparition des anticorps maternels (Owen et al., 1968b; Hall et al., 1966).

La patho
induits
atténués
Mc Feely
est effe
(Saunders
elle exp
quelle a
S'i
et al.,
qu'en té
1960; Ke
La malad
et al.,
mortelle
Les anti
semblent
1968; Ho
valeur d
l'objet
permet c
doses de
Certains
(Kahrs, 1
malgré la
générale
l'immunit
indiqué
L'en
presqu'ex
Wellmans
des signe
la premiè
(French,
duction e
lation in
pérante
1969; Mc
forme res

La pathogénie de ces avortements explique pourquoi ils peuvent être induits par l'injection intramusculaire de vaccins insuffisamment atténués (Kennedy et Richards, 1964; Mc Kercher et Wada, 1964; Mc Feely et al., 1968), alors que la vaccination les prévient si elle est effectuée avant la gestation, de préférence par voie intranasale (Saunders et al., 1972; Durham, 1974; Kahrs et al., 1973). De même, elle explique pourquoi ils peuvent survenir à l'occasion de n'importe quelle autre forme clinique (Kahrs, 1977).

S'il n'est pas protégé grâce au colostrum de sa mère (Baczynski et al., 1975), le veau nouveau-né est hautement réceptif au BHV1, ainsi qu'en témoignent les essais d'inoculation expérimentale (Baker et al., 1960; Kendrick et Straub, 1967; Charton et al., 1968; Langer, 1960). La maladie tant naturelle qu'expérimentale (Baker et al., 1960; Moretti et al., 1964; Espinasse et al., 1974) est d'ailleurs fréquemment mortelle (généralisation de l'infection) à cet âge.

Les anticorps sériques neutralisant le BHV1 acquis par voie colostrale, semblent avoir disparu vers le 3ème mois de la vie du veau (Straub, 1968; House et Baker, 1968; Kahrs, 1965, cité par House et Baker). La valeur de la protection conférée au veau par l'immunité transmise reste l'objet de discussions (York, 1968; Rosner, 1968b), mais elle lui permet certainement de surmonter les infections mortelles; de fortes doses de virus peuvent l'abolir (Langer, 1960).

Certains vaccins, surtout ceux administrés par voie intranasale (Kahrs, 1977; Todd, 1975 a et b) peuvent induire une immunité active malgré la protection passive d'origine colostrale, mais, en règle générale, et surtout pour les vaccins administrés par voie parentérale, l'immunité passive contrarie la vaccination, aussi un rappel est-il indiqué (Kahrs, 1974; Brar et al., 1978).

L'encéphalite est une manifestation clinique sporadique rencontrée presque exclusivement chez le veau, notamment en Belgique (Beck, 1975; Wellemans, 1975). Bien que Webster et Manktelow (1959) aient observé des signes nerveux lors de transmission expérimentale de la maladie, la première description de cette forme clinique remonte à 1962 (French, 1962; Barenfus et al., 1963; Moretti et al., 1964). La reproduction expérimentale en est difficile et réussit le mieux par inoculation intracérébrale alors que l'inoculation intraveineuse est inopérante (Johnston et al., 1964; Straub et Bohm, 1965; Bartha et al., 1969; Mc Kercher et al., 1970). L'encéphalite peut succéder à une forme respiratoire, mais dans ce cas, la généralisation ne se ferait pas

par virémie (Hall et al., 1966; Bagust et Clark, 1972). Le virus qui se multiplie intensément au niveau de la muqueuse nasale, du pharynx et dans la région des amygdales, contaminerait les terminaisons des nerfs trijumeaux, et gagnerait ainsi le cerveau. Certaines souches de virus, telle la souche N569, semblent posséder plus d'affinité pour le système nerveux, et peuvent différer des autres souches par certains traits; mais la dose de virus paraît aussi jouer un rôle (Bagust et Clark, 1972; Straub et Bohm, 1965).

Narita et ses collaborateurs (1976, 1978 a et b) ont comparé les modifications survenant au niveau du système nerveux chez le veau, après des inoculations intranasale, intravaginale ou intraconjonctivale de BHV1; dans ces trois cas, des modifications apparaissent au niveau des ganglions sensitifs. Davies et Duncan (1974) ont cherché si cette contamination des ganglions sensitifs permettait d'expliquer la latence du BHV1, mais sans pouvoir conclure; d'après eux, les inoculations intravaginale et intranasale produisent toutes deux une certaine généralisation de l'infection et la distribution du virus est similaire, en dehors d'une différence de localisation au niveau du système nerveux. Le virus peut être retrouvé à la fois dans le cerveau et la moelle épinière des animaux inoculés par voie intravaginale, alors qu'il reste confiné au seul cerveau chez les animaux ayant subi une inoculation intranasale; ceci devrait être le reflet de la distribution des nerfs sensitifs aux organes périphériques qui subissent une intense multiplication du virus. L'encéphalite est cependant rare et sporadique car, en dépit de la dissémination nerveuse du virus, les signes systémiques se limitent habituellement à une brève réponse fébrile et, chez les animaux plus âgés, la plus grande part des lésions macroscopiques et microscopiques restent confinées au site initial de l'infection, contrairement à ce qui est observé chez le fœtus ou le nouveau-né, où la généralisation de l'infection conduit à une issue fatale. Cette extension au système nerveux ne produit généralement pas de dommages importants à l'exception de ceux observés au niveau des ganglions de Gasser (*Ganglion trigeminale*).

Une autre forme rare de la maladie également observée en Belgique est la forme digestive chez des animaux âgés. Si le tout jeune veau fait fréquemment des localisations digestives s'accompagnant souvent de ptyalisme (Baker et al., 1960; Wellemans et Leunen, 1973;

Van Kruin
tions de
effet peu
1966 a et
1974) et
de diarrhée
isoler le
d'origine
neuse de v
digestive
devrait être
(*A. tomasium*).
La mar
est cepend
Bannister,
des cas nat
al., 1974;
La der
seules deux
Abraham et
clairement
A côté
tent les fo
De la conjo
la maladie d
Mc Kercher e
1971; Ferris
et même n'in
de la vagin
d'avortement
Elle peut être
au niveau de
kératite (Hu
Mohanty et L
à provoquer
(Hughes et al
vaccination p
et Kelling, 1

Van Kruiningen et Bartholomew, 1964; Curtis et al., 1966), les relations de pareilles localisations chez des animaux plus âgés sont en effet peu nombreuses (Mc Kercher et al., 1963; Gratzek et al., 1966 a et b; Crandell, 1974; Reed et al., 1973; Wellemans et Leunen, 1974) et lorsque Markson et Derbyshire (1966) ont observé l'apparition de diarrhée après infection expérimentale, ils ne sont pas parvenus à isoler le virus de l'intestin grêle. Cette forme clinique serait d'origine systémique (Gratzek et al., 1966) car l'injection intraveineuse de virus la reproduit dans certains cas. La voie d'infection digestive doit être rejetée (Gibbs et Rweyemamu, 1977), car le virus devrait être rapidement inactivé par le pH acide de la caillette (*Abomasum*).

La mammite a elle aussi rarement été associée au BHV1. Elle est cependant consécutive à l'inoculation intramammaire (Greig et Bannister, 1965; Corner et al., 1967; Straub et Kielwein, 1966) et des cas naturels ont été décrits (Roberts et Carter, 1974; Espinasse et al., 1974; Gourlay et al., 1974).

La dermite, si elle existe, est beaucoup plus rare encore car seules deux publications en font état (Bwangamoi et Kaminjolo, 1971; Abraham et al., 1976) et la responsabilité du BHV1 n'a pas été clairement établie.

A côté des formes d'origine systémique et des formes rares, coexistent les formes locales qui sont les plus fréquentes.

De la conjonctivite est fréquemment associée à la forme respiratoire de la maladie ou peut exister seule (Abinanti et Plumer, 1961; Quin, 1961; Mc Kercher et al., 1958; Studdert et al., 1961; Timoney et O'Connor, 1971; Ferris et al., 1964; Darbyshire et al., 1962; Rebhun et al., 1978) et même n'intéresser qu'un seul oeil; elle peut aussi être associée à de la vaginite (Hyne et Johnston, 1964) et est fréquemment suivie d'avortement (Kahrs, 1977; Rebhun et al., 1978).

Elle peut être reproduite expérimentalement par instillation de virus au niveau de la muqueuse conjonctivale et peut se compliquer de kératite (Hughes et al., 1964; Sykes et al., 1962; St Georges, 1965; Mohanty et Lillie, 1970). Il semble d'ailleurs que le BHV1 suffit à provoquer l'apparition de kératite, du moins expérimentalement (Hughes et al., 1964; Nayar et Saunders, 1975 a et b); la valeur d'une vaccination préventive reste discutée (Bowen et al., 1970; Schipper et Kelling, 1970).

Le BHV1 a été associé à d'autres maladies oculaires du bétail, notamment une ophtalmie à allure récurrente comparable à la fluxion périodique du cheval (Marolt et al., 1963; Marolt et Brudnjak, 1965); il a été aussi isolé de tumeurs oculaires (Anderson, 1970; Taylor et Hanks, 1969), fait qui doit être interprété avec beaucoup de circonspection, même si un pouvoir transformant lui a été reconnu in vitro (Michalski et Hsiung, 1975; Geder et al., 1978).

Sous sa forme génitale, la maladie affecte indifféremment le mâle ou la femelle, provoquant le plus fréquemment soit une vulvo-vaginite, soit une balanoposthite; cette forme clinique a été particulièrement bien étudiée, car la maladie expérimentale présente des caractères cliniques et une évolution absolument identiques à l'affection spontanée.

Dans les conditions naturelles, la contamination est le plus souvent assurée par le coït (Gilbert et Saurat, 1970), ou le sperme (Conradi et al., 1960; Straub et Mäcke, 1965). L'affection peut également être transmise par le reniflement de la région vulvaire qui est une habitude éthologique du bétail (Kahrs et Smith, 1965; Kahrs, 1977; Collings et al., 1972). Cette particularité permettrait d'expliquer la coexistence des deux localisations principales de la maladie, forme respiratoire et forme génitale, si les contacts nez à vulve sont fréquents, car l'on sait que les souches isolées des formes respiratoires sont infectantes pour la sphère génitale (Gillespie et al., 1959) et réciproquement et que les localisations des lésions sont largement déterminées par la voie d'inoculation (Kahrs, 1977). Si la maladie, dans sa forme génitale, reste le plus souvent localisée, sans guère retentir sur l'état général, Bouters et al. (1960) ont cependant décrit des cas d'orchite, tandis que Gibbs et Rweyemamu (1977a), signalent une aggravation des troubles lors de saillies répétées.

L'infection peut encore avoir d'autres répercussions sur le tractus génital; en effet, de larges doses de virus inoculées dans l'utérus, notamment sous forme de sperme contaminé, peuvent provoquer des endométrites, empêcher temporairement la conception (Kendrick et Mc Entee, 1967; Parsonson et Snowdon, 1975) et réduire la fertilité (Bouters et al., 1964; Maré et Van Rensburg, 1961; Kahrs, 1977; Barth et al., 1978; Kaminjolo et al., 1975). Certains auteurs par contre, n'ont constaté aucune altération de la fertilité (Huck et al., 1971), notamment si l'insémination est naturelle (Gibbs et Rweyemamu, 1977; Saxegaard,

1970; All

Sous

rhinotrach

grosses h

des réper

(Collier

infection

d'inclusi

(Nelson,

dès la 36

soixantai

On peut p

de la mala

L'ens

pagné d'un

maladie ex

duit la ma

conditions

des animau

(Shroyer e

(Kiorpes e

Pour

clinique e

créées aux

Mc Kercher

Rweyemamu,

3°) Transmi

La tra

La transmis

et la trans

La tra

justifiée p

et al., 197

malgré la p

et Coulter,

1970; Allan et al., 1975).

Sous sa forme respiratoire, l'affection se traduit par une rhinotrachéite souvent fortement exsudative, s'étendant jusqu'aux grosses bronches; les complications bactériennes peuvent entraîner des répercussions pulmonaires et aggravent le cours de la maladie (Collier et al., 1960; Jericho et al., 1976). Le virus produit une infection qui aboutit à une lyse cellulaire précédée par la formation d'inclusions intranucléaires, avec destruction de l'épithélium (Nelson, 1974; Crandell et al., 1959); les inclusions apparaissent dès la 36ème heure qui suit l'inoculation et persistent pendant une soixantaine d'heures.

On peut parfois constater la formation de granulomes en fin d'évolution de la maladie (Snowdon, 1964; James et al., 1975).

L'ensemble de ces signes cliniques locaux est précédé et accompagné d'une hyperthermie parfois intense et de durée variable. La maladie expérimentale, par instillation intranasale de virus, reproduit la maladie naturelle sous une forme aiguë mais bénigne, si les conditions d'environnement sont satisfaisantes; après une exposition des animaux à un aérosol virulent, on observe les mêmes symptômes (Shroyer et Easterday, 1968). La pathophysiologie en a été étudiée (Kiorpes et al., 1978).

Pour terminer, il faut signaler qu'un certain polymorphisme clinique est inévitable, et diverses revues critiques ont été consacrées aux formes cliniques de la maladie (Gilbert et Saurat, 1970; Mc Kercher, 1973; Kahrs, 1977; York, 1968; Wellemans, 1975; Gibbs et Rweyemamu, 1977; Schultz et al., 1976; Mc Kercher, 1968; Rosner, 1968b).

3°) Transmission, épizootiologie et prophylaxie.

La transmission de la maladie se fait sur le mode horizontal. La transmission verticale *sensu stricto* (génétique) semble exclue et la transplacentaire (épigénétique) peu plausible.

La transmission par le sperme mérite une attention particulière, justifiée par la diffusion de l'insémination artificielle (Schultz et al., 1976; Saxegaard, 1970; White et Snowdon, 1973). En effet, malgré la présence d'inhibiteurs dans les liquides séminaux (Darcel et Coulter, 1976), le virus est souvent isolé du sperme (Bwangamoi et

Kaminjolo, 1971; Goffaux et al., 1978), car il est émis de manière récurrente (Bitsch, 1973), par des porteurs latents (Ulbrich et Haase, 1973; Kubin, 1969; Böttcher et Mahler, 1970; Kahrs et al., 1976; Kokles et Abshagen, 1971). La congélation du sperme assure une parfaite conservation du virus (Sheffy et Krinsky, 1973; Schultz et al., 1976; Ulbrich et Haase, 1974, 1975; Kahrs, 1977). Cette situation est préoccupante, car une forte contamination virale risque d'affecter les femelles inséminées (Schultz et al., 1976; Sheffy et Krinsky, 1973). L'assainissement des centres d'insémination est une mesure difficile à appliquer, en raison de son impact génétique et des imperfections des méthodes de détection des porteurs latents. Certains ont dès lors préconisé de vacciner les taureaux (Ibrahim et al., 1969; Bouters et Wellemans, 1970; Straub et Wagner, 1977; Schultz et al., 1976). L'immunité, même solidement installée, ne suffit cependant pas à prévenir la récurrence de l'excrétion qui peut se produire en l'absence de signes cliniques (Schultz et al., 1976). Il est d'autre part démontré que l'emploi de vaccins inactivés administrés par voie parentérale, ne prévient pas l'installation ultérieure d'une souche sauvage à l'état latent chez les animaux vaccinés (Sheffy et Rodman, 1973). Dès lors, si le choix se porte sur la vaccination, les lots de sperme devront être régulièrement contrôlés. Cependant, d'après Schultz et al. (1976) et Kahrs et al. (1976), une politique de vaccination efficace par voie nasale réduit considérablement, sinon supprime, le danger de transmission par le sperme. Les porteurs latents n'en demeurent pas moins un danger potentiel constant dans les centres d'insémination; il faut les maintenir à l'abri des stress et prohiber chez eux l'emploi des corticostéroïdes, de façon à réduire les risques de réactivation (Dennett et al., 1976).

En dehors du problème particulier posé par l'existence des centres d'insémination, la maladie naturelle se transmet à l'occasion de contacts directs entre les animaux, la transmission par vecteurs mécaniques étant de peu d'importance réelle. De grandes quantités de virions sont émis par le bétail infecté (Pastoret et al., 1978a) et la vitesse de propagation de la maladie dépend de l'importance du troupeau et des possibilités de contact entre les animaux (Kahrs, 1977; Ferris et al., 1964). Cette relative difficulté de transmission et le fait que dans nos régions et en Amérique du Nord, le bétail semble être

le principal
maladie d'ét
La pérennité
L'ubiquité d
difficiles à
mesures de p
la maladie,
zoonoses. C
plupart du t
risque enco

Le choi
chose facilit
1972; Kiese
beaucoup, l
BHV1 est lo
piratoires

Le vac
cliniquemen
prix abord
l'état late
perser par
Les vaccin
administré
(Straub, 1

Les v
sous formé
Matsuoka e
(Schipper
additionn
Les avant
pas d'av
peut s'in
pas une s
1973). D
anaphylac

Les
utilisés
et al., 1

le principal, sinon l'unique réservoir de virus, n'empêche pas la maladie d'être universellement répandue. La pérennité de l'infection est en fait sans doute assurée par la latence. L'ubiquité de l'infection, sa fréquence, l'existence de porteurs latents difficiles à détecter rendent souvent difficile l'application de mesures de prophylaxie hygiénique. Peu de pays songent à éradiquer la maladie, notamment parce qu'elle ne fait pas partie des anthroponozoonoses. On préfère recourir à une prophylaxie médicale imposée, la plupart du temps, par les structures agricoles existantes et la peur du risque encouru (Kelling et al., 1973a; Kahrs, 1974, 1977).

Le choix d'un bon programme de vaccination n'est cependant pas chose facile (Schipperet Kelling, 1971; Krdzalic et al., 1976; Phillip, 1972; Kiesel et al., 1972), car les structures d'élevage varient beaucoup, le choix des vaccins disponibles est assez étendu et le BHV1 est loin d'être le seul impliqué dans la genèse de troubles respiratoires chez les bovins (Bitsch et al., 1976; Woernle et al., 1973).

Le vaccin idéal devrait satisfaire plusieurs impératifs : être cliniquement efficace; être d'une grande sécurité d'emploi; être d'un prix abordable; prévenir l'installation des souches sauvages à l'état latent et ne pas présenter lui-même ce défaut; ne pas se disperser parmi les animaux non vaccinés.

Les vaccins diffèrent selon qu'ils sont inactivés ou atténués, administrés par voie parentérale ou nasale, monovalents ou polyvalents (Straub, 1975; Schell et al., 1972; Wittmann, 1978).

Les vaccins inactivés sont depuis longtemps disponibles et souvent sous forme de vaccin polyvalent (Kahrs, 1977; Kolar et al., 1972; Matsuoka et al., 1972). Ils sont généralement tenus pour peu efficaces (Schipper et Kelling, 1975; Straub, 1977) à moins qu'ils ne soient additionnés d'adjuvants (Schipper et Kelling, 1975).

Les avantages du vaccin inactivé (Kahrs, 1977) sont qu'il ne provoque pas d'avortements ni d'excrétion du virus vaccinal; cependant s'il ne peut s'installer à l'état latent chez l'animal vacciné, il n'empêche pas une souche sauvage de le faire ultérieurement (Sheffy et Rodman, 1973). Dans certains cas, il est à l'origine d'accidents de type anaphylactique (Kahrs, 1977; Rosner, 1968a).

Les premiers vaccins vivants atténués mis sur le marché étaient utilisés par voie intramusculaire (York et Schwarz, 1956; Kendrick et al., 1956); un de leurs gros avantages était d'être facilement

administrable, de ne pas donner lieu à une dissémination de la souche vaccinale (York et Schwarz, 1956; Kendrick et al., 1956; Baker et al., 1958; Cabasso et Brown, 1958) et de se prêter à l'administration simultanée de plusieurs antigènes différents (Baker et al., 1958; Sampson et al., 1972). L'atténuation était obtenue par passages successifs soit sur cellules bovines (Schwarz et al., 1957), soit sur des cellules hétérologues, comme celles du porc (Schwarz et al., 1958). Le principal désavantage de ce type de vaccin est de provoquer des avortements (Kahrs, 1977; Mitchell, 1974). Administré avant la première saillie, pareil vaccin protège cependant des avortements ultérieurs et il est toujours conseillé de vacciner les génisses avant leur vie de reproductrices (Saunders et al., 1972; Kahrs, 1974; Chow, 1972).

Pour juger de l'innocuité des vaccins utilisés, l'équipe de Cornell a développé un test appelé "Cornell Fetal Test" (Schultz et al., 1976) fondé sur les résultats de l'inoculation de la souche vaccinale directement au fœtus. Tout comme le virus sauvage, plusieurs souches vaccinales destinées à l'administration intramusculaire, entraînent la mort et l'expulsion du fœtus.

On comprend mieux dès lors que l'on exige d'un vaccin :

- 1°) qu'il ne se propage pas aux autres animaux de l'exploitation, parmi lesquels peuvent se trouver des vaches gestantes;
- 2°) qu'il ne s'installe pas à l'état latent chez les animaux vaccinés, et ne puisse être réexcrété à un moment indéterminé de la vie de l'animal, ou à la faveur de certaines mesures thérapeutiques, et exercer son pouvoir pathogène résiduel.

Les premières expériences de vaccination à l'aide de vaccins atténués administrés par voie intramusculaire avaient amené à conclure à l'absence de dissémination de la souche vaccinale. Ces affirmations ont été par la suite réfutées (Kelling et al., 1973b) et d'après Darcel et Dorward (1975), ce virus vaccinal pourrait être réactivé. L'absence de marqueur pour les souches vaccinales avait empêché de vérifier cette hypothèse. La souche réactivée peut être soit la souche vaccinale elle-même, soit une souche sauvage que la vaccination n'a pas empêché de s'installer à l'état latent.

Les désagréments inhérents à l'injection, par voie intramusculaire, de souches atténuées et l'espoir d'une meilleure stimulation de l'immunité locale, ont amené à rechercher la solution dans l'emploi de vaccins administrés par voie nasale.

Franck et
locale et
culaire,
groupes d
la même al
virus. Le
ques de la
le du viru
pèrent qu
Les antic
qu'après u
est contre
et Leunen

Le pr
nie (Todd
L'un des p
sale est l
ainsi que
recombina
avantage r
vaches ges
et al., 19
ne tuent p
(Schultz e
Un autre d
attribuée
surface de
1976). Le
âges que l
premiers d
une immuni
colostrale
fois de re
par voie n
tention de
profonde.

Une d
de mutants
revient le

Franck et al. (1977), ont comparé les réponses clinique et sérologique, locale et générale, chez des bovins inoculés soit par voie intramusculaire, soit par aérosol de virus sauvage. D'après eux, les deux groupes d'animaux ont présenté le même taux d'anticorps sériques et la même absence d'anticorps locaux, après une première exposition au virus. Les animaux exposés à un aérosol développèrent les signes cliniques de la maladie sous une forme bénigne, avec fièvre et excrétion nasale du virus. Les animaux inoculés par voie intramusculaire ne développèrent qu'une brève poussée fébrile mais n'excrétèrent pas de virus. Les anticorps locaux ne sont apparus, dans les deux groupes d'animaux, qu'après une deuxième exposition au virus. Cette dernière affirmation est contredite par les expériences de Lejan et al. (1977) et Florent et Leunen (1961) pour ce qui est de la forme génitale.

Le premier vaccin intranasal a vu le jour au début de cette décennie (Todd et al., 1971).

L'un des principaux désagréments des vaccins administrés par voie nasale est leur dispersion par excrétion (Mc Kercher et Crenshaw, 1971) ainsi que la possibilité d'un retour vers la virulence ou d'une recombinaison avec une souche sauvage (Straub, 1975). Leur principal avantage réside dans le fait qu'ils peuvent être utilisés chez les vaches gestantes, sans risque d'avortement (Smith et al., 1978; Todd et al., 1971; Kahrs et al., 1973); d'ailleurs certaines de ces souches ne tuent pas le fœtus lorsqu'elles lui sont directement administrées (Schultz et al., 1976).

Un autre de leurs avantages serait de procurer une protection rapide attribuée à la production d'interféron et d'anticorps locaux à la surface des muqueuses (Todd et al., 1972; Straub, 1975; Straub et Ahl, 1976). Les vaccins intranasaux peuvent être administrés aux mêmes âges que les vaccins intramusculaires, à cette différence près que les premiers cités pourraient être utilisés plus précocement et installer une immunité active chez des veaux possédant des anticorps d'origine colostrale (Kahrs, 1977; Todd, 1975b). La prudence recommande toutefois de renouveler la vaccination. L'administration d'un vaccin par voie nasale est difficile car elle nécessite une bonne contention de la tête de l'animal et réclame une instillation profonde.

Une des nouvelles façons de modifier le virus est l'obtention de mutants ts. C'est à Zygraich et collaborateurs (1974 a,b,c) que revient le mérite de l'utilisation de pareil mutant à des fins vaccinales.

Le mutant ts vaccinal du virus IBR est administré par voie nasale, seul (Zygraich et al., 1974c), ou associé à d'autres mutants ts (Zygraich et al., 1975). Il possède les qualités généralement attribuées à ce type de vaccin. La protection conférée serait précoce (Zygraich et al., 1974c) et solide, surtout après une vaccination de rappel (Kucera et al., 1978; Gerber et al., 1978). D'après ces derniers auteurs les leucocytes d'origine nasale, chez les animaux vaccinés avec le mutant ts, sont plus actifs que ceux prélevés chez des animaux ayant reçu un vaccin intramusculaire; en outre, les immunoglobulines support de l'activité anti BHV1 dans les sécrétions nasales, sont chez les premiers soit des IgA ou des IgG, et uniquement des IgG chez les seconds. L'immunisation locale est donc supérieure dans le premier cas. Cette souche vaccinale ne produirait pas d'avortement (Zygraich et al., 1974c; Kucera et al., 1978), même après inoculation foetale (Schultz et al., 1976; Schultz, communication personnelle). En effet, elle ne se multiplierait qu'au niveau du tractus respiratoire supérieur (muqueuse nasale) (Zygraich et al., 1974b), où la température locale est plus basse et non dans les organes profonds, tels que le système nerveux, ou le fœtus.

En conclusion, la diversité des situations rencontrées, des structures d'élevage, des exigences liées à la vaccination et des solutions proposées, interdit toute recommandation générale. Il n'y a pas de solution idéale valable partout; il appartiendra au praticien vétérinaire de choisir au mieux des circonstances.

4°) Latence ou récurrence du BHV1.

a) La latence.

L'un des traits caractéristiques des virus herpétiques, est leur propension à persister à l'état latent chez les animaux infectés et à donner lieu à des accès récurrents sous la pression de certains stimuli; cette propriété a en effet été démontrée chez de nombreux représentants du groupe (Honest et Watson, 1977) et a une grande importance épidémiologique.

La latence se définit par la présence du virus chez l'hôte sous une forme masquée. Pendant cette période, faute d'excrétion, le virus ne peut être détecté. Certaines modifications dans l'environnement

interne
virus ave
cas, cet
souvent d
Puisque d
deux ques

La q
à l'état
ganglions
(Davies e
mais sans
siège du
pourrait p
ou les tig
dantes, au
cours de r
des cellul
des termin
dans le nq

En ce
ont été pr
Selon la p
que lentem
d'accès ré
cette prop
et du sièg
multiplica
La seconde
récurrence
multiplica
Dans cet é
différentes
a) virions
génétique;
b) acide nu
interruptio
c) acide nu
de manière

interne et certains stimuli, peuvent déclencher la réactivation du virus avec ou sans production de virus infectieux. Dans le premier cas, cette réactivation s'accompagne d'un épisode d'excrétion et souvent d'apparition de signes cliniques.

Puisque dans l'intervalle, le virus est demeuré absolument caché, deux questions se posent : où et sous quelle forme.

La question de savoir dans quelles cellules le BHV1 se maintient à l'état latent, est encore débattue. Sa persistance au niveau des ganglions de Gasser et d'autres ganglions sensitifs a été recherchée (Davies et Duncan, 1974; Narita et al., 1976; Narita et al., 1978 a,b,c), mais sans que l'on puisse tirer de conclusions définitives quant au siège du virus latent. Davies et Duncan (1974) suggèrent que le BHV1 pourrait persister à l'état latent dans le système nerveux sensoriel ou les tissus périphériques, avec des recrudescences virales indépendantes, aux deux endroits. Le développement des lésions locales en cours de récurrence peut refléter une réactivation du virus au niveau des cellules épithéliales elles-mêmes, ou une réinfection au départ des terminaisons nerveuses locales, consécutive à une réactivation dans le nerf sensitif.

En ce qui concerne l'état du virus latent, deux hypothèses ont été proposées par Roizman (1965).

Selon la première, dite dynamique, le virus latent ne se multiplie que lentement dans les cellules qui l'hébergent, sans susciter d'accès récurrent avant que l'organisme ne l'autorise. Si l'on suit cette proposition (Klein, 1976), les cellules du site de récurrence et du siège de la latence devraient contenir du virus en cours de multiplication lente.

La seconde hypothèse, dite statique, postule qu'entre les accès de récurrence, le virus herpétique se maintient dans des cellules où sa multiplication est interrompue, mais de manière réversible.

Dans cet état statique, le virus peut se présenter sous 3 formes différentes :

- a) virions complets inhibés dans l'expression de leur information génétique;
- b) acide nucléique libre dans le noyau ou le cytoplasme, après interruption des premières étapes du cycle de réplication;
- c) acide nucléique intégré dans les chromosomes des cellules infectées de manière latente.

Si cette dernière hypothèse est la bonne, il doit y avoir une grande différence quantitative selon l'endroit où est intégré le génôme viral. S'il est intégré dans des cellules épithéliales, la multiplication de celles-ci va augmenter la quantité d'information génétique virale; tel ne sera pas le cas s'il est intégré à des cellules nerveuses qui ne se multiplient pas (Klein, 1976).

La théorie statique réunit actuellement le plus de partisans (Rajcani et al., 1977), mais la question de savoir si le génôme viral est ou non intégré, reste discutée.

On connaît actuellement trois systèmes (Werner et al., 1977; Tanaka et al., 1978; Adams et Lindahl, 1975; Tanaka et Nonoyama, 1974; Adams et al., 1977), où 80 à 90 % de l'information génétique virale existe dans des cellules non productives, sous la forme d'ADN circulaire plasmidique non intégré, mais ce n'est pas toujours le cas (Andersson-Anvret et Lindahl, 1978).

Il se pourrait en dernière analyse, qu'une part du génôme viral existe à l'état non intégré et une autre à l'état intégré; c'est ainsi que l'ADN circulaire plasmidique non intégré retrouvé dans des cellules transformées par *Herpesvirus saimiri* (Werner et al., 1977), ne contiendrait que 75 % de l'information génétique retrouvée dans les virions libres. L'hypothèse que l'autre partie du génôme est intégrée, ne peut être écartée, car d'autres expériences (Boldogh et al., 1977) semblent confirmer que le génôme viral est complet dans les cellules où il est installé à l'état quiescent.

b) La récurrence.

La latence des virus herpétiques est entrecoupée d'accès de récurrence (Plummer et al., 1970). La question de savoir pourquoi le virus demeure à l'état latent et comment il est réactivé n'est pas encore résolue. Pour beaucoup, le virus est maintenu à l'état latent par le système immunitaire et une défaillance passagère de ce dernier autorise sa réactivation (Babiuk et Rouse, 1979; Klein, 1976).

Les glucocorticoïdes, lorsqu'ils provoquent la réactivation du BHV1, pourraient cependant agir par un mécanisme différent de celui de l'immunosuppression (Davies et Carmichael, 1973; Pastoret et al., 1978 b et c, 1979a).

5°) Obser

Nous

typique,
cienne),

l'engrais

décrit pa

l'exsudat

respirato

ment IBR/

Nous avon

vaches qu

ce troupe

infectieu

miné par l

les veaux

lésions de

décrites p

1963; Van

Dans un im

symptôme d

été faites

opérations

Lomba et a

IBR/Cu3 et

lors d'att

relevés ch

souche iso

ultérieure

5°) Observations cliniques en Belgique.

Nous avons pu observer plusieurs foyers de maladie respiratoire typique, avec morbidité et même mortalité élevée (lors d'hygiène déficiente), principalement dans des rassemblements de jeunes taureaux à l'engrais; l'aspect clinique de la maladie y était voisin de celui décrit par Gilbert et al. (1976). Les figures 7, 8, 9, 10 illustrent l'exsudation (signe clinique dominant) et les lésions du tractus respiratoire observées chez les animaux de l'un de ces foyers (isolement IBR/Cu1).

Nous avons également assisté à l'éclosion de la maladie chez des vaches qui ont fait une forme respiratoire typique (isolement IBR Cu7); ce troupeau n'avait aucune histoire antérieure de rhinotrachéite infectieuse, n'était pas vacciné et avait vraisemblablement été contaminé par l'introduction d'un bovin étranger. La plupart, si pas tous les veaux nés à cette époque, sont morts en présentant notamment des lésions de la portion antérieure du tube digestif, analogues à celles décrites par divers auteurs (Baker et al., 1960; Thomson et Savan, 1963; Van Kruiningen et Bartholomew, 1964).

Dans un important troupeau laitier, la conjonctivite était le symptôme dominant (isolement IBR/Cu2); des observations similaires ont été faites par Wellemans (1975). Enfin, des cas de métrite après opérations césariennes, ont été décrits en Belgique (Wellemans, 1975; Lomba et al., 1976) et du virus a été isolé à deux occasions (souches IBR/Cu3 et IBR/Cu4). Une souche (IBR/Cu9) a également été isolée lors d'atteinte digestive antérieure chez un veau. Les symptômes relevés chez les animaux inoculés par voie intranasale à l'aide d'une souche isolée d'une forme respiratoire de la maladie, seront décrits ultérieurement.





Figure 7. Exsudation nasale; forme respiratoire de la maladie naturelle (isolement IBR/Cul).



Figure 8. Trachéite nécrotique (isolement IBR/Cul).



Figure 9. Bronchite (isolement IBR/Cul).

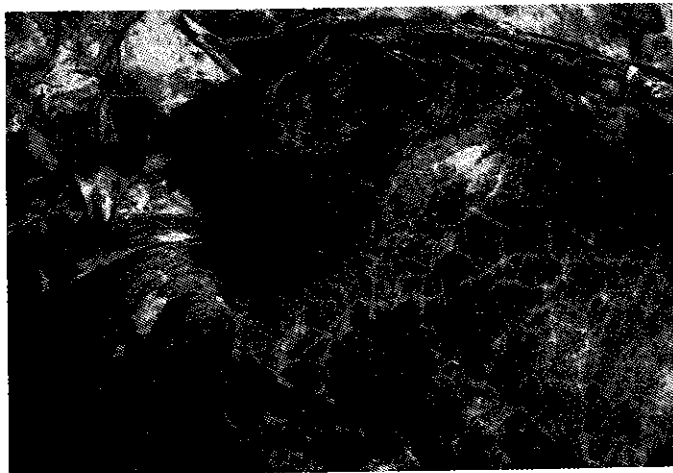


Figure 10. Pneumonie associée (isolement IBR/Cul).

B) ETUDES SUR L'EXCRETION, LA LATENCE, LA REACTIVATION ET LA REEXCRETION
DU BHV1.

PLAN.

- 1°) Introduction.
- 2°) Mesure de l'excrétion du BHV1 et évolution des anticorps neutralisants.
- 3°) Effet de la dexaméthasone sur la latence du BHV1 :
 - 3.1 Chez des animaux inoculés à l'aide d'une souche sauvage.
 - 3.2 Chez des animaux inoculés avec des souches atténuées.
- 4°) Effet de la cyclophosphamide sur la latence du BHV1.
- 5°) Conclusions générales des études sur l'excrétion, la latence, la réactivation et la réexcrétion du BHV1.

1°) Introduction.

Le BHV1 entretient des relations particulières avec son hôte et beaucoup d'aspects de cette relation restent obscurs. Le phénomène de la latence est en fait excessivement complexe.

Il serait notamment intéressant de connaître le mécanisme exact qui provoque la réactivation du virus latent par la dexaméthasone, car cela permettrait de mieux comprendre comment et pourquoi un animal cliniquement sain se transforme brusquement en animal contagieux. Il reste aussi à préciser le site où le virus latent est implanté. La vaccination contre la maladie étant très répandue, il est également nécessaire de savoir si les souches atténuées s'installent à l'état latent chez l'animal et si elles peuvent prévenir l'installation d'une souche sauvage à l'état latent.

Enfin, la prophylaxie étant essentiellement basée sur la stimulation de la réponse immunitaire de l'animal, il faut évaluer la part que prend celle-ci dans le contrôle et la maîtrise éventuelle de la réexcrétion.

2°) Mesure de l'excrétion du BHV1 et évolution des anticorps neutralisants.

2.1. Introduction.

De récentes synthèses ont été consacrées aux possibilités de diagnostic rapide en Virologie (Gardner, 1977), et à l'emploi diagnostique de la microscopie électronique en Médecine vétérinaire (Mc Ferran et al., 1978; Bhatnagar et al., 1977; Ebermann, 1977; Mc Nulty, 1978; England, 1978). Diverses observations engageaient à vérifier la valeur du procédé pour la diagnostic de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Pastoret et al., 1978c).

Les relations de l'excrétion du BHV1 après une inoculation expérimentale de virus par voie intranasale sont relativement rares (Brown et Bjornson, 1959; Straub et Ahl, 1976). Aucune ne fait mention de l'estimation du nombre de particules physiques émises, ni du rapport entre celui-ci et celui des particules infectieuses. Il était dès lors intéressant de mesurer le plus exactement possible, par isolement

et par microscopie électronique à une inoculation intranasale.

2.2 Matériel

a) Souches virales.

Pour l'inoculation intranasale, le virus respiratoire syncytial (RSV) et le virus de la grippe A/PR/8/34 (H1N1) ont été utilisés. Pour la sérologie, le virus IBR/Los Angeles (IBR/LA) a été utilisé, conservé à -70°C, sous forme de suspensions physiologiques.

b) Cellules.

Le titrage a été effectué sur des cellules MDBK.

c) Séroneutralisation.

Les sérums ont été titrés à 56° C, pendant 30 minutes. Les tests de neutralisation ont été effectués de Jenny et Wainman (1977) et de Linbro Chemical (1977). Le virus IBR/LA a été introduit 25. Le virus est réactivé dans la suspension, ou dans le veau, inactivé à 37° C, dans le sérum. Le titre de neutralisation est lisant l'effet de neutralisation de Karber.

d) Animaux.

Une génisse

et par microscopie électronique, l'excrétion du virus consécutive à une inoculation expérimentale.

2.2 Matériel et méthodes.

a) Souches virales.

Pour l'inoculation, la souche IBR/Cu5 isolée d'un cas de maladie respiratoire typique, et clonée sur cellules MDBK a été utilisée. Pour la séroneutralisation, la souche internationale de référence IBR/Los Angeles a été utilisée. Cette suspension virale est standardisée, conservée dans l'azote liquide et comporte 1000 particules physiques pour 1 particule infectieuse.

b) Cellules.

Le titrage du virus et la séroneutralisation se font sur cellules MDBK.

c) Séroneutralisation.

Les sérums conservés à -20°C , ont été inactivés par chauffage à 56°C , pendant 30 minutes, et examinés simultanément. Les tests de séroneutralisation ont été réalisés selon la microméthode de Jenny et Wessman (1973). Pour chaque sérum on réalise, en double, des dilutions (Log_2) dans des plaques pour microtitrage à fond plat (Linbro Chemical Co). On ajoute ensuite, dans chaque cuvette, un volume identique de suspension virale contenant de 30 à 100 DICC 50 % de virus IBR/LA. Après 1 heure de contact à la température ambiante, on introduit 25.000 cellules MDBK dans chaque cupule. Le titrage du virus est réalisé parallèlement. Comme liquide de dilution ou de suspension, on utilise du milieu MEM additionné de 2 % de sérum foetal de veau, inactivé, et dépourvu d'anticorps spécifiques envers le BHV1. Les plaques de microtitrage sont ensuite incubées pendant 120 heures à 37°C , dans une atmosphère contenant 95 % d'air sec et 5 % de CO_2 . Le titre de chaque sérum est donné par la plus grande dilution neutralisant l'effet cytopathogène du virus, et estimé selon la méthode de Karber.

d) Animaux.

Une génisse et un taurillon de race Pie-Noire, de six mois

environ, ont été utilisés. Ils étaient dépourvus d'anticorps neutralisant le BHV1, avant l'instillation intranasale.

Chaque animal a reçu, en instillation dans chacune des narines, 1 millilitre d'une suspension virale contenant, par millilitre 3.10^5 unités formant plaque (P.F.U.).

e) Prélèvements réalisés, examen clinique.

Pendant 20 jours, les deux animaux ont fait l'objet, à intervalles réguliers de 24 heures, d'un écouvillonnage nasal pratiqué à l'aide de coton stérile, matériel respectant au mieux l'infectivité des particules (Hanson et Schipper, 1976). Pour mesurer la quantité de matériel prélevé, les écouvillons ont été pesés avant et après chaque prélèvement (Carmichael, communication personnelle); du milieu MEM dépourvu de sérum y a été ajouté, de façon à diluer dix fois le matériel prélevé. Le pouvoir infectieux des prélèvements a été mesuré extemporanément. Les examens en microscopie électronique ont été pratiqués, après congélation à -20°C , soit sur le mucus nasal non dilué, lorsque cela était possible, soit sur les suspensions diluées 10 fois.

De plus, chaque jour, à la même heure, il a été procédé à un examen clinique des animaux, à une estimation grossière de l'importance du jetage nasal, et à un relevé de la température. Du sang a été prélevé le jour de l'instillation, et ensuite toutes les semaines pendant 1 mois.

f) Dénombrement des particules physiques.

Le nombre de particules physiques a été estimé selon la méthode de Smith (1967), sur photographie, à un agrandissement de 15.000 x.

g) Titration des particules formant plaque.

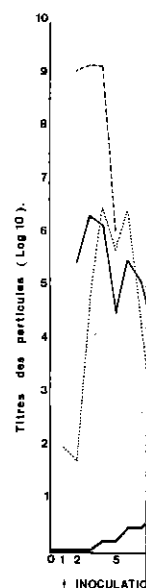
Les particules infectieuses ont été titrées par une technique de plaques sous agar à 1 %.

2.3 Résultats.

a) Titration des particules infectieuses et physiques.

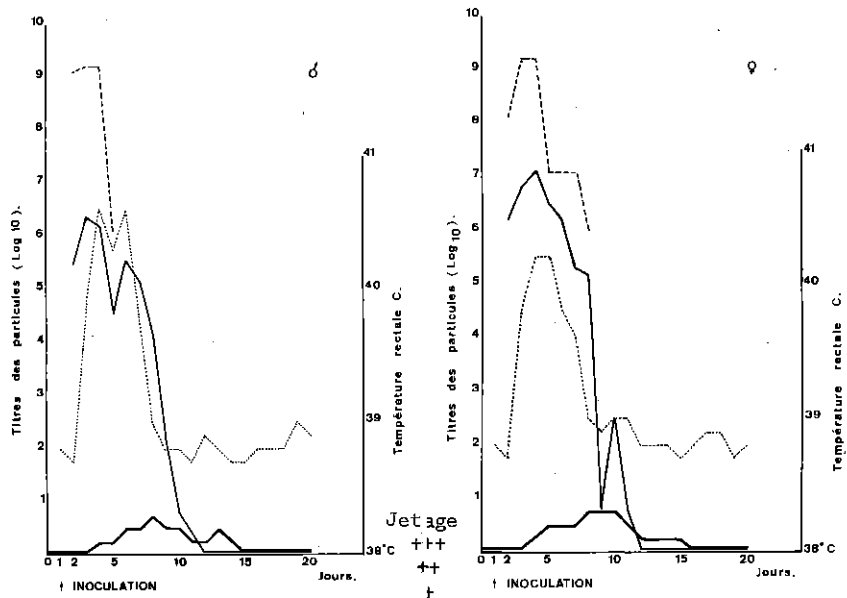
Le titrage journalier des deux types de particules (Figures 11, 12) montre chez les deux animaux, une évolution sensiblement identique de l'excrétion virale, commençant le lendemain de l'inoculation, atteignant son apogée au troisième ou quatrième jour et devenant

indécelable
microscopie



Figures 11

indécélable dès le douzième jour. Le seuil de sensibilité de la microscopie électronique est de l'ordre de 10^6 particules physiques/ml.



Figures 11 et 12. Excrétion des particules et signes cliniques chez le taurillon (11), et la génisse (12).

- : excrétion des particules infectieuses (PFU, Log_{10}).
- : excrétion des particules physiques (Log_{10}).
- : température rectale (échelle Celsius, à droite de la figure).
- ===== : estimation du jetage
 - + jetage faible
 - ++ jetage moyen
 - +++ jetage abondant

b) Evolution des anticorps neutralisants.

La figure 13 donne, pour la génisse et le taurillon, le résultat du titrage des anticorps neutralisant le BHV1.

Ceux-ci apparaissent dès la fin de la première semaine, atteignent leur plus haut niveau à la fin de la deuxième semaine, puis déclinent légèrement.

c) Examen clinique.

Les figures 11 et 12 mettent en parallèle les symptômes cliniques et l'excrétion en particules. Le pic d'excrétion virale correspond à celui de la fièvre et précède celui du jetage qui a été grossièrement estimé.

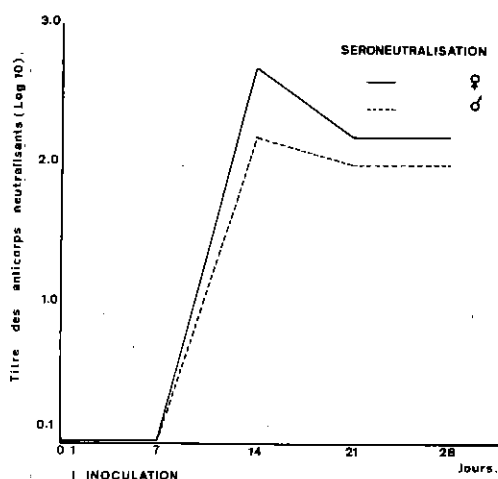


Figure 13. Teneur en anticorps neutralisants chez le taurillon et la génisse.

2.4. Conclusions et discussion.

L'examen des figures 11 et 12 fait apparaître une différence assez importante entre le nombre de particules infectieuses et celui des particules physiques excrétées : en effet pour 1 particule infectieuse,

on trouve 100 à 1000 particules physiques; ce rapport est grossièrement similaire à celui qui est observé en culture de cellules. Cette différence ne peut être attribuée aux anticorps neutralisants, puisque les animaux en sont dépourvus à ce moment.

L'examen direct en microscopie électronique permet un diagnostic rapide et précoce de la rhinotrachéite infectieuse bovine puisque l'excrétion en particules physiques dépasse pendant quatre à sept jours, le seuil critique des 10^6 particules. L'excrétion en particules infectieuses est décelable plus longtemps, et se poursuit pendant plus de dix jours.

Si le pic d'excrétion virale correspond au pic thermique, il n'en va pas de même pour le jetage. Celui-ci (figures 11 et 12), qui est le signe clinique indicateur et prédominant de la maladie, est absent en début d'excrétion et ne devient abondant qu'au moment où le nombre de particules commence à décroître. Ceci implique que le diagnostic de la rhinotrachéite infectieuse bovine, tant par examen direct en microscopie électronique, que par une technique d'isolement, a donc le maximum de chance d'être établi à la période fébrile, alors que les autres symptômes sont encore absents. Ces observations confirment le fait bien connu que le risque de contagion est plus important au moment de la poussée fébrile, avant l'apparition des autres signes cliniques. Il y a lieu d'en tenir compte dans la prophylaxie.

3°) Effet de la dexaméthasone sur la latence du BHV1.

3.1 Chez des animaux inoculés à l'aide d'une souche sauvage.

3.1.1 Introduction.

La persistance du BHV1 chez les bovins infectés a été très tôt l'objet d'investigations (Mc Kercher et al., 1963; Straub et Böhm, 1964) et sa réexcrétion intermittente a été rapidement démontrée (Snowdon, 1965); Storch (1910) l'avait déjà suggéré et Snowdon (1965), cite plusieurs observations faites en Europe à la fin du siècle précédent et au début de ce siècle, d'animaux présentant plusieurs accès

de vulvovaginite, observations confirmées par la suite (Parsonson, 1964; Snowden, 1964; Studdert et al., 1964; Ulbrich et Håase, 1973, 1974, 1975; Saxegaard, 1966; Kokles, 1971).

La réactivation du virus latent peut être provoquée par les glucocorticoïdes, dont la dexaméthasone (Kubin, 1969; Böttcher et Mahler, 1970; Sheffy et Davies, 1972; Bitsch, 1973; Sheffy et Rodman, 1973; Darcel LeQ. et Dorward, 1975; Gibbs et al., 1975; Dennett et al., 1976; Wellemans et al., 1976; Correa-Giron, 1976; Pastoret et al., 1978c), et d'autres stimuli (Mensik et al., 1976).

La réactivation par les glucocorticoïdes n'est pas propre au virus bovin puisqu'elle se produit pour d'autres virus herpétiques, dans d'autres espèces, notamment le chat (Gaskell et Wardley, 1974; Gaskell et Povey, 1977) et le lapin inoculé avec un virus de singe (*Herpesvirus tamarinus*) (Mc Karthy et Tosolini, 1975).

Le BHV1 a été réactivé par les glucocorticoïdes, chez le gnou (*Connochaetes taurinus*) (Karstad et al., 1974) et chez des furets (*Mustela putorius furo* L.) infectés expérimentalement (Smith, 1978), ce qui tendrait à démontrer que cette propriété est bien liée au virus. Après avoir démontré que l'excrétion nasale du BHV1 pouvait être suivie au microscope électronique, pendant plusieurs jours, le même procédé a été appliqué, au cours de trois essais successifs, à l'étude de sa réexcrétion nasale consécutive à l'administration de dexaméthasone, selon un protocole expérimental voisin de celui utilisé par Davies et Carmichael (1973).

3.1.2 Matériel et méthodes.

a) Techniques virologiques.

Elles sont identiques à celles décrites précédemment à ceci près que pour les tests de séroneutralisation et pour la préparation de l'antigène destiné au test d'hypersensibilité retardée, des cellules testiculaires bovines primaires ou secondaires, cultivées dans le même milieu que celui destiné aux cellules MDBK, ont été utilisées.

b) Préparation de l'antigène viral destiné à la réaction d'hypersensibilité retardée.

Le BHV1, de souche Los Angeles, est cultivé sur cellules testiculaires bovines primaires ou secondaires; lorsque l'effet cytopathogène est à son terme, les cellules sont congelées à -20° C, puis décongelées. Le surnageant est alors débarrassé des débris cellulaires, par

centrifugation
concentré 40
une membrane
laire égale
β-hydracryl
tration fin
Le liquide
qu'il ne co
vé à -20° C

c) Test d'h

L'anti
derme de la
en mesurant
l'injection

d) Animaux.

Deux
race Pie-N
avaient fa
de virus H

e) Premier

A partir d
heures, le
0.5 %, CIB
poids vif
Le protoc
chaque jou
des sympt
titrage de
A partir d
prise de s

centrifugation à 2000 rpm pendant 15 minutes (Sorvall GLC-1) et concentré 40 fois, à une température de 4°C, par ultrafiltration sur une membrane Millipore imperméable aux substances d'un poids moléculaire égal ou supérieur à 100.000 daltons. On y ajoute ensuite de la β -hydracrylolacon (Merck, 820650), de façon à obtenir une concentration finale de 0.02 % et l'on chauffe pendant une heure à 56° C. Le liquide concentré est alors testé en culture de cellules jusqu'à ce qu'il ne contienne plus aucune particule infectieuse et il est conservé à -20° C (Correa-Giron et al., 1975).

c) Test d'hypersensibilité retardée.

L'antigène concentré est injecté à la dose de 0,03 ml, dans le derme de la région cervicale des animaux. Les réactions sont évaluées en mesurant à l'aide d'un vernier, l'épaisseur du pli cutané avant l'injection et 48 heures après celle-ci (Aguilar-Setién, 1978a).

d) Animaux.

Deux bovins ont été utilisés, le taurillon et la génisse de race Pie-Noire, âgés de 8 1/2 mois, qui deux mois et demi auparavant, avaient fait une maladie expérimentale suite à l'instillation nasale de virus IBR/Cu5.

e) Premier traitement par la dexaméthasone.

A partir du premier jour et pendant six jours, à intervalles de 24 heures, les deux animaux ont reçu de la dexaméthasone (Opticortenol 0.5 %, CIBA), par voie intraveineuse, à la dose de 0,1 mg/kg de poids vif (Davies et Carmichael, 1973).

Le protocole expérimental précédemment décrit a été suivi : chaque jour, à la même heure, après prise de la température et relevé des symptômes, il était procédé à un écouvillonnage nasal et au titrage des particules infectieuses et des particules physiques. A partir du premier jour et pendant 1 mois, tous les cinq jours, une prise de sang a été effectuée et le titre neutralisant des divers

sérums prélevés a été établi, en le comparant à celui du dernier sérum obtenu lors de l'inoculation expérimentale.

f) Deuxième traitement des mêmes animaux à l'aide de dexaméthasone.

A l'âge de 11 mois, soit deux mois et demi plus tard, les deux animaux ont reçu par voie intraveineuse, pendant cinq jours consécutifs, la même dose de dexaméthasone que lors du premier traitement. Ils ont ensuite été examinés pendant 20 jours, suivant le protocole précédemment décrit. Des échantillons de sang ont été prélevés pour le comptage des globules blancs et des lymphocytes aux jours 4, 9, 14, 18, 30; des tests d'hypersensibilité retardée ont été pratiqués les jours -5, 0, 4, 9.

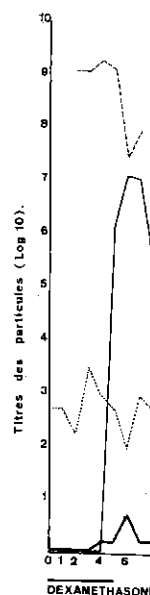
g) Troisième traitement des mêmes animaux à l'aide de dexaméthasone.

Les deux animaux alors âgés de 14 mois, ont reçu par voie intraveineuse pendant cinq jours consécutifs, une double dose de dexaméthasone, c'est-à-dire 0.2 mg dexaméthasone/kg de poids vif; ils ont ensuite été soumis pendant quinze jours aux examens précédemment décrits. Du sang a été prélevé aux jours 0, 2, 4, 7, 11, 16, 29, pour le comptage des leucocytes et des lymphocytes. Aux jours -3, 0, 4, 7, 16, 29, les animaux ont été injectés dans le derme avec de l'antigène concentré pour un test d'hypersensibilité retardée. Un animal témoin, ayant fait une maladie naturelle, était soumis aux mêmes tests d'hypersensibilité retardée répétés, mais sans avoir reçu d'injection de dexaméthasone.

3.1.3 Résultats.

a) Réexcrétion expérimentale après le premier traitement à l'aide de dexaméthasone.

Des résultats du titrage journalier des deux types de particules (Figures 14,15), il apparaît que les deux animaux présentent sensiblement le même schéma d'excrétion : chez la génisse, les particules physiques apparaissent dès la 24ème heure et les particules infectieuses à la 72ème heure; chez le taurillon, les premières sont décelables à la 48ème heure, et les secondes à la 96ème heure. Le virus excrété au sixième jour par le taurillon, a été isolé et sérologiquement caractérisé comme étant bien du BHV1 (souche IBR/T1/J06).



Figures 14, 15

mier sérum

thasone.

ux animaux

rifs, la

Ils ont

précédem-

le

9, 14,

qués les

thasone.

traveineuse

sone,

nt ensuite

rits.

le

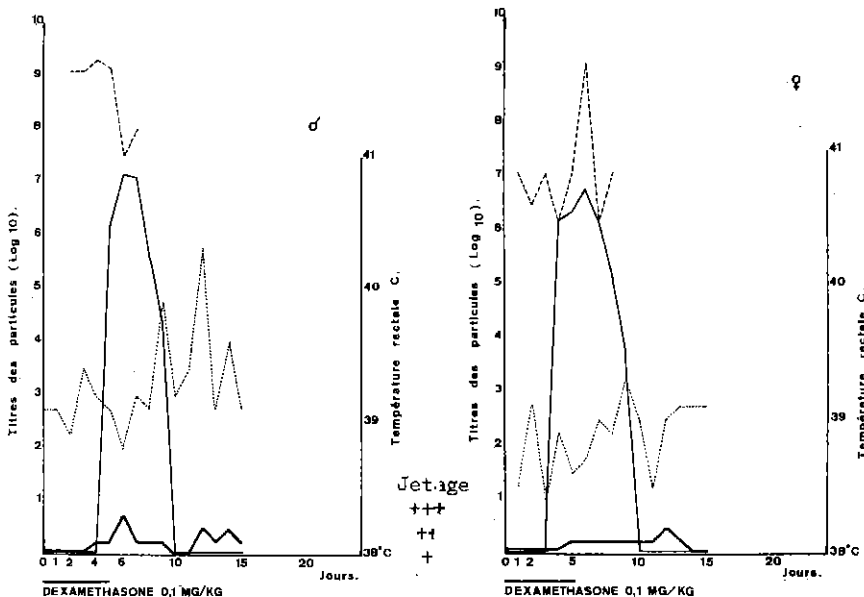
, 4, 7,

'antigène

al témoin,

ts d'hyper-

on de



Figures 14, 15.

Réexcrétion des particules et signes cliniques chez le taurillon (14) et la génisse (15) après le premier traitement à l'aide de dexaméthasone.

'aide de

articules

t sensible-

icules

infec-

ont

e.

lé et

IBR/T1/J06).

- : réexcrétion des particules infectieuses (PFU, $\log_{10}$).
- - - : réexcrétion des particules physiques ($\log_{10}$).
- : température rectale.
- : estimation du jetage.
- + jetage faible
- ++ jetage moyen
- +++ jetage abondant.

Le résultat du titrage des anticorps sériques neutralisants est donné pour les deux sujets, par la figure 16 dont la première valeur correspond à la dernière de l'expérience d'inoculation.

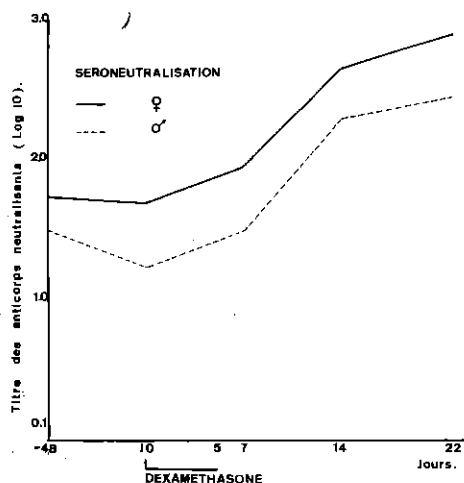


Figure 16. Evolution de la teneur en anticorps neutralisants chez le taurillon et la génisse après une première injection de dexaméthasone.

Aucun des symptômes habituels n'a accompagné la réexcrétion (figures 14 et 15), par contre une forte diarrhée est apparue chez la génisse du 5ème au 12ème jour, et chez le taurillon, du 5ème au 15ème jour, sans qu'il ait été possible d'établir si cette diarrhée coïncidait avec une excrétion intestinale de virus. Comme lors de la primo infection expérimentale, les quantités des deux types de particules émises sont restées dans le rapport de 1 particule infectieuse pour 10 à 100 particules physiques.

b) Réexcrétion expérimentale après le deuxième traitement à l'aide de dexaméthasone.

La figure 17 montre la réexcrétion des particules infectieuses par le mâle. Les particules physiques n'ont pas été décelées, leur nombre n'atteignant pas le niveau requis pour un examen en microscopie

électronique.
La génisse
tieuses.
Les titres
animaux pe

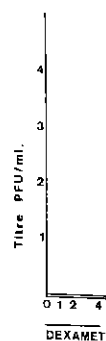


Figure 17.

c) Réexcrétion de dexaméthasone.

La fi
la génisse
méthasone.
isolé et s
Aucune par
réexcréta
Les t
pendant to
L'action p
témoignent
et le fait
au jour 0
20).

Les t
de manière
à la dexa

est donné
leur cor-
électronique.

La génisse ne réexcréta ni particules physiques, ni particules infectieuses.

Les titres en anticorps neutralisant restèrent inchangés chez les deux animaux pendant la durée de l'expérience.

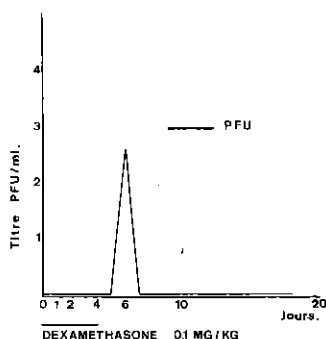


Figure 17. Réexcrétion de particules infectieuses par le mâle, après le deuxième traitement par la dexaméthasone.

c) Réexcrétion expérimentale après le troisième traitement à l'aide de dexaméthasone.

La figure 18 montre la réexcrétion des particules infectieuses par la génisse, consécutive au troisième traitement, à double dose de dexaméthasone. Le virus excrété par ce sujet aux jours 6, 7, 8 a été isolé et sérologiquement caractérisé comme étant du BHV1.

Aucune particule physique n'a pu être décelée. Le taurillon ne réexcréta ni particules infectieuses, ni particules physiques.

Les titres des anticorps neutralisants sont restés presque inchangés pendant toute la durée de l'expérience.

L'action pharmacologique de la dexaméthasone a été normale, ainsi qu'en témoignent la déplétion lymphocytaire observée chez les deux animaux et le fait que les tests d'hypersensibilité retardée étaient négatifs au jour 0 et ne sont redevenus positifs que plus tard (Figures 19 et 20).

Les tests d'hypersensibilité retardée (intradermoréaction) pratiqués de manière répétée, chez un animal témoin, n'ayant subi aucun traitement à la dexaméthasone, ont toujours été positifs.

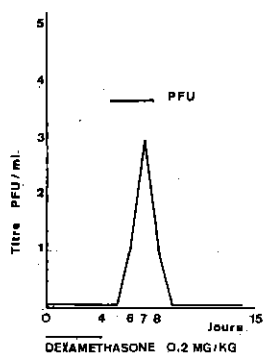
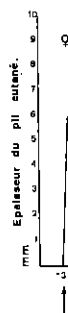
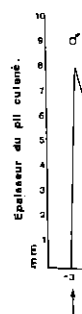
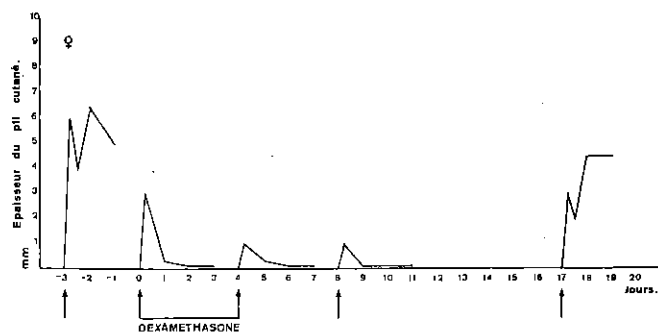
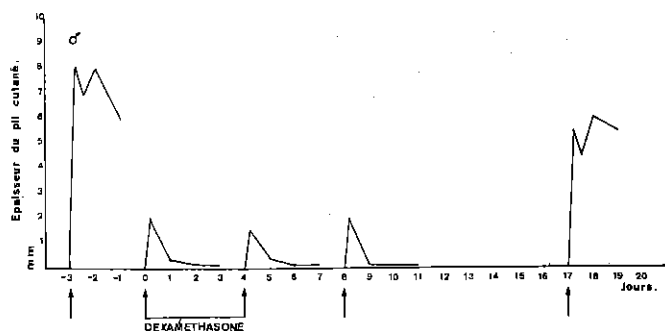


Figure 18. Réexcrétion de particules infectieuses par la femelle, après le troisième traitement par de la dexaméthasone.



Figures



Figures 19 et 20. Variation du test d'hypersensibilité retardée envers le BHV1, chez le taurillon (19) et la génisse (20), après le troisième traitement par de la dexaméthasone.

3.1.4 Conclusions et discussion.

Les résultats obtenus après une première série d'injections de dexaméthasone, sont comparables, quant au moment de l'excrétion des particules infectieuses et à la séroneutralisation, à ceux obtenus par Davies et Carmichael (1973) dans les mêmes conditions. Aucun des symptômes habituels n'a accompagné la réexcrétion, observation qui avait déjà été faite lors d'épisodes de réexcrétion survenant dans les conditions naturelles (Van Nieuwenhuysse, 1957).

L'étude de la réexcrétion de particules infectieuses et physiques après une première série d'injections de dexaméthasone, montre que les particules physiques apparaissent bien avant les particules infectieuses; cet écart peut s'expliquer par la neutralisation des particules infectieuses au début de la réexcrétion, puisque les animaux sont immuns.

L'excrétion des particules physiques peut débuter dès la 24ème heure qui suit la première injection de dexaméthasone. C'est précisé-ment, *in vitro*, le délai requis pour obtenir dans le surnageant de culture de cellules, pareilles particules en quantité équivalente et, *in vivo*, leur délai d'apparition lors d'une inoculation expérimentale (Pastoret et al., 1978a). Ces résultats sont en contradiction avec les observations de Narita et al. (1978c) qui décrivent une inflammation du ganglion de Gasser, du 3ème au 11ème jour qui suit la première injection de dexaméthasone et n'aperçoivent de particules que du 4ème au 9ème jour; ils en déduisent que le BHV1 est demeuré à l'état latent dans le ganglion de Gasser.

Limiter l'observation aux seules particules infectieuses fausse cependant l'interprétation et l'on sait qu'en cas de maladie expérimentale, les ganglions de Gasser sont contaminés et montrent également des signes d'inflammation dès le 4ème jour (Davies et Duncan, 1974).

Divers auteurs ont montré (Aguilar-Setién et al., 1979b; Darcel Le Q. et Dorward, 1975) que la réexcrétion du virus ne se produit qu'en certains endroits, qui correspondent à la porte d'entrée du virus lors de la primo-infection; à ce propos, il faut remarquer que les deux animaux examinés n'ont jamais présenté de symptômes génitaux, que ce soit après l'inoculation expérimentale, ou après les traitements à la dexaméthasone.

L'ensemble de ces observations peut trouver une interprétation satisfaisante, si l'on admet, comme Davies et Duncan (1974), que le

virus s'in-
épithéliau-
En effet,
observée a
les deux a
au niveau
Les différ
deuxième o
difficiles
Une explic
première e
produit in
de virus p
la troisiè
plus que
le faible
L'autre es
tion par
par la pr
La premiè
corollair
une augme
alors que
quant qu
de la ten
Ces expér
être pour
leur affi
L'ex
heure qu
Cette ob
bovins,
d'activa
Des trav
viennent

virus s'installe à l'état latent, indépendamment dans les tissus épithéliaux et dans le tissu nerveux.

En effet, une réexcrétion quantitativement aussi importante que celle observée après un premier traitement à l'aide de dexaméthasone chez les deux animaux, ne peut s'expliquer que par une multiplication au niveau des cellules épithéliales en dehors des cellules nerveuses. Les différences entre les résultats observés après le premier et le deuxième ou troisième traitement à la dexaméthasone sont plus difficiles à interpréter.

Une explication possible de ce phénomène serait la suivante : après la première exposition à la dexaméthasone, la réactivation du virus se produit indépendamment aux deux sites avec une quantité importante de virus produite par les tissus épithéliaux. Après la deuxième et la troisième exposition à la dexaméthasone, le virus ne proviendrait plus que du système nerveux, ce qui permettrait d'expliquer à la fois le faible niveau d'excrétion et le délai retardé d'apparition. L'autre explication serait une augmentation du contrôle de la réexcrétion par le système immunitaire, due à l'effet anamnétique provoqué par la première réactivation.

La première réactivation s'accompagne en effet d'une intense réexcrétion, corollaire d'une multiplication virale tout aussi intense, ce qui provoque une augmentation notable de la teneur en anticorps neutralisants, alors que les traitements ultérieurs par de la dexaméthasone, ne provoquant qu'une faible réexcrétion, ne sont pas suivis d'une augmentation de la teneur en ces mêmes anticorps (invariance des titres). Ces expériences ne sont malheureusement que préliminaires, et devraient être poursuivies en utilisant diverses souches de BHV1, différant par leur affinité pour le système nerveux.

L'excrétion des particules physiques peut débiter dès la 24ème heure qui suit la première injection de dexaméthasone.

Cette observation incite à penser que la réactivation du BHV1 chez les bovins, à l'aide de dexaméthasone, pourrait être due à un mécanisme d'activation directe des cellules infectées de manière latente. Des travaux récents entrepris sur la latence du virus herpes simplex viennent à l'appui de cette hypothèse (Puga et al., 1978).

Contrairement à l'opinion de Kuttler et Adams (1977), Davies et Carmichael (1973) avaient déjà suggéré que la récurrence de l'excrétion du BHV1 après injection de dexaméthasone n'était pas directement imputable à l'immunodépression, mais que l'immunité à médiation cellulaire peut s'avérer importante pour décider de la sévérité et de la durée de l'infection récurrente. Les réactions immunitaires permettraient donc d'expliquer comment l'animal parvient à maîtriser la réactivation et la réexcrétion, mais leur dépression ne permettrait pas d'expliquer le déclenchement de celles-ci.

D'un point de vue épizootologique, l'induction de la réexcrétion du BHV1 par les glucocorticoïdes a aussi son importance et est particulièrement préjudiciable dans l'espèce bovine, car, comme la parturition se déclenche à l'intervention de corticostéroïdes (Derivaux et Ectors, 1973), l'emploi de la dexaméthasone avait été préconisé pour provoquer le part chez les bovins (Muller et al., 1975; Terblanche et al., 1976; Allen et Herring, 1976; Lindell et al., 1977).

Au vu de ce qui précède, cette technique paraît dangereuse, car elle peut susciter, pendant plusieurs jours, une intense excrétion du BHV1, exposant le veau, s'il a des relations privilégiées avec sa mère, à une forte pression d'infection.

3.2 Chez des animaux inoculés avec des souches atténuées.

3.2.1 Introduction.

L'usage généralisé de souches atténuées pour la vaccination du bétail, a soulevé le problème de la sécurité de leur emploi. Il est en effet important de savoir si ces souches s'installent ou non à l'état latent chez l'animal après vaccination, en risquant ultérieurement de revenir à un phénotype virulent. La preuve de l'installation des souches vaccinales à l'état latent était difficile à apporter, principalement du fait de l'absence de marqueurs. On dispose cependant d'une souche atténuée thermosensible (ts) facilement différenciable des souches conventionnelles par ce caractère; d'autre part, la technique d'électrophorèse des brins d'ADN

après digestion
rement puisse
marqueurs ont
tivation des
Une autre ch
trées par voi
souche sauva
nent pas, il
tivée lorsqu
souches peuv
D'autre part
cellules ner
al., 1974b),
se situe au

Le prés
souches atté
l'aide de de
réaction imm
par lequel l
dans la prév

3.2.2 Matériel

a) Cellules

Les cel
du milieu ME
décrit (Babi
Le virus vac
vés à partir
Les cultures
souche ts et
l'obtention
geant ont a
congélation
(1000 g pen
pour vaccin
pour infect
fournie par

après digestion par des endonucléases a fourni un outil particulièrement puissant en épidémiologie moléculaire. Ces deux types de marqueurs ont été utilisés pour l'étude de la latence et de la réactivation des souches atténuées, dans le présent travail.

Une autre chose est de savoir si les souches atténuées administrées par voie nasale, peuvent ou non prévenir l'installation d'une souche sauvage à l'état latent. Si ces souches atténuées n'y parviennent pas, il devient important de connaître quelle est la souche réactivée lorsqu'une réactivation se produit et si des recombinaisons entre souches peuvent survenir.

D'autre part, comme le mutant ts ne peut théoriquement pas envahir les cellules nerveuses, mais bien les cellules épithéliales (Zygraich et al., 1974b), sa réactivation peut signifier que le site de la latence se situe au niveau de ces dernières.

Le présent travail décrit les essais de réactivation de deux souches atténuées administrées par voie nasale (ts et non-ts), à l'aide de dexaméthasone, ainsi que l'étude de divers paramètres de la réaction immunitaire, en vue d'essayer de comprendre le mécanisme par lequel la dexaméthasone agit et le rôle de la réponse immunitaire dans la prévention des accès de réexcrétion.

3.2.2 Matériel et méthodes.

a) Cellules et virus.

Les cellules GBK (Georgia Bovine Kidney) ont été cultivées dans du milieu MEM contenant 10 % de sérum foetal comme précédemment décrit (Babiuk et Rouse, 1976b).

Le virus vaccinal ts (Norden) et le non-ts (Connaught) ont été cultivés à partir de vaccins du commerce, en infectant des cellules GBK. Les cultures infectées ont été incubées respectivement à 35° C pour la souche ts et à 37° C pour la souche Connaught (Con. IBR) jusqu'à l'obtention d'un effet cytopathogène complet. Les cellules et le surnageant ont alors été récoltés puis soumis à deux cycles de congélation-décongélation, avant d'éliminer les débris cellulaires par centrifugation (1000 g pendant 10 minutes). Cette dernière suspension a été utilisée pour vacciner les animaux. La souche sauvage 108 (virulente) utilisée pour infecter les animaux après vaccination, nous a aimablement été fournie par le Docteur C. Darcel le Q., de l'Animal Disease Research

Institute, à Lethbridge, Alberta, Canada.

b) Animaux.

Des bovins de race Hereford, en bonne santé, mâles ou femelles, âgés de neuf mois et dépourvus d'anticorps neutralisant le BHV1 ont été, au hasard, divisés en deux groupes de 8 animaux chacun. Un groupe a été vacciné par voie intranasale, avec le virus ts alors que l'autre groupe l'était avec la souche Con-IBR (2.10^6 PFU/animal). Cinq et six semaines plus tard, des écouvillonnages nasaux et des échantillons de sang ont été prélevés à chaque animal pour des tests de séroneutralisation, de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps et de transformation lymphoblastique afin de mesurer l'immunité conférée par la vaccination et pour des examens hématologiques, afin d'obtenir un profil hématologique de chaque animal. Les animaux ont ensuite subi pendant cinq jours consécutifs des injections répétées de dexaméthasone (0.1 mg/kg de poids corporel). Des écouvillonnages nasaux ont été obtenus tous les jours de chaque animal pour titrer les particules infectieuses émises et des échantillons de sang ont été prélevés tous les deux jours pour mesurer les variations hématologiques et immunologiques.

Trois semaines après la fin du premier traitement par de la dexaméthasone, le groupe d'animaux vacciné avec le mutant ts a été inoculé à l'aide de la souche sauvage 108 et le groupe vacciné avec la souche Con-IBR a été à nouveau traité par de la dexaméthasone comme décrit plus haut; les deux groupes étaient à nouveau soumis à des écouvillonnages nasaux et à des prélèvements sanguins comme précédemment. Quatre semaines après l'inoculation de la souche sauvage 108, les animaux vaccinés avec le mutant ts ont été soumis au même traitement par de la dexaméthasone et aux mêmes prélèvements. L'ensemble des manipulations effectuées sur ces animaux est schématisé dans la figure 21.

Jour 1
Groupe 1
vaccinés
Jours 40-45
Jours 40-55
Et
Jour 55
Jour 66
INOCULATION
VIRUS VI
Jours 66-77
Isolement
Jour 77
Jours 94-101
Jours 94-110
Jour 110

Figure 21. S
I

c) Isolement

Le virus
en les agitant
supérieur. Le
Babiuk et coll.

Jour 1

Groupe 1 (8 animaux) Groupe 2 (8 animaux)
vaccinés à l'aide de ts/IBR vaccinés à l'aide de Con-IBR

Jours 40-45

PREMIER TRAITEMENT PAR DE LA DEXAMETHASONE

Jours 40-55

Etudes hématologiques, isolement viral

Jour 55

Etudes immunologiques

Jour 66

INOCULATION DE SECOND TRAITEMENT PAR DE
VIRUS VIRULENT (souche 108) LA DEXAMETHASONE

Jours 66-77

Isolement viral

Isolement viral, études hématologiques et immunologiques

Jour 77

Jours 94-101

SECOND TRAITEMENT PAR DE LA
DEXAMETHASONE

Jours 94-110

Isolement viral, études hématologiques

Jour 110

et immunologiques

Figure 21. Schéma expérimental de manipulation des animaux (d'après Infect. Immun., 1980, 29, 484).

c) Isolement et titrage du virus.

Le virus a été élué à partir des écouvillons (Falcon N° 2009) en les agitant à l'aide d'un vortex dans un volume de MEM dix fois supérieur. Le virus a été titré en microplaque, comme décrit par Babiuk et collaborateurs (1975).

d) Séroneutralisation.

Des dilutions doubles de sérum ou de plasma inactivés, ont été préparées et 0.25 ml a été mis en contact pendant 1 heure à 37° C avec un volume équivalent de BHV1 (10^2 PFU).

Chaque dilution était ensuite ajoutée, en double, à des cupules de microplaques contenant des cellules GBK en couche monocellulaire.

Après une période d'adsorption de 1 heure, à 37° C, le surnageant était ôté et remplacé par du milieu MEM contenant 2 % de sérum foetal. Après 48 heures d'incubation, les cellules étaient fixées et colorées et le titre viral déterminé, comme décrit par Babiuk et collaborateurs (1975).

e) Réaction de cytotoxicité à médiation cellulaire, dépendante des anticorps (ADCC).

Cette réaction a été effectuée comme décrit par Rouse et al. (1976). Brièvement, les dilutions de plasma étaient ajoutées sous un volume de 20 µl à quatre cupules de microplaque contenant chacune 100 µl de cellules GBK infectées par du BHV1 et marquées au ^{51}Cr et 100 µl de cellules polymorphonucléaires (PMN) d'origine mammaire.

Les cellules polymorphonucléaires étaient obtenues en stimulant la glande mammaire d'une génisse vierge avec 5 µg de lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* (0128 B12 Difco) (Wardley et al., 1976a et b). Le rapport entre PMN et cellules cibles était de 50 : 1. Les témoins comprenaient des cupules dépourvues d'anticorps ou de PMN.

Les résultats sont exprimés par la plus grande dilution du plasma encore capable de sensibiliser les cellules cibles et permettant la libération spécifique du ^{51}Cr après 14 heures de contact.

f) Test de transformation lymphoblastique.

Les lymphocytes du sang périphérique ont été préparés comme décrit par Rouse et Babiuk (1974). Brièvement, le sang était récolté par ponction veineuse dans des seringues héparinées (5 UI/ml de sang collecté). Le "buffy coat" était obtenu par centrifugation à 800 g pendant 20 minutes à 4° C et déposé sur 3 ml de Ficoll-Hypaque (densité à 25° C, 1.077 g/cm^3 , Ficoll-Pharmacia; Hypaque-Winthrope). Après centrifugation à 400 g pendant 20 minutes, les cellules enrichies en lymphocytes étaient lavées une fois dans une solution saline de

Hanks, avant
de chlorure
dans la solu
tion de 1.10
10 % de séru
de 1 ml par
d'entre eux
BHV1 irradié
Vingt-quatre
thymidine ét
tées à l'aide
filtres, lav
d'éthanol, s
échantillons
L'indice de
moyenne du r
celle des é

g) Analyse
enzymes

L'ADN
borateurs
cléases Hin

3.2.3 Résul

a) Effet de

Comme
de dexaméth
nombre tota
dans les 24
d'une très
philes (1.5
monocytes.
sensible (2
thasone a é
les paramèt
après la fi

Hanks, avant la lyse des quelques érythrocytes à l'aide de 0.83 % de chlorure d'ammonium. Les cellules étaient ensuite rincées deux fois dans la solution saline, dénombrées et mises en suspension à une concentration de 1.10^6 cellules par millilitre dans du milieu RPMI-1640 contenant 10 % de sérum foetal. Les cellules étaient ensuite réparties à raison de 1 ml par tube, dans 6 tubes de culture (Falcon No.2054). Trois d'entre eux étaient incubés pendant 96 heures avec des antigènes de BHV1 irradiés aux U.V.s, les trois autres servant de témoins. Vingt-quatre heures avant l'arrêt de la culture, 1 μ Ci de méthyl- 3 (H) thymidine était ajoutée à chaque tube. Les cultures étaient précipitées à l'aide d'acide trichloracétique (TCA) à 10 %, récoltées sur filtres, lavées à l'aide d'une solution contenant 5 % de TCA dans 95 % d'éthanol, séchées et placées dans du liquide de scintillation. Les échantillons étaient ensuite comptés.

L'indice de stimulation se calcule par le rapport entre la valeur moyenne du nombre de coups des échantillons pourvus d'antigène et celle des échantillons dépourvus d'antigène.

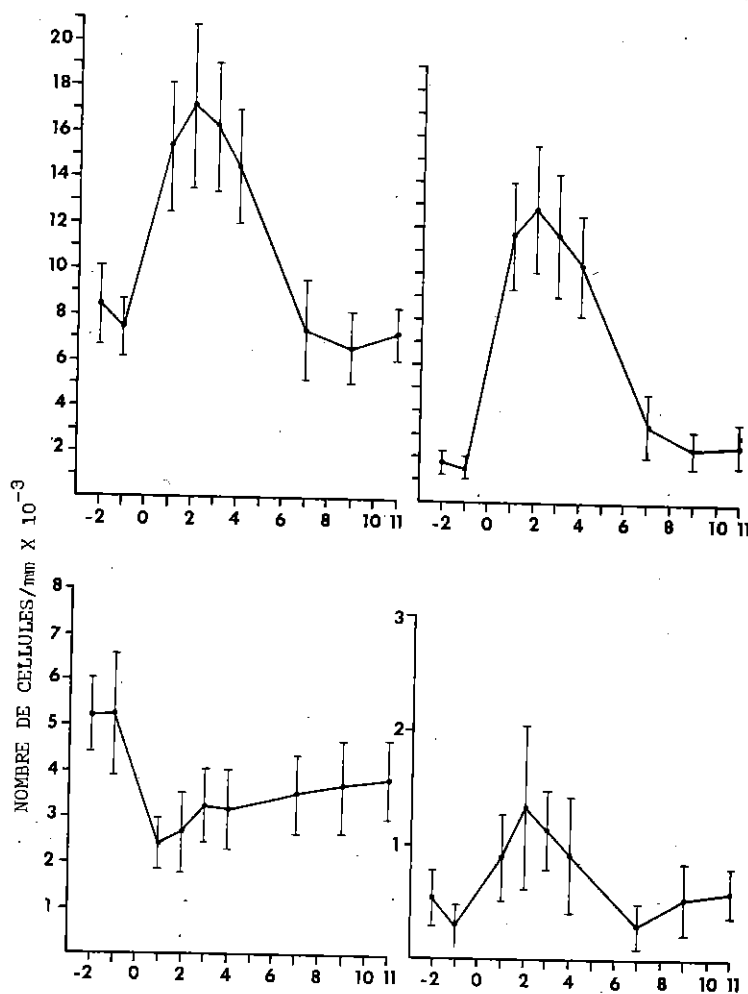
g) Analyse de l'ADN des isollements de BHV1 après digestion par des enzymes de restriction.

L'ADN viral était purifié par la technique de Pignatti et collaborateurs (1979). Les solutions d'ADN étaient digérées par les endonucléases *Hind* III ou *Eco* RI, puis soumises à l'électrophorèse.

3.2.3 Résultats.

a) Effet de la dexaméthasone sur les paramètres hématologiques.

Comme le montre la figure 22, le traitement des animaux à l'aide de dexaméthasone a produit un rapide et très net accroissement du nombre total de leucocytes circulants. Cet accroissement est apparu dans les 24 heures qui suivaient le début du traitement et résultait d'une très forte augmentation du nombre de polymorphonucléaires neutrophiles ($1.5 \times 10^3/\text{mm}^3$ à $12 \times 10^3/\text{mm}^3$) et d'une légère augmentation des monocytes. Ces augmentations compensaient largement une diminution sensible (2x) des lymphocytes. L'administration continue de dexaméthasone a été sans influence; en effet, au quatrième jour du traitement, les paramètres hématologiques revenaient à la normale et 3 jours après la fin du traitement tout était rentré dans l'ordre.



JOURS APRES LE TRAITEMENT PAR DE LA
DEXAMETHASONE.

Figure 22. Effets de la dexaméthasone sur les différentes populations de leucocytes du sang périphérique.

A : leucocytes C : neutrophiles
B : lymphocytes D : monocytes

b) Réactiva
réactivé

Après

6 parmi les
parmi les 8
Tous les an
anticorps s
Les animaux
après un pr
second trai
L'excrétion
dernier jou
dans les d
tion nasale
mutant ts e
une plus l
Con-IBR, l
rieure apr

Tableau 11

Réactivati
dexaméthas

Groupes d'

Con-IBR

ts-IBR

* Les val
tion le
** Les val
tion po

b) Réactivation des souches vaccinales et caractérisation des souches réactivées.

Après le premier traitement des animaux à l'aide de dexaméthasone, 6 parmi les 8 animaux vaccinés à l'aide de la souche Con-IBR et 7 parmi les 8 animaux vaccinés à l'aide du mutant ts excrétèrent du BHV1. Tous les animaux présentèrent une augmentation de la teneur en anticorps spécifiques anti BHV1.

Les animaux du groupe Con-IBR qui n'avaient pas excrété de virus après un premier traitement à la dexaméthasone, l'ont fait après le second traitement.

L'excrétion de particules infectieuses était décelable à partir du dernier jour de traitement et a duré jusque 8 jours. Certains animaux dans les deux groupes ont excrété jusqu'à 8 logs de virus/ml de sécrétion nasale, mais, en moyenne, les animaux vaccinés à l'aide du mutant ts ont excrété plus de virus (5.25 logs contre 3.75 logs) sur une plus longue période. En outre, chez les animaux vaccinés par Con-IBR, la moyenne d'excrétion en particules infectieuses était inférieure après un second traitement par dexaméthasone (Tableau 11).

Tableau 11.

Réactivation des souches vaccinales après traitement à l'aide de dexaméthasone.

Groupes d'animaux	Nombre d'animaux qui excrètent	Niveau d'excrétion primaire	Durée de l'excrétion	Niveau d'excrétion secondaire
Con-IBR	6/8	2.10^2 - 3.10^8 (3.75)*	2 - 5 jours (3.4)**	2.10^2 - 1.10^4 (2.6)*
ts-IBR	7/8	3.10^3 - 2.10^8 (5.25)*	1 - 8 jours (5.3)**	

* Les valeurs entre parenthèses représentent le niveau moyen d'excrétion le jour après la cessation du traitement par dexaméthasone.

** Les valeurs entre parenthèses représentent la durée moyenne d'excrétion pour tous les animaux qui excrétèrent du virus.

Les virus isolés des animaux préalablement vaccinés à l'aide du mutant ts étaient bien des souches thermosensibles comme l'a démontré l'inhibition de croissance à 39° C.

Dans tous les cas, l'électrophorèse des brins d'ADN après digestion par des enzymes de restriction a montré que ces virus thermosensibles isolés chez les animaux après réactivation étaient identiques à la souche primitivement utilisée pour vacciner les animaux et différaient de la souche Con-IBR ainsi que des souches réisolées chez les animaux vaccinés par ce virus (Tableau 12).

Tableau 12. (D'après Infect. Immun., 1980, 29, 486).

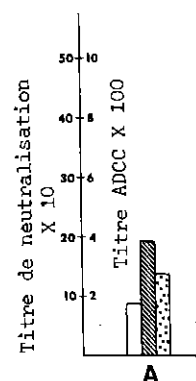
Poids moléculaires des brins d'ADN après digestion par des endonucléases (*Eco* RI et *Hind* III) pour les souches ts IBR et Con-IBR.

Enzyme	Fragments		Poids moléculaire (x10 ⁶)
	Con-IBR	ts IBR	
<i>Eco</i> RI	A	A	35
	B	B	13.7
		C	11.95
	C + D		11.6
		D	11.2
	E	E	9.69
	F	F	6.02
<i>Hind</i> III	G	G	4.5
	A	A	12.88
	B	B	12.3
	c	c	10.9
	d	d	10.44
	E	E	9.45
	F + G	F + G	8.3
	H	H	5.9
		I	5.66
	J	J	5.0
	K		4.79
	L	L	2.2
	M	M	1.42

Les souches Con-IBR isolées après un second traitement étaient plus syncytiales que la souche utilisée initialement.

c) Etat immuni

Après le
en anticorps s
cytotoxicité à
dans les deux



- A Avant traitem
la dexaméthas
- B Après un prem
par de la dex
- C Après un seco
par de la dex

side du
l'a démontré
digestion
ermosensibles
ques à la
et différaient
les animaux

es endonucléases

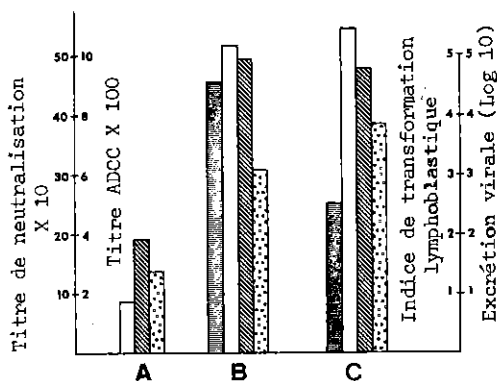
moléculaire
(6)

5
3.7
1.95
1.6
1.2
9.69
6.02
4.5
2.88
2.3
0.9
0.44
9.45
8.3
5.9
5.66
5.0
4.79
2.2
1.42

aient plus

c) Etat immunitaire des animaux avant et après les réactivations.

Après le premier traitement par de la dexaméthasone, la teneur en anticorps séroneutralisants et intervenant dans la réaction de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, a augmenté dans les deux groupes (Figures 23 et 24).

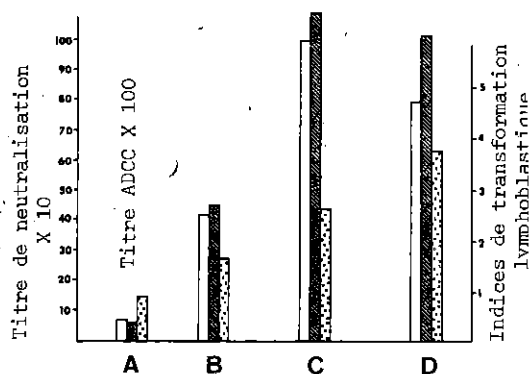


- A** Avant traitement par de la dexaméthasone
B Après un premier traitement par de la dexaméthasone
C Après un second traitement par de la dexaméthasone

Figure 23 . Niveau d'excrétion virale et des réponses immunitaires des animaux vaccinés à l'aide de la souche Con-IBR et traités par la dexaméthasone.

■ Niveau d'excrétion virale
 □ Titres séroneutralisants
 ▨ Titre des anticorps intervenant dans l'ADCC
 ▤ Transformation lymphoblastique vis à vis du BHV1

(D'après Infect. Immun., 1980, 29, 487).



- A Avant traitement par de la dexaméthasone
- B Après un premier traitement par de la dexaméthasone
- C Après inoculation d'une souche virulente
- D Après un second traitement par de la dexaméthasone

Figure 24. Réponses immunitaires des animaux vaccinés à l'aide de la souche ts-IBR après plusieurs types de traitement. Ces animaux ont été vaccinés par voie intranasale puis, après six semaines, ont été traités à l'aide de dexaméthasone. Trois semaines après ce traitement, ils ont été inoculés à l'aide d'une souche virulente (souche 108) puis quatre semaines plus tard, à nouveau traités à l'aide de dexaméthasone.

Titres séroneutralisants
 Titre des anticorps intervenant dans l'ADCC
 Transformation lymphoblastique vis à vis du BHV1.

(D'après Infect. Immun., 1980, 29, 487).

De même, l'immunité à médiation cellulaire vis-à-vis du BHV1 a été accrue comme le montrent les tests de transformation lymphoblastique. Après le second traitement par de la dexaméthasone des animaux vaccinés à l'aide de la souche Con-IBR, seule une légère augmentation des réponses immunitaires de type cellulaire a été observée (test de transformation lymphoblastique) alors qu'il y avait invariance des réponses sérologiques. Les animaux qui n'ont pas réexcrété de virus ont cependant présenté une augmentation de leur indice de stimulation en transformation lymphoblastique.

d) Effet (ts) et

Tous virus sau 6 jours, e respirato Après cet observée d Après trai virale n' une augmen transfor Les secré de 5 logs

3.2.4 Con

Le t inoculatio provoque circulant La fréque maux vacc Ces résul tallent à les souch En f porteurs le premie avec le t ne pas l' nique et physiques droit de BHV1 après Les l'ont dém

d) Effet d'un traitement par la dexaméthasone chez des animaux vaccinés (ts) et inoculés par la suite avec une souche sauvage.

Tous les animaux vaccinés à l'aide du mutant ts excrétèrent du virus sauvage (souche 108) après avoir été infectés, certains pendant 6 jours, et présentèrent des lésions typiques au niveau du tractus respiratoire antérieur.

Après cette infection, une très forte stimulation immunitaire a été observée quel que soit le paramètre étudié (figure 24).

Après traitement ultérieur par de la dexaméthasone, aucune excrétion virale n'a pu être démontrée; certains animaux ont cependant présenté une augmentation significative de leur indice de stimulation (test de transformation lymphoblastique) comme l'atteste la figure 24.

Les sécrétions nasales de certains animaux pouvaient neutraliser plus de 5 logs de virus *in vitro*.

3.2.4 Conclusions et discussion.

Le traitement à l'aide de dexaméthasone, de bovins vaccinés par inoculation intranasale de souches atténuées de BHV1 (Con-IBR et ts-IBR), provoque des modifications importantes dans le nombre de leucocytes circulants et la réactivation du BHV1.

La fréquence de cette réactivation est identique qu'il s'agisse d'animaux vaccinés avec la souche Con-IBR ou ts-IBR.

Ces résultats démontrent que ces deux types de souches atténuées s'installent à l'état latent chez l'animal vacciné avec autant de succès que les souches sauvages.

En fait, tous les animaux appartenant au groupe Con-IBR étaient porteurs latents de BHV1, puisqu'ils réexcrétèrent du virus soit après le premier, soit après le second traitement; 7 des 8 animaux vaccinés avec le ts-IBR ont réexcrété des particules infectieuses; le seul à ne pas l'avoir fait a cependant subi une profonde stimulation antigénique et, contrairement à l'expérience précédente, les particules physiques n'ont pas été recherchées cette fois-ci. On est donc en droit de conclure que tous les animaux deviennent porteurs latents de BHV1 après infection naturelle ou vaccinale.

Les souches réactivées étaient bien les souches vaccinales comme l'ont démontré la recherche de leur thermosensibilité de multiplication

et la comparaison entre souches réactivées et vaccinales par électrophorèse des brins d'ADN après digestion par des endonucléases.

Toutes les souches réisolées chez les animaux vaccinés par le mutant ts avaient conservé ce caractère, ce qui témoigne de la stabilité de ce marqueur et suggère que le virus installé à l'état latent chez un animal, est bien représentatif de l'ensemble de la population utilisée pour l'infecter.

L'observation que les souches réisolées après un second traitement des animaux du groupe Con-IBR, sont plus syncytiales que la souche initiale mériterait cependant confirmation. En effet, la question de savoir si le génotype ou la virulence changent après des réactivations répétées et si des recombinaisons surviennent entre souches sauvages et vaccinales, n'a pu être résolue puisque les animaux vaccinés par ts-IBR et infectés par la souche 108 n'ont pas réexcrété de particules infectieuses lors du second traitement par la dexaméthasone. De même, la question de savoir si la vaccination à l'aide du mutant ts prévient l'installation d'une souche sauvage à l'état latent, reste provisoirement posée.

La raison de l'impossibilité de mettre des particules infectieuses en évidence dans ce dernier cas, doit notamment être trouvée dans la très haute teneur en anticorps locaux présents chez ces animaux.

Si l'on avait attendu que l'immunité de ces animaux ait décliné, il aurait sans doute été possible d'isoler des souches réactivées et de les étudier. En effet, la moyenne d'excrétion chez les animaux vaccinés par Con-IBR était inférieure à celle observée chez les animaux vaccinés par ts-IBR et la durée d'excrétion plus longue chez ces derniers. Ces différences tiennent vraisemblablement au fait que les animaux vaccinés par le mutant ts avaient produit une réponse immunitaire moins bonne que les autres. En outre, dans le groupe Con-IBR, la moyenne d'excrétion des particules infectieuses était inférieure après un second traitement par de la dexaméthasone, c'est-à-dire au moment où les animaux étaient dans un meilleur état immun.

Cette relation entre niveau d'excrétion et état immun des animaux plaide en faveur du rôle de l'immunité dans la maîtrise des accès de réexcrétion; maîtrise qui peut être complète si l'immunité est suffisamment développée.

L'absence ou la quasi absence de réexcrétion entraîne l'invariance de l'immunité humorale par une trop faible stimulation antigénique;

une stimulation
souvent l'a
chez des an
La réactiva
La réactiva
car l'ensem
la survie

Cette
faveur de
sone sur l
tivation s
de réexcré
immun des
l'injection
de contrôl
maîtrisée
émises, ma
en témoign
(Pastoret
tements ré
Il faut ma
l'organis
ceux disp
provoque
transform
s'expliqu
antigéniqu
que ce so
IgG inter
(Aguilar
mobilise
des récep
donc beau
(cytotoxi
Le p
que prent
laire dan
l'immuni

une stimulation antigénique a cependant bien lieu comme en témoigne souvent l'augmentation de l'indice de transformation lymphoblastique chez des animaux qui n'ont pas réexcrété.

La réactivation doit donc être dissociée de la réexcrétion.

La réactivation peut survenir sans que la réexcrétion soit décelable, car l'ensemble des mécanismes immunitaires contrarie la formation ou la survie des particules infectieuses.

Cette dissociation entre réactivation et réexcrétion est en faveur de l'hypothèse d'un mécanisme d'action directe de la dexaméthasone sur les cellules infectées de manière latente. En effet, la réactivation semble toujours avoir lieu qu'elle soit ou non accompagnée de réexcrétion et quel que soit l'état immun des animaux. Si l'état immun des animaux est fort développé, l'immunodépression provoquée par l'injection de dexaméthasone est insuffisante pour empêcher l'organisme de contrôler la réexcrétion. La réexcrétion est vraisemblablement maîtrisée non seulement par neutralisation des particules infectieuses émises, mais aussi par inhibition de la multiplication virale comme en témoigne l'impossibilité de détecter des particules physiques (Pastoret et al., 1979a) et l'absence de séroconversion lors de traitements répétés par la dexaméthasone.

Il faut mentionner que les mécanismes immunitaires mis en place par l'organisme à l'issue d'une primo-infection (vaccination), diffèrent de ceux disponibles après une première réactivation. Cette dernière provoque une très nette augmentation de phénomènes comme l'ADCC et la transformation lymphoblastique. Cette augmentation de l'ADCC s'explique partiellement par le fait qu'après une première stimulation antigénique, ce sont les anticorps de classe IgM qui prédominent, alors que ce sont principalement des IgG après une réponse anamnétique; les IgG interviennent dans le mécanisme de l'ADCC contrairement aux IgM (Aguilar-Setién et al., 1980a) et l'injection de dexaméthasone mobilise chez l'animal les monocytes et les neutrophiles qui portent des récepteurs Fc et interviennent dans l'ADCC. L'organisme serait donc beaucoup mieux à même de contrecarrer la multiplication virale (cytotoxicité) après une seconde stimulation antigénique.

Le présent travail ne permet pas de mesurer les parts respectives que prennent les processus d'immunité humorale ou à médiation cellulaire dans la maîtrise des accès de réexcrétion, mais démontre que l'immunité joue un rôle important à ce niveau; il est plus difficile

d'expliquer comment la dépression des mécanismes immunitaires interviendrait à elle seule pour déclencher la réactivation. La dexaméthasone n'altère pas profondément l'état immunitaire de l'animal, même si elle déprime certains mécanismes. Elle supprime les réactions d'hypersensibilité retardée au BHV1 (Pastoret et al., 1979a) et le nombre de lymphocytes présents dans la circulation diminue très rapidement après une injection; l'addition de dexaméthasone au milieu de culture supprime *in vitro* la transformation lymphoblastique. Chez l'animal infecté de manière latente, la dexaméthasone pourrait agir par deux mécanismes agissant en synergie, l'un d'activation directe des cellules infectées de manière latente qui déclenche la réactivation, l'autre de suppression temporaire et partielle de l'immunité, ce qui permet, dans certains cas, à la réactivation de s'exprimer pleinement sous forme de réexcrétion. L'action immunodépressive de la dexaméthasone doit être très brève puisque le nombre de lymphocytes circulants retourne à la normale pendant la durée du traitement et qu'une réponse immunitaire anamnétique s'installe tout à fait normalement.

Le mutant ts du BHV1 s'installe à l'état latent chez les animaux vaccinés. Or Zygraich et al. (1974b) ont démontré qu'il pouvait envahir les cellules épithéliales, mais pas le tissu nerveux. Il faut donc admettre que le site de latence du BHV1 se situe, au moins en partie, au niveau des cellules épithéliales. Il devrait être possible de produire des mutants ts qui ne s'installent pas à l'état latent, car pareils mutants ont été décrits pour l'herpes simplex (Gerdes et al., 1979; Lofgren et al., 1977). Pareil mutant du BHV1, s'il conférait une immunité satisfaisante, serait un vaccin atténué idéal.

4°) Effet de la cyclophosphamide sur la latence du BHV1.

4.1 Introduction.

Les travaux précédents portant sur l'excrétion et la réexcrétion du BHV1 chez le bovin avaient montré que la réactivation du virus provoquée par l'injection de dexaméthasone, pouvait être due à l'action directe du médicament sur les cellules infectées de manière latente. La réactivation ne résulterait pas directement de l'immunodépression associée à l'injection de dexaméthasone, même si la défaillance passagère de la surveillance immunitaire est souvent invoquée pour

expliquer
(Klein, 19
D'autre pa
ticoïdes p
pour d'aut
Underwood
thasone pa
tées où e
mécanisme
Afin de v
seurs aut
méritait
est connu
pour son
et al., 1
Schmitz,
Elle dépr
lement le
de l'admi
phosphami
hospitali
à dose ma

4.2 Matériaux

a) Animaux

Un t
de race F
dépourvus
expérimen

b) Souche

Pour
lée en 19
mortalité
sur cell
Pour la

expliquer le déclenchement des accès récurrents d'autres herpesvirus (Klein, 1976).

D'autre part, l'immunodépression engendrée par l'emploi de glucocorticoïdes ne s'accompagne pas nécessairement d'accès récurrents pour d'autres virus herpétiques que le BHV1 (Hurd et Robinson, 1976; Underwood et Weed, 1974; Stevens et Cook, 1973), alors que la dexaméthasone parvient à réactiver ce dernier dans toutes les espèces infectées où elle a été employée (Karstad et al., 1974; Smith, 1978). Un mécanisme plus spécifique que l'immunodépression doit être envisagé. Afin de vérifier cette hypothèse, l'effet de médicaments immunodépresseurs autres que la dexaméthasone sur la réactivation du BHV1 "*in vivo*" méritait d'être étudié. La cyclophosphamide (Connors et al., 1972) est connue pour son action immunodépresseive (Balow et al., 1975) et pour son aptitude à réactiver certains virus herpétiques (Vindevogel et al., 1980; Vindevogel et Pastoret, 1980), mais pas tous (Price et Schmitz, 1978; Blyth et al., 1976; Hough et Robinson, 1975). Elle déprime essentiellement les lymphocytes B, mais aussi partiellement les T. Le présent travail se propose de décrire les résultats de l'administration à des bovins porteurs latents de BHV1, de cyclophosphamide à une dose correspondant à celle utilisée en milieu hospitalier, pour la médecine humaine, en cas de traitement d'attaque à dose massive.

4.2 Matériel et méthodes.

a) Animaux.

Un taurillon et une génisse de six mois environ, respectivement de race Pie-Rouge et Pie-Noire, ont été utilisés. Tous deux étaient dépourvus d'anticorps neutralisant le BHV1 avant l'infection expérimentale.

b) Souches virales et cellules utilisées.

Pour l'infection expérimentale des animaux, la souche IBR/Cu7 isolée en 1977 lors d'un épisode de maladie respiratoire associée à des mortalités de veaux, a été utilisée; cette souche a été clonée sur cellules MDBK, par 3 passages successifs sous agarose à 1 %. Pour la séroneutralisation, la souche IBR/LA a été utilisée.

La suspension virale standardisée est conservée dans l'azote liquide et contient 1000 particules physiques pour une particule infectieuse. Pour le titrage des particules infectieuses, on s'est servi de cellules MDBK et de cellules GBK, alors que pour les examens de séroneutralisation, des cellules testiculaires bovines primaires ou secondaires ont été utilisées. Le titrage des particules infectieuses et physiques et la séroneutralisation ont été réalisés comme précédemment décrit.

c) Caractérisation des souches réisolées.

Le virus réexcrété a été sérologiquement caractérisé à l'aide d'une technique de séroneutralisation par réduction du nombre de plages, avec un antisérum anti-IBR préparé sur lapin (Hoskins, 1967).

d) Infection expérimentale.

Pour l'infection expérimentale, deux millilitres d'une suspension virale contenant 10^7 particules infectieuses par millilitre (valeur exprimée en unités formant plages) ont été instillés dans chaque naris des deux animaux. Ils ont également été inoculés au niveau conjonctival, par imprégnation au-dessous de chaque paupière, à l'aide d'un écouvillon stérile préalablement plongé dans la même suspension d'IBR/Cu7.

L'excrétion virale a été contrôlée deux jours après l'inoculation expérimentale.

e) Traitement par la cyclophosphamide.

Trois mois après l'inoculation expérimentale, les animaux ont été pesés (Taurillon : 280 kg; Génisse : 190 kg), puis ont reçu, par voie intraveineuse, une dose massive de cyclophosphamide (Endoxan, Cilag-Chemie (R), à raison de 10 g pour le taurillon et de 7,5 g pour la génisse.

A dater du jour précédent (jour 0), jusqu'au 16ème jour suivant l'injection de cyclophosphamide, les deux animaux ont fait l'objet d'un relevé journalier de leur température et des symptômes cliniques et ont subi, à intervalles réguliers de 24 heures, un écouvillonnage

nasal et ocul

Afin de
pesés avant e
MEM pour obt
Pour des rais
pu être titré

Du mucus
deux animaux,
a été prélevé
pendant 16 j
hématocrite
à nouveau con

f) Traitement

Deux moi
animaux ont é
répétées de c
intraveineuse
Carmichael, J
l'injection d
quinze jours

4.3 Résultats

a) Infection

L'infec
tractus resp
noncée et d'
La figu
sants après

nasal et oculaire à l'aide de coton stérile.

Afin de mesurer la quantité prélevée, les écouvillons ont été pesés avant et après chaque prélèvement, puis imprégnés de milieu MEM pour obtenir une dilution 10^{-1} .

Pour des raisons pratiques, la majeure partie des échantillons n'ont pu être titrés extemporanément, mais bien après congélation à -20°C .

Du mucus nasal a été prélevé tel quel, chaque jour, chez les deux animaux, en vue des examens en microscopie électronique. Du sang a été prélevé le jour de l'injection et ensuite tous les deux jours pendant 16 jours, pour la numération des lymphocytes, un éventuel hématoctrite et l'obtention de sérum. Ces divers paramètres ont été à nouveau contrôlés ultérieurement.

f) Traitement par la dexaméthasone.

Deux mois et demi après l'injection de cyclophosphamide, les mêmes animaux ont été soumis, pendant cinq jours consécutifs, à des injections répétées de dexaméthasone (Opticorténol, Ciba, 0,5 % (R), par voie intraveineuse, à la dose de 0,1 mg par kilogramme de poids vif (Davies et Carmichael, 1973; Pastoret et al., 1978b, 1979a). De même qu'après l'injection de cyclophosphamide, les animaux ont été soumis pendant quinze jours à des prélèvements journaliers.

4.3 Résultats.

a) Infection expérimentale.

L'infection expérimentale a provoqué une maladie très sévère du tractus respiratoire antérieur, s'accompagnant d'une conjonctivite prononcée et d'une excrétion nasale de virus très importante.

La figure 25 donne l'évolution du titre des anticorps neutralisants après infection expérimentale chez les deux animaux.

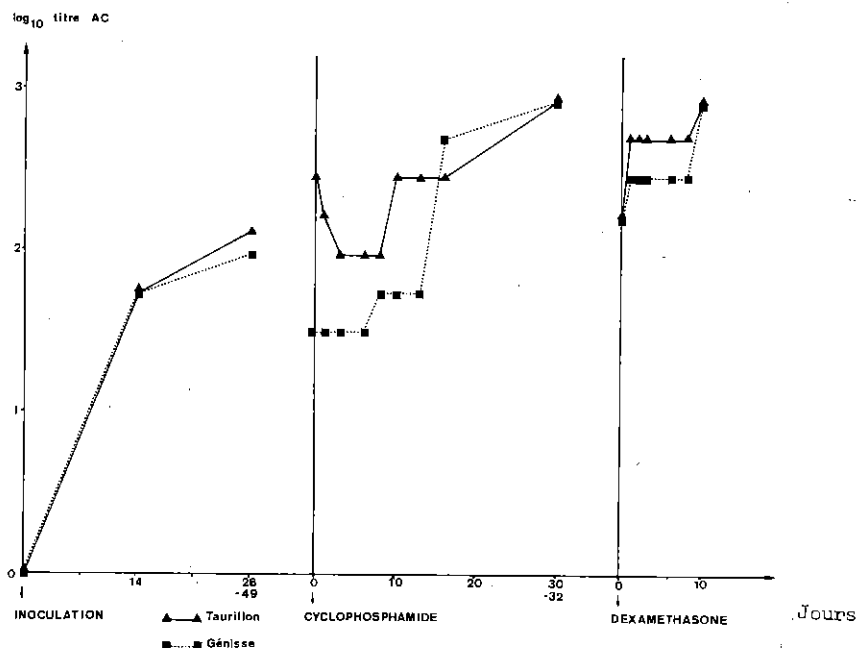


Figure 25. Evolution du titre des anticorps neutralisants chez les deux animaux, après infection expérimentale, après traitement par de la cyclophosphamide et par de la dexaméthasone.

b) Traitement par la cyclophosphamide.

b.1 Titration des particules physiques et infectieuses.

Aucune réexcrétion du BHV1 n'a pu être mise en évidence, à aucun des deux sites d'inoculation, ni par la recherche des particules infectieuses (P.F.U.), ni par celle des particules physiques, à l'exception de quelques particules infectieuses au jour 16 chez l'un des animaux.

b.2 Examen clinique.

L'administration de cyclophosphamide a entraîné, chez les deux animaux, l'apparition de manifestations cliniques sévères se caractérisant

principalement
diarrhée pro
que par une

b.3 Examens

Les fi
et de lymph
des lymphoc
leucocytes
l'injection
L'évol
dans la fig
de titre e



Figure 26.

principalement par de la stomatite, de l'exsudation nasale, une diarrhée profuse (sans profonde modification de l'hématocrite), ainsi que par une phase fébrile.

b.3 Examens hématologiques et séroneutralisation.

Les figures 26 et 27 montrent l'évolution du nombre de leucocytes et de lymphocytes chez les deux animaux. On constate une chute brutale des lymphocytes le troisième jour qui suit l'injection, alors que les leucocytes n'atteignent leur taux minimum qu'au sixième jour suivant l'injection. Il y a ensuite un retour graduel à la normale.

L'évolution du titre des anticorps neutralisants est présentée dans la figure 25. On constate dans un cas une diminution transitoire de titre et, dans les deux cas, une augmentation tardive.

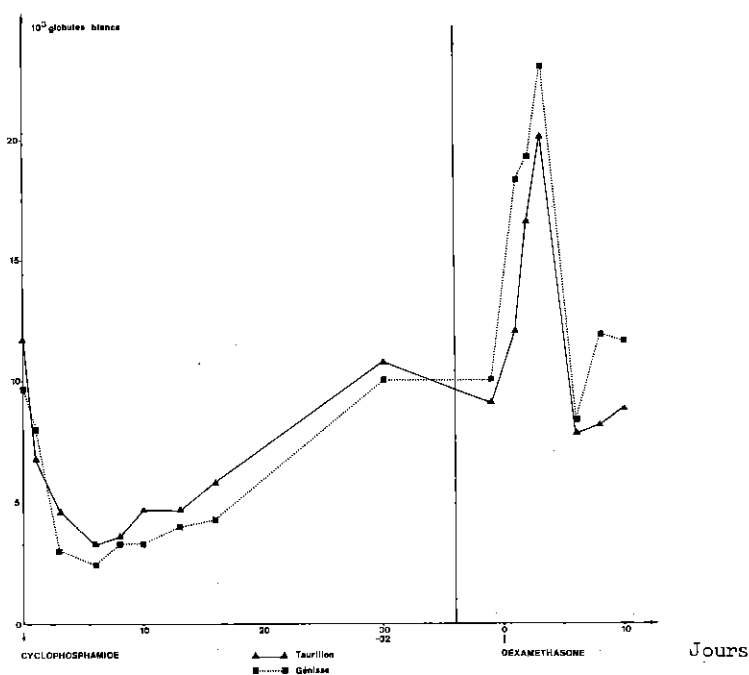


Figure 26. Evolution du nombre de globules blancs chez le taurillon et chez la génisse, après injection de cyclophosphamide et de dexaméthasone.

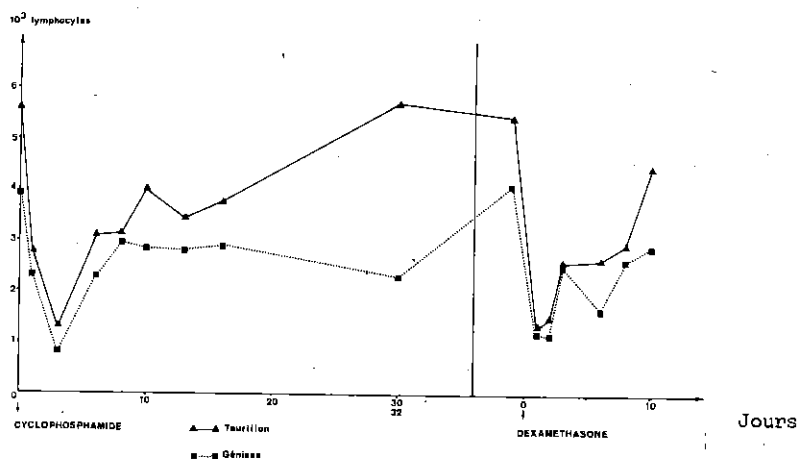


Figure 27. Evolution du nombre de lymphocytes chez le taurillon et la génisse, après injection de cyclophosphamide et de dexaméthasone.

c) Traitement par la dexaméthasone.

c.1 Titration des particules physiques et infectieuses.

Le résultat du titrage des particules infectieuses au niveau nasal et conjonctival est donné par la figure 28.

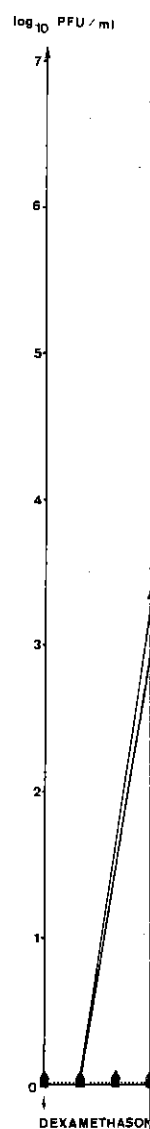


Figure 28.

Jours
illon et
et de de-

veau

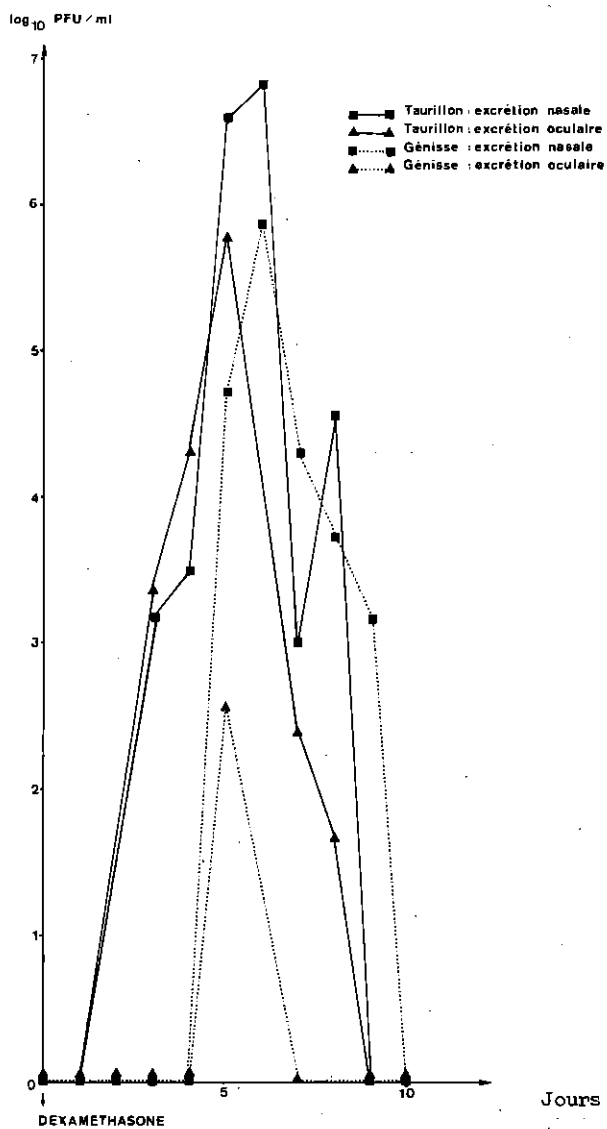


Figure 28. Titration des particules infectieuses au niveau nasal et conjonctival chez la génisse et le taurillon, après injection de dexaméthasone.

Les deux animaux ont excrété très rapidement une quantité importante de particules infectieuses, aux deux endroits où ils avaient été primitivement infectés. L'excrétion était cependant plus modérée que celle que l'on peut observer après une première injection de dexaméthasone chez des animaux n'ayant été soumis à aucun traitement préalable, puisqu'aucune particule physique n'a été mise en évidence cette fois-ci.

c.2 Examen clinique.

L'évolution clinique des animaux a été tout à fait comparable à celle précédemment décrite, si ce n'est l'absence de diarrhée dans ce cas-ci.

c.3 Examens hématologiques et séroneutralisation.

Les figures 26 et 27 montrent l'évolution du nombre de leucocytes et de lymphocytes chez les deux animaux. Comme précédemment décrit, on observe une déplétion lymphocytaire rapide, mais moins intense qu'après traitement par la cyclophosphamide. En cours de traitement les animaux retournent vers des valeurs normales.

La figure 25 illustre l'évolution du titre des anticorps neutralisants. On constate une augmentation du titre des anticorps, comme précédemment décrit après une première injection de dexaméthasone.

4.4 Conclusions et discussion.

La cyclophosphamide exerce, chez le bovin, une profonde influence sur le taux des lymphocytes sanguins et sur l'état clinique de l'animal. L'administration de cyclophosphamide ne produit cependant pas une réexcrétion directe de particules infectieuses et physiques du BHV1 comparable à celle enregistrée après un premier traitement des animaux par de la dexaméthasone. Une réexcrétion plus tardive peut avoir eu lieu, puisque les deux animaux ont présenté, en fin d'expérience, une augmentation du taux des anticorps séroneutralisants. Cette réexcrétion peut ne pas être directement imputable à l'action de la cyclophosphamide, mais consécutive aux modifications physiologiques induites chez l'animal. Les deux bovins étaient bien porteurs latents de BHV1, comme l'a démontré la réactivation du virus par

l'injection d'une réexcrétion observée après cyclophosphamide ne se différencie pas du BHV1 chez le bovin. L'herpès simplex (Robinson, 1977) (Vindevogel et al., 1979). Par contre, les observations de neutrophiles cellulaires dans l'ADCC de cytotoxicité (Pastoret et al., 1977), au cours de la production de virus constaté une

On peut réactiver la simple immunisation comme l'immunité le plus importante (Aguilar-Setien et al., 1974; Lehn et al., 1974; Rajcani et al., 1974) et il

l'injection de dexaméthasone. Cette réactivation a été accompagnée d'une réexcrétion fort comparable, bien que moins intense, à celle observée après une première injection de ce produit. La cyclophosphamide ne semble donc pas à même de déclencher la réactivation du BHV1 chez le bovin. Pareille situation avait déjà été décrite pour l'herpès simplex (*Human herpesvirus 1*) chez la souris (Hough et Robinson, 1975), mais est contraire à celle observée chez le pigeon (Vindevogel et al., 1980; Vindevogel et Pastoret, 1980). L'effet immunodépresseur de la cyclophosphamide est pourtant beaucoup plus profond que celui induit par la dexaméthasone, s'exerce sur l'ensemble des leucocytes sanguins, mais préférentiellement sur les lymphocytes B (Gorham et al., 1977; Corrier et al., 1979), alors que la dexaméthasone agit indifféremment sur les deux types de lymphocytes (Wilkie et al., 1979).

Par contre, la dexaméthasone peut augmenter certains mécanismes immunitaires puisque son injection est suivie d'une brusque augmentation des neutrophiles et monocytes circulants et que ces deux types cellulaires portent des récepteurs Fc à leur surface et interviennent dans l'ADCC. En outre, la dexaméthasone stimule *in vitro* la réaction de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (Pastoret et Babiuk, observations non publiées) contrairement aux observations de Wardley et al., 1976b). Enfin, Cummins et Rosenquist (1977), au cours d'une étude de l'effet de l'hydrocortisone sur la production d'interféron chez des veaux infectés avec du BHV1, ont constaté une augmentation du taux d'interféron circulant.

On peut en conclure que la dexaméthasone, lorsqu'elle provoque la réactivation du BHV1, agit par un mécanisme différent de celui de la simple immunodépression qui accompagne son injection. Cependant, comme l'immunité à médiation cellulaire joue vraisemblablement le rôle le plus important dans le contrôle des accès de réactivation (Aguilar-Setién et al., 1980), il serait intéressant de mesurer l'effet de médicaments qui, comme l'azothioprine, exercent préférentiellement leur action au niveau des lymphocytes T. Il faut cependant garder à l'esprit que certaines théories font intervenir les anticorps dans la surveillance de l'état latent (Klein, 1976; Stevens et Cook, 1974; Lehner et al., 1975; Oakes et Rosemond-Hornbeak, 1978; Rajcani et al., 1977). La situation est en fait excessivement complexe et il est difficile, sinon impossible, chez l'animal vivant,

de ne mesurer l'effet que d'un seul paramètre.

Comme décrit par Davies et Carmichael (1973), l'injection de dexaméthasone a provoqué une réexcrétion de particules infectieuses aux deux sites de l'infection initiale, ce qui soulève à nouveau la question du site de la latence (Narita et al., 1976; Narita et al., 1978b et c) et plaide en faveur de l'installation du virus à l'état latent, non seulement au niveau des fibres nerveuses sensibles qui innervent la zone primitivement infectée, mais aussi des cellules épithéliales où la multiplication virale initiale s'est déroulée.

5°) Conclusions générales de la deuxième partie.

Tous les animaux deviennent porteur latents de BHV1 après leur infection par une souche sauvage ou vaccinale et toutes les souches peuvent être réactivées par l'emploi de dexaméthasone. Ces faits ont une portée épizootologique considérable.

Le phénomène de réactivation doit être distingué de celui de la réexcrétion; la réactivation peut être enclenchée sans qu'une réexcrétion puisse être mise en évidence, car le système immunitaire exerce un contrôle sur la réexcrétion.

Le déclenchement de la réactivation virale par la dexaméthasone chez les animaux porteurs latents peut résulter d'une action directe de la dexaméthasone sur les cellules infectées de manière latente plutôt que de l'immunodépression associée à son injection. Plusieurs observations et arguments plaident en faveur de cette hypothèse, notamment le fait que les particules physiques apparaissent très précocement lors d'une première réactivation et que la cyclophosphamide, en dépit de profonds effets immunodépresseurs, est incapable de provoquer la réactivation du BHV1.

L'intensité de la première réexcrétion et la réactivation du mutant ts semblent indiquer que le BHV1 peut demeurer latent au sein des cellules épithéliales.

V. RESUME ET

La rhin
d'étude de l
de nombreux
Tout d'abord
expérimental
Ensuite, le
produit et d
Il est en ef
neutralisant
la famille d
popotamidés)
pratiquement
particulière
La variété d
chez les bov
privilegiées
La multiplic
sation de so
de l'épizoot
oeuvre pour
faitement per
Nous avons d
giques ou bio
soient sauvag
utiliser comm
Certaines sou
du virus et d
ment, l'étude
tivation et d
réexcrétion.
qui suit.

Certaine
taille signif

V. RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES.

La rhinotrachéite infectieuse bovine constitue un modèle d'étude de la latence particulièrement intéressant, car il présente de nombreux avantages.

Tout d'abord, la réactivation du virus latent peut être provoquée expérimentalement par l'emploi de glucocorticoïdes (dexaméthasone).

Ensuite, le phénomène peut être étudié dans l'espèce même où il se produit et dans une situation naturellement établie.

Il est en effet remarquable de constater que l'on trouve des anticorps neutralisant le BHV1 essentiellement dans des espèces appartenant à la famille des *Bovidae* et à des familles apparentées (cervidés, hippopotamidés). La réceptivité à cette infection semble dès lors pratiquement se limiter à l'ordre des Artiodactyles avec une affinité particulière pour la tribu des bovinés.

La variété des symptômes rencontrés lors d'infection par le BHV1 chez les bovins, tient à la pathogénie de la maladie et aux relations privilégiées que le virus entretient avec l'organisme.

La multiplicité des formes cliniques, la latence du virus, l'utilisation de souches vaccinales atténuées, ne facilitaient pas la tâche de l'épizootiologiste ou du chercheur, car les techniques mises en oeuvre pour tenter de différencier les souches ne l'avaient qu'imparfaitement permis.

Nous avons dès lors cherché à caractériser par des marqueurs biologiques ou biochimiques les différentes souches de BHV1, qu'elles soient sauvages ou qu'il s'agisse de souches modifiées en vue de les utiliser comme vaccin, réactivées ou non.

Certaines souches ont ensuite été utilisées pour l'étude de la latence du virus et de sa réactivation par la dexaméthasone. Plus précisément, l'étude du site de la latence, du mécanisme qui induit la réactivation et du contrôle exercé par le système immunitaire sur la réexcrétion. Des études poursuivies, il résulte principalement ce qui suit.

Certaines souches du BHV1 produisent sous agarose des plages de taille significativement plus petites que les autres, mais cette

propriété ne peut être utilisée pour caractériser les souches réactives. La comparaison de la moyenne de la taille des plages permet aussi de démontrer que toutes les souches du BHV1 sont sensibles à l'effet du phosphonoformate, inhibiteur de l'ADN-polymérase induite par les virus herpétiques et la sensibilité à ce composé permet de distinguer le groupe des souches IPV des autres souches.

La répartition générale des poids moléculaires des polypeptides de structure du BHV1 est fort similaire à celle qui est décrite pour les autres virus du même groupe étudiés à ce jour. L'électrophorèse permet en effet de distinguer au moins 21 polypeptides dont les poids moléculaires varient de 31000 à 275000 daltons; dix d'entre eux étant glycosylés.

La somme des poids moléculaires est de 2 043 000 daltons. La protéine majeure (VP7) d'un poids moléculaire de 99 000 daltons, représente près de 15 % des protéines totales. Si l'on compare les souches du BHV1 du point de vue de leur composition polypeptidique, il apparaît que les souches isolées du tractus respiratoire (IBR) sont identiques entre elles et identiques à la souche Los Angeles. Les souches isolées du tractus génital (IPV) sont également semblables entre elles. Les souches de virus IBR se distinguent des souches IPV, principalement par le poids moléculaire des glycopolypeptides VP12 et 13 et du polypeptide VP7. La souche IBR/Cu5 utilisée pour inoculer un bovin et la souche IBR/Cu5/T1J06, réisolée chez le même animal après injection de dexaméthasone, ne diffèrent pas. L'installation de la souche IBR/Cu5 à l'état latent n'a donc pas modifié les caractères électrophorétiques de ses polypeptides.

La technique d'électrophorèse des brins d'ADN après digestion par des endonucléases a fourni un outil particulièrement puissant en épidémiologie moléculaire. Cette technique a dès lors été utilisée pour la caractérisation biochimique des souches atténuées, dont une souche thermosensible, avant et après réactivation. Dans tous les cas, l'électrophorèse des brins d'ADN après digestion par des enzymes de restriction a montré que les virus thermosensibles isolés chez les animaux après réactivation étaient identiques à la souche primitivement utilisée pour les vacciner et différaient de la souche Con-IBR (atténuation conventionnelle) ainsi que des souches réisolées chez les animaux vaccinés à l'aide de cette dernière. D'autre part, les

virus réisolés après injection de dexaméthasone chez les animaux préalablement vaccinés à l'aide du mutant ts conservent leur thermosensibilité comme le démontre l'inhibition de la multiplication à 39° C.

L'étude de l'excrétion, de la latence, de la réactivation et de la réexcrétion du BHV1 a permis de résoudre plusieurs problèmes. Tout d'abord, l'examen direct en microscopie électronique d'écouvil- lonage nasal permet un diagnostic rapide et précoce d'une primo infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Lors de réactivation d'une souche virulente du BHV1 par la dexaméthasone, les particules physiques apparaissent bien avant les particules infectieuses et leur excrétion peut débuter dès la 24ème heure qui suit la première injection de dexaméthasone. D'autre part, la première réactivation du BHV1 par la dexaméthasone provoque une nette augmentation du taux en anticorps neutralisant le virus chez les bovins, alors que la répétition du stimuli n'est pas suivie des mêmes effets.

Les souches atténuées du BHV1 administrées par voie nasale s'installent à l'état latent chez les animaux vaccinés et sont également réactivées par l'injection de dexaméthasone. En effet, après le premier traitement des animaux à l'aide de dexaméthasone, 6 parmi les 8 animaux vaccinés à l'aide de la souche Con-IBR et 7 parmi les 8 vaccinés à l'aide du mutant ts excrétèrent du BHV1. Les animaux du groupe Con-IBR qui n'avaient pas excrété de virus après un premier traitement à la dexaméthasone, l'ont fait après le second traitement. En moyenne, les animaux vaccinés à l'aide du mutant ts ont excrété plus de virus sur une plus longue période. En outre, chez les animaux vaccinés par Con-IBR la moyenne d'excrétion en particules infectieuses était inférieure après un second traitement par dexaméthasone. D'après ce qui précède, il semble bien qu'après une primo infection, tous les animaux deviennent porteurs latents.

Les premières observations réalisées sur la réactivation d'une souche sauvage ont montré que la réactivation doit être distinguée de la réexcrétion, puisque le virus peut être réactivé sans qu'une réexcrétion de particules infectieuses soit décelable.

Après le premier traitement par de la dexaméthasone des animaux infectés à l'aide de souches atténuées, les taux d'anticorps séroneu- tralisants et intervenant dans une réaction de cytotoxicité à

médiation cellulaire dépendante des anticorps, a augmenté. De même, l'immunité à médiation cellulaire vis-à-vis du BHV1 a été accrue comme l'ont montré les tests de transformation lymphoblastique. Après inoculation par une souche virulente des animaux préalablement vaccinés à l'aide du mutant ts, une très forte stimulation immunitaire a été observée quel que soit le paramètre étudié. Après traitement ultérieur par de la dexaméthasone, aucune excrétion virale n'a pu être démontrée; certains animaux ont cependant présenté une augmentation significative de leur indice de stimulation dans un test de transformation lymphoblastique. Le système immunitaire peut donc contrôler la réexcrétion du BHV1, car un animal très immunisé parvient même à la contenir.

La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps pourrait jouer un rôle important dans le contrôle des accès de réactivation, car la dexaméthasone n'influence pas négativement cette réaction et ne déprime pas les populations de cellules qui portent des récepteurs Fc et interviennent dans la réaction. D'après ce qui précède, la réactivation ne résulterait donc pas de l'immunodépression engendrée par l'injection de dexaméthasone et un mécanisme plus spécifique doit être envisagé, comme celui d'une action directe de la dexaméthasone sur les cellules infectées de manière latente. Cette hypothèse se confirme dans la mesure où l'administration, à des animaux porteurs latents de BHV1, d'un autre immunodépresseur comme la cyclophosphamide provoque l'apparition de manifestations cliniques sévères, mais sans produire une réexcrétion de particules physiques ou infectieuses.

D'autre part, le fait qu'une souche thermosensible réputée ne pas envahir le système nerveux des animaux infectés puisse être réactivée, amène à postuler l'existence d'une latence au sein des cellules épithéliales.

De tout ceci, il se dégage plusieurs faits qui ont une portée épizootiologique, prophylactique et diagnostique importante.

Du point de vue épizootiologique, il faut donc savoir que :

- a) tous les animaux deviennent porteurs latents à la suite d'une contamination;
- b) toutes les souches vaccinales atténuées s'installent à l'état latent, y compris celles insuffisamment atténuées pour le fœtus;

L'animal infecté de manière latente par une souche sauvage ou insuffisamment atténuée constitue un danger permanent pour son entourage.

L'étude de la prophylaxie médicale doit donc non seulement porter sur les mécanismes immunitaires qui protègent l'animal vacciné de la maladie qui pourrait résulter d'un contact ultérieur avec un virus sauvage, mais aussi sur ceux qui lui permettent de surmonter, ou mieux, de maîtriser les accès de réactivation.

Tout ce qui précède démontre également les difficultés de poser un diagnostic virologique d'infection respiratoire à BHV1, même par l'emploi de sérums couplés. En effet, d'une part les bovins peuvent présenter, en l'absence de signes cliniques, une augmentation de leurs taux en anticorps séroneutralisants; d'autre part, la réexcrétion du BHV1 peut se produire sans que le taux soit modifié.

Le simple isolement du BHV1 doit être pris avec la même circonspection puisque le virus peut être excrété en l'absence de signes cliniques, que les souches atténuées se comportent comme des souches sauvages et, qu'en dehors de la souche thermosensible, les souches atténuées ne peuvent être sûrement distinguées des souches sauvages que par l'électrophorèse des brins d'ADN après digestion par des enzymes de restriction. Seule la détection des porteurs latents peut être entreprise avec plus de garanties.

La connaissance exacte du mécanisme de réactivation est également très importante car c'est le déclenchement de la réactivation qui risque de transformer un animal apparemment sain en un animal objectivement dangereux; les porteurs latents de BHV1 jouent en effet un rôle épizootologique considérable car, malgré leur état immun, ils menacent en permanence les sujets neufs. Ces études doivent donc être poursuivies.

Ces quelques éclaircissements sur le portage latent du BHV1 peuvent aider à déduire les mesures prophylactiques les plus aptes à maîtriser la maladie dans les diverses situations épidémiologiques rencontrées en économie animale.

VI. BIBLIOGRAPHIE.

- ABINANTI F.R., PLUMER G.J.
The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from cattle affected with conjunctivitis - observations on the experimental infection. *Am. J. Vet. Res.*, 1961, 86, 13-17.
- ABRAHAM A.S., ARBITMAN A., SAVIR D.
An outbreak of infectious bovine rhino-tracheitis-Infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) in dairy cows, accompanied by dermatitis. *Refuah Veterinarit*, 1976, 33, 79-81.
- ADAMS A., LINDAHL T.
Epstein-Barr virus genomes with properties of circular molecules in carrier cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 1477-1481.
- ADAMS A., BJURSELL G., KASCHKA-DIERICH C., LINDAHL T.
Circular Epstein-Barr virus genomes of reduced size in a human lymphoid cell line of infectious mononucleosis origin. *J. Virol.*, 1977, 22, 373-380.
- AFSHAR A., TADJBAKHS H.
Occurrence of precipitating antibodies to bovine herpesvirus (Infectious Bovine Rhinotracheitis) in sera of farm animals and man in Iran. *J. Comp. Path.*, 1970, 80, 307-310.
- AGUILAR-SETIEN A., PASTORET P.-P., BURTONBOY G., COIGNOUL F., JETTEUR P., VANDEPUTTE J., SCHOENAERS F.
Communauté antigénique entre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*, BHV1) et le virus de la maladie d'Aujeszky (*Suis herpesvirus 1*, SHV1) démontrée, chez le bovin, par un test d'hypersensibilité retardée. *Ann. Méd. Vét.*, 1979a, 123, 55-61.
- AGUILAR-SETIEN A., PASTORET P.-P., BURTONBOY G., SCHOENAERS F.
Test d'hypersensibilité retardée au virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*) avec du virus purifié. *Ann. Méd. Vét.*, 1978a, 122, 193-200.
- AGUILAR-SETIEN A., PASTORET P.-P., JETTEUR P., BURTONBOY G., SCHOENAERS F.
Excrétion du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*, IBR), par traitement à la dexaméthasone d'un bovin positif au test d'hypersensibilité retardée, mais négatif au test de séroneutralisation avec ce virus. *Ann. Méd. Vét.*, 1979b, 123, 93-101.
- AGUILAR-SETIEN A., PASTORET P.-P., SCHOENAERS F.
L'immunité envers le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*). *Ann. Méd. Vét.*, 1980a, 124, 103-122.
- AGUILAR-SETIEN A., PASTORET P.-P., SCHWERS A.
Etude chez le bovin, par neutralisation et immunoprécipitation, des réactions sérologiques croisées entre le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*, BHV1) et celui de la maladie d'Aujeszky (*Suis herpesvirus 1*, SHV1). *Ann. Méd. Vét.*, 1980b, 124, 199-209.

AGUILAR-SETIEN A., PASTORET P.-P., TOMA B., JOUBERT L., MICHAUX C.,
SCHOENAERS F.
Réponse immunitaire de type anamnétique envers le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine, (*Bovid herpesvirus 1*), chez des bovins, après exposition à des antigènes du virus de la maladie d'Aujeszky (*Sus herpesvirus 1*).
Ann. Méd. Vét., 1979d, 123, 429-434.

AGUILAR-SETIEN A., VANDEPUTTE J., PASTORET P.-P., MICHAUX C.,
PENSAERT M.B., SCHOENAERS F.
Présence concomitante, chez les bovins et les porcs, d'anticorps neutralisant le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*, BHV1) et celui de la maladie d'Aujeszky (*Sus herpesvirus 1*, SHV1) après contact avec le virus homologue.
Ann. Méd. Vét., 1979c, 123, 275-284.

ALLAN P.J., DENNETT D.P., JOHNSON R.H.
Studies on the effects of infectious bovine rhinotracheitis virus on reproduction in heifers.
Aust. Vet. J., 1975, 51, 370-373.

ALLEN J.G., HERRING J.
The induction of parturition using dexamethasone in dairy cattle.
Aust. Vet. J., 1976, 52, 442.

ALMEIDA J., LANG D., TALBOT P.
Herpesvirus morphology : visualization of a structural subunit.
INTERVIROLOGY, 1978, 10, 318-320.

American Type Culture Collection.
Registry of animal cell lines, 1972.

ANDERSSON-ANVRET M., LINDAHL T.
Integrated viral DNA sequences in Epstein-Barr virus - converted human lymphoma lines.
J. Virol., 1978, 25, 710-718.

ANDERSON D.E.
Cancer eye in cattle.
Mod. Vet. Pract., 1970, 51, 43-47.

ANDREWES C.H., HORSTMANN D.M.
The susceptibility of viruses to ethyl ether.
J. Gen. Microbiol., 1949, 3, 290-297.

ANKER H.S.
A solubilizable acrylamide gel for electrophoresis.
FEBS Letters, 1970, 7, 293.

ARMSTRONG J.A., PEREIRA H.G., ANDREWES C.H.
Observations on the virus of infectious bovine rhinotracheitis and its affinity with the herpesvirus group.
VIROLOGY, 1961, 14, 276-285.

ASHE W.K., SCHERP H.W.
Antigenic variations in herpes simplex virus isolates from successive recurrences of herpes labialis.
The Journal of Immunology, 1965, 94, 385-394.

BABIUK L.A.
Ribonucleoti
J. Gen. Virol

BABIUK L.A.
Immune inter
of herpesvir
Infect. Immun

BABIUK L.A.
Immune contr
Can. J. Micro

BABIUK L.A.
Defense mech
virus-host
lysis.
Infect. Immun

BACZYNSKI Z.
Aetiology ap
breeding fa
Bull. Vet.

BAGUST T.J.
Comparison
four strain
J. Comp. Pa

BAGUST T.J.
Pathogenesis
bovine rhin
J. Comp. Pa

BAHNEMANN H.
Inactivation
Journal of

BAKER J.A.
Simultaneou
diarrhea an
Cornell Vet

BAKER J.A.
Effects of
vaginitis
Cornell Vet

BALOW J.E.
Cyclophosph
quantitativ
The Journal

BARENFUS M.
Isolation o
meningo en
J.A.V.M.A.

X C.,

rhinotra-
ins, après
Sus herpes -

rps neu-
vid herpes -
rus 1,

rus on

le.

d human

and its

cessive

BABIUK L.A., ROUSE B.T.

Ribonucleotides in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA.
J. Gen. Virol., 1976a, 31, 221-230.

BABIUK L.A., ROUSE B.T.

Immune interferon production by lymphoid cells : role in the inhibition of herpesviruses.

Infect. Immun., 1976b, 13, 1567-1578.

BABIUK L.A., ROUSE B.T.

Immune control of herpesvirus latency.

Can. J. Microbiol., 1979, 25, 267-274.

BABIUK L.A., WARDLEY R.C., ROUSE B.T.

Defense mechanisms against bovine herpesvirus : relationship of virus-host cell events to susceptibility to antibody-complement cell lysis.

Infect. Immun., 1975, 12, 958-963.

BACZYNSKI Z., CAKALA S.T., SKULMOWSKA-KRYSZKOWSKA D., SZYMANDERSKA H.
Aetiology and epizootiology of enzootic infections in calves in large breeding farms.

Bull. Vet. Inst. Pulawy, 1975, 19, 69-74.

BAGUST T.J.

Comparison of the biological, biophysical and antigenic properties of four strains of infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus.

J. Comp. Path., 1972, 82, 365-374.

BAGUST T.J., CLARK L.

Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus.

J. Comp. Path., 1972, 82, 375-383.

BAHNEMANN H.G.

Inactivation of viruses in serum with binary Ethylenimine.

Journal of clinical Microbiology, 1976, 3, 204-210.

BAKER J.A., GILLESPIE J.A., SHEFFY B.E., MARSHALL V.

Simultaneous immunization of cattle against leptospirosis, virus diarrhea and infectious bovine rhinotracheitis.

Cornell Vet., 1958, 48, 207-213.

BAKER J.A., Mc ENTÉE K., GILLESPIE J.H.

Effects of infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis (IBR-IPV) virus on newborn calves.

Cornell Vet., 1960, 50, 157-170.

BALOW J.E., HURLEY D.L., FAUCI A.S.

Cyclophosphamide suppression of established cell-mediated immunity quantitative VS. qualitative changes in lymphocytes populations.

The Journal of Clinical Investigation, 1975, 56, 65-70.

BARENFUS M., DELLICQUADRI C.A., Mc INTYRE R.W., SCHROEDER R.J.

Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningo encephalitis.

J.A.V.M.A., 1963, 143, 725-728.

BARRETT M.W., CHALMERS G.A.
A serologic survey of pronghorns in Alberta and Saskatchewan, 1970-1972.
J. Wildl. Dis., 1975, 11, 157-163.

BARTH T., ULBRICH F., HAASE H., STREU J., POHLE V., WEYHE D.
Untersuchungen über den Einfluß der IBR/IPV-Infektion auf die Reproduktion in Milchviehherden.
Monatshefte für Veterinärmedizin, 1978, 33, 538-543.

BARTHA A., BELAK S., BENYEDA J.
Trypsin-and heat-resistance of some strains of the herpes virus group.
Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae, 1969, 19, 97-99.

BA-VY NGUYEN, PERREAU P.
Culture du virus de la rhinotrachéite infectieuse des bovins sur les cellules testiculaires d'embryon de mouton.
Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 1964, 17, 197-203.

BECK B.E.
Infectious bovine rhinotracheitis encephalomyelitis in cattle and its differential diagnosis.
Can. Vet. J., 1975, 16, 269-271.

BELLONCIK S., DEVAUCHELLE G.
Premiers stades d'infection de cellules de moustiques *in vitro* par le chilo iridescent virus et le virus infectieux de la rhinotrachéite bovine. Microscopie électronique.
Archiv. Virol., 1976, 50, 189-195.

BERRIOS P.E., Mc KERCHER D.G.
Characterization of a caprine herpesvirus.
Am. J. Vet. Res., 1975, 36, 1755-1762.

BHATNAGAR R., JOHNSON G.R., CHRISTIAN R.G.
Electron microscopy for rapid identification of animal viruses in hematoxylin-eosin sections.
Can. J. Comp. Med., 1977, 41, 416-419.

BISWAL N., MURRAY B.K., BENYESH-MELNICK M.
Ribonucleotides in newly synthesized DNA of herpes simplex virus.
VIROLOGY, 1974, 61, 87-99.

BITSCH V.
Infectious bovine rhinotracheitis virus infection in bulls, with special reference to preputial infection.
Appl. Microbiol., 1973, 26, 337-343.

BITSCH V., FRIIS N.F., KROGH H.V.
A microbiological study of pneumonic calf lungs.
Acta Vet. Scand., 1976, 17, 32-42.

BLACK D.N., SLACK G.
A comparison of two strains of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Archiv. ges. Virusforsch., 1972, 39, 330-337.

BLATTER D.P., GARNER F., VAN SLYKE K., BRADLEY A.
Quantitative electrophoresis in polyacrylamide gels of 2-40 %.
J. Chromatogr., 1972, 64, 147-155.

BLUE W.T., PLUMMER G.
Antigenic relationships among four herpesviruses.
Infect. Immun., 1973, 7, 1000-1002.

BLYTH W.A., HIL
Reactivation of
possible involv
J. Gen. Virol.,

BOCCIARELLI D.S.
The Nucleus of
Istituto superi

BOCCIARELLI D.S.
The core of a b
VIROLOGY, 1966,

BOECKX M., IBRA
De invloed van
taten van k. i.
Vlaams Diergene

BOLDOGH I., GON
Expression of t
human-mouse het
Archiv. Virol.

BOLTON W.D., MU
An Immunity stu
Am. J. Vet. Res.

BONNER W.M., LA
A film detectio
in polyacrylam
Eur. J. Biochem

BORGEN H.C.
Differentiation
Archiv. ges. V

BORGEN H.C.
Equine herpesv
isolates.
Archiv. ges. V

BOTTCHER R., M
Untersuchungen
natürlich infi
Dtsch. tierärz

BOUTERS R., VA
De ulcereuse b
Vlaams Diergen

BOUTERS R., VA
Virus-infectie
Vlaams Diergen

BOUTERS R., WE
Vaccinatie pro
Vlaams Diergen

BOWEN J.M., JA
Experimental i
Texas Rep. Bic

, 1970-1972.

e Reproduk-

rus group.
97-99.

sur les

e and its

ro par le
achéite

ses in hemato-

virus.

with special

itis virus.

%.

BLYTH W.A., HILL T.J., FIELD H.J., HARBOUR P.A.

Reactivation of herpes simplex virus infection by ultraviolet light and possible involvement of prostaglandins.

J. Gen. Virol., 1976, 33, 547-550.

BOCCIARELLI D.S., ORFEI Z., MONDINO G., PERSECHINO A.

The Nucleus of a Herpes Virus.

Istituto superiore di Sanita, Laboratori di Fisica. Roma, 1965.

BOCCIARELLI D.S., ORFEI Z., MONDINO G., PERSECHINO A.

The core of a bovine herpesvirus.

VIROLOGY, 1966, 30, 58-61.

BOECKX M., IBRAHIM M., BOUTERS R.

De invloed van een acute I.P.V.-I.B.R. infectie op de bevruchtingsresultaten van k. i. stieren.

Vlaams Diergeneesk. Tijdschr., 1968, 37, 177-188.

BOLDOGH I., GONCZOL E., GARTNER L., VACZI G.

Expression of the human cytomegalovirus genome in mouse cells and in human-mouse heterokaryons.

Archiv. Virol., 1977, 53, 101-108.

BOLTON W.D., MURRAY R.W.

An Immunity study on a Reindeer herd.

Am. J. Vet. Res., 1964, 25, 1783-1785.

BONNER W.M., LASKEY R.A.

A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels.

Eur. J. Biochem., 1974, 46, 83-88.

BORGEN H.C.

Differentiation of equine herpesvirus type 1 strains by a plaque marker.

Archiv. ges. Virusforsch., 1970, 32, 283-285.

BORGEN H.C.

Equine herpesvirus type 1; the L⁻ character in two of forty-three field isolates.

Archiv. ges. Virusforsch., 1972, 36, 391-393.

BOTTCHER R., MAHLER R.

Untersuchungen über die Persistenz des IBR-IPV-Virus des Rindes in Samen natürlich infizierter Bullen.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 1970, 77, 421-444.

BOUTERS R., VANDEPLASSCHE M., FLORENT A., LEUNEN J., DEVOS A.

De ulcerouse balanoposthitis bij fokstieren.

Vlaams Diergeneesk. Tijdschr., 1960, 29, 171-186.

BOUTERS R., VANDEPLASSCHE M., FLORENT A., LEUNEN J.

Virus-infecties en steriliteit bij runderen.

Vlaams Diergeneesk. Tijdschr., 1964, 33, 405-421.

BOUTERS R., WELLEMANS G.

Vaccinatie proeven tegen IPV bij stieren.

Vlaams Diergeneesk. Tijdschr., 1970, 39, 85-86.

BOWEN J.M., JARDINE J.H., SCANLON M.D., DMCHOWSKI L., RUSSELL W.O.

Experimental immunization of cattle against bovine keratoconjunctivitis.

Texas Rep. Biol. Med., 1970, 24, 531-539.

BOWLING C.P., GOODHEART C.R., PLUMMER G.
Oral and genital bovine herpesviruses.
J. Virol., 1969, 3, 95-97.

BRANYIK A., ZUFFA A., DUSEK I.
Heterogeneity of pseudorabies virus studied by isoelectric separation.
Acta Virol., 1977, 21, 198-204.

BRAR J.S., JOHNSON P.W., MUSCOPLAT C.C., SHOPE R.E., MEISKE J.C.
Maternal immunity to infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral
diarrhea viruses : duration and effect on vaccination in young calves.
Am. J. Vet. Res., 1978, 39, 241-244.

BRONSON D.L., GRAHAM B.J., LUDWIG H., BENYESH-MELNICK M., BISWAL N.
Studies on the relatedness of herpes viruses through DNA-RNA
hybridization.
Biochimica et biophysica Acta, 1972, 259, 24-34.

BROWN A.L., BJORNSSON C.B.
The relationship of nasal discharge to infection with infectious bovine
rhinotracheitis virus.
Am. J. Vet. Res., 1959, 20, 985-988.

BROWN R.G., CABASSO V.J.
Studies on infectious bovine rhinotracheitis (IBR).
II. Experimental transmission to cattle.
Vet. Med., 1957, 52, 321-326.

BROWN W.N., CHOW T.L.
Field trials of infectious bovine rhinotracheitis vaccine.
J.A.V.M.A., 1959, 134, 29-31.

BUENING G.M., GRATZKE J.B.
Comparison of selected characteristics of four strains of infectious
bovine rhinotracheitis virus.
Am. J. Vet. Res., 1967, 28, 1257-1267.

BURTONBOY G.
La morphologie virale.
Ann. Méd. Vét., 1978, 122, 235-242.

BWANGAMOI O., KAMINJOLO J.S.
Isolation of IBR/IPV virus from the semen and skin lesions of bulls at
Kabete, Kenya, 1971.

BWANGAMOI O., KAMINJOLO J.S.
Observations on experimental infection with bovine rhinotracheitis virus
in rabbits.
Bull. epizoot. Dis. Afr., 1973, 21, 357-361.

CABASSO V.J.,
Infectious bo
III. Lack of
Vet. Med., 19

CABASSO V.J.,
Infectious bo
cancer cells
P.S.E.B.M., 1

CALAFAT J., H
Virus-like pa
J. Gen. Virol

CARLEER J., P
Isozyme chara
cell cultures
Anim. Blood C

CARMICHAEL L.
The relations
rhinopneumoni
Report of the
394-388.

CARMICHAEL L.
Small-plaque
for newborn p
Infect. Immun

CASSAI E.N.,
Plaque disso
cal character
INTERVIROLOG

CHARTON A.,
Pouvoir path
d'Herpes vir
Bull. Acad.

CHEATHAM W.J.
Occurrence of
virus infect
P.S.E.B.M.,

CHIA W.K., S
Electron mic
virus in bov
Arch. ges. V

CHO B.R.
A possible a
Marek's dise
Avian Diseas

CHOW T.L.
Duration of
rhinotrache
J.A.V.M.A.,

- separation.
- E J.C.
bovine viral
young calves.
- BISWAL N.
NA
- infectious bovine
- infectious
- of bulls at
- rhinotracheitis virus
- CABASSO V.J., BROWN R.G.
Infectious bovine rhinotracheitis (I.B.R.).
III. Lack of contact transmission following intramuscular inoculation.
Vet. Med., 1958, 53, 503-506.
- CABASSO V.J., BROWN R.G., COX H.R.
Infectious bovine rhinotracheitis (I.B.R.) I. Propagation of virus in
cancer cells of human origin (Hela).
P.S.E.B.M., 1957, 95, 471-476.
- CALAFAT J., HAGEMAN P.C., RESSANG A.A.
Virus-like particles in bovine sera for tissue culture.
J. Gen. Virol., 1976, 33, 151-154.
- CARLEER J., PASTORET P.P., ANSAY M.
Isozyme characterization of cattle (*Bos taurus*) and Buffalo (Bison bison)
cell cultures.
Anim. Blood Grps biochem. Genet., 1979, 9, 175-179.
- CARMICHAEL L.E., BARNES F.D.
The relationship of infectious bovine rhinotracheitis virus to equine
rhinopneumonitis virus.
Report of the Annual meeting U.S. Livestock sanitary association, 1961,
394-388.
- CARMICHAEL L.E., MEDIC B.L.S.
Small-plaque variant of canine herpesvirus with reduced pathogenicity
for newborn pups.
Infect. Immun., 1978, 20, 108-114.
- CASSAI E.N., MANSERVIGI R., CORALLINI A., TERNI M.
Plaque dissociation of herpes simplex viruses : biochemical and biological
characters of the viral variants.
INTERVIROLOGY, 1975/76, 6, 212-223.
- CHARTON A., PARODI A., FAYE P., LELAYEC C.
Pouvoir pathogène expérimental pour le veau nouveau-né d'une souche
d'Herpes virus bovis inoculée par voie aérienne.
Bull. Acad. Vét., 1968, 41, 69-76.
- CHEATHAM W.J., CRANDELL R.A.
Occurrence of intranuclear inclusions in tissue cultures infected with
virus infectious bovine rhinotracheitis.
P.S.E.B.M., 1957, 96, 535-538.
- CHIA W.K., SAVAN M.
Electron microscopic observations of infectious bovine rhinotracheitis
virus in bovine fetal tracheal organ cultures.
Arch. ges. Virusforsch., 1974, 45, 185-198.
- CHO B.R.
A possible association between plaque type and pathogenicity of
Marek's disease herpesvirus.
Avian Diseases, 1976, 20, 324-331.
- CHOW T.L.
Duration of immunity in heifers inoculated with infectious bovine
rhinotracheitis virus.
J.A.V.M.A., 1972, 160, 51-54.

CHOW T.L., DAVIS R.W.
The susceptibility of mule deer to infectious bovine rhinotracheitis.
Am. J. Vet. Res., 1964, 25, 518-519.

CHOW T.L., DEEM A.W., JENSEN R.
Infectious rhinotracheitis in cattle.
II. Experimental reproduction.
Proc. U.S. Livestock San. Ass., 1955, 168-172.

CHOW T.L., MOLELLO J.A., OWEN N.V.
Abortion experimentally induced in cattle by infectious bovine rhinotracheitis virus.
J.A.V.M.A., 1964, 144, 1005-1007.

COHEN J.C., PERDUE M.L., RANDALL C.C., O'CALLAGHAN D.J.
Herpes virus transcription : altered regulation induced by FUDR.
VIROLOGY, 1977, 76, 621-633.

COLBERE F.
L'Herpes virus simplex.
Structure, répllication et biologie.
Bulletin de l'Institut Pasteur, 1975, 73, 203 - 254.

COLLIER J.R., CHOW T.L., BENJAMIN M.M., DEEN A.W.
The combined effect of infectious bovine rhinotracheitis virus and Pasteurella hemolytica on cattle.
Am. J. Vet. Res., 1960, 21, 195-198.

COLLINGS D.F., GIBAS E.P.J., STAFFORD L.P.
Concurrent respiratory and genital disease associated with infectious bovine rhinotracheitis / Infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a dairy herd in the United Kingdom.
Vet. Rec., 1972, 91, 214-219.

CONNORS T.A., FOSTER A.B., GILSENAN A.M., JARMAN M., TISDALE M.J.
Observations on the metabolism of cyclophosphamide.
Biochem. Pharmacol., 1972, 21, 1373.

CONRADI H., HUBRIG T., WOHANKA K.
Untersuchungen und Beobachtungen zum Bläschenausschlag des Rindes.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 1960, 73, 46-52.

CONTENT J., DUESBERG P.H.
Electrophoretic distribution of the proteins and glycoproteins of influenza virus and Sendai virus.
J. Virol., 1970, 6, 707-716.

CORNER A.H., GREIG A.S., HILL D.P.
A histological study of the effects of the herpesvirus of infectious bovine rhinotracheitis in the lactating bovine mammary gland.
Can. J. Comp. Med., 1967, 31, 320-330.

CORREA-GIRON P.
Reexcretion of IBR after corticosteroid treatment.
Communication personnelle, 1976.

CORREA-GIRON P., CARMICHAEL L.E., SCHULTZ R.D.
Observations on the response of cattle to a skin test using infectious bovine rhinotracheitis (IBR) inactivated antigen.
Proceedings of eighteen annual meeting of the American Association of Veterinary Laboratory diagnosticians.
Portland, Oregon, November 2, 3, 4, 1975.

CORRIER D.E.,
Effects of cyclophosphamide on cellular immunity.
Am. J. Vet. Res.

COURTNEY R.J.
Herpes simplex virus.
VIROLOGY, 1978

CRAIGHEAD J.E.
Nonviral microvirus-infected cells.
J. Virol., 1978

CRANDELL R.A.
Antigenic variation of bovine herpesvirus 1.
Proceedings 7th International Conference on health associated viruses, 1978

CRANDELL R.A.
Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from a feeder steer.
Am. J. Vet. Res.

CRANDELL R.A.
Infectious bovine rhinotracheitis virus in semen.
Am. J. Vet. Res.

CRANDELL R.A.
Development, pathogenesis and control of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) (Felis Catus).
In vitro, 1978

CRUISCKSHANK J.
Morphology of infectious bovine rhinotracheitis virus.
VIROLOGY, 1968

CUMMINS J.M.,
Effect of hydrocortisone on the response of cattle with infectious bovine rhinotracheitis.
Am. J. Vet. Res.

CURTIS R.A.,
Infectious bovine rhinotracheitis virus.
Can. Vet. J.,

tracheitis.

CORRIER D.E., ADAMS L.G., PIERCE K.R.
Effects of cyclophosphamide on the lymphoid tissues and humoral and cellular immune responsiveness of young calves.
Am. J. Vet. Res., 1979, 40, 1683-1689.

COURTNEY R.J.
Herpes simplex virus protein synthesis in the presence of 2-Deoxy-D-Glucose.
VIROLOGY, 1976, 73, 286-294.

vine rhinotra-

CRAIGHEAD J.E., KANICH R.E., ALMEIDA J.D.
Nonviral microbodies with viral antigenicity produced in cytomegalovirus-infected cells.
J. Virol., 1972, 10, 766-775.

FuDR.

CRANDELL R.A.
Antigenic variations among infectious bovine rhinotracheitis viruses. Proceedings 76 th Annual Meeting of the United States animal health association, 1972, 480-482.

rus and

CRANDELL R.A.
Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from feces of a feeder steer.
Am. J. Vet. Res., 1974, 35, 951-952.

infectious
(IBR/IPV)

CRANDELL R.A., CHEATHAM W.J., MAURER F.D.
Infectious bovine rhinotracheitis-the occurrence of intranuclear inclusion bodies in experimentally infected animals.
Am. J. Vet. Res., 1959, 20, 505-509.

E M.J.

CRANDELL R.A., FABRICANT C.G., NELSON-REES W.A.
Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (Felis Catus) renal cell line (CRFK).
In vitro, 1973, 9, 176-185.

Rindes.

CRUISCKSHANK J.G., BERRY D.M.
Morphology of infectious bovine rhinotracheitis virus.
VIROLOGY, 1965, 25, 481-482.

ins of

CUMMINS J.M., ROSENQUIST B.D.
Effect of hydrocortisone on the interferon response of calves infected with infectious bovine rhinotracheitis virus.
Am. J. Vet. Res., 1977, 38, 1163-1166.

infectious
d.

CURTIS R.A., VAN DREUEL A.A., DITCHFIELD J.
Infectious bovine rhinotracheitis-clinical, pathological, and virological aspects.
Can. Vet. J., 1966, 7, 161-168.

infectious
iation of

DARBYSHIRE J.A., DAWSON P.S., PATERSON A.B., LOOSMORE R.M.
The isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus in United Kingdom : a preliminary report.
Vet. Rec., 1962, 74, 156-157.

DARCEL C. Le Q.
Precipitins in bovine sera to infectious bovine rhinotracheitis virus antigens.
Can. Vet. Jour., 1977, 18, 259-262.

DARCEL C. Le Q., BRADLEY J.A., MITCHELL D.
Immune response of cattle to antigens obtained from bovine herpes 1 infected tissue cultures.
International Virology IV, abstracts, The Hague, The Netherlands, August 30 - September 6, 1978.

DARCEL C. Le Q., COULTER G.H.
IBR virus neutralizing substance in bull seminal fluid and its removal prior to attempts at virus isolation from semen.
Can. Vet. Jour., 1976, 17, 318-320.

DARCEL C. Le Q., DORWARD W.J.
Recovery of infectious bovine rhinotracheitis virus following corticosteroid treatment of vaccinated animals.
Can. Vet. Jour., 1975, 16, 87-88.

DAVIS B.J.
Disc electrophoresis. II. Method and application to serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404.

DAVIES D.H., CARMICHAEL L.E.
Role of cell-mediated immunity in the recovery of cattle from primary and recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus.
Infect. Immun., 1973, 8, 510-518.

DAVIES D.H., DUNCAN J.R.
The pathogenesis of recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus induced in calves by treatment with corticosteroids.
Cornell Vet., 1974, 64, 340-366.

DAWSON P.S., DARBYSHIRE J.H., LOOSMORE R.M., PATERSON A.B., FAULL W.B.
Infectious bovine rhinotracheitis (IBR). A clinical condition of cattle occurring in the United Kingdom.
Vet. Rec., 1962, 74, 1379-1383.

DEDEK J., LUDWIG E., LUDWIG C.
Untersuchungen zur Infektion des Schweines mit dem IBR/IPV virus.
Mh. Vet. Med., 1977, 32, 172-174.

DE MEURICHY W., PENSABERT M.
Ademhalingsstoornissen bij mestrunderen in België veroorzaakt door het infectieuze Boviene rhinotracheitis virus, II. Virusisolatie - identificatie en - karakterizatie.
Vlaams Diergeneesk. Tijdschr., 1972, 41, 230-242.

DENNETT D.P., BARASA J.O., JOHNSON R.H.
Infectious bovine rhinotracheitis virus : studies on the venereal carrier status in range cattle.
Research in Veterinary Science, 1976, 20, 77-83.

DEPAULI F.J.
Studies of i
III. Amino
Archiv.

DERBYSHIRE J.
The isolatio
rhinotrache
Can. J. Comp

DERIVAUX J.
Corticoides
Ann. Méd. V

DIMMOCK N.J.
Proteins spe
polyacrylam
virus partic
J. Gen. Viro

DOBERSEN M.J.
Enzymatic ba
by 5-halogen
J. Virol., 1

DONALDSON A.
The survival
humidity.
Vet. Microbi

DUNKER A.K.
Observations
The Journal

DUNCAN D.B.
Multiple ran
Biometrics,

DURHAM P.J.
Infectious
New Zealand

United

DEPAULI F.J., SABINA L.R.
Studies of infectious bovine rhinotracheitis virus.
III. Amino acid requirements for viral replication.
Archiv. ges. Virusforsch., 1972, 36, 380-390.

tis virus

DERBYSHIRE J.B., CAPLAN B.A.
The isolation and characterization of a strain of infectious bovine
rhinotracheitis virus from stillbirth in swine.
Can. J. Comp. Med., 1976, 40, 252-256.

erpes 1

DERIVAUX J., ECTORS F.
Corticoïdes et parturition chez les animaux.
Ann. Méd. Vét., 1973, 117, 267-274.

ands,

DIMMOCK N.J., WATSON D.H.
Proteins specified by influenza virus in infected cells : analysis by
polyacrylamide gel electrophoresis of antigens not present in the
virus particles.
J. Gen. Virol., 1969, 5, 499-509.

ts removal

g corticos-

DOBERSEN M.J., JERKOFSKI M., GREER S.
Enzymatic basis for the selective inhibition of Varicella-Zoster virus
by 5-halogenated analogues of Deoxycytidine.
J. Virol., 1976, 20, 478-486.

roteins.

DONALDSON A.I., FERRIS N.P.
The survival of some air-borne animal viruses in relation to relative
humidity.
Vet. Microbiol., 1976, 1, 413-420.

m primary
tis virus.

DUNKER A.K., RUECKERT R.R.
Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel.
The Journal of Biological Chemistry, 1969, 244, 5074-5080.

ine rhino-
steroids.

DUNCAN D.B.
Multiple range and multiple F tests.
Biometrics, 1955, 11, 1.

FAULL W.B.
on of cattle

DURHAM P.J.K.
Infectious bovine rhinotracheitis virus and its role in bovine abortion.
New Zealand Veterinary Journal, 1974, 22, 175-180.

irus.

t door
latie - iden-

ereal

EBERMANN H.P.

Der direkte elektronen mikroskopische Virusnachweis.
Thèse, Hannover, 1977.

ELAZHARY M.A.S., DERBYSHIRE J.B.

Effect of temperature, relative humidity and medium on the aerosol stability of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Can. J. Comp. Med., 1979, 43, 158-167.

ENGLAND J.J.

Techniques for rapid viral diagnosis by negative contrast electron microscopy. Abstracts of the fourth international Congress for Virology.
The Hague, The Netherlands, 1978.

ESPARZA J., BENYESH-MELNICK M., SCHAFER P.A.

Intertypic complementation and recombination between temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus types 1 and 2.
VIROLOGY, 1976, 70, 372-384.

ESPINASSE J., GILBERT Y., SAURAT P.

Différents aspects de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR/IPV) dans un troupeau laitier du Sud-Ouest de la France.
Revue de Médecine vétérinaire, 1974, CXXV, 1441-1452.

EVANS D.L., BARNETT J.W., BOWEN J.M., DMOCHOWSKI L.

Antigenic relationship between the herpesviruses of infectious bovine rhinotracheitis, Marek's disease, and Burkitt's lymphoma.
J. Virol., 1972, 10, 277-287.

EVANS D.L., BARNETT J.W., DMOCHOWSKI L.

Common antigens in herpesviruses from divergent species of animals.
Texas Reports on Biology and Medicine, 1973, 31, 755-770.

FALCON M.
Antiviral
Ara-A5' n
with aden
J. Gen.

FAYE P.,
Etude sé
de la "P
Bull. Ac

FAZEKAS
Two new
electrop
Biochim.

FELDMAN
Sensitiv
P.S.E.B.

FERRIS J.
Infectio
Cornell

FLORENT
Exanthèm
mucus va
Proc. IV

FOX B.W.
Pharmac
J. Antin

FRANK G.
Clinical
rhinotra
inoculat
Am. J. V

FRENCH
Relatio
a virus
Aust. V

FRIEND
Serolog
Bull. W

FRITSCH
Les cen
1975, 2

FALCON M.G., JONES B.R.

Antiviral activity in the rabbit cornea of adenine arabinoside, Ara-A5' monophosphate, and hypoxanthine aminobioside; and interactions with adenosine deaminase inhibitor.

J. Gen. Virol., 1977, 36, 199-202.

FAYE P., CHARTON A., LE LAYEC Cl.

Etude sérologique chez le lapin expérimentalement infecté par le virus de la "Rhino-trachéite infectieuse des bovins", (virus I.B.R.-I.P.V.).

Bull. Acad. Vét., 1975, XLVIII, 67-70.

FAZEKAS de St. GROTH, WEBSTER R.G., DATYNER A.

Two new straining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips.

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 71, 377-391.

FELDMAN H.A., WANG S.S.

Sensitivity of various viruses to chloroform.

P.S.E.B.M., 1961, 106, 736-738.

FERRIS J., BATCHELDER R., KAHRS R., PRITCHARD D.

Infectious bovine rhinotracheitis in New York dairy cattle.

Cornell Vet., 1964, 54, 319-324.

FLORENT A., LEUNEN J.

Exanthème coïtal. Présence d'anticorps neutralisant le virus dans le mucus vaginal de la bête bovine.

Proc. IV^e Int. Cong. Anim. Reprod., La Haye, 1961, 481-483.

FOX B.W.

Pharmacology and chemistry of some inhibitors of herpes replication.

J. Antimicrob. Chem., 1977, 3, (Suppl. A), 23-32.

FRANK G.H., MARSHALL R.G., SMITH P.C.

Clinical and immunologic responses of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus after infection by viral aerosol or intramuscular inoculation.

Am. J. Vet. Res., 1977, 38, 1497-1502.

FRENCH E.L.

Relationship between infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and a virus isolated from calves with encephalitis.

Aust. Vet. J., 1962, 38, 555-556.

FRIEND M., HALTERMAN L.G.

Serologic survey of two deer herds in New York State.

Bull. Wildl. Dis. Ass., 1967, 3, 32-34.

FRITSCH A.

Les centrifugations préparatives en gradient de densité.

1975, 2^e édition, BECKMAN Paris.

GARDNER P.S.
Rapid virus diagnosis.
J. Gen. Virol., 1977, 36, 1-29.

GASKELL R.M., POVEY R.C.
Experimental induction of feline viral rhinotracheitis virus re-excretion in FVR-recovered cats.
Vet. Rec., 1977, 100, 128-133.

GASKELL R.M., WARDLEY R.C.
The carrier state in feline viral upper respiratory tract disease.
Vet. Annu., 1974, 15, 252-255.

GEDER L., HYMAN R.W., FIGUEROA M., OAKES J.E., ILTIS J.P., DAWSON M.S., RAPP F.
Identification of a herpesvirus isolated from cytomegalovirus transformed human cells.
J. Virol., 1978, 27, 713-724.

GENTRY G.A., ASWELL J.F.
Inhibition of herpes simplex virus replication by Ara T.
VIROLOGY, 1975, 65, 294-296.

GERBER J.D., MARRON A.E., KUCERA C.J.
Local and systemic cellular and antibody immune responses of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus vaccines administered intranasally or intramuscularly.
Am. J. Vet. Res., 1978, 39, 753-760.

GERDES J.C., MARSDEN H.S., COOK M.L., STEVENS J.G.
Acute infection of differentiated neuroblastoma cells by latency-positive and latency-negative herpes simplex virus ts mutants.
VIROLOGY, 1979, 94, 430-441.

GIBBS E.P.J., PITZOLIS G., LAWMAN M.J.P.
Use of corticosteroids to isolate IBR virus from cattle in CYPRUS after respiratory disease and ataxia.
Vet. Rec., 1975, 96, 464-466.

GIBBS E.P.J., RWEYEMAMU M.M.
Bovine herpesviruses. Part. I. - Bovine herpesvirus 1.
The Veterinary Bulletin, 1977a, 47, 317-343.

GIBBS E.P.J., RWEYEMAMU M.M.
Bovine herpes viruses. Part. II. - Bovine herpes viruses 2 and 3.
The Veterinary Bulletin, 1977b, 47, 411-425.

GIBSON C.D., ZEMJANIS R.
Immune response of the bovine fetus to several antigens.
Am. J. Vet. Res., 1973, 34, 1277-1280.

GILBERT Y., ESPINASSE J., SAURAT P., VAISSAIRE J.
Rhinotrachéite infectieuse dans les élevages industriels de bovins à l'engrais.
Revue Méd. Vét., 1976, 127, 383-389.

GILBERT Y., SAURAT P.
Le complexe rhinotrachéite infectieuse des bovins.
Monographie : les maladies animales à virus, l'expansion.
Editeur, Paris, 1970.

GILLESPIE J.
Infectious
Am. J. Vet

GILLESPIE J.
Comparison
bovine rhi
Cornell Ve

GOFFAUX M.
Untersuchu
Dtsch. Tie

GOODHEART
The densit
Progr. Med

GORHAM J.F.
Pathogenes
J. Equid.

GOURLAY R.
Isolation
tracheitis
Vet. Rec.

GRAHAM B.
Physicoche
Biochim.

GRATZKE J.
Isolation
tracheitis
developme
microscop
Am. J. Ve

GRATZKE J.
Isolation
tracheitis
logic cha
Am. J. Ve

GREIG A.S.
Infectio
Can. J.

GREIG A.
Cultivat
thema of
Can. J.

GRIFFIN
Stabilit
Am. J. V

GRINYER
An elect
vulvovag
tissue c
Can. J.

- GILLESPIE J.H., LEE K.M., BAKER J.A.
Infectious bovine rhinotracheitis.
Am. J. Vet. Res., 1957, 18, 530-535.
- GILLESPIE J.H., Mc ENTÉE K., KENDRICK J.W., WAGNER W.C.
Comparison of infectious pustular vulvovaginitis virus with infectious
bovine rhinotracheitis virus.
Cornell Vet., 1959, 49, 288-297.
- GOFFAUX M., HARLAY T., ALLIETTA M.
Untersuchungen über das IBR-IPV-Virus in Samen von Besamungsbullen.
Dtsch. Tierärztl. Wschr., 1976, 83, 544-547.
- GOODHEART C.R., PLUMMER G.
The densities of herpes viral DNAs.
Progr. Med. Virol., 1975, 19, 324-352.
- GORHAM J.R., Mc GUIRE T.C., HENSON J.B., CRAWFORD T.B.
Pathogenesis of Equine Infectious anemia.
J. Equid. Med. Surg., 1977, 1, 71-73.
- GOURLAY R.N., STOTT E.J., ESPINASSE J., BARLE C.
Isolation of mycoplasma agalactiae var-bovis and infectious bovine rhino-
tracheitis virus from an outbreak of mastitis in France.
Vet. Rec., 1974, 95, 534-535.
- GRAHAM B.J., LUDWIG H., BRONSON D.L., BENYESH-MELNICK M., BISWAL N.
Physicochemical properties of the DNA of herpesviruses.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 259, 13-23.
- GRATZEK J.B., JENKINS R.A., PETER C.P., RAMSEY F.K.
Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhino-
tracheitis virus associated with enteritis in cattle : comparative
developmental study by fluorescent antibody tracing and electron
microscopy.
Am. J. Vet. Res., 1966a, 27, 1573-1582.
- GRATZEK J.B., PETER C.P., RAMSEY F.K.
Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhino-
tracheitis virus associated with enteritis in cattle : isolation, sero-
logic characterization, and induction of the experimental disease.
Am. J. Vet. Res., 1966b, 27, 1567-1572.
- GREIG A.S., BANNISTER G.L.
Infection of the bovine udder with bovine herpesvirus.
Can. J. Comp. Med., 1965, 29, 57-62.
- GREIG A.S., BANNISTER G.L., MITCHELL D., BARKER C.A.V.
Cultivation in tissue culture of an infectious agent from coital exan-
thema of cattle.
Can. J. Comp. Med., 1958, 22, 119-122.
- GRIFFIN T.P., HOWELLS W.V., CRANDELL R.A., MAURER F.D.
Stability of the virus of infectious bovine rhinotracheitis.
Am. J. Vet. Res., 1958, 19, 990-992.
- GRINER I., SAVAN M., SUTDDERT M.J.
An electron microscopic comparison of bovine infectious pustular
vulvovaginitis virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in
tissue culture.
Can. J. Microbiol., 1962, 8, 373-378.

GUPTA V.S., BUBBAR G.L., MELDRUM J.B., SAUNDERS J.R.
 Synthesis and cell culture studies on the antiviral activity of
 5-mercaptomethyl -2'-deoxyuridine.
 The Journal of Medicinal Chemistry, 1975, 18, 973.

GUSTAFSON D.P.

Cellular events in herpesvirus replication and inapparent infections.
 J.A.V.M.A., 1973, 163, 847-848.

HAHNEFELD H.
 Plaquebildung
 (Exanthema
 turen.
 Arch. exp.

HAHNEFELD H.
 Die Nukleinsäuren
 des Bläschens
 Arch. exp.

HAHNEFELD H.
 Untersuchungen
 Rhinotracheitis
 Kälbern
 Arch. exp.

HAHNEFELD H.
 Die stabilen
 coitale
 stoffionen
 und Natrium
 Arch. exp.

HALL N.K.
 Enhancement
 with corti
 Vet. Micro

HALL W.T.
 The pathol
 tracheiti
 Aust. Vet

HANSON B.
 Effects o
 Am. J. Ve

HARDWICK
 Glycoprote
 J. Viro

HAZRATI A.
 The isolat
 virus in
 Arch. Ins

HEDGER R.
 Neutraliz
 tracheiti
 with spe
 J. Comp.

HEINE J.
 Proteins
 XII. Th
 J. Virol

- HAHNEFELD H., HAHNEFELD E.
Plauebildung bei dem Virus des Bläschenausschlages des Rindes
(Exanthema coitale vesiculosum bovis) auf Kälbernieren-Einschichtkul-
turen.
Arch. exp. Vet. Med., 1962, 16, 1115-1123.
- HAHNEFELD H., HAHNEFELD E.
Die Nukleinsäuren des Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis und
des Bläschenausschlages des Rindes (Exanthema coitale vesiculosum bovis).
Arch. exp. Vet. Med., 1964, 18, 921-928.
- HAHNEFELD H., HAHNEFELD E., SCHULZE P.
Untersuchungen zum Ausbreitungsmodus des Virus der infektiösen bovinen
Rhinotracheitis (IBR) und des Bläschenausschlages des Rindes (IPV) in
Kälbernieren-Einschichtzellkulturen.
Arch. exp. Vet. Med., 1965, 19, 1405-1429.
- HAHNEFELD E., HANTSCH H., HAHNEFELD H.
Die Stabilität des Virus des Bläschenausschlages des Rindes (Exanthema
coitale vesiculosum bovis) bei verschiedenen Temperaturen und Wasser-
stoffionenkonzentrationen sowie bei Einwirkung organischer Lösungsmittel
und Natriumdesoxycholat.
Arch. exp. Vet. Med., 1963, 17, 439-448.
- HALL N.K., MINOCHA H.C.
Enhancement of infectious bovine rhinotracheitis virus. Replication
with corticosterone.
Vet. Microbiol., 1977, 2, 109-119.
- HALL W.T.K., SIMMONS G.C., FRENCH E.L., SNOWDON W.A., ASDELL M.
The pathogenesis of encephalitis caused by the infectious bovine rhino-
tracheitis virus.
Aust. Vet. J., 1966, 42, 229-237.
- HANSON B.R., SCHIPPER I.A.
Effects of swab materials on infectious bovine rhinotracheitis virus.
Am. J. Vet. Res., 1976, 37, 707-708.
- HARDWICK J.M., BUSSELL R.H.
Glycoproteins of measles virus under reducing and non reducing conditions.
J. Virol., 1978, 25, 687-692.
- HAZRATI A., AMJADI A.R.
The isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis
virus in Iran.
Arch. Inst. Razi, 1975, 27, 21-35.
- HEDGER R.S., HAMBLIN C.
Neutralizing antibodies to bovid herpesvirus 1 (infectious bovine rhino-
tracheitis/infectious pustular vulvo-vaginitis) in african wildlife
with special reference to the cape buffalo (*Syncaerus caffer*).
J. Comp. Path., 1978, 88, 211-218.
- HEINE J.W., HONESS R.W., CASSAI E., ROIZMAN B.
Proteins specified by herpes simplex virus.
XII. The virion polypeptides of type 1 strains.
J. Virol., 1974, 14, 640-651.

HELGSTRAND E., ERIKSSON B., JOHANSSON N.G., LANNERO B., LARSSON A., MISIORNY A., NOREN J.O., SJOBERG B., STENBERG K., STENING G., STRIDH S., OBERG B., ALENUS S., PHILIPSON L.
Trisodium phosphonoformate a new antiviral compound.
SCIENCE, 1978, 201, 819-821.

HELGSTRAND E., OBERG B.
Antiviral screening based on cell-free polymerase models and an new selective inhibitor.
Current Chemother., 1978, 329.

HIRSCH I., VONKA V.
Ribonucleotides linked to DNA of herpes simplex virus type 1.
J. Virol., 1974, 13, 1162-1168.

HOFF G.L., RICHARDS S.H., TRAINER D.O.
Epizootic of hemorrhagic disease in North Dakota deer.
J. Wildl. Mgmt, 1973, 37, 331-335.

HONESS R., KILLINGTON R.A., YEO J., RANDALL R.E., HALLIBURTON I.W., WATSON D.H.
Variation and herpesviruses-measurement, exploitation and significance of herpesvirus diversity.
International Virology IV. abstracts of the fourth International Congress for Virology, The Hague, 1978, p. 255.

HONESS R.W., WATSON D.H.
Unity and diversity in the herpesviruses.
J. Gen. Virol., 1977, 37, 15-37.

HOSKINS J.M.
Virological procedures.
Butterworths, London, 1967.

HOTCHIN J.E.
Use of methylcellulose gel as a substitute for agar in tissue culture overlays.
NATURE, 1955, 19, 351-353.

HOUGH V., ROBINSON T.W.E.
Exacerbation and reactivation of herpesvirus hominis infection in mice by cyclophosphamide.
Archiv. Virol., 1975, 48, 75-83.

HOUSE J.A.
Bovine herpesvirus IBR-IPV strain differences.
Cornell Vet., 1972, 62, 431-453.

HOUSE J.A., BAKER J.A.
Comments on combination vaccines for bovine respiratory diseases.
J.A.V.M.A., 1968, 152, 893-894.

HUBBERT W.T., BRYNER J.H., FERNELIUS A.L., FRANK G.H., ESTES P.C.
Viral infection of the bovine fetus and its environment.
Archiv. ges. Virusforsch., 1972, 41, 86-98.

HUCK R.A., MILLAR P.G., EVANS D.H., STABLES J.W., ROSS A.
Penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (I.B.R./I.P.V.) virus in a stud of bulls.
Vet. Rec., 1971, 88, 292-297.

HUGHES J.P.,
Keratoconjunctivitis
J.A.V.M.A., 1968, 152, 893-894.

HURD J., ROBERTS
Herpes simplex virus
J. Antimicrob. Chemother., 1978, 329.

HYNE R.H., JONES
Conjunctivitis
bovine rhinotracheitis
Aust. Vet. J., 1971, 47, 1-2.

ON A.,
STRIDH S.,

HUGHES J.P., OLANDER H.J., WADA M.
Keratoconjunctivitis associated with infectious bovine rhinotracheitis.
J.A.V.M.A., 1964, 145, 32-39.

HURD J., ROBINSON T.W.E.
Herpes simplex : aspects of reactivation in a mouse model.
J. Antimicrob. Chemother., 1976.

an new

HYNE R.H., JOHNSTON K.G.
Conjunctivitis accompanying vaginitis in an outbreak of infectious
bovine rhinotracheitis.
Aust. Vet. J., 1964, 40, 385.

I.W.,
ificance
nal Con-

culture

in mice

es.

.C.

s/infec-
of bulls.

IBRAHIM M., BOUTERS R., WELLEMANS G., BOECKX M., VAN DE PLASSCHE M.
Vaccinatie proeven met levend verzwakt IBR-vaccin tegen IPV-infectie
bij stieren.
Vlaams Diergeneesk. Tijdschr., 1969, 38, 1.

IFFT J.B., VOET D.H., VINOGRAD J.
The determination of density distributions and density gradients in
binary solutions at equilibrium in the ultracentrifuge.
The Journal of Physical Chemistry, 1961, 65, 1138-1145.

IWASAKI Y., FURUKAWA T., PLOTKIN S., KOPROWSKI H.
Ultrastructural study on the sequence of human cytomegalovirus infection
in human diploid cells.
Arch. ges. Virusforsch., 1973, 40, 311-324.

JAMES M.P., LA
Bovine nasal g
New Zealand Ve

JASTY V., CHAN
Infectious bo
of viral produ
acid and prote
Am. J. Vet. Re

JASTY V., CHAN
Effect of hydr
virus.
Am. J. Vet. Re

JASTY V., CHAN
Envelopment o
bovine kidney
Am. J. Vet. Re

JASTY V., CHAN
Infectious bo
II. Virus de
Experimental

JASTY V., CHAN
Effects of hy
cheitis virus
Am. J. Vet. R

JENSEN R., GR
Infectious rh
I. Pathology
Proc. U.S. Li

JENNY E.W., W
Microtiter se
In. Serologic
Diagnostic vi
animal, plant
1973, 6-7.

JERICHO K.W.E
Prevention of
to IBR virus.
Can. Vet. Jou

JESSETT D.M.
The incidence
Kenyan cattle
Res. Vet. Sci

JETTEUR P., E
SCHOENAERS P.
Différenciat
bovine (*Bov*
Ann. Méd. Vét

SCHE M.
infectie

ents in

us infection

JAMES M.P., LAKE D.E., SINCLAIR C.G.

Bovine nasal granuloma.

New Zealand Veterinary Journal, 1975, 23, 63-64.

JASTY V., CHANG P.W.

Infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine kidney cells : sequence of viral production, cellular changes, and localization of viral nucleic acid and protein.

Am. J. Vet. Res., 1969, 30, 1325-1332.

JASTY V., CHANG P.W.

Effect of hydroxyurea on replication of infectious bovine rhinotracheitis virus.

Am. J. Vet. Res., 1970, 31, 1943-1949.

JASTY V., CHANG P.W.

Envelopment of infectious bovine rhinotracheitis viral particles in bovine kidney cell cultures : an electron microscopic study.

Am. J. Vet. Res., 1971, 32, 1945-1953.

JASTY V., CHANG P.W., GOERTEMILLER C.C., YATES V.J.

Infectious bovine rhinotracheitis virus on bovine kidney cells.

II. Virus development and ultrastructural alteration in cultured cells. Experimental and Molecular Pathology, 1972a, 16, 124-137.

JASTY V., CHANG P.W., YATES V.J., GOERTEMILLER C.C., CECE J.M.

Effects of hydroxyurea on replication of infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine kidney cells : an electron microscopic study.

Am. J. Vet. Res., 1972b, 33, 1759-1766.

JENSEN R., GRINER L.A., CHOW T.L., BROWN W.W.

Infectious rhinotracheitis in feedlot cattle.

I. Pathology and symptoms.

Proc. U.S. Livestock San. Ass., 1955, 189-199.

JENNY E.W., WESSMAN S.J.

Microtiter serology-methods for bovine virology. : IBR-NT (microtiter).

In. Serologic microtiter techniques for diagnostic virology.

Diagnostic virology section, veterinary services diagnostic laboratory, animal, plant and health inspection service, Ames Iowa, February 12, 1973, 6-7.

JERICO K.W.F., MAGWOOD S.E., STOCKDALE P.H.G.

Prevention of experimental bovine pneumonic pasteurellosis by exposure to IBR virus.

Can. Vet. Jour., 1976, 17, 194-195.

JESSETT D.M., RAMPTON C.S.

The incidence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus in Kenyan cattle.

Res. Vet. Sci., 1975, 18, 225-226.

JETTEUR P., PASTORET P.-P., AGUILAR-SETIEN A., LEROY P., GODART M., SCHOENAERS F.

Différenciation de souches du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*) fondée sur la dimension moyenne des plages. Ann. Méd. Vét., 1979, 123, 115-121.

JOHNSON L.A.Y., SIMMONS G.C., Mc GAVIN M.D.
Studies on the transmissibility of a viral meningo-encephalitis of
calves.
Aust. Vet. J., 1964, 40, 189-194.

JOKLIK W.K., ZWEERINK H.J.
The morphogenesis of animal viruses.
Annu. Rev. Genet., 1971, 5, 297-360.

KAHRS R.F.
Rational basis
of the bovine
Can. Vet. J.,

KAHRS R.F.
Infectious bo
J.A.V.M.A., 1

KAHRS R.F., H
Observations
infectious bo
J.A.V.M.A., 1

KAHRS R.F., S
An appraisal
congenital de
Proc. U.S. An

KAHRS R.F., S
Epidemiologic
rhinotracheit
Proc. 19th An
385-394.

KAHRS R.F., S
Infectious b
and abortion
J.A.V.M.A.,

KAMINJOLO J.
Infectious b
viral isolat
Am. J. Vet.

KAMINJOLO J.
The occurenc
rhinotrachei
Zbl. Vet. Me

KARSTAD L.,
Vulvovaginit
rhinotrachei
J. Wildl. D

KASZA L., S
Establishme
a swine kid
Research in

KELLING C.L.
Antibody re
infectious
Can. J. Comp

KELLING C.L.
Effects of
tracheitis
Am. J. Vet.

- KAHRS R.F.
Rational basis for an immunization program against the common diseases of the bovine respiratory tract.
Can. Vet. J., 1974, 15, 252-256.
- KAHRS R.F.
Infectious bovine rhinotracheitis : a review and update.
J.A.V.M.A., 1977, 171, 1055-1064.
- KAHRS R.F., HILLMAN R.B., TODD J.D.
Observations on the intranasal vaccination of pregnant cattle against infectious bovine rhinotracheitis and parainfluenza -3 virus infection.
J.A.V.M.A., 1973, 163, 437-441.
- KAHRS R.F., SCOTT F.W., HILLMAN R.B.
An appraisal of fetal serology for the diagnosis of bovine abortion and congenital defects.
Proc. U.S. Animal Health A., 1971, 75, 588-594.
- KAHRS R.F., SCHULTZ R.D., BEAN B.H.
Epidemiologic considerations regarding the detection of infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine semen.
Proc. 19th Ann. Meeting Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians, 1976, 1977, 385-394.
- KAHRS R.F., SMITH R.S.
Infectious bovine rhinotracheitis, infectious pustular vulvovaginitis, and abortion in a New York dairy herd.
J.A.V.M.A., 1965, 146, 217-220.
- KAMINJOLO J.S., NYAGA P.N., OMUSE J.K., MUTIGA E.R.
Infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis viral isolates from cattle with epididymitis and vaginitis.
Am. J. Vet. Res., 1975, 36, 123-125.
- KAMINJOLO J.S., PAULSEN J.
The occurrence of virus-neutralizing antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in sera from hippopotami and buffaloes.
Zbl. Vet. Med. B, 1970, 17, 864-868.
- KARSTAD L., JESSETT D.M., OTEMA J.C., DREVEMO S.
Vulvovaginitis in wildebeest caused by the virus of infectious bovine rhinotracheitis.
J. Wildl. Dis., 1974, 10, 392-396.
- KASZA L., SHADDUCK J.A., CHRISTOFINIS G.J.
Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6.
Research in Veterinary Science, 1972, 13, 46-51.
- KELLING C.L., SCHIPPER I.A., HAUGSE C.N.
Antibody response in calves following administration of attenuated infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccines.
Can. J.Comp. Med., 1973b, 37, 309-312.
- KELLING C.L., SCHIPPER I.A., SCHERMEISTER L.J., VACIK J.P.
Effects of crude extracts of various plants on infectious bovine rhinotracheitis virus-plaque production.
Am. J. Vet.Res., 1976, 37, 215-218.

KELLY C.L., SCHIPPER I.A., STRUM G.E.
 Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) abortion, observations on
 incidence in vaccinated and non-vaccinated and exposed cattle.
 Cornell Vet., 1973a, 63, 383-390.

KELLY D.F.
 Experimental infection of rabbits with the virus of infectious bovine
 rhinotracheitis.
 Br. J. exp. Path., 1977, 58, 168.

KENDRICK J.W.
 Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the fetus.
 J.A.V.M.A., 1973a, 163, 852-854.

KENDRICK J.W.
 Immunologic response of the bovine fetus to inactivated infectious
 bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus.
 Am. J. Vet. Res., 1973b, 34, 1567-1571.

KENDRICK J.W., GILLESPIE J.H., Mc ENTEE K.
 Infectious pustular vulvovaginitis of cattle.
 Cornell Vet., 1958, 48, 458-495.

KENDRICK J.W., Mc ENTEE K.
 The effects of artificial insemination with semen contaminated with
 IBR-IPV virus.
 Cornell Vet., 1967, 57, 3-11.

KENDRICK J.W., OSBURN B.I.
 Immunologic response of the bovine fetus to inactivated infectious
 bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus.
 Am. J. Vet. Res., 1973, 34, 1567-1571.

KENDRICK J.W., SCHNEIDER L., STRAUB O.C.
 Placental reaction to the infectious bovine rhinotracheitis-infectious
 pustular vulvovaginitis virus.
 Am. J. Vet. Res., 1971, 32, 1045-1051.

KENDRICK J.W., STRAUB O.C.
 Infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis
 virus infection in pregnant cows.
 Am. J. Vet. Res., 1967, 28, 1269-1282.

KENDRICK J.W., YORK C.J., Mc KERCHER D.G.
 A controlled field trial of a vaccine for infectious bovine rhinotra-
 cheitis.
 Proc. U.S. Livestock Sanit. Ass., 1956, 60, 155-158.

KENNEDY P.C., RICHARDS W.P.C.
 The pathology of abortion caused by the virus of infectious bovine
 rhinotracheitis.
 Path. Vet., 1964, 1, 7-17.

KIEFF E., HOYER B., BACHENHEIMER S., ROIZMAN B.
 Genetic relatedness of type 1 and type 2 herpes simplex viruses.
 J. Virol., 1972, 9, 738-745.

KIESEL G.K., ROSSI C.R., ALEXANDER H.D., BROOKS G.G.
 A study of weaning, acclimatization, and limited vaccination on the
 incidence of respiratory disease complex in cattle.
 Cornell Vet., 1972, 62, 454-463.

KILLINGTON R.
 HALLIBURTON I.
 Comparative a
 J. Gen. Virol.

KIMURA T., UE
 Some biologic
 variants of
 Archiv. Virol.

KIOPES A.L.
 Pathophysiol
 Holstein-Frie
 Am. J. Vet. 1

KITANO T.
 Unusual migr
 polypeptides
 Archiv. Virol.

KLEIN R.J.
 Pathogenetic
 Arch. Virol.

KINGEBORN B.
 Equine abort
 to inactivat
 Applied Micro

KNIAZEFF A.J.
 γ-globulin i
 NATURE, 1967

KNIAZEFF A.J.
 Detection of
 In vitro, 19

KNOCKE K.W.
 Die morpholo
 tiosa des R
 Zbl. Bakt. 1

KNOWLES R.W.
 Effects of
 and the gly
 J. Virol., 1

KOBAYASHI Y.
 Practical as
 mical analy
 Volume 17,
 Sydney, Tor

KOKLES R.
 Die Infekti
 In. Handbuc
 Band II, Ed
 VEB GUSTAV

KILLINGTON R.A., YEO J., HONESS R.W., WATSON D.H., DUNCAN B.E.,
HALLIBURTON I.W., MUMFORD J.
Comparative analyses of the proteins and antigens of five herpesviruses.
J. Gen. Virol., 1977, 37, 297-310.

KIMURA T., UEBA N.
Some biological and serological properties of large and small plaque
variants of Getah virus.
Archiv. Virol., 1978, 57, 221-229.

KIROPES A.L., BISGARD G.E., MANOHAR M., HERNANDEZ A.
Pathophysiologic studies of infectious bovine rhinotracheitis in the
Holstein-Friesian Calf.
Am. J. Vet. Res., 1978, 39, 779-783.

KITANO T.
Unusual migration profiles of Japanese encephalitis virus structural
polypeptides in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
Archiv. Virol., 1977, 54, 159-163.

KLEIN R.J.
Pathogenetic mechanisms of recurrent herpes simplex virus
Arch. Virol., 1976, 51, 1-13.

KINGEBORN B., DINTER Z.
Equine abortion (Herpes) virus : strain differences in susceptibility
to inactivation by dithiothreitol.
Applied Microbiology, 1972, 23, 1121-1124.

KNIAZEFF A.J., RIMER V., GAETA L.
γ-globulin in foetal bovine sera : significance in virology.
NATURE, 1967, 214, 805-806.

KNIAZEFF A.J., WOPPSCHALL L.J., HOPPS H.E., MORRIS C.S.
Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture.
In vitro, 1975, 11, 400-403.

KNOCKE K.W., LIESS B.
Die morphologische Entwicklung des Virus der Rhinotracheitis infec-
tiosa des Rindes.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 1961, 181, 429-439.

KNOWLES R.W., PERSON S.
Effects of 2-Deoxyglucose, glucosamine, and mannose on cell fusion
and the glycoproteins of herpes simplex virus.
J. Virol., 1976, 18, 644-651.

KOBAYASHI Y., MAUDSLEY D.V.
Practical aspects of liquid scintillation counting. Methods of Bioche-
mical analysis.
Volume 17, David Glick, editor; Interscience Publishers New-York, London,
Sydney, Toronto, 1969.

KOKLES R.
Die Infektiöse Rhinotracheitis und das Coitalexanthem des Rindes.
In. Handbuch der Virusinfektion bei Tieren.
Band II, Edité par HEINZ ROHRER, 1967.
VEB GUSTAV FISCHER VERLAG, JENA, pages 901 à 960.

- KOKLES R.
Virologische Untersuchungen zur Infektion des Rindes mit dem Virus des Bläschenausschlages (IBR-IPV-Virus).
Mh. Vet. Med., 1971, 26, 641-643.
- KOKLES R.
Untersuchungen zum Nachweis von IBR/IPV-Antikörpern bei verschiedenen Haus- und Wildtieren sowie beim Menschen.
Mh. Vet. Med., 1977, 32, 170-171.
- KOKLES R., ABSHAGEN H.
Untersuchungen zur Infektion mit dem Virus des Bläschenausschlages des Rindes (IBR-IPV-Virus).
I. Der Nachweis latenter Virusträger unter Bullen einer Besamungsstation.
Fortpfl. Haust., 1971, 7, 188.
- KOLAR J.R., SHECHMEISTER I.L., KAMMLADE W.G.
Use in cattle of formalin-killed polyvalent vaccine with adjuvant against infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhea, and parainfluenza 3 viruses.
Am. J. Vet. Res., 1972, 33, 1415-1420.
- KRDZALIC P., JERMOLENKO G., BRESJANAC D., STOJICEVIC S., DAVCEVSKI T., MARINAC M., MILIDRAGOVIC M.
Contribution to the study of immunoprophylaxis of respiratory diseases in calves in the breeding herds of the agricultural combine the "Beograd".
Veterinaski Glasnik, 1976, XXX, 251-256.
- KUBIN G.
Intermittierender Nachweis des Bläschenausschlagvirus (IPV) bei einem natürlich infizierten Stier.
Wien. tierärztl. Mschr., 1969, 56, 336-337.
- KUCERA C.J., WHITE R.G., BECKENHAUER W.H.
Evaluation of the safety and efficacy of an intranasal vaccine containing a temperature-sensitive strain of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Am. J. Vet. Res., 1978, 39, 607-610.
- KUTTLER K.L., ADAMS L.G.
Influence of dexamethasone therapy on *Anaplasma* carrier, splenectomized calves.
In Thick-borne disease and their vectors.
Edited by J.K.H. WILDE, Edinburgh, University Press, 1977.

LAEMMLI
Cleavage
bacterio
NATURE,
LANCZ G.
Herpes s
Type and
Archiv.
LANGENBE
Chromic-
Ø6 and i
J. Gen.
LANGER P
The effe
vulvo-va
immune d
Cité dan
LASKEY R
Quantita
fluorogr
Eur. J.
LAWMAN J
A prelem
of farm
Br. Vet.
LEHNER T
Immunolo
of herpe
Lancet i
LE JAN C
Applicat
locaux n
chez le
Bull. Of
LIESS V
Feststel
II. Kult
des Viru
zytopath
Deut. Ti
LILLIE M
The effe
bovine r
Cornell
LINDELL
Prostagl
Acta Vet

- LAEMMLI V.K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
NATURE, London, 1970, 227, 680-684.
- LANCZ G.J.
Herpes simplex viruses type 1 and 2.
Type and strain specific characteristics affecting virus plaque formation.
Archiv. ges.Virusforsch., 1974, 46, 36-43.
- LANGENBERG W.G., SHARPEE R.L.
Chromic-Acid Formaldehyde fixation of nucleic acids of Bacteriophage Ø6 and infectious bovine rhinotracheitis virus.
J. Gen. Virol., 1978, 39, 377-380.
- LANGER P.H.
The effects of infectious bovine rhinotracheitis, infectious pustular vulvo-vaginitis (IBR-IPV) virus on newborn calves from immune and non immune dams, 1960.
Cité dans GILBERT et SAURAT, 1970.
- LASKEY R.A., MILLS A.D.
Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrylamide gels by fluorography.
Eur. J. Biochem., 1975, 56, 335-341.
- LAWMAN J.P., EVANS D., GIBBS E.P.J., Mc DIARMID A., ROWE L.
A preliminary survey of british deer for antibody to some virus diseases of farm animals.
Br. Vet. J., 1978, 134, 95-91.
- LEHNER T., WILTON J.M.A., SHILLITOE E.J.
Immunological bases for latency, recurrences, and putative oncogenicity of herpes simplex virus.
Lancet ii, 1975, 60-62.
- LE JAN Ch., L'HARIDON R., ASSO J.
Application au diagnostic précoce de la mise en évidence d'anticorps locaux neutralisant le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine chez le veau.
Bull. Off. int. Epiz., 1977, 88, 57-60.
- LIESS Von B., KNOCKE K.W., SCHIMMELPFENNIG H.
Feststellung der virusbedingten Rhinotracheitis infectiosa des Rindes. II. Kulturelle, serologische und elektronenoptische charakterisierung des Virus unter Berücksichtigung der in Gewebekulturen auftretenden zytopathischen Veränderungen.
Deut. Tierärztl. Wochschr., 1960, 67, 551-558.
- LILLIE M.G., MOHANTY S.B.
The effect of 5-iodo-2'-deoxyuridine on the multiplication of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Cornell Vet., 1968, 58, 278-288.
- LINDELL J.O., KINDAHL H., EDQVIST L.E.
Prostaglandin release at dexamethasone induced parturitions in cows.
Acta Vet. Scand., 1977, 18, 257.

LOFGREN K.W., STEVENS J.G., MARODEN H.S., SUBAK-SHARPE J.H.
Temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus differ in
the capacity to establish latent infections in mice.
VIROLOGY, 1977, 76, 440-443.

LOMBA F., BIENFET V., WELLEMANS G.
IBR virus and occurrence of metritis at parturition in the bovine
belgian blue white breed.
Br. Vet. J., 1976, 132, 178-181.

LOMNICZI B.
Biological properties of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus strains
with special regard to interferon production and interferon sensitivity.
Archiv. ges. Virusforsch., 1974, 44, 205-214.

LONSDALE D.M., BROWN S.M., SUBAK-SHARPE J.H., WARREN K., KOPROWSKI H.
Restriction enzyme analysis herpes simplex virus type 1 from human
trigeminal, vagus and superior cervical ganglia.
International Virology IV, Abstracts of the Fourth International Congress
for Virology, The Hague, The Netherlands, 1978.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.
Protein measurements with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193, 267-275.

LOWRY S.P., MELNICK J.L., RAWLS W.E.
Investigations of plaque formation in chick embryo cells as a biological
marker for distinguishing herpes virus type 2 from type 1.
J. Gen. Virol., 1971, 10, 1-9.

LUDWIG H.
Untersuchungen am genetischen Material von Herpesviren.
I. Biophysikalisch-chemische Charakterisierung von Herpesvirus-Desoxy-
ribonucleinsäuren.
Med. Microbiol. Immunol., 1972a, 157, 186-211.

LUDWIG H.
Untersuchungen am genetische Material von Herpesviren.
II. Genetische Verwandtschaft verschiedener Herpesviren.
Med. Microbiol. Immunol., 1972b, 157, 212-238.

LUDWIG H., BECHT H., ROTT R.
Inhibition of herpes virus-induced cell fusion by Concanavalin A,
antisera, and 2-Deoxy-D-glucose.
J. Virol., 1974, 14, 307-314.

LUDWIG H., BISWAL N., BENYESH-MELNICK M.
Studies on the relatedness of herpesviruses through DNA-DNA hybridization.
VIROLOGY, 1972, 49, 95-101.

LUDWIG H., PAULSEN J., KAMINJOLO J.S.
Kälbercornea-Zellen in Kultur.
Med. Mikrobiol. Immunol., 1969, 155, 133-149.

LUDWIG H.
Activation
prolonged
Med. Micro

LUDWIG H., STORZ J.

Activation of herpesvirus form normal bovine fetal spleen cells after prolonged cultivation.

Med. Microbiol. Immunol., 1973, 158, 209-217.

Mc FEELY R.A., MERRIT A.M., STEARLY E.L.
 Abortion in a dairy herd vaccinated for infectious bovine rhinotracheitis.
 J.A.V.M.A., 1968, 152, 657-661.

Mc FERRAN J.B., Mc NULTY M.S., CURRAN W.L.
 Diagnosis of avian viral diseases by electron microscopy.
 Am. J. Vet. Res., 1978, 39, 505-508.

Mc GAVRAN M.H., SMITH M.G.
 Ultrastructural, cytochemical, and microchemical observations on cytome-
 galovirus (Salivary gland virus) infection of human cells in tissue
 culture.
 Exp. Mol. Pathol., 1965, 4, 1-10.

Mc INTYRE R.W.
 Experimental studies of acute respiratory infection in cattle.
 J.A.V.M.A., 1954, 125, 473-474.

Mc KARTHY K., TOSOLINI F.A.
 Hazards from simian herpes viruses : reactivation of skin lesions with
 virus shedding.
 The Lancet, 1975, 649-650.

Mc KERCHER D.G.
 Studies of the etiologic agents of infectious bovine rhinotracheitis and
 Bläschenausschlag (Coital Vesicular Exanthema).
 Am. J. Vet. Res., 1963, 24, 501-509.

Mc KERCHER D.G.
 Comments on infectious bovine rhinotracheitis.
 J.A.V.M.A., 1968, 152, 760-761.

Mc KERCHER D.G.
 Viruses of others vertebrates.
 In : The Herpesviruses, chapter 14, pages 427-493.
 Edited by A.S. Kaplan, Academic Press inc. 1973, N.Y., London.

Mc KERCHER D.G., BIBRACK B., RICHARDS W.P.C.
 Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the central
 nervous system of cattle.
 J.A.V.M.A., 1970, 156, 1460-1467.

Mc KERCHER D.G., CRENSHAW G.L.
 Comparative efficacy of intranasally and parenterally administered
 infectious bovine rhinotracheitis vaccines.
 J.A.V.M.A., 1971, 159, 1362-1369.

Mc KERCHER D.G., MOULTON J.E., JASPER D.E.
 Virus and virus-like cattle disease entities new to California.
 Proc. 58 th Annual Meeting U.S. Livestock Sanit. Ass., 1954, p. 260.

Mc KERCHER D.G., SAITO J.K., WADA E.M., STRAUB O.
 Current status of the newer virus diseases of cattle.
 Proc. U.S. Livestock Sanit. Assoc., 1958, 62, 136-158.

Mc KERCHER D.G., STRAUB O.C., SAITO J.K., WADA E.M.
 Comparative studies of the etiological agents of infectious bovine rhino-
 tracheitis and infectious pustular vulvovaginitis.
 Can. J. Comp. Med., 1959, 23, 320-328.

Mc KERCHER D.
 The virus of
 in cattle.
 J.A.V.M.A.,

Mc KERCHER D.
 Distribution
 in experimen
 Am. J. Vet.

Mc KERCHER F.
 A compariso
 infectious p
 Part. I., St
 Can. J. Comp

Mc KERCHER F.
 A compariso
 infectious p
 Part. II., I
 Can. J. Comp

Mc NULTY M.
 Use of the
 Abstracts,
 therlands,

MADIN S.H.,
 Established
 P.S.E.B.M.,

MADIN S.H.,
 Isolation o
 SCIENCE, 19

MAO J.C.H.,
 Mode of inh
 acetate.
 BIOCHEMISTR

MAO J.C., F
 Phosphonoac
 Internation
 Abstracts o

MARE C.J.
 Susceptibi
 virus.
 J.A.V.M.A.

MARE C.J.,
 The isolat
 minary rep
 J.S. Afr.

MARKSON L.
 The reacti
 of infecti
 Brit. Vet.

- rhinotracheitis.
- Mc KERCHER D.G., WADA E.M.
The virus of infectious bovine rhinotracheitis as a cause of abortion in cattle.
J.A.V.M.A., 1964, 144, 136-142.
- Mc KERCHER D.G., WADA E.M., STRAUB O.C.
Distribution and persistence of infectious bovine rhinotracheitis virus in experimentally infected cattle.
Am. J. Vet. Res., 1963, 24, 510-514.
- on cytome-
tissue
- Mc KERCHER P.D.
A comparison of the viruses of infectious bovine rhinotracheitis (IBR), infectious pustular vulvovaginitis (IPV) and rinderpest.
Part. I., Studies of antigenic relationships.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1964a, 28, 77-88.
- Mc KERCHER P.D.
A comparison of the viruses of infectious bovine rhinotracheitis (IBR), infectious pustular vulvovaginitis (IPV) and rinderpest.
Part. II., Plaque assay.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 1964b, 28, 113-120.
- ons with
- Mc NULTY M.S.
Use of the electron microscope in veterinary viral diagnosis.
Abstracts, Fourth International Congress for Virology, The Hague, The Netherlands, 1978, International Virology IV.
- MADIN S.H., DARBY N.B.
Established Kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin.
P.S.E.B.M., 1958, 98, 574-576.
- MADIN S.H., YORK C.J., Mc KERCHER D.G.
Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus.
SCIENCE, 1956, 124, 721.
- central
- MAO J.C.H., ROBISHAW E.E.
Mode of inhibition of herpes simplex virus DNA-polymerase by phosphonoacetate.
BIOCHEMISTRY, 1975, 14, 5475-5479.
- ered
- MAO J.C., ROBISHAW E.E., OVERBY L.R.
Phosphonoacetate : an antiherpesvirus drug with unique mode of action.
International Virology 3.
Abstracts of the 3rd International Congress for Virology, 1975.
- MARE C.J.
Susceptibility of the common eland to infectious bovine rhinotracheitis virus.
J.A.V.M.A., 1971, 159, 614-616.
- 260.
- MARE C.J., VAN RENSBURG S.J.
The isolation of viruses associated with infertility in cattle : a preliminary report.
J.S. Afr. Vet. Med. Ass., 1961, 32, 201-210.
- vine rhino-
- MARKSON L.M., DARBYSHIRE J.H.
The reaction of calves to experimental infection with the Oxford strain of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Brit. Vet. J., 1966, 122, 522-530.

- MAROLT J., BRUDNJAK Z.
The viral etiology of periodic ophtalmia.
Vet. Arch., 1965, 35, 263-268.
- MAROLT J., BRUDNJAK Z., VUKELIC E., ANDRASIC N.
Specific ophtalmia of cattle.
Zbl. Vet. Med., 1963, 10A, 286-294.
- MARTEL J.L., DANNACHER G., PERRIN M., FEDIDA M., COUDERT M.
Fréquence de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (I.B.R.-I.P.V.) en France.
Rec. Méd. Vét., 1976, 152, 829-834.
- MARTIN W.B.
The Herpesviruses.
Vet. Rec., 1976, 99, 352-354.
- MASSIP A., WELLEMANS G., LEUNEN J., CHARLIER G.
Anticorps antiviraux dans le sérum sanguin de veaux nouveau-nés.
Ann. Rech. Vétér., 1974, 5 (4), 397-406.
- MATHEKA H.D., GEIS E.
Die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit tierischer Virusarten im Dichtegradienten der trägerfreien Zonenelektrophorese.
Arch. ges. Virusforsch., 1965, 15, 301-326.
- MATHEKA H.D., STRAUB O.C.
Weitere Untersuchungen zur Differenzierung des Virus der Rhinotracheitis (IBR) vom Virus des Bläschenausschlages (IPV) durch die tragerfreie Zonenelektrophorese in einem Glukose-Dichtegradienten.
Arch. ges. Virusforsch., 1972, 39, 265-273.
- MATSUOKA T., FOLKERTS T.M., GALE C.
Evaluation in calves of an inactivated bovine rhinotracheitis and parainfluenza-3 vaccine combined with Pasteurella bacterin.
J.A.V.M.A., 1972, 160, 333-337.
- MAURICE Y., PROVOST A.
Essai d'infection de chèvres tchadiennes par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. Enquête sérologique dans l'Ouest Tchadien.
Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 1970, 23, 419-423.
- MAYR A.
Bekämpfung der Crowding disease bei der Kälber-und Bullenmast.
Tierärztl. Umsch., 1976, 31, 479.
- MAYR A.
Bekämpfung der wichtigsten akuten Viruskrankheiten des Kalbes in der Bundesrepublik Deutschland.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 1978, 91, 181-186.
- MENSIK J., POSPISIL Z., SUCHANKOVA A., CEPICA A., ROZOSNY V., MACHATKOVA M.
Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis after experimental infection with parainfluenza 3 virus in young calves.
Zbl. Vet. Med., 1976, B, 23, 854-864.

MICHALSKI
Growth cha
tracheitis
P.S.E.B.M.

MICHALSKI
Malignant
bovine he
P.S.E.B.M.

MILLER N.
Infectious
J.A.V.M.A.

MILLER R.
A summary
abortion.
Can. Vet.

MIRCHAMSY
Developme
productio
Develop.

MITCHELL
An outbre
intramusc
Can. Vet.

MOHANTY S
Relations
virus of
Cornell V

MOHANTY S
Natural
J.A.V.M.A.

MOLELLO
Placenta
infected
Am. J. V

MONDINO
The use
of infec
Vet. Ita

MORETTI
Infectio
virus is
Vet. Ita

MORGAN D
Observat
and herp
J. Gen.

- MICHALSKI F.J., DIETZ A., HSIUNG G.D.
Growth characteristics of bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis) in human diploid cell strain WI-38.
P.S.E.B.M., 1976, 151, 407-410.
- MICHALSKI F., HSIUNG G.D.
Malignant transformation of hamster cells following infection with a bovine herpesvirus (infectious bovine rhinotracheitis virus).
P.S.E.B.M., 1975, 148, 891-896.
- MILLER N.J.
Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle.
J.A.V.M.A., 1955, 126, 463-467.
- MILLER R.B.
A summary of some of the pathogenetic mechanisms involved in bovine abortion.
Can. Vet. Jour., 1977, 18, 87-95.
- MIRCHAMSY H., BAHRAMI S., KAMALI M., HAZRATI A., SHAFY I.
Development of a diploid cell line from fetal calf lung for virus vaccine production.
Develop. Biol. Standard., 1977, 37, 53-57.
- MITCHELL D.
An outbreak of abortion in a dairy herd following inoculation with an intramuscular infectious bovine rhinotracheitis vaccine.
Can. Vet. J., 1974, 15, 148-151.
- MOHANTY S.B., LILLIE M.G.
Relationship of infectious bovine keratoconjunctivitis virus to the virus of infectious bovine rhinotracheitis.
Cornell Vet., 1970, 60, 3-9.
- MOHANTY S.B., LILLIE M.G., CORSELIUS N.P., BECK J.D.
Natural infection with infectious bovine rhinotracheitis in goats.
J.A.V.M.A., 1972, 160, 879-880.
- MOLELLO J.A., CHOW T.L., OWEN N., JENSEN R.
Placental pathology : V. Placental lesions of cattle experimentally infected with infectious bovine rhinotracheitis virus.
Am. J. Vet. Res., 1966, 27, 907-915.
- MONDINO G., CUPI R.M., ORFEI Z.
The use of methylcellulose in the production of plaques by the virus of infectious bovine rhinotracheitis.
Vet. Ital., 1964, 15, 671-676.
- MORETTI B., ORFEI Z., MONDINO G., PERSECHINO A.
Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) : Clinical observations and virus isolation.
Vet. Ital. 1964, 15, 691-702.
- MORGAN D.G.
Observations on the antigenic relationships between Epstein-Barr virus and herpesvirus Saimiri.
J. Gen. Virol., 1977, 36, 281-187.

MULLER L.D., BEARDSLEY G.L., ELLIS R.P., REED D.E., OWENS M.J.
Calf response to the initiation of parturition in dairy cows with
dexamethasone or dexamethasone with estradiol benzoate.
J. Anim. Science, 1975, 41, 1711.

MUNDAY B.L.
Res. Bull. N°5, 1966, Tasmania Department of Agriculture.

MUNK K., LUDWIG G.
Properties of plaque variants of herpes virus hominis strains of genital
origin.
Archiv. ges. Virusforsch., 1972, 37, 308-315.

MURRAY B.K., BISWAL N.
Synthesis of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) DNA in isolated nuclei.
II. Covalent linkage of RNA to nascent viral DNA.
INTERVIROLOGY, 1974, 4, 14-22.

MUURLING F., HELDER A.W., ROEST G., KROLL O.
Het voorkomen van antistoffen tegen IBR/IPV bij runderen in de omgeving
van Leiden.
Tijdschr. Diergeneesk., 1976, 101, 1263-1264.

NAHMIAS A.J.
Herpesviruses
A search for
In Pathobiolo
H. Joachim, E
New York, App

NAHMIAS A.J.
The evolution
Tiré de : VIR
Edited by Edo
N.Y., San Fra

NARITA M., IN
Trigeminal ga
lated with in
J. Comp. Path

NARITA M., IN
Neural change
rhinotrachei
J. Comp. Pat

NARITA M., IN
Neural change
tious bovine
J. Comp. Pat

NARITA M., I
Neural change
virus in cal
Am. J. Vet.

NAYAR P.S.G.
Infectious b
I. Experime
Can J. Comp.

NAYAR P.S.G.
Infectious b
II. Antibod
tally infect
Can. J. Comp

NELSON R.D.
Effects of f
epithelium
Am. J. Vet.

NELSON D.R.
Infectious
Am. J. Vet.

NII S., YAS
Electron mi
simplex vir
Biken Journ

NAHMIAS A.J.

Herpesviruses from fish to man.

A search for pathobiologic unity.

In Pathobiology Annual.

H. Joachim, Editor, p.p. 153-182.

New York, Appleton, 1972.

NAHMIAS A.J.

The evolution (Evovirology) of herpesviruses.

Tiré de : VIRUSES, EVOLUTION and CANCER.

Edited by Edouard Kurstak et Karl Maramorosch : Academic Press, inc.,

N.Y., San Francisco, London, 1974, 605 à 624.

NARITA M., INUI S., NAMBA K., SHIMIZU Y.

Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus.

J. Comp. Path., 1976, 86, 93-100.

NARITA M., INUI S., NAMBA K., SHIMIZU Y.

Neural changes in calves intravaginally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus.

J. Comp. Path., 1978a, 88, 381-386.

NARITA M., INUI S., NAMBA K., SHIMIZU Y.

Neural changes in calves after intraconjunctival inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus.

J. Comp. Path., 1978b, 88, 387-394.

NARITA M., INUI S., NAMBA K., SHIMIZU Y.

Neural changes in recurrent infection of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves treated with dexamethasone.

Am. J. Vet. Res., 1978c, 39, 1399-1403.

NAYAR P.S.G., SAUNDERS J.R.

Infectious bovine keratoconjunctivitis.

I. Experimental production.

Can J. Comp. Med., 1975a, 39, 22-31.

NAYAR P.S.G., SAUNDERS J.R.

Infectious bovine keratoconjunctivitis.

II. Antibodies in lacrimal secretions of cattle naturally or experimentally infected with Moraxella bovis.

Can. J. Comp. Med., 1975b, 39, 32-40.

NELSON R.D.

Effects of infectious bovine rhinotracheitis virus on bovine tracheal epithelium : a scanning electron microscopic study.

Am. J. Vet. Res., 1974, 35, 831-833.

NELSON D.R., MARE C.J., GLOCK R.D.

Infectious bovine rhinotracheitis (herpesvirus bovis) infection in swine.

Am. J. Vet. Res., 1972, 33, 1209-1215.

NII S., YASUDA I.

Electron microscopic observations of FL cells infected with herpes simplex virus. III. Dense bodies.

Biken Journal, 1976, 19, 53-61.

OAKES J.E., ROSEMOND-HORNBEAK H.
Antibody-Mediated recovery from subcutaneous herpes simplex virus type 2 infection.
Infect. Immun., 1978, 21, 489-495.

OBERG B., HELGSTRAND E.
The antiviral activity of trisodium phosphonoformate.
Internat. Virol. IV, Centre for Agricultural Publishing and Documentations, Wageningen, 1978, Abstr. W4/4.

O'CALLAGHAN D.J., RANDALL C.C.
Molecular anatomy of herpesviruses : recent studies.
Prog. Med. Virol., 1976, 22, 152-210.

ONSTAD O., SAXEGAARD F.
Outbreaks of vaginitis and balanitis in swine. Clinical and pathological findings.
Nord. Vet. Med., 1967, 19, 49-53.

ORMEROD E., JARRET O.
A classification of feline calicivirus isolates based on plaque morphology.
J. Gen. Virol., 1978, 39, 537.

ORSI E.V., CABASSO V.J.
Infectious bovine rhinotracheitis (IBR).
IV. Cytological changes in infected bovine kidney and Hela cultures.
P.S.E.B.M., 1958, 98, 637-639.

OVERBY L.R., ROBISHAW E.E., SCHLEICHER J.B., RUETER A., SHIPKOWITZ N.L., MAO J.C.H.
Inhibition of herpes simplex virus replication by phosphonoacetic acid.
Antimicrob. Ag. chemother., 1974, 6, 360-365.

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

OWEN N.V., CHOW T.L., MOLELLO J.A.
Infectious bovine rhinotracheitis : correlation of fetal and placental lesions with viral isolations.
Am. J. Vet. Res., 1968a, 29, 1959-1965.

OWEN N.V., CHOW T.L., MOLELLO J.A.
Infectious bovine rhinotracheitis : relationship of level of maternal antibody titer to incidence of fetal death and abortion.
Am. J. Vet. Res., 1968b, 29, 1967-1970.

PARSONSON I.
Infectious p
Aust. Vet. J.

PARSONSON I.
The effect
or semen con
Aust. Vet. J.

PASTORET P.
Comparison o
Abstracts In

PASTORET P.
SCHOENAERS I.
Effect of re
of infectio
Vet. Microb

PASTORET P.
Mesure de l
après inje
Ann. Méd. V

PASTORET P.
Le virus de
Ann. Méd. V

PASTORET P.
Reactivation
infectious
Infect. Imm

PASTORET P.
SCHOENAERS
Comparison
(Bovid herp
acrylamide
Vet. Microb

PASTORET P.
Mesure de l
après inoc
Ann. Méd. V

PASTORET P.
Structural
C.270 page
Virology -

PASTORET P.
Standardiz
Acta. Viro

rus

PARSONSON I.M.
Infectious pustular vulvovaginitis in dairy cattle in Victoria.
Aust. Vet. J., 1964, 40, 257-260.

documenta-

PARSONSON I.M., SNOWDON W.A.
The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with,
or semen contaminated with IBR virus.
Aust. Vet. J., 1975, 51, 365-369.

pathological

PASTORET P.P., AGUILAR-SETIEN A., BURTONBOY G., LAMY M.E., SCHOENAERS F.
Comparison of several strains of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Abstracts International Virology IV, The Hague, 1978d, p. 526.

PASTORET P.P., AGUILAR-SETIEN A., BURTONBOY G., MAGER J., JETTEUR P.,
SCHOENAERS F.
Effect of repeated treatment with dexamethasone on the reexcretion pattern
of infectious bovine rhinotracheitis virus and humoral immune response.
Vet. Microbiol., 1979a, 4, 149.

ne morphology.

PASTORET P.P., AGUILAR-SETIEN A., BURTONBOY G., SCHOENAERS F.
Mesure de la réexcrétion du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine
après injection de dexaméthasone.
Ann. Méd. Vét., 1978b, 122, 449-456.

ltures.

PASTORET P.P., AGUILAR-SETIEN A., SCHOENAERS F.
Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*).
Ann. Méd. Vét., 1978c, 122, 371-391.

WITZ N.L.,

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., 1980a, 29, 483-488.

etic acid.

vine rhino-

PASTORET P.P., BURTONBOY G., AGUILAR-SETIEN A., GODART M., LAMY M.E.,
SCHOENAERS F.
Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus
(*Bovid herpesvirus 1*) from respiratory and genital origins, using poly-
acrylamide gel electrophoresis of structural proteins.
Vet. Microbiol., 1980b, 5, 187-194.

lacental

PASTORET P.P., BURTONBOY G., AGUILAR-SETIEN A., SCHOENAERS F.
Mesure de l'excrétion du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine
après inoculation expérimentale.
Ann. Méd. Vét., 1978a, 122, 441-447.

maternal

PASTORET P.P., BURTONBOY G., LAMY M.E., SCHOENAERS F.
Structural proteins of enveloped infectious bovine rhinotracheitis virus.
C.270 page 248, Abstracts of the 3rd. International Congress for
Virology - MADRID, 10-17 septembre 1975.

PASTORET P.P., BURTONBOY G., LAMY M.E., VAN DIJCK M.Cl., SCHOENAERS F.
Standardized method of sendai virus production for biological assays.
Acta. Virol., 1976, 20, 429-431.

- PASTORET P.P., JETTEUR P., AGUILAR-SETIEN A., LEROY P., SCHWERS A.,
GODART M., SCHOENAERS F.
Effet de la dexaméthasone sur le titre et la taille des plages du virus
de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*, IBR).
Ann. Méd. Vét., 1979c, 123, 397.
- PAVAN P.R., ENNIS F.A.
The elimination of herpes simplex plaques by antibody and the emergence
of resistant strains.
J. Immunol., 1977, 118, 2167-2175.
- PENSAERT M., OYAERT W., DE MEURICHY W.
Ademhalingsstoornissen bij mestrunderen in België veroorzaakt door
het infectieuze bovine rhinotracheitis virus.
I. Klinische waarnemingen.
Vlaams Diergeneesk. Tijdschr. 1972, 41, 222-229.
- PEREIRA L., CASSAI E., HONESS R.W., ROIZMAN B., TERNI M., NAHMIAS A.
Variability in the structural polypeptides of simplex virus 1
strains : potential application in molecular epidemiology.
Infect. Immun., 1976, 13, 211-220.
- PERSECHINO A., MERUCCI P., ORFEI Z.
Patogenicita del virus della rinotracheite infettiva del bovino (IBR)
su animali de laboratorio.
La Nuova Veterinaria, 1965, 41, 213-222.
- PERSECHINO A., ORFEI Z.
Activity of 5-Iodo-2'-deoxyuridine on infectious bovine rhinotracheitis
virus-in vitro and in vivo studies.
Arch. ges. Virusforsch., 1965, 17, 116-124.
- PHILLIP J.I.H.
Bovine respiratory disease : is control possible ?
Vet. Rec., 1972, 90, 552-555.
- PIGNATTI P.F., CASSAI E., MENEGUZZI G., CHENCINER N., MILANESI G.
Herpes simplex virus DNA isolation from infected cells with a novel
procedure.
VIROLOGY, 1979, 93, 260-264.
- PLUMMER G.
Serological comparison of the herpes viruses.
Br. J. Exp. Pathol., 1964, 45, 135-141.
- PLUMMER G.
Comparative virology of the Herpesgroup.
Progr. Med. Virol., 1967, 9, 302-340.
- PLUMMER G., GOODHEART C.R., HENSON D., BOWLING C.P.
A comparative study of the DNA density and behavior in tissue cultures of
fourteen different herpesviruses.
VIROLOGY, 1969, 39, 134-137.
- PLUMMER G., HOLLINGSWORTH D.C., PHUANGSAB A., BOWLING C.P.
Chronic infections by herpes simplex viruses and by the horse and cat
herpesviruses.
Infect. Immun., 1970, 1, 351-355.
- PORTER D.D., LARSEN A.E., COX N.A.
Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from Mustelidae.
J. Clin. Microbiol., 1975, 1, 112-113.

POSPISIL Z., M
Demonstration
cheitis virus
and horseradish
Acta Vet. Brn
POTGIETER L.N.
Differentiation
by neutralization
Infect. Immun
PRICE R.W., S
Reactivation of
nervous system
Infect. Immun
PUGA A., ROSE
Herpes simplex
infected trigem
VIROLOGY, 197

RS A.,

s du virus
(IBR).

emergence

door

MIAS A.
virus 1

no (IBR)

tracheitis

I G.
novel

cultures of

and cat

elidae.

POSPISIL Z., MACHATKOVA M., ROZKOSNY V., MENSIK J.

Demonstration of parainfluenza-3 virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine foetal organ cultures by immunofluorescence and horseradish peroxidase techniques.
Acta Vet. Brno., 1975, 44, 189-195.

POTGIETER L.N.D., MARE C.J.

Differentiation of strains of infectious bovine rhinotracheitis virus by neutralization kinetics with late 19S rabbit antibodies.
Infect. Immun., 1974, 10, 520-527.

PRICE R.W., SCHMITZ J.

Reactivation of latent herpes simplex virus infection of the autonomic nervous system by postganglionic neurectomy.
Infect. Immun., 1978, 19, 523.

PUGA A., ROSENTHAL J.D., OPENSHAW H., NOTKINS A.L.

Herpes simplex virus DNA and mRNA sequences in acutely and chronically infected trigeminal ganglia of mice.
VIROLOGY, 1978, 89, 102-111.

QUIN A.H.
Conjunctivitis caused by IBR virus.
Vet. Med., 1961, 56, 192-193.

RAJCANI J., C.
Activation of
trigeminal ga
Archiv. Virol

RAMPTON C.S.,
The prevalence
in some game
J. Wildl. Dis

RAPP F.
Variants of I
factors infl
J. Bact., 19

REBHUN W.C.,
An outbreak
Cornell Vet.

REED D.E., B
Systemic for
J.A.V.M.A.,

REISINGER L.
Beitrag zur
Wien. Tierärz

RENO J.M., I
Inhibition o
merase by pl
Antimicrob.

ROBERTS A.W.
Infectious
cow with ma
J.A.V.M.A.,

ROIZMAN B.
An inquiry
Perspect. V

ROIZMAN B.
The Herpesv
Current top
1969, 49, 1
Springer-Ver

- RAJCANI J., CIAMPOR F., SABO A., LIBIKOVA H., ROSENBERGOVA M.
Activation of latent herpesvirus hominis in explants of rabbit
trigeminal ganglia : the influence of immune serum.
Archiv. Virol., 1977, 53, 55-69.
- RAMPTON C.S., JESSETT D.M.
The prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus
in some game animals of East Africa.
J. Wildl. Dis., 1976, 12, 2-6.
- RAPP F.
Variants of herpes simplex virus : isolation, characterization, and
factors influencing plaque formation.
J. Bact., 1963, 86, 985-991.
- REBHUN W.C., SMITH J.S., POST J.E., HOLDEN H.R.
An outbreak of the conjunctival form of infectious bovine rhinotracheitis.
Cornell Vet., 1978, 68, 297-307.
- REED D.E., BICKWELL E.J., BURY R.J.
Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves.
J.A.V.M.A., 1973, 163, 753-755.
- REISINGER L., REIMANN H.
Beitrag zur Ätiologie des Bläschenausschlages des Rindes.
Wien. Tierärztl. Mschr., 1928, 15, 249-261.
- RENO J.M., LEE L.F., BOEZI J.A.
Inhibition of herpesvirus replication and herpesvirus-induced DNA-poly-
merase by phosphonoformate.
Antimicrob. Ag. Chemother., 1978, 13, 188.
- ROBERTS A.W., CARTER G.R.
Infectious bovine rhinotracheitis virus recovered from the milk of a
cow with mastitis.
J.A.V.M.A., 1974, 164, 413.
- ROIZMAN B.
An inquiry into the mechanism of recurrent herpes infections of man.
Perspect. Virol., 1965, 4, 283-301.
- ROIZMAN B.
The Herpesviruses, - a biochemical definition of the group.
Current topics in Microbiology and Immunology.
1969, 49, 1-79.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New-York.

ROIZMAN B., BARTHA A., BIGGS P.M., CARMICHAEL L.E., GRANOFF A.,
HAMPAR B., KAPLAN A.S., MELENDEZ L.V., MUNK K., NAHMIAS A., PLUMMER G.,
RAJCANI J., RAPP F., TERNI M., DE THE G., WATSON D.H., WILDY P.
Provisional labels for herpesviruses.
J. Gen. Virol., 1973, 20, 417-419.

ROIZMAN B., FURLONG D.
The replication of herpesviruses.
In comprehensive Virology, volume 3, Chapter 4, pages 229-403.
Edited by H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner.
Plenum Press, 1974, New-York.

ROSNER S.F.
Complication following vaccination of cattle against infectious bovine
rhinotracheitis, bovine viral diarrhea-mucosal disease, and parainfluenza type 3.
J.A.V.M.A., 1968a, 152, 898-902.

ROSNER S.F.
Infectious bovine rhinotracheitis. A clinical review, immunity and control.
J.A.V.M.A., 1968b, 153, 1631-1638.

ROSSI C.R., KIESEL G.K.
Susceptibility of bovine macrophage and tracheal-ring cultures to bovine viruses.
Am. J. Vet. Res., 1977, 38, 1705-1708.

ROUBAL J.
Cytosine-arabinside does not inhibit incorporation of ³H-Thymidine in herpes simplex virus transformed cells.
Archiv. Virol., 1977, 53, 255-259.

ROUHANDEH H.
Propagation of infectious bovine rhinotracheitis virus in monkey kidney tissue culture cells.
NATURE, 1963, 200, 386-387.

ROUHANDEH H., BRINKMAN M.L., SELLS L.L.
Reactivation of ether-inactivated infectious bovine rhinotracheitis virus.
The Journal of infectious diseases, 1967, 117, 237-241.

ROUHANDEH H., WERDER A.A.
Plaque production by infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus on primary cells and established mammalian cell lines.
Bac. Proc., 1961, 61, 149.

ROUSE B.T., BABIUK L.A.
Host responses to infectious bovine rhinotracheitis virus III.
Isolation and Immunological activities of bovine T lymphocytes.
J. Immunol., 1974, 113, 1391-1398.

ROUSE B.T., WARDLEY R.C., BABIUK L.A.
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in cows : Comparison of effector cell activity against heterologous erythrocytes and herpesvirus infected bovine target cells.
Infect. Immun., 1976, 13, 1433-1441.

RUSSELL W.C.
Properties
VIROLOGY, 1
RWEYEMAMU M
Probable oc
Tanzania in
NATURE, 197
RWEYEMAMU M
The inciden
tanzanian g
Bulletin de

.,
LUMMER G.,
P.

RUSSELL W.C., CRAWFORD L.V.
Properties of the nucleic acids from some herpes group viruses.
VIROLOGY, 1964, 22, 288-292.

RWEYEMAMU M.M.
Probable occurrence of infectious bovine rhinotracheitis virus in
Tanzania in wildlife and cattle.
NATURE, 1970, 225, 738-739.

RWEYEMAMU M.M.
The incidence of infectious bovine rhinotracheitis antibody in
tanzanian game animals and cattle.
Bulletin des épizooties en Afrique, 1974, 22, 19-22.

us bovine
arainflu-

ty and

s to bovine

midine in

key

neitis

virus on

s.

vision of
herpesvirus

SABINA L.R.

Studies of infectious bovine rhinotracheitis virus.

II. Effect of metabolic inhibitors on virus multiplication.

Can. J. Microbiol., 1965, 11, 887-892.

SABINA L.R., PARKER R.C.

Studies of infectious bovine rhinotracheitis virus.

I. Plaque assay and some characteristics in bovine kidney cells.

Can. J. Microbiol., 1963, 9, 567-576.

St GEORGES T.D.

Keratoconjunctivitis associated with infectious bovine rhinotracheitis infection in Victorian Cattle.

Aust. Vet. J., 1965, 41, 222.

St GEORGES T.D., PHILPOTT M.

Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia.

Aust. Vet. J., 1972, 48, 126.

SAITO J.K., GRIBBLE D.H., BERRIOS P.E., KNIGHT H.D., Mc KERCHER D.G.

A new herpesvirus isolate from goats : preliminary report.

Am. J. Vet. Res., 1974, 35, 847-848.

SAMPSON G.R., GALE C., ELLISTON N.G., GRUETER H.P., Mc ASKILL J.W., TONKINSON L.V.

Bovine rhinotracheitis/parainfluenza-3 vaccine, with pasteurized bacterin as the diluent.

VM/SAC, 1972, 67, 899-902.

SATTAR S.A., BOHL E.H., TRAPP A.L.

Abortion in cattle caused by experimental infection with infectious bovine rhinotracheitis virus.

Cornell Vet., 1967, 57, 438-454.

SAUNDERS J.R., OLSON S.M., RADOSTITS O.M.

Efficacy of an intramuscular infectious bovine rhinotracheitis vaccine against abortion due to the virus.

Can. Vet. J., 1972, 13, 273-278.

SAXEGAARD F.

Problems connected with the diagnosis of subclinical infection with infectious pustular vulvovaginitis virus (IPV Virus) in bulls.

Nord. Vet. Med., 1966, 18, 452-459.

SAXEGAARD F.

Serological investigations of bulls subclinically infected with infectious pustular vulvovaginitis virus (IPV Virus).

Nord. Vet. Med., 1968, 20, 28-32.

SAXEGAARD F.

Infectious Bovine Rhinotracheitis / Infectious Pustular Vulvovaginitis (IBR/IPV) Virus in cattle with particular reference to genital infections.

Vet. Bull., 1970, 40, 605-611.

SAXEGAARD F., ONSTAD O.

Isolation and identification of IBR-IPV virus from cases of vaginitis and balanitis in swine and from healthy swine.

Nord. Vet. Med., 1967, 19, 54-57.

SCHAFFER

Tempera

Current

SCHAFFER

Collabo

herpes

J. Viro

SCHELL

The ant

Cornell

SCHIMME

Entwick

aus Rin

Zent. V

SCHIPPE

Infecti

North I

SCHIPPE

Shippin

admini

Can. V

SCHIPPE

Evaluat

Can. J

SCHMID

Fluoro

J. Vir

SCHNEW

Biolog

simple

Archiv

SCHROE

An acu

J.A.V.

SCHULT

Curren

Unite

Miami

SCHUL

Elekt

des R

Arch.

SCHUL

Die F

des B

bovis

Arch.

SCHAFFER P.A.

Temperature sensitive mutants of herpesviruses.

Current topics in microbiology and immunology, 1975, 70, 51-100.

SCHAFFER P.A., CARTER V.C., TIMBURY M.C.

Collaborative complementation study of temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus types 1 and 2.

J. Virol., 1978, 27, 490-504.

SHELL K., SANDERSON R.P., WHALEN J.W., BITTLE J.L.

The antigenicity of multivalent vaccines for bovine respiratory disease.

Cornell Vet., 1972, 62, 101-109.

SCHIMMELPFENNIG H., LIESS B.

Entwicklung und Histochemie der Kerneinschlußkörperchen in Gewebekulturen aus Rinderhodenzellen bei der Rhinotracheitis infectiosa des Rindes.

Zent. Vet. Med., 1961, 8, 461-472.

SCHIPPER I.A., KELLING C.L.

Infectious keratitis in feeder cattle.

North Dakota Farm Research, 1970, 27, 19-20.

SCHIPPER I.A., KELLING C.L.

Shipping fever prophylaxis : comparison of vaccine and antibiotics administered following weaning.

Can. Vet. Jour., 1971, 12, 172-173.

SCHIPPER I.A., KELLING C.L.

Evaluation of inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines.

Can. J. Comp. Med., 1975, 39, 402-405.

SCHMIDT M.F.G., SCHWARZ R.T., LUDWIG H.

Fluorosugars inhibit biological properties of different enveloped viruses.

J. Virol., 1976, 18, 819-823.

SCHNEWEIS K.E., SOMMERHAUSER H., HUBER D.

Biologic and immunologic comparison of two plaque variants of herpes simplex virus type 1.

Archiv. ges. Virusforsch., 1972, 38, 338-346.

SCHROEDER R.J., MOYS M.D.

An acute respiratory infection of dairy cattle.

J.A.V.M.A., 1954, 125, 471-472.

SCHULTZ R.D., HALL C.E., SHEFFY B.E., KAHRS R.F., BEAN B.H.

Current status of IBR-IPV virus infection in bulls.

United States Animal Health Association's 80th Annual Meeting, Miami Beach, Florida, 1976.

SCHULZE P., HAHNEFELD E., HAHNEFELD H.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Virus des Bläschenausschlages des Rindes (Exanthema Coitale vesiculosum bovis) in der Gewebekultur.

Arch. exper. Vet. Med., 1963, XVII, 375-390.

SCHULZE P., HAHNEFELD H., HANTSCHER H., HAHNEFELD E.

Die Feinstruktur des Viren der infektiösen bovinen Rhinotracheitis und des Bläschenausschlages des Rindes (Exanthema coitale vesiculosum bovis).

Arch. exper. Vet. Med., 1964, 18, 417-425.

SCHWARZ A.J.F., YORK C.J., ZIRBEL L.W., ESTELA L.A.
Modification of infectious bovine rhinotracheitis virus in tissue culture and development of a vaccine.
P.S.E.B.M., 1957, 96, 453-458.

SCHWARZ A.J.F., ZIRBEL L.W., ESTELA L.A., YORK C.J.
Propagation and modification of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus in porcine kidney tissue culture.
P.S.E.B.M., 1958, 97, 680-683.

SCHWERS A., PASTORET P.P., LEROY P., VINDEVOGEL H., AGUILAR-SETIEN A., VERHEYDEN A.
Sensibilité au phosphonoformate de différentes souches du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (*Bovid herpesvirus 1*).
Ann. Méd. Vét., 1980b, 124, 271-279.

SCHWERS A., PASTORET P.P., VINDEVOGEL H., LEROY P., AGUILAR-SETIEN A., GODART M.
Comparison of the effect of trisodium phosphonoformate on the mean plaque size of pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus.
J. Comp. Path., 1980a, 90, 625-633.

SHAPIRO A.S., VINUELA E., MAIZEL J.V.
Molecular weight estimation of polypeptides chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochemical and biophysical research communications, 1967, 28, 815-820.

SHEFFY B.E., DAVIES D.H.
Reactivation of a bovine herpes virus after corticosteroid treatment.
P.S.E.B.M., 1972, 140, 974-976.

SHEFFY B.E., KRINSKY M.
IBR in extended bovine semen.
Proc. 77th Ann. U.S.A.H.A. Meeting, 1973.

SHEFFY B.E., RODMAN S.
Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis infection.
J.A.V.M.A., 1973, 163, 850-851.

SHINKAI K.
Plaque morphology of herpes simplex virus in various cells under liquid overlay as a marker of its type differentiation.
Japan.J. Microbiol., 1975, 19, 459-462.

SHROYER E.L., EASTERDAY B.C.
Growth of infectious bovine rhinotracheitis virus in organ cultures.
Am. J. Vet. Res., 1968, 29, 1355-1362.

SHROYER E.
Studies on
following
Cornell Ve

SILVA R.P.
An electro
Bovine Kid
J. Comp. P

SKARE J.,
Structure
I. Compar
DNA with
J. Virol.

SKLYANSKY
Structural
Acta Virol

SKODA R.,
Immunisier
aus zwei
Zbl. Vet.

SKODA R.,
Small pla
Acta Virol

SMID B.,
Freeze-Et
in the nu
Archiv. V

SMITH J.D.
Herpes si
I. Sequen
J. Virol.

SMITH J.D.
Herpes si
III. Cyto
J. Virol.

SMITH K.C.
Some bio
of 5-Iodo
The Journ

SMITH K.C.
Identific
Cancer Re
Harris B

SMITH K.C.
Effects o
survival
The Journ

- SHROYER E.L., EASTERDAY B.C.
Studies on the pathogenesis of infectious bovine rhinotracheitis following aerosol exposure.
Cornell Vet., 1968, 58, 442-460.
- SILVA R.F., AMBORSKI R.L., WHITE M.R., AMBORSKI G.F.
An electron microscopic study of a single-cycle infection of Madin-Darby Bovine Kidney cells by infectious bovine rhinotracheitis virus.
J. Comp. Path., 1973, 83, 161-172.
- SKARE J., SUMMERS W.P., SUMMERS W.C.
Structure and function of herpesvirus genomes.
I. Comparison of five HSV-1 and two HSV-2 strains by cleavage of their DNA with Eco RI restriction endonuclease.
J. Virol., 1975, 15, 726-732.
- SKLYANSKAYA E.I., ITKIN Z.B., GOPMAN Y.P., KAVERIN N.V.
Structural proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Acta Virol., 1977, 21, 273-279.
- SKODA R., JAKUBIK J.
Immunisierung von Schweinen mit Aujeszkyvirus-Vakzinen, hergestellt aus zwei Plaquevarianten des Virus.
Zbl. Vet. Med. B, 1974, 21, 234-241.
- SKODA R., JAMRICHOVA O.
Small plaque variants of pseudorabies virus in chick embryo cell cultures.
Acta Virol., 1965, 9, 94.
- SMID B., VALICEK L., NECAS O.
Freeze-Etching observations on infectious bovine rhinotracheitis virus in the nucleus of bovine kidney cells.
Archiv. Virol., 1977, 53, 167-170.
- SMITH J.D., De HARVEN E.
Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. I. Sequence of viral replication.
J. Virol., 1973, 12, 919-930.
- SMITH J.D., De HARVEN E.
Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. III. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in infected cells.
J. Virol., 1978, 26, 102-109.
- SMITH K.O.
Some biologic aspects of herpesvirus-cell interactions in the presence of 5-Iodo-2-Desoxyuridine (IDU).
The Journal of Immunology, 1963, 91, 582-590.
- SMITH K.O.
Identification of viruses by electron microscopy., 1967.
Cancer Research, 1, chap. X.
Harris Busch A.P. ed.
- SMITH K.O., DUKES C.D.
Effects of 5-Iodo-2-Desoxyuridine (IDU) on herpesvirus synthesis and survival in infected cells.
The Journal of Immunology, 1964, 92, 550-554.

SMITH M.W., MILLER R.B., SVOBODA I., LAWSON K.F.
Efficacy of an intranasal infectious bovine rhinotracheitis vaccine
for the prevention of abortion in cattle.
Can. Vet. J., 1978, 19, 63-71.

SMITH P.C.
Experimental infectious bovine rhinotracheitis virus infections of
English Ferrets (*Mustela putorius furo* L.).
Am. J. Vet. Res., 1978, 39, 1369-1372.

SNOWDON W.A.
Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis
in australian cattle.
Aust. Vet. J., 1964, 40, 277-288.

SNOWDON W.A.
The IBR-IPV virus : reaction to infection and intermittent recovery
of virus from experimentally infected cattle.
Aust. Vet. J., 1965, 41, 135-142.

SOLBERG I.M.
Neutralising antibody to infectious bovine rhinotracheitis/infectious
pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in foetal calf serum.
Acta Vet. Scand., 1975, 16, 549-550.

SPEAR P.G., ROIZMAN B.
Proteins specified by herpes simplex virus.
V. Purification and structural proteins of the herpesvirion.
J. Virol., 1972, 9, 143-159.

STAUBER E.H., NELLIS C.H., MAGONIGLE R.A., VAUGHN H.W.
Prevalence of reactors to selected livestock pathogens in Idaho mule deer.
J. Wildl. Mgmt., 1977, 41, 515-519.

STENBERG K., LARSSON A.
Reversible effect on cellular metabolism and proliferation by trisodium
phosphonoformate.
Antimicrob. Ag. Chemother., 1978, 14, 727.

STERZ H., LUDWIG H., ROTT R.
Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and
bovine herpes mammillitis virus.
INTERVIROLOGY, 1974, 2, 1-13.

STEVELY W.S.
Virus-induced proteins in pseudorabies-infected cells.
II. Proteins of the virion and nucleocapsid.
J. Virol., 1975, 16, 944-950.

STEVENS J.G., COOK M.L.
Latent infections induced by herpes simplex viruses.
Cancer Research., 1973, 33, 1399-1401.

STEVENS J.G., COOK M.L.
Maintenance of latent herpetic infection : an apparent role for
anti-viral IgG.
J. Immunol., 1974, 113, 1685-1693.

STEVENS J.G.
Effects of
rhinotracheitis
P.S.E.B.M.

STEVENS J.G.
Properties
virus-cell
Am. J. Vet.

STEVENS J.G.
Infectious
plaque for
J. Bacteriol.

STEVENS J.G.
Studies on
replication
VIROLOGY,

STOJKOVIC
Investigation
infectious
Acta Veterinaria

STORCH.
Dtsch. tierärztliche

STRAUB O.
In vitro
auf ein Zoonose
(Rhinotracheitis)
Tierärztliche

STRAUB O.
Abortion
virus.
Dtsch. tierärztliche

STRAUB O.
Zur Übertragung
Rapports
Jugoslavien

STRAUB O.
Les possibilités
Bull. Officiel

STRAUB O.
The altered
prophylaxis
Berl. Monatsschrift

STRAUB O.
Vorkommen
möglichst
Kontinuität
Dtsch.

STEVENSON J.G., CHOW T.L.

Effects of some fixatives on inclusion bodies of infectious bovine rhinotracheitis.

P.S.E.B.M., 1959, 100, 856-859.

STEVENSON J.G., GROMAN N.B.

Properties of infectious bovine rhinotracheitis virus in a quantitated virus-cell culture system.

Am. J. Vet. Res., 1963, 24, 1158-1163.

STEVENSON J.G., GROMAN N.B.

Infectious bovine rhinotracheitis virus replication, cytopathology, and plaque formation in the presence and absence of nucleic acid analogues.

J. Bacteriol., 1964, 87, 446-453.

STEVENSON J.G., JACKSON N.L.

Studies on a temperature sensitive step essential to herpesvirus DNA replication.

VIROLOGY, 1967, 32, 654-661.

STOJKOVIC-ATANACKOVIC M.R.

Investigation of some properties of domestic strains of the virus of infectious bovine rhinotracheitis (IBR).

Acta Veterinaria, 1967, XVII, 4, 491-500.

STORCH.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 1910, 18, 130.

STRAUB O.C.

In vitro-Untersuchungen über die Wirkung einiger Desinfektionsmittel auf ein zur Herpesgruppe gehören des Virus der IBR-IPV-Virusgruppe (Rhinotracheitis-und Bläschenausschlagviren der Rinder).

Tierärztl. Umsch. 1965, 20, 568-573.

STRAUB O.C.

Abortion experimentally produced by bovine coital vesicular exanthema virus.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 1966, 73, 286-288.

STRAUB O.C.

Zur Übertragung viraler antikörper durch das Kolostrum.

Rapports du V. International meeting on diseases of cattle. Yugoslavia, 1968.

STRAUB O.C.

Les possibilités de mise en oeuvre de vaccins anti IBR/IPV.

Bull. Off. int. Epiz., 1975, 84, 83-93.

STRAUB O.C.

The alternate application of inactivated and live IBR-IPV vaccine for prophylactic purposes.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., 1977, 90, 273-276.

STRAUB O.C.

Vorkommen der durch IBR-IPV - Viren hervorgerufenen Krankheiten und mögliche differential diagnostische Probleme in den verschiedenen Kontinenten und deren Ländern.

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 1978, 85, 77-112.



STRAUB O.C., AHL R.
Lokale Interferonbildung beim Rind nach intranasaler Infektion mit avirulentem IBR-IPV - Virus und deren Wirkung auf eine anschließende Infektion mit Maul und Klauenseuche - Virus.
Zbl. Vet. Med. B., 1976, 23, 470-482.

STRAUB O.C., BOHM H.O.
Untersuchungen über die Lokalisation und Persistenz des Virus des infektiösen Rhinotracheitis und des Bläschenausschlages in experimentelle infizierten Rindern.
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr., 1964, 77, 458-462.

STRAUB O.C., BOHM H.O.
Experimentelle Infektionen des Zentralnervensystem durch das Virus der Bovinen Rhinotracheitis.
Dtsch. Tierärztl. Wschr., 1965, 72, 124-128.

STRAUB O.C., KIELWEIN G.
Experimentelle Mastitiden durch das Bläschenausschlagvirus des Rindes.
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr., 1966, 79, 310.

STRAUB O.C., MACKLE N.
Ein Ausbruch des Bläschenausschlages in einer Besamungsstation.
Tierärztl. Umsch., 1965, 20, 113-116.

STRAUB O.C., MATHEKA H.D., STROHMAIER K.
Die differenzierung des Virus der Rhinotracheitis (IBR) vom Virus des Bläschenausschlages (IPV) durch die trägerfreie Virus-Zonenelektrophorese in einem Glukose-Dichtegradientem.
Zbl. Vet. Med., Reihe B, 1964, 11, 565, 571.

STRAUB O.C., WAGNER K.
Die Sanierung einer Besamungsstation von IBR-IPV Virusausscheidern durch den Einsatz von IBR-IPV-Lebend-impfstoff.
Dtsch. Tierärztl. Wschr., 1977, 84, 259-261.

STROBBE R., LACROIX C., CHARLIER G., DEBECQ J.
Routine titration of Foot-and-Mouth disease virus suspensions by analytical ultracentrifugation.
2nd communication : Sedimentation equilibrium method.
Arch. exper. vet. Med., Leipzig, 1977, 31, 397-404.

STUDDERT M.J., BARKER C.A.V., SAVAN M.
Infectious pustular vulvovaginitis virus infection of bulls.
Am. J. Vet. Res., 1964, 25, 303-314.

STUDDERT M.J., RADOSTITS O.M., SAVAN M.
An outbreak of infectious bovine rhinotracheitis in Ontario.
Can. Vet. J., 1961, 2, 201-206.

SVENNERHOLM B., VAHLNE A., LYCKE E.
Inhibition of herpes simplex virus infection in tissue culture by trisodium phosphonoformate.
P.S.E.B.M., 1979, 61, 115.

SYKES J.A., DMOCHOWSKI L., GREY C.E., RUSSELL W.O.
Isolation of a virus from infectious bovine keratoconjunctivitis.
P.S.E.B.M., 1962, 111, 51-57.

TALBOT P.,
Human cytom
J. Gen. Vir

TALENS L.T.
Purificatio
virus.
P.S.E.B.M.

TANAKA A.,
Latent DNA
cell DNA i
Proc. Nat.

TANAKA A.,
Biochemica
DNA in vir
VIROLOGY,

TAYLOR R.L.
Viral isol
Am. J. Vet

TERBLANCHE
Induced pa
Jl. S. Afr

THEIL K.W.
Intracellu
bovine rhi
Am. J. Vet

THORSEN J.
Survey for
virus diarr
J. Wildl.

TIMONEY P.
An outbrea
virus infe
Vet. Rec.

TODD J.D.
Immune res
following
rally adm
Develop.

TODD J.D.
Intranasa
laborator
In Procee
Develop.

TODD J.D.
Intranasa
on early
J.A.V.M.A

TALBOT P., ALMEIDA J.D.

Human cytomegalovirus : purification of enveloped virions and dense bodies.
J. Gen. Virol., 1977, 36, 345-349.

TALENS L.T., ZEE Y.C.

Purification and buoyant density of infectious bovine rhinotracheitis virus.

P.S.E.B.M., 1976, 151, 132-135.

TANAKA A., NONOYAMA M.

Latent DNA of Epstein-Barr virus : separation from high molecular weight cell DNA in neutral glycerol gradient.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4658-4661.

TANAKA A., SILVER S., NONOYAMA M.

Biochemical evidence of the nonintegrated status of Marek's disease virus DNA in virus-transformed lymphoblastoid cells of chicken.
VIROLOGY, 1978, 88, 19-24.

TAYLOR R.L., HANKS M.A.

Viral isolation from bovine eye tumors.
Am. J. Vet. Res., 1969, 30, 1885-1886.

TERBLANCHE H.M., KRITZINGER L.J., VAN HEERDEN J.S.

Induced parturition in cattle. I. Clinical studies.
Jl. S. Afr. vet. Ass., 1976, 47, 113.

THEIL K.W., MOHANTY S.B., HETRICK F.M.

Intracellular localization and sequential development of infectious bovine rhinotracheitis viral antigens.
Am. J. Vet. Res., 1971, 32, 1955-1962.

THORSEN J., HENDERSON J.P.

Survey for antibody to infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine virus diarrhea (BVD) and parainfluenza 3 (PI3) in moose sera.
J. Wildl. Dis., 1971, 7, 93-95.

TIMONEY P.J., O'CONNOR P.T.

An outbreak of the conjunctival form of infectious bovine rhinotracheitis virus infection.
Vet. Rec., 1971, 89, 370.

TODD J.D.

Immune response to infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) following natural infection or vaccination by intranasally or parenterally administered vaccines.
Develop. Biol. Standard., 1975a, 28, 526-529.

TODD J.D.

Intranasal vaccination of cattle against IBR and PI3 : field and laboratory observations in dairy, beef and neonatal calf populations.
In Proceedings 14th Cong. Internatl Assoc. Biological Standardization, Develop. Biol. Standard., 1975b, 33, (1976), 391-395.

TODD J.D., VOLENEC F.J., PATON I.M.

Intranasal vaccination against infectious bovine rhinotracheitis : studies on early onset of protection and use of the vaccine in pregnant cattle.
J.A.V.M.A., 1971, 159, 1370-1374.

TODD J.D., VOLENEC F.J., PATON I.M.

Interferon in nasal secretions and sera of calves after intranasal administration of avirulent infectious bovine rhinotracheitis virus : association of interferon in nasal secretions with early resistance to challenge with virulent virus.

Infect. Immun., 1972, 5, 699-706.

TOKUMARU T.

Pseudorabies virus in tissue culture : differentiation of two distinct strains of virus by cytopathogenic pattern induced.

P.S.E.B.M., 1957, 96, 55-60.

TOUSIMIS A.J., HOWELLS W.V., GRIFFIN T.P., PORTER P.P., CHEATHAM W.J., MAURER F.D.

Biophysical characterization of infectious bovine rhinotracheitis virus.

P.S.E.B.M., 1958, 99, 614-616.

TROMMSDORF F.

Zur Frage des Bläschenausschlages.

Berl. Tierärztl. Wschr., 1894, 595.

TRUEBLOOD M.S., SWIFT B.L., Mc HOLLAND-RAYMOND L.

A bovine herpesvirus isolated from sheep.

Can. J. Comp. Med., 1978, 42, 97-99.

TYTELL A.A., NEUMAN R.E.

A medium free of agar, serum, and peptone for plaque assay of herpes simplex virus.

P.S.E.B.M., 1963, 113, 343.

ULBRICH F.,
Zur latenter
cheitis/Inf
Mh. Vet. Med.

ULBRICH F.,
Zur latenter
cheitis/Inf
2. Mitt. :
Mh. Vet. Me

ULBRICH F.,
Zur latente
cheitis/Inf
3. Mitt. :
von Spermap
Mh. Vet. Me

UNDERWOOD G.
Recurrent c
Infect. Imm

ULBRICH F., HAASE H.

Zur latenten Infektion mit dem Virus der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis/Infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis (IBR/IPV) bei Bullen.
Mh. Vet. Med., 1973, 28, 935-937.

ULBRICH F., HAASE H.

Zur latenten Infektion mit dem Virus des Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis/Infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis (IBR/IPV) bei Bullen.
2. Mitt. : Virusnachweis in pelletiertem Bullensperma.

Mh. Vet. Med., 1974, 29, 459-462.

ULBRICH F., HAASE H.

Zur latenten Infektion mit dem Virus der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis/Infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis (IBR/IPV) bei Bullen.
3. Mitt. : Zu einigen Fragen der Untersuchungstechnik bei der Kontrolle von Spermapellets auf Virusgehalt.

Mh. Vet. Med., 1975, 30, 887-890.

UNDERWOOD G.E., WEED Sh. D.

Recurrent cutaneous herpes simplex in hairless mice.
Infect. Immun., 1974, 10, 471.

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

VAN BEKKUM J.G., STRAVER P.J.
 The recent evolution of IBR in the Netherlands.
 Bull. Off. int. Epiz., 1975, 84, 17-23.

VAN HOUWELING C.D.
 Susceptibility of goats to infectious bovine rhinotracheitis.
 Cornell vet., 1966, 56, 38-41.

VAN KRUININGEN H.J., BARTHOLOMEW R.C.
 Infectious bovine rhinotracheitis diagnosed by lesion in a calf.
 J.A.V.M.A., 1964, 144, 1008-1012.

VAN NIEUWENHUYSE E.
 De vesiculeuse ontsteking van penis en praeputium bij stieren in natuurlijke dekdienst en bij K.I. stieren.
 Vlaams Diergeneesk. Tijdschr., 1957, 26, 129-143.

VINDEVOGEL H., PASTORET P.P.
 Pigeon herpes infection : natural transmission of the disease.
 J. Comp. Path., 1980, 90, 409-413.

VINDEVOGEL H., PASTORET P.P., BURTONBOY G.
 Pigeon herpes infection : excretion and reexcretion of virus after experimental infection.
 J. Comp. Path., 1980, 90, 401-408.

WAGNER W.C.
 Comparative
 tious pustul
 tracheitis
 Cornell vet

WARBURG et
 B.Z., 1941,

WARDLEY R.C.
 Polymorph-m
 by drugs and
 Can. J. Micr

WARDLEY R.C.
 The mammary
 collection
 J. Reticul

WATRACH A.M.
 The structur
 Archiv. ges

WATSON D.H.
 Morphology
 The herpes
 Edited by
 Academic P

WATSON D.H.
 Quantitati
 using the
 VIROLOGY,

WEBER K.,
 The reliab
 polyacryla
 The Journa

WEBSTER R.
 Some obser
 N.Z. Vet.

WELLEMANS
 Examen sér
 respiratoi
 Ann. Méd.

WELLEMANS
 Rapport d

WELLEMANS
 La rhinotr
 Bull. Off

WELLEMANS
 Isolement
 Ann. Méd.

WELLEMANS
 La rhinotr
 Ann. Méd.

- WAGNER W.C., GILLESPIE J.H.
Comparative studies of a Canadian strain with New-York strain of infectious pustular vulvovaginitis virus and with infectious bovine rhinotracheitis virus.
Cornell vet., 1959, 49, 409-410.
- WARBURG et CHRISTIAN.
B.Z., 1941, 310, 384.
- WARDLEY R.C., BABIUK L.A., ROUSE B.T.
Polymorph-mediated antibody-dependent cytotoxicity-modulation of activity by drugs and immune interferon.
Can. J. Microbiol., 1976b, 22, 1222-1228.
- WARDLEY R.C., ROUSE B.T., BABIUK L.A.
The mammary gland of the Ox : A convenient source for the repeated collection of neutrophils and macrophages.
J. Reticuloendothel. Soc., 1976a, 19, 29-36.
- WATRACH A.M., BAHNEMANN H.
The structure of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Archiv. ges. Virusforsch., 1966, 18, 1-7.
- WATSON D.H.
Morphology - chapter 2.
The herpesviruses.
Edited by : A.S. Kaplan.
Academic Press, inc 1973. New-York, London, pages 27-43.
- WATSON D.H., WILBY P., RUSSELL W.C.
Quantitative electron microscope studies on the growth of herpesvirus using the techniques of negative staining and ultramicrotomy.
VIROLOGY, 1964, 24, 523-538.
- WEBER K., OSBORN M.
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
The Journal of Biological Chemistry, 1969, 244, 4406-4412.
- WEBSTER R.G., MANKTELOW B.W.
Some observations on infectious bovine rhinotracheitis in New-Zealand.
N.Z. Vet. J., 1959, 7, 143-148.
- WELLEMANS G.
Examen sérologique de quelques troupeaux de bovins atteints de troubles respiratoires.
Ann. Méd. Vét., 1969, 113, 47-60.
- WELLEMANS G.
Rapport d'activité de l'UNRV, 1970, page 35.
- WELLEMANS G.
La rhinotrachéite infectieuse (IBR) en Belgique.
Bull. Off. int. Epiz., 1975, 84, 9-15.
- WELLEMANS G., DIVE M., STROBBE R.
Isolement d'un virus IBR chez un veau après usage de cortisoniques.
Ann. Méd. Vét., 1976, 120, 127-128.
- WELLEMANS G., LEUNEN J.
La rhinotrachéite infectieuse des bovins (IBR) et sa sérologie.
Ann. Méd. Vét., 1973, 117, 507-518.

WELLEMANS G., LEUNEN J.
 Le tropisme digestif du virus IBR.
 Ann. Méd. Vét., 1974, 118, 243-251.

WELLEMANS G., STROBBE R., LEUNEN J.
 Les troubles respiratoires des bovins en Belgique.
 Bull. Off. int. Epiz., 1977, 88, 61-68.

WERNER F.J., BORNKAMM G.W., FLECKENSTEIN B.
 Episomal viral DNA in a *herpesvirus Saimiri* transformed lymphoid cell line.
 J. Virol., 1977, 22, 794-803.

WHITE M.B., SNOWDON W.A.
 The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with IBR virus.
 Aust. Vet. J., 1973, 49, 501-506.

WILDY P., RUSSEL W.C., HORNE R.W.
 The morphology of herpesvirus.
 VIROLOGY, 1960, 12, 204-222.

WILKIE B.N., CAOILI F., JACOBS R.
 Bovine lymphocytes : erythrocyte rosettes in normal, lymphomatous and corticosteroid-treated cattle.
 Can. J. Comp. Med., 1979, 43, 22-28.

WITTE J.
 Untersuchungen über den Bläschenausschlag (Exanthema pustulosum coitale) des Rindes.
 Z. Inf. Krankh. paras. Krankh., Hyg. Haustiere, 1933, 44, 163-191.

WITTMANN G.
 Neu entwickelte Virusimpfstoffe auf dem Gebiet der Veterinärmedizin.
 Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. B., 166, 1978, 272-279.

WOERNLE H., BRUNNER A., KUßMAUL K.F.
 Serologische diagnose von parainfluenza-2, parainfluenza-3, mucosal-disease, adeno-virus- und chlamydien-infektionen sowie der infektiösen rhinotracheitis des Rindes.
 Tierärztl. Umsch., 1973, 28, 319-325.

WOODS G.J., MEYER R.C., SIMON J.
 Experimental exposure of pigs to infectious bovine rhinotracheitis virus.
 Can. J. Comp. Med., 1968, 32, 480-482.

YORK D.J.
 Infectious
 J.A.V.M.A.

YORK C.J.,
 Immunologic
 Proc. U.S.

YORK C.J.,
 The isolati
 virus in t
 P.S.E.B.M.

YORK D.J.
Infectious bovine rhinotracheitis.
J.A.V.M.A., 1968, 152, 758-760.

YORK C.J., SCHWARZ A.J.F.
Immunological studies on infectious bovine rhinotracheitis.
Proc. U.S. Livestock Sanit. Ass., 1956, 60, 149-154.

YORK C.J., SCHWARZ A.J.F., ESTELA L.A.
The isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis
virus in tissue culture.
P.S.E.B.M., 1957, 94, 740-744.

- ZEE Y.C., TALENS L.
Entry of infectious bovine rhinotracheitis virus into cells.
J. Gen. Virol., 1971, 11, 59-63.
- ZEE Y.C., TALENS L.
Electron microscopic studies on the development of infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine kidney cells.
J. Gen. Virol., 1972, 17, 333-336.
- ZUFFA A., CHUMCHAL R., GRUNERT Z.
Mikroepidemiologie und Mikroplaquetitration des Virus des infektiösen Rhinotracheitis des Rindes auf primären Kälbernierenzellen mittels Immunofluoreszenz.
Arch. exper. Vet. Med., 1976, 30, 441-457.
- ZWICK, GMINDER.
Untersuchungen über den Bläschenausschlag (exanthema vesiculosum coitale) der Rinder.
Berl. Tierärztl. Wschr., 1913, 29, 637-640.
- ZYGRAICH N., HUYGELEN C., VASCOBOINIC E.
Vaccination of calves against infectious bovine rhinotracheitis using a temperature sensitive mutant.
13th International Congress of IABS, Budapest 1973, Part B : selected veterinary vaccines.
Develop. biol. Standard., 1974c, 26, 8-14.
- ZYGRAICH N., LOBMANN M., PEETERMANS J., VASCOBOINIC E., HUYGELEN C.
Local and systemic response after simultaneous intranasal inoculation of temperature-sensitive mutants of parainfluenza 3, IBR and bovine adenovirus 3.
International symposium on Immunity to infections of the respiratory system in man and animals, London, 1974.
Develop. biol. Stand., 1975, 28, 482-488.
- ZYGRAICH N., LOBMANN M., VASCOBOINIC E., BERGE E., HUYGELEN C.
In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus.
Res. Vet. Sci., 1974a, 16, 328-335.
- ZYGRAICH N., VASCOBOINIC E., HUYGELEN C.
Replication of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus in the tissues of inoculated calves.
Zbl. Vet. Med., B, 1974b, 21, 138-144.

