

## FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

**L'herpèsvirus bovin 4**

MARKINE-GORIAYNOFF N.<sup>1</sup>, MINNER F.<sup>1</sup>, DE FAYS K.<sup>1</sup>, GILLET L.<sup>1</sup>,  
THIRY E.<sup>2</sup>, PASTORET P.-P.<sup>3</sup>, VANDERPLASSCHEN A.<sup>1,\*</sup>

1 Département des maladies infectieuses et parasitaires

Service d'Immunologie-Vaccinologie – Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège – Boulevard de Colonster, 20, bât B43b, 4000 Liège

2 Département des maladies infectieuses et parasitaires

Service de Virologie – Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège – Boulevard de Colonster, 20, bât B43b, 4000 Liège

3 Institute for Animal Health

Compton Laboratory – Compton, Newsbury, Berks – RG20 7NN, Grande-Bretagne

\* Correspondance : Tél. : 0032(0)4/366.42.64 – Fax : 0032(0)4/366.39.08 – E-mail : a.vdplasschen@ulg.ac.be

**RESUME :** L'herpèsvirus bovin 4 (BoHV-4) est un gammaherpèsvirus ubiquiste des bovins. Il appartient au genre *Rhadinovirus* tout comme l'herpèsvirus humain 8 (HHV-8), un virus associé au sarcome de Kaposi. Le BoHV-4 a été isolé de nombreuses entités cliniques ainsi que de bovins sains. Son rôle en tant qu'agent étiologique d'une entité précise reste un sujet de controverses. Le spectre d'hôtes de ce virus est large et s'étend peut-être au-delà des ruminants. L'entièreté de son génome a récemment été séquencée. Le BoHV-4 intéresse la communauté scientifique parce qu'il procure l'opportunité d'étudier la biologie d'un gammaherpèsvirus par l'infection de son hôte naturel. Par ailleurs, ce virus représente un candidat potentiel comme vecteur d'expression, en vaccinologie notamment. Les auteurs proposent ici une revue exhaustive de la littérature, reprenant l'ensemble des connaissances actuelles relatives à ce virus sur les plans clinique, épidémiologique et fondamental. Sont également présentées des données récentes de la biologie du BoHV-4, suggérant que ce dernier est en réalité un virus de buffle africain.

### 1/ NOMENCLATURE ET CLASSIFICATION

Les herpèsvirus constituent une famille extrêmement riche de virus à ADN de grande taille. Leurs hôtes sont les hommes, d'autres mammifères et vertébrés et, dans un cas décrit, un invertébré (Roizman et Pellet, 2001). La famille *Herpesviridae* a été divisée en trois sous-familles, les *Alpha-*, *Beta-* et *Gammaherpesvirinae*. Cette division reposait initialement sur les seules propriétés biologiques des espèces. Elle est maintenant confirmée par des analyses phylogéniques (figure 1) (McGeoch *et al.*, 1995; McGeoch *et al.*, 2000; McGeoch, 2001; Davison, 2002).

L'herpèsvirus bovin 4 (BoHV-4) a été isolé de par le monde, de bovins sains ou atteints de pathologies diverses. Il appartient à la sous-famille des gammaherpèsvirus, ce qui le différencie des trois autres herpèsvirus bovins qui appartiennent à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. Ces derniers sont l'herpèsvirus bovin 1 (BoHV-1), responsable entre autre de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR pour *infectious bovine rhinotracheitis*), l'herpèsvirus bovin 2 (BoHV-2), responsable de la thélite infectieuse bovine (*bovine herpes mammillitis*) et l'herpèsvirus bovin 5 (BoHV-5), causant l'encéphalite infectieuse bovine (*bovine herpes meningoencephalitis*).

Le BoHV-4 présente les quatre pro-

priétés biologiques partagées par les herpèsvirus, à savoir : (i) leur génome viral code pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques, dans la synthèse de l'ADN viral ou encore dans la modification d'autres protéines; (ii) la synthèse de l'ADN viral et l'assemblage des capsides se réalisent dans le noyau de la cellule infectée; (iii) la production de particules virales infectieuses s'accompagne quasi systématiquement de la mort cellulaire; (iv) les herpèsvirus sont capables d'établir une infection latente chez leur hôte naturel.

Le BoHV-4 a été isolé pour la première fois en 1966, en Hongrie, chez des bovins présentant des signes res-

piratoires et de la conjonctivite (souche Movar 33/63) (Bartha *et al.*, 1966). Il fut classé parmi les herpesvirus suite à l'observation de sa structure en microscopie électronique (Bartha *et al.*, 1966; McCoy *et al.*, 1985). A partir de 1966, des souches apparentées à la souche Movar 33/63 d'un point de vue antigénique ou génomique ont été isolées dans de nombreux pays où elles ont reçu différentes dénominations : "orphan

herpesvirus", "Movar-type herpesviruses", "Bovine cytomegalovirus", "Bovine herpesvirus 3 (BHV-3)", "Bovine herpesvirus 4 (BHV-4)" ou encore "Bovine herpesvirus 5 (BHV-5)" (pour revue, voir Bartha *et al.*, 1987). Dès 1987, un consensus fut adopté pour mettre fin à la confusion générée par ces diverses appellations : l'ensemble des souches fut regroupé sous le nom BHV-4 (*Bovine herpesvirus 4*) (Bartha *et al.*, 1987).

Récemment, le comité international de taxonomie virale (ICTV) a adopté la terminologie officielle "BoHV-4" (Minson *et al.*, 2000).

Comme suggéré ci-dessus, le BoHV-4 a d'abord été considéré comme un cytomegalovirus bovin. Cette classification initiale reposait sur certaines de ses propriétés biologiques, caractéristiques de la sous-famille des *Betaherpesvirinae*, à savoir une multiplication virale *in vitro* relativement

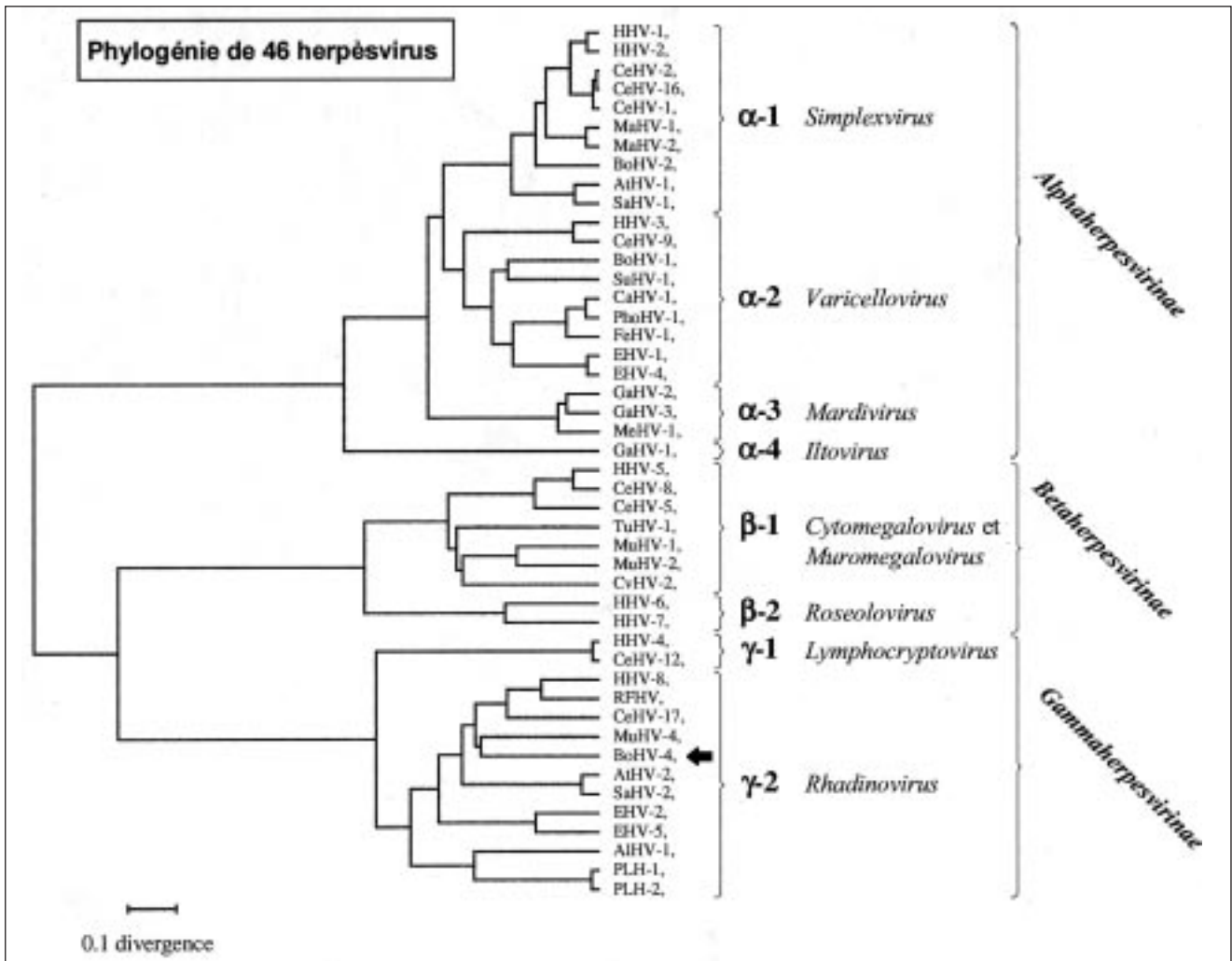


Figure 1 : Arbre phylogénétique de 46 espèces d'herpèsvirus

(obtenu par maximum likelihood avec horloge moléculaire imposée). La classification initiale des herpesvirus en 3 sous-familles (*Alpha-*, *Beta-* et *Gammaherpesvirinae*) sur base de leurs propriétés biologiques est confirmée par l'analyse phylogénétique de leurs séquences. Les abréviations utilisées sont relatives aux espèces suivantes (anciennes dénominations entre parenthèses) : **HHV-1**, human herpesvirus 1 (HSV-1, herpes simplex virus 1); **HHV-2**, human herpesvirus 2 (HSV-2, herpes simplex virus 2); **CeHV-2**, cercopithecine herpesvirus 2 (SA8, simian agent 8); **CeHV-16**, cercopithecine herpesvirus 16 (HVP-2, herpesvirus papio 2); **CeHV-1**, cercopithecine herpesvirus 1 (HVB, B virus); **MaHV-1**, macropodid herpesvirus 1 (WHV-1, Parma wallaby herpesvirus); **MaHV-2**, macropodid herpesvirus 2 (WHV-2, Dorcopsis wallaby herpesvirus); **BoHV-2**, Bovine herpesvirus 2 (BHV-2); **AtHV-1**, ateline herpesvirus 1 (HVA-1, herpesvirus ateles 1); **SaHV-1**, saimiriine herpesvirus 1 (HVS-1, herpesvirus saimiri 1); **HHV-3**, human herpesvirus 3 (VZV, varicella-zoster virus); **CeHV-9**, cercopithecine herpesvirus 9 (SVV, simian varicella virus); **BoHV-1**, bovine herpesvirus 1 (BHV-1); **SuHV-1**, suid herpesvirus 1 (PRV, pseudorabies virus); **CaHV-1**, canid herpesvirus 1 (CHV-1); **PhoHV-1**, phocid herpesvirus 1 (SHV-1, seal herpesvirus 1); **FeHV-1**, feline herpesvirus 1 (FHV-1, felid herpesvirus 1); **EHV-1**, equid herpesvirus 1; **EHV-4**, equid herpesvirus 4; **GaHV-2**, gallid herpesvirus 2 (MDV-1, Marek's disease virus 1); **GaHV-3**, gallid herpesvirus 3 (MDV-2, Marek's disease virus 2); **MeHV-1**, meleagrid herpesvirus 1 (HVT, herpesvirus of turkeys); **GaHV-1**, gallid herpesvirus 1 (ILT, infectious laryngotracheitis virus); **HHV-5**, human herpesvirus 5 (HCMV, human cytomegalovirus); **CeHV-8**, cercopithecine herpesvirus 8 (CCMV, chimpanzee cytomegalovirus); **RHCM**, rhesus cytomegalovirus; **CeHV-5**, cercopithecine herpesvirus 5 (SCMV, simian cytomegalovirus); **TuHV-1**, tupaiid herpesvirus 1 (THV-1); **MuHV-1**, murid herpesvirus 1 (MCMV, murine cytomegalovirus); **MuHV-2**, murid herpesvirus 2 (RCMV, rat cytomegalovirus); **CvHV-2**, caviid herpesvirus 2 (GCMV, guinea pig herpesvirus); **HHV-6**, human herpesvirus 6, variant a; **HHV-7**, human herpesvirus 7; **HHV-4**, human herpesvirus 4 (EBV, Epstein-Barr virus); **CeHV-12**, cercopithecine herpesvirus 12 (HVP, herpesvirus papio); **HHV-8**, human herpesvirus 8 (KSHV, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus); **RFHV**, retroperitoneal fibromatosis herpesvirus of macaques; **CeHV-17**, cercopithecine herpesvirus 17 (RRV, rhesus rhadinovirus); **MuHV-4**, murid herpesvirus 4 (murine herpesvirus 68); **BoHV-4**, bovine herpesvirus 4 (BHV-4); **AtHV-2**, ateline herpesvirus 2 (HVA, herpesvirus ateles); **SaHV-2**, saimiriine herpesvirus 2 (HVS, herpesvirus saimiri); **EHV-2**, equid herpesvirus 2; **EHV-5**, equid herpesvirus 5; **AIHV-1**, alcelaphine herpesvirus 1 (AHV-1, malignant catarrhal fever virus from wildebeest); **PLH-1**, porcine lymphotropic herpesvirus 1; **PLH-2**, porcine lymphotropic herpesvirus 2. La position du BoHV-4 est indiquée par une flèche. Selon McGeoch *et al.*, 2000.

lente et l'apparition de corps d'inclusion cytoplasmiques et nucléaires dans les cellules infectées (Todd et Storz, 1983; Storz *et al.*, 1984). Plus tard, le BoHV-4 fut reclassé dans la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*, sur base d'autres propriétés biologiques telles qu'un spectre d'hôtes large, mais surtout, sur base de la structure de son génome et de son contenu génétique: (i) son génome n'est pas aussi grand que celui des *betaherpesvirinae*; (ii) il présente une structure de type B, typique des *gammaherpesvirinae* (Roizman et Pellet, 2001); (iii) le génome contient un gène codant pour la thymidine kinase, gène absent chez les *betaherpesvirinae*; (iv) les gènes du BoHV-4 ont un pourcentage d'identité plus élevé avec leurs homologues d'autres *gammaherpesvirus*; (v) et ils présentent un arrangement co-linéaire avec celui observé dans cette sous-famille (Ehlers *et al.*, 1985; Kit *et al.*, 1986; Thiry *et al.*, 1989; Staczek, 1990; Bublot *et al.*, 1992; Goltz *et al.*, 1994; Lomonte *et al.*, 1995; Lomonte *et al.*, 1996; Broll *et al.*, 1999a; Zimmermann *et al.*, 2001).

La sous-famille des *Gammaherpesvirinae* rassemble des virus phylogéniquement apparentés (figure 1) et possédant certains gènes qui leur semblent propres. De nombreux membres de cette sous-famille sont capables d'infecter les lymphocytes *in vitro*. *In vivo*, ces virus persistent à l'état latent dans les lymphocytes ou les tissus lymphoïdes. L'infection aiguë est fréquemment associée à des désordres lymphoprolifératifs et beaucoup de *gammaherpesvirus* sont impliqués dans l'oncogenèse (d'origine lymphoïde ou non). Aucune immortalisation cellulaire, caractéristique de cette sous-famille, n'a cependant été décrite pour le BoHV-4. La sous-famille des *Gammaherpesvirinae* se divise en deux genres: le genre *gamma-1* herpèsvirus (ou *Lymphocryptovirus*) et le genre *gamma-2* herpèsvirus (ou *Rhadinovirus*), auquel appartient le BoHV-4.

Le genre *Lymphocryptovirus* ne compte que des virus infectant les primates dont l'homme. Ces virus sont tous apparentés sérologiquement. Ce

genre est représenté par l'herpèsvirus humain 4 (HHV-4 ou EBV pour herpèsvirus Epstein-Barr) responsable de la mononucléose infectieuse, et par des virus apparentés infectant des singes de l'ancien monde. Les lymphocryptovirus infectent les lymphocytes B ( $L_B$ ) *in vitro*. L'infection est généralement non productive et peut résulter en l'immortalisation des cellules B ou de leurs précurseurs. Ces cellules constituent le site de latence pour les membres du genre.

Le BoHV-4 appartient au genre *Rhadinovirus* dont le prototype est l'herpèsvirus saimiri (SaHV-2, anciennement HVS), infectant le singe saimiri, primate d'Amérique du Sud (Bublot *et al.*, 1990; Lomonte *et al.*, 1995). D'autres *rhadinovirus* sont l'herpèsvirus alcélapin 1 (AlHV-1) et l'herpèsvirus ovin 2 (OvHV-2), agents étiologiques respectifs des formes africaine et européenne du coryza gangreneux, l'herpèsvirus humain 8 (HHV-8) associé au sarcome de Kaposi, ou encore l'herpèsvirus murin 4 (MuHV-4, anciennement MHV-68) et les herpèsvirus équins 2, 5 et 7 (EHV-2, 5 et 7). Les membres de ce genre forment un groupe distinct au sein de la sous-famille sur base de leurs séquences nucléotidique et protéique. Ils ont été isolés à partir d'un grand nombre d'espèces hôtes. Beaucoup de *rhadinovirus* réalisent *in vitro* une infection productive dans des fibroblastes issus d'espèces multiples. Bien que les *rhadinovirus* présentent généralement un tropisme pour les cellules lymphoïdes T (Roizman et Pellet, 2001), l'infection latente a été aussi rapportée pour certains membres dans les  $L_B$  (Drummer *et al.*, 1996; Bergquam *et al.*, 1999; Flano *et al.*, 2002). Notons enfin que si le SaHV-2 est le *rhadinovirus* phylogéniquement le plus proche du BoHV-4 (Bublot *et al.*, 1990; Lomonte *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 2001), ce dernier ne possède pas de parent direct parmi les espèces identifiées au sein du genre, ce qui rend son origine incertaine (McGeoch, 2001).

En conclusion, le BoHV-4 appartient à la famille *Herpesviridae*, sous-famille *Gammaherpesvirinae*, genre *Rhadinovirus*. Il n'est phylogénique-

ment proche d'aucun *rhadinovirus* décrit à ce jour.

## 2/ ASPECTS CLINIQUES DE L'INFECTION PAR L'HERPÈSVIRUS BOVIN 4

### 2.1/ Spectre d'hôtes *in vivo*

Les bovins ont toujours été considérés comme les hôtes naturels les plus probables du BoHV-4. Cependant, le BoHV-4 a très souvent été isolé d'autres espèces. Ainsi, la souche 66-p-347 de BoHV-4 a été isolée d'un bison américain (*Bison bison*) présentant des signes cliniques de coryza gangreneux (Todd et Storz, 1983). La souche M40 a été isolée en Inde à partir de tumeurs ethmoïdales issues de deux troupeaux de zébus (*Bos indicus*) (Moreno-Lopez *et al.*, 1989). Le BoHV-4 a pu être isolé du buffle africain (*Syncerus caffer*) et cette espèce semble même constituer un réservoir pour le virus dans certaines régions d'Afrique où la prévalence de l'infection chez des buffles apparemment sains est largement supérieure (93,6%) à ce qui est généralement observé chez les bovins domestiques en élevage intensif (Rossiter *et al.*, 1989). Le BoHV-4 a également été isolé d'un mouton atteint de pneumonie (Van Opdenbosch *et al.*, 1986a). Cet isolat ne semblait néanmoins pas responsable de la maladie observée vu l'impossibilité de reproduire la pathologie par l'épreuve d'inoculation. Quoi qu'il en soit, le virus inoculé au mouton a pu être réisolé à la suite d'un traitement à la dexaméthasone, indiquant que cette espèce animale pourrait jouer un rôle dans la dissémination du BoHV-4 aux troupeaux de bovins. Une enquête sérologique effectuée sur 50 moutons provenant de 50 exploitations différentes a détecté trois animaux séropositifs vis-à-vis du BoHV-4.

En ce qui concerne les ruminants sauvages en Belgique et en France, une étude sérologique n'a pas détecté d'animaux séropositifs, ce qui peut laisser présager que ces espèces ne constituent pas des réservoirs du BoHV-4 (Meersschaert *et al.*, 1988; Thiry *et al.*, 1988).

Le BoHV-4 a également été isolé à

partir d'espèces de non ruminants. Le "*feline cell-associated herpesvirus*" (FeCAHV) ou "*feline herpesvirus 2*" (FeHV-2) est issu de chatons cliniquement sains, d'un chaton présentant une obstruction urétrale et une infection à calicivirus (Rich et Fabricant, 1969; Fabricant *et al.*, 1971; Fabricant et Gillespie, 1974). Le profil de restriction et l'antigénicité de ce virus révèlent qu'il constitue en réalité un isolat supplémentaire de BoHV-4 (Kit *et al.*, 1986; Kruger *et al.*, 1989). Il est à priori étonnant d'isoler un virus de bovin chez un félin et il a été suggéré que son origine soit une contamination survenue ultérieurement au prélèvement. En effet, le BoHV-4 est fréquemment isolé de sérum de veau fœtal, utilisé dans les milieux de culture cellulaire (Thiry *et al.*, 2000). Néanmoins, l'inoculation expérimentale de chats avec le BoHV-4 a été réussie (Kruger *et al.*, 1990a). Ces résultats démontrent que le chat est réceptif au BoHV-4 ou du moins aux souches qui lui sont adaptées. En effet, les tentatives d'inoculation du chat adulte par la souche européenne Movar 33/63 ont échoué (Thiry *et al.*, 1991). La souche FeCAHV ne présente aucune parenté avec le véritable herpèsvirus félin, responsable de la rhinotrachéite féline. La détection d'anticorps réagissant contre le BoHV-4 chez un grand pourcentage de chats aux Etats-Unis traduit vraisemblablement la présence réelle du BoHV-4 chez cette espèce. En effet, une virémie associée aux cellules a pu être détectée à l'aide d'une amplification spécifique du gène de la glycoprotéine B du BoHV-4 chez 37,7 % des animaux séropositifs (Kruger *et al.*, 2000). On peut spéculer sur l'origine d'une souche de BoHV-4 chez le chat : elle pourrait résulter de la réelle circulation d'une souche adaptée aux félins, tout comme de l'inoculation d'un matériel biologique contaminé à grande échelle (par le biais d'un vaccin, par exemple). Si le chat est sensible au BoHV-4, il reste à déterminer de façon définitive s'il est la cible d'infections naturelles, voire même s'il n'existe pas un autre herpèsvirus du chat non encore identifié, antigéniquement et phylogéniquement proche

du BoHV-4. Des souches de BoHV-4 ont également été isolées chez un autre félin : le lion (*Panthera leo*) (souche HB420) (Egelhof *et al.*, 1991; Egyed *et al.*, 1997). Il convient là encore d'être prudent quant à l'interprétation de ce type de découverte, bien qu'à nouveau, la souche de lion se soit montrée adaptée aux félins (Egyed *et al.*, 1997).

La découverte que l'herpèsvirus aotus type 2 (HVA-2) est également une souche de BoHV-4 étend encore le spectre d'espèces présumées réceptives au BoHV-4 (Barahona *et al.*, 1973; Fuchs *et al.*, 1985; Bublot *et al.*, 1991a). L'isolat provient d'une culture de cellules rénales d'un singe douroucouli (*Aotus trivirgatus*) apparemment sain. Le HVA-2 a été entièrement caractérisé. Son génome et ses protéines sont quasi identiques à ceux du BoHV-4; les différences observées sont compatibles avec les variations inter-souches déjà observées (Bublot *et al.*, 1991a; Dubuisson *et al.*, 1991a). Il semble que le virus ne soit ni pathogène ni oncogène pour le douroucouli. Quoi qu'il en soit, il n'a pas été utilisé pour des infections expérimentales et la sensibilité de ce singe n'est donc pas définitivement établie (Rüger *et al.*, 1980). Cependant, une enquête sérologique menée dans différents centres de primates a révélé une séroprévalence anti-BoHV-4 significative (42 %) (Barahona *et al.*, 1973). A nouveau, ces résultats doivent être interprétés avec prudence, en considérant la possibilité qu'il s'agisse d'une contamination en phase d'isolement ou qu'il existe dans la niche écologique étudiée un herpèsvirus antigéniquement apparenté provoquant des réactions sérologiques croisées.

Des anticorps dirigés envers le BoHV-4 ont été détectés chez des éléphants d'Asie (*Elephas maximus*) captifs (Metzler *et al.*, 1990). Par ailleurs, une séquence codante pour une ADN polymérase et présentant une haute homologie avec le gène orthologue du BoHV-4 a pu être amplifiée à partir de cellules mononucléées sanguines d'un rhinocéros noir (*Diceros bicornis*) d'un zoo californien (numéros d'accès: AF287948, Worley *et al.*, non publié). Ceci pourrait traduire l'exis-

tence d'un herpèsvirus apparenté au BoHV-4 dans cette niche.

Un certain nombre d'espèces chez lesquelles le BoHV-4 n'a pas été isolé en conditions naturelles se sont néanmoins avérées sensibles expérimentalement à la multiplication virale, voire à l'établissement de la latence et à la réactivation virale. Ces espèces doivent donc être incorporées dans le spectre d'hôte expérimental du virus. Citons notamment la chèvre, le cobaye et le lapin (Moreno-Lopez *et al.*, 1989; Egyed *et al.*, 1997). Le lapin est par ailleurs considéré comme un modèle expérimental adéquat pour l'étude de la biologie du BoHV-4 (Osorio *et al.*, 1982; Osorio *et al.*, 1985a; Naeem *et al.*, 1990; Naeem *et al.*, 1991a; Naeem *et al.*, 1991b; Egyed *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000). Notons que l'inoculation expérimentale de souris, hamsters, rats et poulets ne produit pas de signes cliniques (Gibbs et Rweyemamu, 1977).

## 2.2/ Signes cliniques associés à l'herpèsvirus bovin 4

Le BoHV-4 a été isolé de bovins malades, de bétail apparemment sain ou même de culture de cellules primaires (Thiry *et al.*, 1989; Thiry *et al.*, 1990; Egyed, 2000). Pour cette raison, il a parfois été qualifié de "virus passager" (Moreno-Lopez *et al.*, 1989; Thiry *et al.*, 2000).

Chez les bovins, les différentes souches proviennent principalement de cinq groupes d'entités cliniques :

### a) Affections oculaires et respiratoires (conjonctivite, rhinite, trachéite, pneumonie).

Les deux souches de référence ont été isolées de cas de kératoconjonctivite aiguë (Bartha *et al.*, 1966) ou de maladie respiratoire caractérisée par des écoulements nasaux, de la toux, de l'hyperpnée et de la dyspnée mais sans conjonctivite (Mohanty *et al.*, 1971). D'autres souches ont également été isolées d'animaux atteints de pathologies respiratoires (Smith *et al.*, 1972; Evermann *et al.*, 1985).

**b) Affections génitales (orchite, épидидymite, vaginite, avortement, métrite, mammite).**

En Afrique du Sud, de nombreuses souches de BoHV-4 ont été isolées d'un syndrome appelé "épivag", se caractérisant par de l'épididymite chez les taureaux et de la vaginite chez les vaches (Mare et Van Resenburg, 1961; Theodoridis, 1978; 1985). D'autres souches africaines (Tanzanie) dites "non syncytiales" ont été isolées de sperme de taureau (Rweyemamu et Loretu, 1973; Loretu *et al.*, 1974; Marinov *et al.*, 1974). Ces dernières présentent des propriétés biologiques similaires au BoHV-4, sans pour autant avoir fait l'objet d'une caractérisation antigénique ou génomique. Les deux souches belges de référence, la souche V. test et la souche LVR 140, proviennent respectivement d'animaux présentant de l'orchite et de la métrite *post-partum* (Thiry *et al.*, 1981a; 1981b; Wellemans *et al.*, 1983; Wellemans, 1984). La métrite est observée seule ou associée à des symptômes variés dans l'exploitation concernée : diarrhée, mortalité néonatale, signes respiratoires et mammite (Wellemans, 1984). L'isolement d'autres souches au départ de pathologies génitales a été décrit en Italie (Castrucci *et al.*, 1986; Luini et Fioni, 1986a) et aux Etats-Unis (Parks et Kendrick, 1973; Evermann *et al.*, 1985). Le BoHV-4 a également été isolé d'avortons, parfois en association avec le virus de la diarrhée virale bovine (Reed *et al.*, 1979; Wellemans et Van Opdenbosch, 1989). Récemment, le BoHV-4 était encore associé à de l'endométrite (Frazier *et al.*, 2001; 2002). Le BoHV-4 a aussi été isolé de vaches atteintes de mammite (Wellenberg *et al.*, 2000; Wellenberg, 2002). Sa présence a été détectée dans la fraction cellulaire du lait de vaches issues d'un troupeau ayant un historique sanitaire lié au virus (Donofrio *et al.*, 2000c).

**c) Lésions cutanées.**

Le BoHV-4 a été isolé de lésions cutanées, notamment de dermatite aiguë pustuleuse mammaire, d'ulcères mammaires et de dermatite interdigitée (Reed *et al.*, 1977; Luini et Fioni,

1986b; Cavirani *et al.*, 1996; Donofrio *et al.*, 2000a). Il a également été isolé d'animaux atteints de dermatose nodulaire (Alexander *et al.*, 1957; Rweyemamu et Loretu, 1973; House *et al.*, 1990).

**d) Coryza gangreneux.**

Le BoHV-4 a été isolé chez des animaux présentant la forme européenne du coryza gangreneux (Liebermann *et al.*, 1967; Storz, 1968; Todd et Storz, 1983).

**e) Troubles associés au tractus digestif (glossite, entérite, tumeurs du rumen).**

Aux Etats-Unis, le BoHV-4 a été isolé du tractus digestif, à partir de fèces diarrhéiques (Eugster, 1978/1979). Une souche a été détectée à partir d'une tumeur du rumen (Kaminjolo *et al.*, 1972). D'autres proviennent de glossite ulcéreuse et autres lésions linguales (Rweyemamu et Loretu, 1973; Luini *et al.*, 1985; Cavirani *et al.*, 1990).

Ajoutons que certaines souches de BoHV-4 ont aussi été isolées chez des animaux atteints de pathologies et tableaux cliniques aussi variés que la stomatite vésiculeuse (Evermann et Henry, 1989), l'asthénie (Nakane *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000) ou de diverses néoplasies telles un lymphosarcome (Potgieter et Mare, 1974), un carcinome squameux oculaire (Anson *et al.*, 1982), un lymphome à cellules T (Toho *et al.*, 1985), une tumeur de la vessie (Kaminjolo *et al.*, 1972) ou une tumeur ethmoïdale (Moreno-Lopez *et al.*, 1989).

Parallèlement aux souches issues d'animaux malades, de nombreuses souches ont aussi été isolées chez des animaux apparemment sains, principalement au départ de cellules rénales (Luther *et al.*, 1971; Belak et Palfi, 1974; Ludwig, 1983), mais aussi à partir du ganglion de Gasser (Homan et Easterday, 1981) ou encore d'un mélange de foie, de poumon et de rate provenant d'un veau (Krogman et Mcadaragh, 1982).

Chez le chat, le BoHV-4 a été associé à l'urolithiase (Rich et Fabricant, 1969; Fabricant *et al.*, 1971;

Fabricant et Gillespie, 1974; Kruger *et al.*, 1991; Kruger et Osborne, 1995); il a été isolé chez un lionceau qui présentait un retard de croissance et des troubles du système nerveux central (Egelhof *et al.*, 1991; Egyed *et al.*, 1997).

**2.3/ Virulence**

Les essais d'inoculations expérimentales du BoHV-4 n'ont souvent reproduit que peu ou pas de signes cliniques, malgré qu'une multiplication virale soit observée. Ces essais ont été effectués avec des souches respiratoires (Bartha *et al.*, 1967; Smith *et al.*, 1972), des souches génitales (Osorio et Reed, 1983; Castrucci *et al.*, 1987a), des souches intestinales (Eugster, 1978/1979) et une souche isolée d'un cas de coryza gangreneux (Liebermann *et al.*, 1967).

Par ailleurs, des expériences semblables réalisées avec d'autres isolats ont induit une pathologie sévère. En ce qui concerne la sphère respiratoire, les inoculations intratrachéales et intranasales de la souche DN599 ont entraîné conjonctivite et pneumonie provoquant une détresse respiratoire responsable de la mort de certains animaux (Mohanty *et al.*, 1971). Notons cependant que ces manifestations ne peuvent pas être attribuées au rôle unique du BoHV-4 puisque *Pasteurella multocida* était isolée concomitamment. D'autres auteurs ont reproduit des symptômes respiratoires accompagnés de fièvre, d'anorexie et d'abattement, par inoculation par voie intranasale d'une souche génitale à des veaux (Castrucci *et al.*, 1987b). Pour ce qui est des affections cutanées, il a été possible de reproduire une dermatite papuleuse après inoculation expérimentale de BoHV-4 (Cavirani *et al.*, 1990).

L'implication du BoHV-4 dans les maladies du tractus génital est étayée par plusieurs résultats. En Belgique, l'inoculation expérimentale de la souche V. test par les voies intratesticulaire, intraveineuse et intranasale n'a pas reproduit de signes cliniques, exceptée une azoospermie transitoire chez certains animaux. La souche s'est pourtant multipliée, a été excré-

tée, a provoqué des lésions microscopiques dans les testicules et s'est installée à l'état latent chez les animaux inoculés (Dubuisson *et al.*, 1987a; 1989a). D'autre part, l'inoculation intraveineuse de la souche LVR140 à des vaches gestantes a entraîné une métrite, une semaine environ après le part (Wellemans *et al.*, 1986; Wellemans et Van Opdenbosch, 1987). En 1976, une souche de BoHV-4, isolée d'un cas de métrite, a été inoculée à différentes périodes de gestation (Kendrick *et al.*, 1976). Deux foetus sont morts à trois et quatre mois de gestation. Aucun signe n'était observé chez les vaches infectées à sept mois de gestation. Le rôle du BoHV-4 dans l'avortement bovin n'est pas définitivement élucidé bien que des évidences épidémiologiques plaident pour son intervention à ce niveau en Belgique (Wellemans et Van Opdenbosch, 1989). Des taux élevés d'anticorps anti-BoHV-4 sont associés à l'avortement bovin entre cinq et neuf mois de gestation (Fitton *et al.*, 1990; Czapliski et Thiry, 1998). Les inoculations intranasale et intramammaire simultanées permettent de reproduire une mammite subclinique (Wellenberg *et al.*, 2002a).

Le BoHV-4 s'est avéré pathogène dans des modèles animaux autres que les bovins, tels que le lapin (Osorio *et al.*, 1982; Naeem *et al.*, 1990; 1991a; 1991b) ou le chat (Fabricant, 1977; Kruger *et al.*, 1989; 1990a; 1990b; Egyed *et al.*, 1997). L'inoculation intra-utérine d'une souche de BoHV-4, isolée d'un avorton bovin, à des lapines gestantes a provoqué l'avortement de foetus hémorragiques et une endométrite. Par contre, l'inoculation intraveineuse et intravaginale n'a entraîné dans cette espèce qu'une vulvovaginite légère et de l'endométrite (Naeem *et al.*, 1990). Les souches de BoHV-4 isolées du chat induisent la formation de cristaux en culture de cellules (Fabricant *et al.*, 1971). L'un de ces cristaux a été identifié comme étant du cholestérol (Fabricant *et al.*, 1973). L'inoculation du virus à des chats d'élevages conventionnels ou SPF (*Specific Pathogen Free*) a induit des signes cliniques de conjonctivite, trachéite, bronchite, pneumonie (Egyed *et al.*, 1997). Chez des chats

mâles SPF, le virus a provoqué une pathologie urinaire (cystites hémorragiques et obstructions urétrales) accompagnée d'une séroconversion (Fabricant, 1981; Kruger *et al.*, 1990b). Par contre, une autre expérience d'inoculation expérimentale à des chats non SPF n'a pas reproduit de signes cliniques (Kruger *et al.*, 1990a). Le virus a néanmoins provoqué une réponse sérologique et s'est installé à l'état latent chez ces animaux. Les modèles expérimentaux lapin et chat reproduisent plus ou moins fidèlement la pathogénie observée chez l'espèce hôte naturelle. Quoiqu'il en soit, le type de souches utilisées, certains facteurs propres aux animaux (âge, sexe, gestation) et à la procédure expérimentale (voie d'inoculation, mode de détection) peuvent aboutir à des résultats variables qui ne reflètent qu'imparfaitement la réalité d'une infection naturelle (Naeem *et al.*, 1991a; Thiry *et al.*, 1991).

Le rôle du BoHV-4 dans les maladies des bovins reste donc matière à discussion. Le pouvoir pathogène du BoHV-4 est controversé et semble dépendre en partie des souches utilisées. Peu d'entre elles sont réellement pathogènes, et la majorité n'induit pas ou peu de signes cliniques lors d'infections expérimentales de bovins. Néanmoins, le BoHV-4 est de plus en plus impliqué dans des affections du tractus génital femelle : métrite *post-partum*, vulvovaginite et avortement. Le BoHV-4 pourrait aussi agir en association avec d'autres agents infectieux. Par exemple, une surinfection par le BoHV-4 de veaux infectés un mois plus tôt par du virus de la diarrhée virale bovine cytopathogène a provoqué des signes généraux (fièvre et dépression), ainsi que du jetage nasal, de la leucopénie et de la diarrhée. Le virus de la diarrhée virale bovine était résolu des écouillons nasaux (Castrucci *et al.*, 1992). Une association de type synergique pourrait exister entre le BoHV-4 et d'autres agents pathogènes (Evermann et Henry, 1989). Il a notamment été proposé que le BoHV-4 induit une immunodépression favorisant d'autres infections (Van Opdenbosch *et al.*, 1984). Par ailleurs, il est connu que certains rha-

dinivirus, tels l'AIHV-1, l'agent étiologique de la forme africaine du coryza gangreneux, ont la propriété de s'atténuer complètement après quelques passages en culture de cellules (Plowright *et al.*, 1965; Plowright, 1968; Handley *et al.*, 1995). Ces données suggèrent qu'une atténuation des souches de BoHV-4 au cours de l'amplification en culture de cellules consécutive à l'isolement viral pourrait être une des raisons expliquant l'incapacité fréquente à reproduire des signes cliniques suite à l'inoculation d'épreuve avec ce virus.

## 2.4/ Pathogénie et latence

Le BoHV-4 est régulièrement isolé à la fois du tractus respiratoire supérieur (Castrucci *et al.*, 1987b) et des voies génitales (Wellemans, 1984; Van Opdenbosch *et al.*, 1988). La transmission par voie nasale a été prouvée de manière expérimentale (Castrucci *et al.*, 1987a; Dubuisson *et al.*, 1989a). La transmission naturelle par voie génitale est probable mais n'a pas encore été établie. D'autres voies d'inoculation ont été utilisées expérimentalement : injections intraveineuse, intradermique et intratesticulaire (Osorio et Reed, 1983; Dubuisson *et al.*, 1987a; 1989a).

La multiplication primaire du virus se déroule vraisemblablement au niveau de la porte d'entrée, c'est-à-dire au niveau des cellules épithéliales des muqueuses. Le virus se propagerait ensuite dans l'organisme par le biais des cellules mononucléées infectées (Osorio et Reed, 1983). L'infection de cellules sanguines par le BoHV-4 pourrait avoir des conséquences sur la régulation de la réponse immunitaire. L'altération de cette réponse pourrait expliquer l'intervention du BoHV-4 comme facteur associé à une variété de syndromes différents. La virémie n'est pas toujours détectable et peut réapparaître de façon périodique (Dubuisson *et al.*, 1987a; Egyed *et al.*, 1999). Sur base de la sensibilité des cellules endothéliales bovines à l'infection par le BoHV-4, il a été suggéré que le virus puisse se propager des cellules mononucléées sanguines à l'endothélium vasculaire, et de là, dans divers tissus (Lin *et al.*,

1997; Lin *et al.*, 1999). Le virus peut être isolé de nombreux organes ou tissus, y compris le cerveau et la moelle épinière (Castrucci *et al.*, 1987b; Dubuisson *et al.*, 1989a; Nakane *et al.*, 2000). De plus, il peut passer la barrière placentaire et infecter le fœtus chez la vache gravide (Kendrick *et al.*, 1976; Wellemans et Van Opdenbosch, 1989). L'étude des interactions entre le BoHV-4 et la cellule infectée a révélé que les héparans sulfates interviennent comme premiers récepteurs d'attachement (Vanderplasschen *et al.*, 1993). Vu la distribution ubiquiste de l'héparan sulfate, il faut postuler l'existence d'un second récepteur cellulaire impliqué dans une seconde phase d'attachement et/ou de pénétration et qui restreint le tropisme tissulaire du virus. *In vitro*, il a été démontré que la multiplication du BoHV-4 est dépendante de la phase S du cycle cellulaire (Vanderplasschen *et al.*, 1995). Si cette dépendance existe également *in vivo*, elle expliquerait pourquoi le BoHV-4 se multiplie exclusivement dans les cellules en division. Le virus se multiplie principalement dans les épithéliums oculaires, respiratoires et génitaux. Ces tissus sont considérés à la fois comme des sites de multiplication primaires et secondaires. Le virus peut y produire des lésions de nécrose cellulaire et être excrété dans les écoulements oculaires, le jetage nasal et les sécrétions génitales.

Après primo-infection, le BoHV-4 s'installe à l'état latent, comme les autres herpesvirus. L'état latent consiste en la présence, dans certaines cellules, de l'information génétique virale sous forme d'un épisode circulaire. Il s'agit donc d'une infection silencieuse au cours de laquelle seul un petit nombre de gènes codant pour des protéines virales sont exprimés. Le BoHV-4 à l'état latent peut être réactivé à la suite d'un stimulus naturel tel que la parturition, ou expérimental tel qu'un traitement à la dexaméthasone. Il est alors réisolé à partir d'écouvillons nasaux, de cellules mononucléées sanguines (CMS), de cultures d'explants de moelle épinière et de ganglion trijumeau (Krogman et McAdaragh, 1982; Osorio et Reed, 1983; Castrucci *et al.*, 1987c;

Dubuisson *et al.*, 1989a). Les caractéristiques des isolats viraux réisolés après réactivation ou durant la période de latence ne diffèrent pas du virus inoculé initialement.

Le site de latence a pu être déterminé pour certains rhadinovirus: il s'agit de cellules macrophagiques et/ou des L<sub>B</sub> en ce qui concerne le MuHV-4, le EHV-2 et le CeHV-17 (Sunil-Chandra *et al.*, 1992; Drummer *et al.*, 1996; Bergquam *et al.*, 1999; Weck *et al.*, 1999; Flano *et al.*, 2000). La nature des cellules supportant l'infection latente du BoHV-4 reste encore l'objet d'une littérature abondante et contradictoire. La présence du virus latent a été démontrée dans les CMS (Osorio et Reed, 1983; Dubuisson *et al.*, 1989a; Boerner *et al.*, 1999). Parallèlement, la rate apparaît comme l'organe principal supportant la latence chez le lapin infecté expérimentalement (Osorio *et al.*, 1982; Osorio *et al.*, 1985a) et chez les bovins (Egyed *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 1996). La latence du BoHV-4 au sein des CMS est vraisemblablement à l'origine de la détection de l'ADN viral au sein de tous les organes vascularisés (nœuds lymphatiques, amygdales, ganglion trijumeau, système nerveux central (cerveau, cervelet, moelle épinière), tractus respiratoire supérieur, poumon, moelle osseuse, conjonctive, cornée, tractus digestif, vésicule biliaire) (revu par Egyed et Bartha, 1998; Boerner *et al.*, 1999). Il faut donc être très prudent avant de considérer ces organes en tant que sites de latence effectifs. Parmi les CMS, certains auteurs soutiennent la thèse d'une latence au sein de la lignée lymphocytaire (Egyed *et al.*, 1996; Boerner *et al.*, 1999) ou de la lignée monocytaire-macrophagique (cellules non T et non B de la zone marginale de la rate) (Osorio et Reed, 1983; Osorio *et al.*, 1985a; Lopez *et al.*, 1996). Aucun consensus clair n'a pu être dégagé jusqu'à présent (Osorio *et al.*, 1996). Récemment, il a été montré que le virus peut établir une infection persistante *in vitro* dans une lignée macrophagique bovine (Donofrio et Van Santen, 2001).

## 2.5/ Réponse immune envers l'herpèsvirus bovin 4

La réponse immune des bovins après une infection par le BoHV-4 se caractérise par une production faible voire nulle d'anticorps neutralisants alors que de hauts titres d'anticorps anti-BoHV-4 peuvent être détectés par immunofluorescence indirecte (IFI) (Luther *et al.*, 1971; Mohanty *et al.*, 1972; Sass *et al.*, 1974; Storz *et al.*, 1984; Edwards et Newman, 1985; Truman *et al.*, 1986; Wellemans *et al.*, 1986; Castrucci *et al.*, 1988).

Quand une réponse est observée, les anticorps neutralisants apparaissent entre 22 et 34 jours après la primo-infection (Castrucci *et al.*, 1987a). Cependant, la présence de complément permet une détection plus précoce et augmente considérablement les titres d'anticorps neutralisant le BoHV-4 (Dubuisson *et al.*, 1987b). Aucune réponse secondaire en anticorps neutralisants n'est observée chez des animaux infectés, traités à la dexaméthasone. Ceci suggère que le BoHV-4 n'est neutralisé que par des immunoglobulines précoces appartenant probablement à la classe des IgM (Dubuisson *et al.*, 1989a). Une étude de la neutralisation à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre des glycoprotéines d'enveloppe du BoHV-4 indique que les domaines protéiques impliqués dans l'attachement et la pénétration sont peu accessibles aux anticorps monoclonaux (Dubuisson *et al.*, 1990). Le test de séroneutralisation ne peut donc pas être utilisé pour identifier une souche du BoHV-4 ou pour détecter des anticorps. Par contre, des techniques comme l'IFI ou l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) détectent une séroconversion entre 14 et 20 jours après une infection primaire (Osorio et Reed, 1983; Edwards et Newman, 1985; Dubuisson *et al.*, 1987b). De plus, une réponse secondaire est mise en évidence par ces techniques à la suite de la réactivation virale (Dubuisson *et al.*, 1989a).

L'association du BoHV-4 avec les CMS et les tissus lymphoïdes dans les infections aiguës et latentes pourrait interférer avec la régulation de la réponse immune à médiation cellulaire, mais ces effets n'ont pas encore

été étudiés (Osorio *et al.*, 1985a).

Seuls des tests d'hypersensibilité retardée ont été pratiqués chez les bovins infectés expérimentalement. Ceux-ci se sont révélés négatifs à plusieurs reprises et ne peuvent donc pas être utilisés pour le diagnostic de routine (Castrucci *et al.*, 1988). Un test à l'interféron- $\gamma$  a également été suggéré pour investiguer la réponse à médiation cellulaire montée envers le BoHV-4 (Godfroid *et al.*, 1996).

## 2.6/ Epidémiologie de l'infection

Le virus a été identifié dans de nombreux pays, notamment en Europe, mais aussi en Afrique, en Amérique du Nord et en Asie. L'infection virale est signalée depuis longtemps en Europe. En Belgique, 28,7 % des exploitations de Wallonie sont séropositives, contre 15 % en Flandre (Van Malderen *et al.*, 1987). Dans une autre étude, 38 % des veaux de deux unités d'élevage possédaient des anticorps dirigés contre le BoHV-4 (Van Opdenbosch *et al.*, 1986b). Aux Pays-Bas, le virus a pu être détecté dans 4 % des échantillons de lait issus de 54 vaches atteintes de mammite (Wellenberg *et al.*, 2002b). En 1986, 18,4 % des sera bovins étaient positifs en Allemagne de l'Ouest ainsi que 0 % à 69 % des sera issus de taureaux appartenant à un centre d'insémination artificielle situé en Allemagne (Truman *et al.*, 1986). Dans le nord de l'Italie, 50 % des exploitations sont infectées (Luini et Fioni, 1986a; 1986b). En Suisse, 4,2 % du bétail est séropositif (Metzler *et al.*, 1990). Dans l'ouest de l'Ecosse, une étude portant sur 109 taureaux d'élevage n'a pas détecté d'anticorps anti-BoHV-4 (Mcgowan et Murray, 1999). La situation épidémiologique en France n'est pas connue avec précision. Cependant, il existe des bovins séropositifs envers le BoHV-4. En Pologne, une enquête menée sur des bisons européens sauvages (*Bison bonasus*) n'a pas permis la détection du BoHV-4 (Borchers *et al.*, 2002).

Au Kenya, en Tanzanie et en Afrique du Sud, différentes souches assimilables au BoHV-4 ont été isolées d'affections cutanées ou du syndrome

"epivag" (Kaminjolo *et al.*, 1972; Rweyemamu et Loreto, 1973; Theodoridis, 1978). Une étude sérologique effectuée au Zaïre a détecté 70 % de bovins séropositifs (Eyanga *et al.*, 1989). Au Ghana et en Ethiopie, on rapporte respectivement des séroprévalences de 14 % et de 22,3 % (Marchot *et al.*, 1991; Woldemeskel *et al.*, 2000). En Afrique de l'Est, 93,6 % des buffles africains sont séropositifs pour le BoHV-4 (Rossiter *et al.*, 1989). Une telle séroprévalence n'est pas explicable en soi, à fortiori chez des animaux vivant en liberté sur des territoires étendus.

En Amérique du Nord, la séroprévalence de différentes sous-populations envers le BoHV-4 varie fortement d'une région à l'autre. En 1977, 2 % des bovins de l'Oklahoma étaient séropositifs (Potgieter et Mare, 1974). En 1986, 8,7 % des sera provenant des Etats-Unis étaient positifs (Truman *et al.*, 1986). Une étude sérologique sur des bovins viandeux et laitiers de l'Idaho, de l'Oregon et de Washington a détecté 86 % d'animaux séropositifs (Guo *et al.*, 1988). Une autre étude récente effectuée dans le Minnesota a permis de mettre en évidence des anticorps anti-BoHV-4 chez 17 % d'animaux appartenant à des exploitations sans problèmes, et chez 36 % à 88 % d'animaux provenant d'une exploitation avec problèmes de reproduction (Naeem *et al.*, 1989). Dans le Kansas, la prévalence de l'infection par le BoHV-4 est de 12,4 % dans le bétail viandeux et de 24,2 % dans le bétail laitier (Phillips *et al.*, 1983; Phillips et Nassar, 1989). Dans l'état de Géorgie, l'endométrite associée au BoHV-4 semble être un syndrome émergent et on rapporte une séroprévalence de 36 % chez des troupeaux laitiers présentant ce genre de problèmes (Frazier *et al.*, 2001; 2002). A Taiwan, 23,3 % des bovins sont séropositifs (Kwang, 1999); au Japon, une enquête épidémiologique récente montre que 8,9 % des bovins ont des anticorps anti-BoHV-4 détectables par ELISA (Asano *et al.*, 2003).

Dans le centre du Michigan, 44 % des chattes et 73 % des chats possèdent des anticorps dirigés contre le BoHV-

4 (Kruger *et al.*, 2000), ce qui dépasse les 30 % de séroprévalence décelés préalablement au Minnesota (Kruger *et al.*, 1991).

Le virus est donc présent de manière significative partout dans le monde, sans être cependant la cause de pathologies importantes.

## 2.7/ Diagnostic

Le diagnostic peut être réalisé par la mise en évidence du virus de façon directe (isolement viral ou mise en évidence du génome ou des antigènes viraux) ou indirecte (démonstration d'une réponse immunitaire dirigée contre le BoHV-4). Comme le BoHV-4 infecte des CMS (Osorio et Reed, 1983), il peut être isolé virtuellement de tous les organes. Son isolement ou sa détection dans un tissu ou un organe ne démontre pas son rôle dans les lésions observées, mais peut simplement résulter de sa présence incidente dans des cellules sanguines, au moment de la récolte du prélèvement. Ceci explique probablement aussi en partie la variété de maladies dans lesquelles le BoHV-4 a été isolé. Tout diagnostic direct d'infection par le BoHV-4 doit donc être interprété avec beaucoup de prudence.

Tout d'abord, le diagnostic direct d'infection par le BoHV-4 peut reposer sur son isolement en cultures primaires de cellules ou par co-culture de cellules mononucléées ou d'explants avec des lignées continues. D'autre part, la détection du matériel génétique du BoHV-4 se fait par PCR ou par hybridation in situ. Le diagnostic PCR utilise des amorces spécifiques, par exemple pour le gène codant pour la glycoprotéine gB (Boerner *et al.*, 1999) ou la thymidine kinase (Egyed *et al.*, 1996; Egyed et Bartha, 1998; Wellenberg *et al.*, 2001). D'autres séquences d'ADN ont été choisies pour la détection spécifique du BoHV-4, par des techniques d'hybridation notamment (Naeem *et al.*, 1991b; Galik *et al.*, 1993). La mise en évidence des glycoprotéines virales se fait par marquages immunofluorescents (Anson *et al.*, 1982; Augsburg et Metzler, 1989) ou autres techniques d'immunohistochimie (Egyed *et al.*, 1997).



Ces techniques utilisent des sera polyclonaux monospécifiques issus de bovins ou de lapins, ou encore différents anticorps monoclonaux produits par inoculation de souris (Dubuisson *et al.*, 1989b; Li *et al.*, 1991; Dubuisson *et al.*, 1992a; 1992b). Les anticorps monoclonaux anti-BoHV-4 ne reconnaissent pas les autres herpesvirus bovins. L'un d'entre eux reconnaît l'AIHV-1, un virus de gnou (*Connochaetes taurinus*) responsable de la forme africaine du coryza gangreneux chez les bovins (Dubuisson *et al.*, 1989b). La relation antigénique existant entre le BoHV-4 et l'AIHV-1 a par ailleurs été démontrée par différentes études sérologiques (Rossiter *et al.*, 1977; Osorio *et al.*, 1985b; Rossiter *et al.*, 1988).

Par ailleurs, le diagnostic indirect repose sur la démonstration de la présence ou du passage du BoHV-4 par la détection d'une réaction immune humorale spécifique dirigée contre le virus. Ce diagnostic repose sur des tests ELISA (Edwards et Newman, 1985), IFAT (*Immunofluorescent Antibody Test*) ou autres (Naeem et Goyal, 1990; Essmail *et al.*, 1999; Wellenberg *et al.*, 1999). Comme mentionné ci-dessus, le test de séro-neutralisation n'est pas utilisable car les bovins produisent peu d'anticorps neutralisant le BoHV-4 et cette réponse est transitoire (Dubuisson *et al.*, 1990). Certaines relations antigéniques entre herpesvirus bovins ont été démontrées antérieurement (Rossiter *et al.*, 1977; Ludwig, 1983; Levings *et al.*, 1984; Rossiter *et al.*, 1988). Aucune relation antigénique entre le BoHV-4 et les autres herpesvirus bovins n'a été démontrée par des tests classiques (séroneutralisation et immunofluorescence) (Potgieter et Mare, 1974; Osorio *et al.*, 1985b; Metzler et Wyler, 1986a; 1986b; Yamamoto *et al.*, 2000). Cependant, une réaction croisée a été rapportée entre le BoHV-4 et le BoHV-1 par ELISA ou en immunoelectrophorèse à deux dimensions (Mohanty *et al.*, 1984; Spirig *et al.*, 1989). Il se pourrait cependant que les sera positifs en ELISA envers les deux virus proviennent d'animaux infectés à la fois par le BoHV-4 et le BoHV-1 (Metzler et Wyler, 1986a; 1986b).

## 2.8/ Prophylaxie

Des vaccins contre le BoHV-4 ont été développés aux Etats-Unis, mais ils sont absents en Europe. En effet, les laboratoires pharmaceutiques se sont toujours interrogés, à juste titre, sur l'opportunité de disposer d'un tel vaccin pour lutter contre une infection virale largement asymptomatique.

Le contrôle de l'infection par le BoHV-4 sera donc assuré dans une ferme par des mesures exclusivement hygiéniques. Les animaux infectés de manière latente seront identifiés par examen sérologique positif et seront séparés du groupe séronégatif, ou mieux éliminés du troupeau. Il faudra être particulièrement attentif aux vaches post-parturientes séropositives qui sont susceptibles d'excréter de grandes quantités de virus, de manière prolongée, dans les exsudats utérins lors de métrites. Cependant, les mesures de contrôle prendront surtout en compte la transmission directe du virus par voie respiratoire et devront empêcher les contacts directs entre animaux séropositifs et séronégatifs. La transmission indirecte sera prévenue par l'utilisation de matériel distinct pour les deux groupes d'animaux (Thiry *et al.*, 2000).

## 3/ ASPECTS VIROLOGIQUES CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES DE L'INFECTION PAR L'HERPÈSVIRUS BOVIN 4

Bien que l'implication directe du BoHV-4 dans les pathologies bovines ne soit pas clairement établie, ce rhadinovirus représente un centre d'intérêt pour la recherche fondamentale, et ce pour diverses raisons. Premièrement, le BoHV-4 procure l'opportunité d'étudier la biologie d'un gammaherpèsvirus par l'infection de son hôte naturel, et ce, sans danger apparent pour le chercheur. Certaines données relatives au BoHV-4 peuvent être transposées à d'autres rhadinovirus qui sont parfois impliqués dans des pathologies humaines graves. Par

ailleurs, grâce à sa qualité de virus à priori apathogène, le BoHV-4 représente un candidat potentiel comme vecteur d'expression, en vaccinologie notamment. Le séquençage complet du génome du BoHV-4 et la caractérisation de ses autres propriétés moléculaires sont en ce sens des outils indispensables aux manipulations génétiques nécessaires pour la création de ce type de vecteurs.

### 3.1/ La particule virale

La particule virale du BoHV-4 possède la structure typique des herpesvirus (figure 2) (Schulze *et al.*, 1967; Smith *et al.*, 1972; Munz *et al.*, 1974; Todd et Storz, 1983). Le matériel génétique consiste en une molécule d'ADN linéaire bicaténaire formant un corps dense. Il a été démontré récemment que la particule virale du cytomégalovirus humain (HCMV) contient, outre la molécule d'ADN, certains transcrits viraux qui permettraient à quelques gènes d'être traduits dès la pénétration du virus dans la cellule (Babiuk et Rouse, 1976; Bresnahan et Shenk, 2000). Le matériel génétique est contenu dans une capsid de symétrie icosaédrique formée de l'arrangement régulier de 162 capsomères tubulaires (150 hexamères et 12 pentamères). Matériel génétique et capsid forment la nucléocapsid dont le diamètre est de 90 à 100 nm. La nucléocapsid est entourée d'une substance amorphe appelée tégument. Ce dernier contient notamment des protéines de régulation. La distribution du tégument est souvent asymétrique et son épaisseur varie en fonction de la localisation de

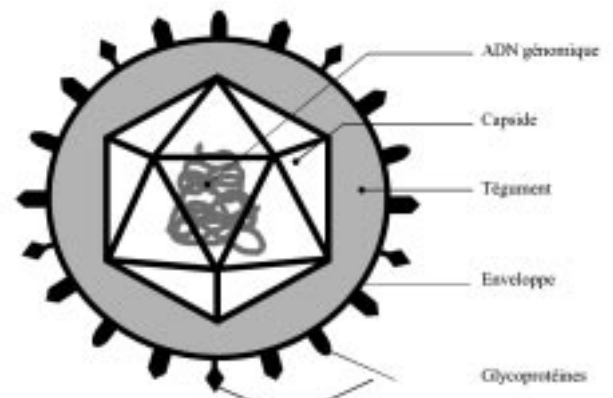


Figure 2 : Particule virale d'herpèsvirus.

la particule virale au sein de la cellule infectée. L'ensemble des structures susmentionnées est enveloppé dans une membrane constituée d'une double couche lipidique semblable à celle des membranes cellulaires : l'enveloppe virale. Celle-ci contient des glycoprotéines s'élevant jusqu'à 8 nm de la surface du virion.

Le BoHV-4 est sensible aux pH faibles (pH 3), à l'éther (20 %) et au chloroforme (20 %). Il est détruit par la chaleur (50°C pendant 30 min.). Sa multiplication est inhibée par le bromure de déoxyuridine (0,1 mM) (Bartha *et al.*, 1966; Luther *et al.*, 1971; Castrucci *et al.*, 1986).

### 3.2/ Biologie de l'infection *in vitro*

#### 3.2.1/ Spectre d'hôtes *in vitro*

Le BoHV-4 se multiplie en cultures de cellules bovines primaires ou continues: cellules primaires de rein, de testicule, de poumon, de peau, de rate, de thyroïde, de trachée embryonnaire (EBTr pour *Embryonic Bovine Trachea*), de moelle osseuse fœtale (BBm pour *Bovine Bone marrow*, et FB4M pour *Foetal Bovine 4M*), de lymphosarcome de thymus de veau (LCT pour *Lymphosarcoma Calf Thymus*), ainsi que dans diverses lignées continues d'origine rénale (cellules MDBK pour *Madin Darby Bovine Kidney*, GBK pour *Georgia Bovine Kidney*, et BEK pour *Bovine Embryonic Kidney*) et pulmonaire (EBL pour *Embryonic Bovine Lung*) (Bartha *et al.*, 1966; Luther *et al.*, 1971; Smith *et al.*, 1972; Parks et Kendrick, 1973; Rweyemamu et Loretu, 1973; Sass *et al.*, 1974; Thiry *et al.*, 1981a; Storz *et al.*, 1984; Theodoridis, 1985; Truman, 1985; Kit *et al.*, 1986). Le BoHV-4 peut établir une infection persistante dans des cellules macrophagiques bovines (BOMAC pour *Bovine Macrophagic Cells*) (Donofrio et Van Santen, 2001).

Le BoHV-4 se multiplie également en culture de cellules (rénales pour la plupart) d'origines diverses : mouton, chèvre, porc, chat, chien, lapin, vison, cheval, dindon, furet, poulet, hamster, singe et homme (Bartha *et al.*, 1966; Fabricant *et al.*, 1971; Luther *et al.*, 1971; Barahona *et al.*, 1973;

Rweyemamu et Loretu, 1973; Gibbs et Rweyemamu, 1977; Theodoridis, 1985; Truman, 1985; Kit *et al.*, 1986; Kokles, 1986; Kokles et Pellinghoff, 1987; Peterson et Goyal, 1988; Egyed, 1998). Des cellules de rhabdomyosarcome d'origine humaine ont permis l'établissement d'une infection persistante par le BoHV-4 (Donofrio *et al.*, 2000b). Par contre, aucune production virale ne peut être obtenue sur des cellules humaines de type HeLa (Henrietta Lacks) et Hep-2 (*Human Epidermoid carcinoma*) ou des fibroblastes d'embryons de poulets (Bartha *et al.*, 1966; Luther *et al.*, 1971; Rweyemamu et Loretu, 1973; Truman, 1985; Egyed, 1998). Le spectre d'hôtes *in vitro* du BoHV-4 est donc très large.

#### 3.2.2/ Culture virale et effet cytopathogène

La cinétique de production virale extra- et intracellulaire indique que le BoHV-4 est un virus associé aux cellules et qu'il présente une croissance lente (Storz *et al.*, 1984). Cette cinétique est différente selon que le virus est produit sur des cellules fraîchement ensemencées ou sur des cellules confluentes (Dubuisson *et al.*, 1988). Ceci s'explique par la dépendance du BoHV-4 vis-à-vis de la phase S du cycle cellulaire (Vanderplasschen *et al.*, 1995). L'effet cytopathogène n'apparaît que 48 à 72 heures après infection et est caractérisé par la présence de cellules arrondies, dispersées dans le tapis cellulaire (Bartha *et al.*, 1966); la lyse totale est observée après environ cinq jours d'incubation et ce délai varie selon le type de cellules et la multiplicité d'infection utilisés. Des inclusions de Cowdry de type A sont présentes dans le noyau des cellules infectées (Bartha *et al.*, 1966). En milieu semi-liquide ou solide, des plages de lyse sont visibles après cinq à neuf jours selon le type de cellules utilisé (Potgieter et Mare, 1974; Storz *et al.*, 1984; Castrucci *et al.*, 1986; Dubuisson *et al.*, 1988); les plages de lyse produites sous carboxyméthylcellulose ou agarose ont un contour irrégulier et sont beaucoup plus petites que celles induites par le BoHV-1 (Storz *et al.*, 1984).

#### 3.2.3/ Cycle de multiplication virale *in vitro*

Les herpèsvirus peuvent établir deux types principaux d'infection : l'infection dite productive et l'infection latente (figure 3). La compréhension des mécanismes sous-tendus par ces deux types d'infection résulte plus particulièrement de l'étude de certains herpèsvirus dont l'herpèsvirus simplex 1 (HSV-1) et le virus d'Epstein-Barr (HHV-4). Ces données sont le plus souvent transposables aux autres espèces d'herpèsvirus. Le cycle de multiplication viral sera ici décrit dans le cadre général des herpèsvirus, tout en mentionnant les particularités connues pour le BoHV-4.

##### L'infection productive

Les processus décrits ci-après sont schématisés dans la figure 3A. L'attachement du virion à la surface cellulaire résulte de l'interaction entre une ou plusieurs glycoprotéines de l'enveloppe virale et un ou plusieurs récepteurs cellulaires. Le premier récepteur cellulaire reconnu par le BoHV-4 est l'héparan sulfate (Vanderplasschen *et al.*, 1993). Ces molécules sont présentes à la surface d'un grand nombre de cellules, ce qui permet d'expliquer en partie le large spectre de cellules sensibles au virus. Après l'attachement initial du virion survient l'attachement stable impliquant un second récepteur cellulaire non encore déterminé pour le BoHV-4.

Suite à l'attachement, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane plasmique, libérant la nucléocapside et les protéines de tégument dans le cytoplasme (Roizman et Knipe, 2001). La capsid libérée s'attache à des microtubules et est transportée vers le noyau (Granzow *et al.*, 1997; Sodeik *et al.*, 1997). Certaines protéines du tégument peuvent également être transportées vers le noyau où elles activent la transcription du génome viral. Au terme du transport intracytoplasmique, la nucléocapside arrive à proximité de la membrane nucléaire.

La capsid délivre son ADN dans le noyau au niveau d'un pore nucléaire. Dès son entrée dans le noyau, l'ADN viral se circularise en l'absence de

toute synthèse protéique virale (Garber *et al.*, 1993). Cette observation suggère un mécanisme de circularisation sous la dépendance de pro-

téines cellulaires ou de protéines virales de structure (Poffenberger et Roizman, 1985). La transcription de l'ADN viral débute alors dans le

noyau. Les gènes des herpesvirus sont exprimés en cascade grâce à une régulation stricte par un système alternatif "on-off", qui joue le rôle de déclencheur-extincteur de la lecture séquentielle des gènes. Ceci permet de distinguer trois groupes de gènes dont l'expression diffère dans le temps : les gènes  $\alpha$  ou gènes précoces-immédiats (IE, *Immediate early*), les gènes  $\beta$  ou gènes précoces (E, *Early*) et les gènes  $\gamma$  ou gènes tardifs (L, *Late*) (Honess et Roizman, 1974; 1975; Jones et Roizman, 1979; Dubuisson *et al.*, 1991b; Chang et Van Santen, 1992).

Dès que l'ADN viral est circularisé dans le noyau, certaines protéines de tégment interagissent avec des composants transcriptionnels de l'hôte de façon à stimuler la transcription des gènes  $\alpha$  par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Les protéines IE1 et IE2 du BoHV-4 sont considérées comme les deux protéines précoces-immédiates majeures du virus (Van Santen, 1991; Chang et Van Santen, 1992; Zhang et Van Santen, 1995; Bermudez-Cruz *et al.*, 1997; 1998). Une fois produites dans le cytoplasme, les protéines  $\alpha$  vont être importées dans le noyau où elles vont contrôler la suite des événements transcriptionnels, c'est-à-dire ralentir l'expression des gènes  $\alpha$  et activer l'expression des gènes  $\beta$  et  $\gamma$ .

Les protéines codées par les gènes  $\beta$  atteignent leur pic d'expression dans les quatre à huit heures suivant l'infection. Elles sont notamment impliquées dans le métabolisme nucléotidique et les événements liés à la réplication de l'ADN viral.

Le pic d'expression des gènes  $\gamma$  n'est atteint qu'une fois la réplication de l'ADN viral entamée. On distingue au sein des gènes  $\gamma$ , les gènes  $\gamma_1$  ou tardifs partiels, dont l'expression est augmentée par la synthèse d'ADN viral, et les gènes  $\gamma_2$  ou tardifs réels, dont l'expression est totalement dépendante de la synthèse d'ADN viral (Sullivan *et al.*, 1989; Dubuisson *et al.*, 1991b; Roizman et Knipe, 2001). Les protéines de structure (capside, tégment, enveloppe) exprimées par les gènes  $\gamma$  sont produites en grande quantité dans le cytoplasme. Certaines d'entre elles

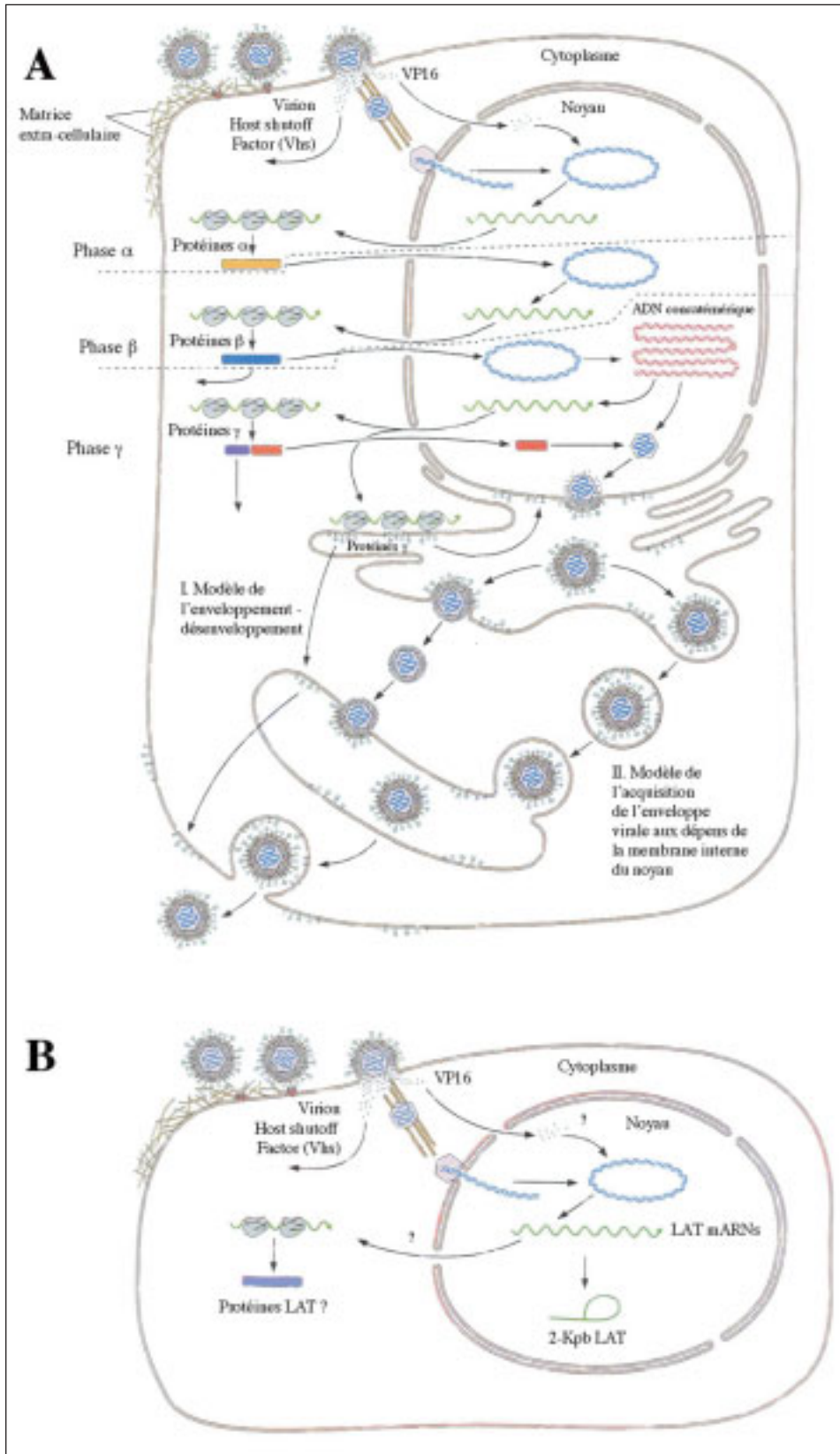


Figure 3 : Cycle des herpesvirus. (A) cycle lytique, les points I et II schématisent les deux modèles décrits d'acquisition de la membrane virale et de sortie des particules virales néoformées ; (B) établissement de l'infection latente. Selon Flint *et al.*, 2000b.

migrent vers le noyau où elles s'assemblent pour former de nouvelles capsides.

La majorité des herpèsvirus sont connus pour réprimer l'expression des gènes cellulaires au cours de l'infection productive (phénomène connu sous le nom de "host shutoff") (Greco *et al.*, 2000). Le BoHV-4 n'affecte pas la synthèse des protéines cellulaires au cours de la multiplication virale (Augsburger et Metzler, 1989).

La réplication de l'ADN viral circularisé débute au niveau des origines de réplication. Elle se déroule selon le mode des "cercles roulants". Ceci génère des concatémères, structures complexes composées d'unités génomiques se suivant en tête-à-queue. Le clivage et l'encapsidation de l'ADN viral sont les étapes au cours desquelles les intermédiaires de réplication sont clivés en unités génomiques et intégrés à l'intérieur des capsides néoformées. Les capsides contenant l'ADN bourgeonnent à la face interne de la membrane nucléaire puis migrent dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE), acquérant de ce fait une enveloppe supposée contenir les précurseurs des protéines d'enveloppe virale. Le passage des virions enveloppés de la lumière du RE vers la surface cellulaire n'est pas bien compris; deux mécanismes sont décrits chez les herpèsvirus.

Le premier modèle, le plus probable, est celui de l'enveloppement-désenveloppement (voir figure 3A, point I). Dans ce modèle, les virions enveloppés fusionnent avec la membrane du RE, relarguant de ce fait des capsides libres dans le cytoplasme. Ces capsides bourgeonnent dans des vésicules golgiennes aux dépens desquelles se fait l'enveloppement définitif (Smith, 1980; Browne *et al.*, 1996; Granzow *et al.*, 2001; Mettenleiter, 2002).

Dans le second modèle (modèle luminal), les virions enveloppés présents dans la lumière du RE sont incorporés dans une vésicule de transport et délivrés aux compartiments golgiens (voir figure 3A, point II). Selon ce modèle, les protéines virales d'enveloppe seraient modifiées à la surface

des virions. Les virions enveloppés sont enfin relargués par exocytose (Darlington et Moss, 1968; Johnson et Spear, 1982).

Le BoHV-4 se caractérise par l'accumulation de particules virales à différents stades de maturité sous forme d'inclusions cytoplasmiques. Ces dernières apparaissent 48 à 72 heures après l'infection et sont composées d'une substance amorphe et dense aux électrons, de fibrilles granuleuses et de capsides vides ou pleines, enveloppées ou non. Ces caractéristiques rapprochent le BoHV-4 des cytomegalovirus (Liebermann *et al.*, 1967; Schulze *et al.*, 1967; Mohanty, 1973; Todd et Storz, 1983; Storz *et al.*, 1984; McCoy *et al.*, 1985).

Pour le BoHV-4 comme pour tous les autres herpèsvirus, l'infection productive (ou lytique) provoque la destruction des cellules inoculées. Par ailleurs, une étude a montré que le BoHV-4 est capable d'induire l'apoptose cellulaire au sein de cellules permissives (Sciortino *et al.*, 2000).

#### L'infection latente

Les processus décrits ci-après sont schématisés dans la figure 3B. La latence est observée chez tous les herpèsvirus (pour revue, voir Stevens, 1999; Flint *et al.*, 2000a; Roizman et pellet, 2001). Elle consiste en l'installation du virus au sein des cellules, en l'absence de multiplication virale. L'initiation de l'infection latente se déroule comme le début de l'infection productive. Lorsque l'état latent est établi, la transcription des gènes viraux est sévèrement réduite. La manière dont la cascade de transcription normale est bloquée ou réduite reste un sujet de recherches et de débats. Un faible niveau de transcription des gènes  $\alpha$  ou  $\beta$  peut avoir lieu mais est insuffisant pour initier une infection productive. A l'état latent, le génome viral persiste au sein du noyau sous une forme circulaire appelée épisome. Si la cellule infectée de manière latente se divise, l'ADN viral se comporte comme une unité génomique autosomale: l'épisome est répliqué en même temps que l'ADN génomique de la cellule. Les copies d'épisomes sont alors distribuées aléatoirement entre les cellules filles.

L'état de latence peut être interrompu à la suite d'un stimulus exogène. Des changements dans la physiologie cellulaire peuvent conférer à la cellule la permissivité nécessaire à une infection productive. Le génome est alors transcrit plus efficacement et est répliqué; de nouveaux virions sont produits.

### **3.3/ Biologie moléculaire de l'herpèsvirus bovin 4**

#### **3.3.1/ Protéines virales et antigénicité**

L'enveloppe des herpèsvirus contient de nombreuses glycoprotéines intervenant entre autres dans l'attachement, la pénétration, la sortie et la diffusion des particules virales. Certaines de ces glycoprotéines sont propres à des espèces ou à des sous-familles d'herpèsvirus, ce qui traduit vraisemblablement des adaptations individuelles aux différentes niches écologiques. D'autres sont conservées dans leur séquence ou organisation génomique, ce qui reflète une origine évolutive, et sans doute une fonction biologique commune. On considère habituellement qu'il existe cinq glycoprotéines conservées chez tous les herpèsvirus, bien que toutes n'aient pas fait l'objet d'études approfondies: les glycoprotéines gB, gH, gL, gM et gN (Lake *et al.*, 1998).

L'analyse de virions de BoHV-4 purifiés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à une dimension a révélé 29 polypeptides de structure (Dubuisson *et al.*, 1989c; Thiry *et al.*, 1989; 1990; 1992a; 1992b; 1994). Ils ont été nommés respectivement GVP (gp) ou VP selon qu'ils sont glycosylés ou non, et numérotés de 1 à 29, du plus lourd au plus léger. Dix d'entre eux, tous présents au niveau de l'enveloppe virale, sont glycosylés (GVP3, 6, 8, 10, 11, 16, 17, 18, 21 et 29). Une protéine de 140 kDa (VP7) est présente en grande quantité et représente vraisemblablement la protéine majeure de capsid.

Quatre glycoprotéines majeures de l'enveloppe virale ont été étudiées. La première est constituée du complexe gp6/gp10/gp17 (150 kDa/ 120 kDa/ 51 kDa), composé de deux glycopro-

téines (gp10 et gp17) liées par des ponts disulfures, et auxquelles la gp6 vient s'associer de manière non covalente (Dubuisson *et al.*, 1989c; Li *et al.*, 1991). Il a été déterminé que l'hétérodimère gp10/gp17 (de masse moléculaire apparente de 210 kDa) provient du clivage protéolytique d'un produit de traduction de 135 kDa du gène gB du BoHV-4. Les deux sous-unités subissent l'addition de glycanes *N*- et *O*-liés et sont associées de façon covalente (Dubuisson *et al.*, 1989c; Goltz *et al.*, 1994; Lomonte *et al.*, 1997a). Le gène codant pour la glycoprotéine gB est présent dans le génome de tous les herpèsvirus et sa séquence en acides aminés est très conservée entre les sous-familles. Cette glycoprotéine n'est pas essentielle pour la morphogénèse virale, mais bien pour la pénétration dans les cellules hôtes. Les propriétés biochimiques et biologiques de gB peuvent varier entre les herpèsvirus et, contrairement à celles du BoHV-4, les gB de l'HHV-4 et du MuHV-4 ne sont pas toujours décelables dans la particule virale (Neuhierl *et al.*, 2002). Des anticorps monoclonaux dirigés contre le BoHV-4 ont permis d'identifier 11 épitopes dans cinq domaines antigéniques pour le complexe gp6/gp10/gp17; trois de ces domaines sont localisés sur la gp10 qui semble jouer un rôle majeur dans la production d'anticorps neutralisants (Dubuisson *et al.*, 1989b; 1990). La gB du BoHV-4 exprime le précurseur gp10/gp17 en phase précoce, dès six heures post-inoculation. La concentration du complexe gp6/gp10/gp17 mature augmente néanmoins après répllication de l'ADN viral. Ce complexe est donc de type tardif partiel ou  $\gamma$ 1 (Dubuisson *et al.*, 1991b).

Le second complexe glycoprotéique caractérisé pour le BoHV-4 est gp11/VP24 (120 kDa/ 16,5 kDa), dans lequel gp11, contenant des sucres *N*-liés, est lié de façon non covalente à VP24, un polypeptide non glycosylé (Dubuisson *et al.*, 1989c). Le précurseur de gp11 a été identifié (Dubuisson *et al.*, 1991a). Six épitopes ont été localisés dans deux domaines antigéniques adjacents impliqués dans la neutralisation (Dubuisson *et al.*, 1990). La cinétique

d'expression de ce complexe est strictement de type tardif (Dubuisson *et al.*, 1991b). La plupart des anticorps monoclonaux produits reconnaissent l'un des deux complexes décrits ci-dessus. Ceux-ci représentent donc des composants antigéniques majeurs du virion.

La troisième glycoprotéine majeure d'enveloppe du BoHV-4 est gp8 (135 kDa) (Dubuisson *et al.*, 1989c; Dubuisson *et al.*, 1992a). Il a été montré que gp8 interagit avec les molécules de sulfate d'héparane et joue par ce biais un rôle déterminant dans l'attachement de la particule virale à la surface des cellules hôtes (Vanderplasschen *et al.*, 1993). En plus d'être insérée dans l'enveloppe virale, la gp8 est également sécrétée dans le surnageant de culture (Dubuisson *et al.*, 1992a). La forme sécrétée pourrait interférer avec la réponse immunitaire humorale de l'hôte (Dubuisson *et al.*, 1992a). Gp8 est une protéine strictement tardive (Dubuisson *et al.*, 1991b).

La quatrième glycoprotéine majeure du BoHV-4 à avoir été caractérisée est gp1 (>300 kDa) (Dubuisson *et al.*, 1989c; Dubuisson *et al.*, 1992b). Elle est exprimée strictement en phase tardive (Dubuisson *et al.*, 1991b). Une cinquième glycoprotéine, la gp21 (26-27 kDa) a été détectée par immunoprecipitation au moyen de sera d'animaux infectés (Dubuisson *et al.*, 1989a).

Les gènes du BoHV-4 exprimant les glycoprotéines gH (gp110) et les deux formes de la gL (gp31-35 et gp 45-65) ont pu être déterminés sur base de leur homologie positionnelle avec les gènes BXL2 (gH) et BKRF2 (gL) du HHV-4. Leur produit d'expression a été caractérisé (Lomonte *et al.*, 1997b). Ces deux glycoprotéines d'enveloppe sont conservées chez pratiquement tous les herpèsvirus. La glycoprotéine gH est impliquée dans la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte et dans la propagation du virus de cellule à cellule, probablement par fusion des membranes plasmiques. Le rôle de gL est moins bien connu. Elle ne possède pas de zone d'ancrage dans la membrane plasmique, contrai-

rement à gH avec laquelle elle s'associe pour former un complexe de deux ou trois protéines. Ces deux glycoprotéines interviennent donc de façon concomitante dans des processus liés à l'infectivité virale.

Le génome du BoHV-4 possède une ORF homologue au gène de la gM. La fonction biologique de cette glycoprotéine n'a pas été déterminée, et pourrait varier entre les trois sous-familles. Comme propriété conservée, il s'agit d'une glycoprotéine *N*-glycosylée qui forme un complexe covalent ou non avec la glycoprotéine gN. Ce complexe ne semble pas essentiel *in vitro* (exception faite du virus de la maladie de Marek (MDV)), mais peut contribuer à l'atténuation *in vivo*. Une délétion de gM empêche la sortie du virus mais pas le passage de cellules à cellules (Dijkstra *et al.*, 1996; 1997; Jons *et al.*, 1998; Lake *et al.*, 1998; Masse *et al.*, 1999; Rudolph et Osterrieder, 2002; Tischer *et al.*, 2002). Ce complexe a été très peu étudié chez les gammaherpèsvirus et encore moins chez les rhadinovirus.

Le gène Bo10 (anciennement BOLF D1) code pour une glycoprotéine présente sous deux formes: gp113 et gp80. Bo10 a été séquencé et son produit d'expression partiellement caractérisé (Lomonte, 1997; Zimmermann *et al.*, 2001). Cette glycoprotéine de structure du BoHV-4 est fortement *O*-glycosylée et sialylée; 58% de ses acides aminés sont des résidus sérine ou thréonine. Cette protéine est homologue à la protéine gp150 de l'HHV-4 (gène BDLF3); leur profil d'hydrophobicité est quasiment identique. La gp150 de l'EBV est une sialomucine dont la fonction reste inconnue à ce jour (Kurilla *et al.*, 1995). Cette protéine de l'EBV n'est pas essentielle à la multiplication du virus en culture de cellules (Borza et Hutt-Fletcher, 1998) et exercerait donc plutôt ses fonctions biologiques *in vivo*.

Les souches du BoHV-4 sont indiscernables par IFI à l'aide de sera polyclonaux (Potgieter et Mare, 1974; Sass *et al.*, 1974; Storz *et al.*, 1984; Osorio *et al.*, 1985b; Dubuisson *et al.*, 1988). Elles peuvent cependant être distinguées par l'utilisation d'une batterie

d'anticorps monoclonaux, et ce malgré qu'une grande partie de ces derniers reconnaisse des épitopes communs à toutes les souches (Dubuisson *et al.*, 1988). Il a été suggéré que les souches américaines et européennes pourraient être distinguées sur base des propriétés électrophorétiques des complexes gp6/gp10/gp17, gp11/VP24 et de la gp8 (Dubuisson *et al.*, 1991a) mais il s'avère que cette corrélation n'est pas systématiquement respectée (Dubuisson *et al.*, 1991c). Il n'y a pas non plus de corrélation entre le profil antigénique observé en immunofluorescence et le tableau clinique présenté chez l'animal dont est issue la souche étudiée (Dubuisson *et al.*, 1989b; Dubuisson *et al.*, 1991c). L'étude des glycoprotéines du BoHV-4 a montré que les souches de cette espèce forment un groupe antigéniquement homogène, suggérant que la pression de sélection exercée à leur rencontre par le système immunitaire n'autorise que de faibles variations (Potgieter et Mare, 1974; Metzler et Wyler, 1986a; 1986b; Dubuisson *et al.*, 1991a; 1991c).

De nombreux anticorps monoclonaux ont été produits pour étudier les glycoprotéines du BoHV-4 (Dubuisson *et al.*, 1989b; Dubuisson *et al.*, 1992a; 1992b). Aucun (sauf le Mab 16) ne peut, à lui seul, neutraliser le BoHV-4, avec ou sans complément (Dubuisson *et al.*, 1990). Par contre, l'action synergique de certaines paires de monoclonaux a abouti à une neutralisation complète du virus. Les épitopes neutralisants sont de type conformationnel et faiblement accessibles au système immunitaire. Il se pourrait qu'ils soient en partie masqués par des structures secondaires stériquement encombrantes.

### 3.3.2/ Le génome viral

#### *Séquence et structure du génome de l'herpèsvirus bovin 4*

Le génome du BoHV-4 a récemment été complètement séquencé (Broll *et al.*, 1999b; Zimmermann *et al.*, 2001). Cette information est à mettre en regard avec des séquences génomiques complètes publiées pour les autres rhadinovirus (tableau I). Ces séquences ont permis de confirmer,

sur une base moléculaire, les concepts de sous-famille et de genre antérieurement établis sur base des propriétés biologiques des différentes espèces. La structure génomique du BoHV-4 et les analyses phylogéniques ont depuis longtemps révélé qu'il s'agit d'un gammaherpèvirus, et plus précisément d'un rhadinovirus car il est plus proche des SaHV-2 et AtHV que du HHV-4 (figure 1). Notons qu'au sein des rhadinovirus, l'AIHV-1 est l'espèce la plus distante du BoHV-4 (Honess, 1984; Bublot *et al.*, 1990; 1992; Lomonte *et al.*, 1992; Goltz *et al.*, 1994; Lomonte *et al.*, 1995; 1996; Broll *et al.*, 1999a; Zimmermann *et al.*, 2001). Cependant, l'origine de la branche phylogénique menant au BoHV-4 ainsi que la parenté qui unit ce virus aux autres rhadinovirus restent incertaines, comme c'est d'ailleurs le cas pour le MuHV-4 et l'EHV-2 (McGeoch *et al.*, 1995; McGeoch *et al.*, 2000; McGeoch, 2001; Zimmermann *et al.*, 2001).

La structure du génome du BoHV-4 est de type B à l'instar de celle des autres gammaherpèvirus (figure 4) (Roizman *et al.*, 1992; Roizman et Pellet, 2001). Elle consiste en une molécule d'ADN bicaténaire organisée en une longue séquence unique centrale (LUR pour *Long Unique Region*, ou L-DNA pour *Light DNA*) flanquée à ses extrémités par des séquences répétées et non codantes constituant le prDNA (*polyrepetitive DNA*, ou H-DNA pour *Heavy DNA*). Il est intéressant de noter que les gènes conservés dans un genre ou une sous-famille d'herpèvirus sont regroupés en cinq "blocs" (numérotés de 1 à 5 selon l'orientation 5' vers

3') au sein desquels les ORFs ont tendance à avoir les mêmes organisations et orientations (Bublot *et al.*, 1990; Bublot *et al.*, 1992; Lomonte *et al.*, 1996; Neipel *et al.*, 1998; Simas et Efstathiou, 1998; Nicholas, 2000). Les blocs 1, 2 et 4 regroupent des gènes conservés dans les trois sous-familles et les blocs 3 et 5 contiennent des gènes propres aux gammaherpèvirus. Les zones dites "interbloc" (de A à F selon l'orientation 5' vers 3') renferment des gènes uniques à une ou quelques espèces phylogéniquement apparentées. Il s'agit souvent de gènes d'origine cellulaire (Lomonte *et al.*, 1995; Becker, 2000; Raftery *et al.*, 2000; Holzerlandt *et al.*, 2002).

Les différentes souches de BoHV-4 respectent cette organisation génétique (Thiry *et al.*, 1989; 1990; 1992a; 1992b). Elles forment un groupe génétiquement homogène (88 % à 99 % d'identité entre les souches 66-p-347 et V. test, contre >99% entre les souches 66-p-347 et DN599) (Zimmermann *et al.*, 2001). Les analyses de restriction ont cependant permis de les répartir en trois catégories: (i) les souches ayant un profil de restriction similaire à celui de la souche DN-599, souche de référence pour les Etats-Unis (les souches "DN599-like"); (ii) les souches ayant un profil de restriction similaire à celui de la souche MOVAR 33/63, référence pour l'Europe (les souches "MOVAR-like"); et (iii) les souches "non classées", ayant un profil de restriction spécifique (Thiry *et al.*, 1989; Bublot *et al.*, 1990; Thiry *et al.*, 1990). Mises à part quelques exceptions, la répartition des souches

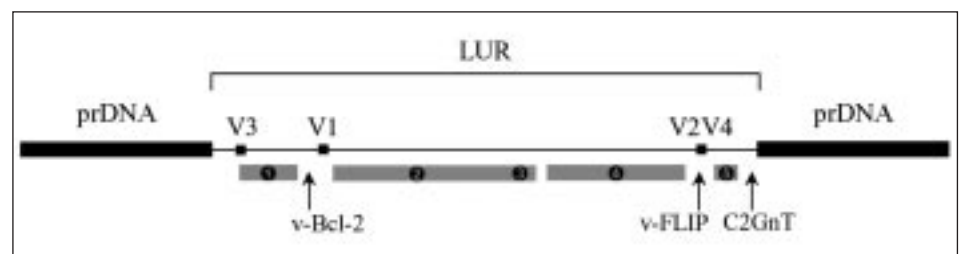


Figure 4. Organisation génomique du BoHV-4.

Le BoHV-4 a un génome de type B (Roizman & Pellet 2001) : les gènes sont contenus dans une longue région unique (LUR) de  $\pm 108$  Kpb aux extrémités de laquelle est répartie aléatoirement une quinzaine de copies répétées en tandem d'une séquence non codante de  $\pm 2,2$  Kpb, l'ensemble de ces copies formant le prDNA (rectangles noirs) (Ehlers *et al.*, 1985; Broll *et al.*, 1999b; Zimmermann *et al.*, 2001). Les gènes conservés chez les herpèvirus sont regroupés en 5 blocs (rectangles gris) (Lomonte *et al.*, 1996). Les gènes codants pour les protéines anti-apoptotiques (v-Bcl-2 et v-FLIP) et une  $\beta$ -1,6-Nacétylglycosaminyltransférase (C2GnT) sont indiqués par des flèches. V1 à V4 : régions de séquences variables selon les souches.

Tableau I : *Rhadinovirus*<sup>a</sup> dont le génome a été entièrement séquencé

<i>Rhadinovirus</i> <sup>b</sup>	Numéros d'accès <sup>c</sup>		Références
<b>BoHV-4</b> Bovine herpesvirus 4	AF092919 AF318573		Broll <i>et al.</i> , 1999b Zimmermann <i>et al.</i> , 2001
<b>AIHV-1</b> Alcelaphine herpesvirus 1 (AHV-1)	AF005370 AF005363 AF005368		Ensser <i>et al.</i> , 1997
<b>AtHV-3</b> Ateline herpesvirus 3 (HVA, Herpesvirus ateles)	AF083424		Albrecht, 2000
<b>CeHV-17</b> Cercopithecine herpesvirus 17 (RRV, Rhesus rhadinovirus) (macaca mulata rhadinovirus: souches H26-95 et 17577)	17577 H26-95	AF083501 AF210726	Searles <i>et al.</i> , 1999 Alexander <i>et al.</i> , 2000
<b>EHV-2</b> Equid herpesvirus 2 (Equine cytomegalovirus)	U20824		Telford <i>et al.</i> , 1995
<b>HHV-8</b> Human herpesvirus 8 (KSHV, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)	U75698 U75699 U75700		Chang <i>et al.</i> , 1994 Russo <i>et al.</i> , 1996
<b>MuHV-4</b> Murid herpesvirus 4 (MHV-68, Mouse herpesvirus strain 68)	U97553		Virgin <i>et al.</i> , 1997
<b>SaHV-2</b> Saimiriine herpesvirus 2 (HVS, Herpesvirus saimiri)	X64346		Albrecht <i>et al.</i> , 1992
<i>Lymphocryptovirus</i> <sup>b</sup>	Numéros d'accès <sup>c</sup>		Références
<b>HHV-4</b> Human herpesvirus 4 (EBV, Epstein-Barr virus, souche B95-8)	X00784		Arrand <i>et al.</i> , 1981 Baer <i>et al.</i> , 1984

<sup>a</sup> La table mentionne également le HHV-4 : prototype du genre *Lymphocryptovirus*.

<sup>b</sup> Les anciens noms sont entre parenthèses.

<sup>c</sup> Numéros d'accès dans la *GenBank* du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

sur base de leur profil de restriction respecte l'origine géographique de leur isolement. Par contre, il n'est pas possible d'établir une corrélation entre le profil de restriction et le tableau clinique observé chez les animaux à partir desquels les différentes souches ont été isolées (Bublott *et al.*, 1991b).

#### Le prDNA : organisation et fonctions

Le prDNA du BoHV-4 consiste en une quinzaine de copies directement répétées d'une séquence de 2267 pb (paires de bases), réparties aléatoirement aux extrémités du LUR (Ehlers *et al.*, 1985 ; Broll *et al.*, 1999b). Chaque unité de prDNA contient elle-même deux types de séquences répé-

tées: l'une de ± 196 pb répétée en série à l'extrémité 3' de chaque unité (trois fois complètement et une fois incomplètement), l'autre de 25 pb répétée deux fois à l'extrémité 5' de chaque unité, la première copie débordant sur l'unité précédente. Le contenu en C+G est de 71,1%. Le prDNA ne contient pas de séquence

codante à proprement parler (Chang et Van Santen, 1992). Il est cependant très conservé au sein de chaque espèce car il contient des séquences en cis jouant un rôle déterminant dans le clivage des concatémères viraux produits lors de la réplication de l'ADN et dans l'encapsidation des unités génomiques monomériques ainsi produites. Ces séquences, appelées *pac-1* et *pac-2*, sont présentes aux extrémités opposées de l'ADN génomique de tous les herpèsvirus. Elles sont respectivement réparties aux extrémités 5' et 3' de chaque unité prDNA et consistent pour *pac-1* en une séquence riche en T-A encadrée de motifs C-G et en un motif T pour *pac-2*. Le prDNA est donc une séquence servant à délimiter et encapsider une unité génomique.

#### Le LUR et ses 79 ORFs

Le LUR du BoHV-4 consiste en une séquence de 108.873 pb (Zimmermann *et al.*, 2001). Son contenu en G+C est de 41,4%, celui en CpG est à peine de 1%. Le déficit du dinucléotide CpG compensé par un excès de dinucléotides TpG et CpA est le signe d'une séquence d'ADN ayant subi une méthylation. Les herpèsvirus ne possèdent pas de système de méthylation, contrairement à la cellule eucaryote qui l'exploite comme moyen de régulation de l'expression de ses propres gènes. Le génome viral produit au cours de l'infection lytique n'étant pas méthylé, il est admis que le taux de CpG du génome viral traduit la méthylation consécutive aux phases de latence dans la cellule eucaryote (Honess *et al.*, 1989). Le LUR du BoHV-4 contient plusieurs séquences répétées directes regroupées en deux régions appelées R1 et R2 (elle-même subdivisée en deux régions R2a et R2b) (Zimmermann *et al.*, 2001). La région R2 se distingue du reste de la séquence du LUR par un contenu élevé en G+C (71%).

L'analyse de la séquence LUR du BoHV-4 a révélé l'existence d'au moins 79 ORFs (tableau II et figure 5). Parmi ces ORFs, 62 sont homologues à des gènes existants chez le SaHV-2 et/ou le HHV-8, alors que 17 semblent être uniques au BoHV-4.

Les gènes communs aux BoHV-4 et au SaHV-2 ont été nommés "ORF1" à "ORF79" (la numérotation se rapporte à celle du gène homologue dans le génome du SaHV-2). Les gènes uniques au BoHV-4 ont été nommés "Bo1" à "Bo17" (la numérotation suit l'ordre positionnel dans le génome du BoHV-4 selon l'orientation 5' vers 3'). Ces derniers n'ont pas de véritable équivalent chez le SaHV-2 ni, à l'exception de Bo5, chez d'autres herpèsvirus. En ce qui concerne l'organisation génomique, à l'image du SaHV-2 et contrairement à l'AIHV-1, les gènes du BoHV-4 ne sont jamais séparés par de longues séquences non codantes. La partie centrale du LUR consiste en une région regroupant 54 gènes (ORFs 16 à 69) ayant la même position et la même orientation que leur homologue chez le SaHV-2, sauf en ce qui concerne Bo9 et Bo10 qui se substituent en lieu et orientation aux ORFs respectives 28 et 51 du SaHV-2. Si l'on compare cette région chez différents gammaherpèsvirus, on observe des différences relatives à la présence et/ou la position de l'ORF16 (*v-Bcl-2*) et dans le nombre de gènes spécifiques d'une espèce ou d'un sous-groupe entre les ORFs 50 et 69. De telles différences ne sont pas observées entre le BoHV-4 et le SaHV-2.

#### Séquences impliquées dans le contrôle de la réplication de l'ADN viral

Une origine de réplication fonctionnelle (*ori*) a été localisée sur base de son homologie positionnelle avec l'origine de réplication lytique (*oriLyt*) d'autres gammaherpèsvirus (Hammerschmidt et Sugden, 1988; Zimmermann *et al.*, 2001). Elle est localisée au niveau de la zone R2b, en aval de l'ORF69 et à proximité immédiate d'un segment très riche en G+C. L'origine de réplication du BoHV-4 recouvre partiellement l'ORF de Bo11, le transcrit tardif de 1,1 Kpb (Bermudez-Cruz *et al.*, 1998), et contient l'ORF Bo12. Il n'a pas encore été déterminé si ces transcrits et/ou leur produit d'expression sont impliqués dans la réplication de l'ADN viral. Distincte de l'*oriLyt*, l'*oriP* est une autre origine de réplication fonctionnelle lorsque le génome

viral est circulaire, durant la latence. L'*oriP* du BoHV-4 n'a pas encore été localisée. Notons aussi que chez le SaHV-2, le prDNA participe à la persistance épisomale du génome (Collins *et al.*, 2002). Une protéine LANA (*Latency-Associated Nuclear Antigen*) interagit avec l'*oriP* au niveau nucléaire et participe à la persistance de l'épisome viral durant la latence (Yates *et al.*, 1984; Lupton et Levine, 1985; Kung et Medveczky, 1996; Ballestas *et al.*, 1999). La protéine LANA joue également un rôle dans la régulation de l'expression des gènes viraux du HHV-8 chez qui elle est particulièrement étudiée. Le produit d'expression de l'homologue de l'ORF73 du BoHV-4 chez le SaHV-2 constitue un homologue potentiel de la protéine LANA (Hall *et al.*, 2002).

Le BoHV-4, comme tous les herpèsvirus, assume de manière indépendante la synthèse des acides nucléiques. En effet, ce virus est capable d'induire une activité thymidine kinase (TK ou deoxy-pyrimidine kinase) dans des cellules TK- (ORF21) (Kit *et al.*, 1986; Lomonte *et al.*, 1992). Cette activité est exprimée en phase précoce et participe au métabolisme des pyrimidines (Kit, 1985). Posséder ce gène est une propriété conservée chez les alpha- et gammaherpèsvirus. Par ailleurs, le BoHV-4 possède deux copies d'un gène exprimant potentiellement une v-FGAM (*viral phosphoribosylformylglycinamide synthase* ou FGARAT pour phosphoribosylglycinamide formyltransférase) (Lomonte *et al.*, 1995). Ces copies sont disposées en orientations inversées aux deux extrémités du LUR (ORFs 3 et 75). Ces positions sont conservées chez le SaHV-2 et l'AIHV-1, mais on ne retrouve qu'une seule copie chez les HHV-4 et 8. Cette protéine a été décrite comme une protéine de tégument chez le HHV-4 (Cameron *et al.*, 1987). Il s'agit aussi d'un homologue de séquence d'un gène intervenant dans la quatrième étape de la biosynthèse *de novo* des purines chez *Drosophila melanogaster* et chez certains organismes procaryotes.

Sept gènes de l'HSV-1 sont requis pour l'expression d'un complexe enzymatique impliqué dans le clivage



et l'encapsidation de l'ADN viral consécutifs à la réplication menant à une infection lytique (UL 6, 15, 17, 25, 28, 32 et 33) (Baines *et al.*, 1994). L'ORF29 du BoHV-4 code potentiellement pour une terminase, une des protéines intervenant dans ce complexe (Broll *et al.*, 1999a). Ce gène est présent et épissé chez tous les herpesvirus chez qui il a été étudié. Son produit d'expression, actif au niveau du noyau de la cellule, possède un signal de transport nucléaire de type NLS (*Nuclear Localization Signal*) (chez le HSV-1), ou doit pouvoir s'associer à une autre protéine ayant un NLS (ce qui pourrait être le cas chez le BoHV-4).

#### Séquences impliquées dans la régulation de l'expression des gènes viraux

Comme mentionné précédemment, les herpesvirus expriment leurs gènes en trois vagues de synthèse protéique successives. Les gènes précoces-immédiats ( $\alpha$ ) sont les premiers à être exprimés au début de l'infection, sans nécessiter de synthèse protéique *de novo*; ils codent pour des transactivateurs nécessaires à l'initiation de la transcription des gènes précoces ( $\beta$ ) et tardifs ( $\gamma$ ). Les gènes Bo4 et Bo5 font partie du transcrit précoce-immédiat majeur (IE1, *Immediate-early 1*) (Van Santen, 1991). Bo4 pourrait constituer une ORF séparée ou un exon du transcrit issu de la région IE1. Il est intéressant de noter que Bo4 et Bo5 partagent une homologie de séquence partielle et pourraient être impliqués dans un épissage alternatif. L'ORF50 représente un homologue fonctionnelle du transactivateur R (HHV-4 BRLF1), exprimé par la forme épissée du gène IE2 (*Immediate-Early 2*) (Van Santen, 1993; Zhang et Van Santen, 1995). L'ORF50 participe à la réactivation virale après la phase de latence du HHV-8 (Lukac *et al.*, 1999). L'intron du transcrit IE2 contient l'entièreté de l'ORF49 qui exprime une protéine conservée chez les autres gammaherpèsvirus.

Le BoHV-4 possède un régulateur post-transcriptionnel par le biais de l'ORF57, gène conservé chez tous les herpesvirus (van Santen, résultats non publiés; Zimmermann *et al.*, 2001).

Chez le SaHV-2, le produit d'expression de ce gène est responsable de la redistribution du SC (*Spliceosome Complex*), ce qui permet au virus de réprimer l'expression des gènes cellulaires contenant un intron, tout comme pICP27/IE63 de l'HSV-1 (Cooper *et al.*, 1999). Il a également été montré que l'ORF57 est capable de transactiver l'expression de gènes viraux au niveau transcriptionnel, ou au contraire de réprimer, par des mécanismes post-transcriptionnels, l'expression de gènes viraux contenant un intron (Bello *et al.*, 1999; Goodwin *et al.*, 2000). Six gènes du BoHV-4 subissent un épissage : Bo5 (IE1), Bo10, Bo11 (recouvrant partiellement l'*ori*), l'ORF29 (qui participe à l'encapsidation de l'ADN viral en fin de réplication), l'ORF50 (IE2) et l'ORF57 lui-même.

#### Le contenu génétique de l'herpèsvirus bovin 4 est "pauvre"

Mis à part les gènes impliqués dans la multiplication virale, un grand intérêt est porté aux gènes viraux participant à la virulence et aux modulations des interactions virus-hôte. Dans ce domaine, la comparaison des génomes du SaHV-2 et d'autres gammaherpèsvirus à celui du BoHV-4 révèle que le contenu génétique de ce dernier est relativement "pauvre". Certaines ORFs du SaHV-2, dont bon nombre d'homologues à des gènes cellulaires, sont absentes chez le BoHV-4 : les ORFs 1, 2, 4, 5, 11 à 15, 28, 51, 70, 72 et 74. Si ce n'est pour l'ORF11 qui est présente au niveau de tous les autres génomes de rhadinovirus séquencés à ce jour, certaines ou la totalité de ces ORFs manquent chez les autres membres du genre. Les gènes de gammaherpèsvirus homologues à des gènes cellulaires sont souvent impliqués dans la croissance ou la survie cellulaire, dans le métabolisme nucléotidique ou dans l'immuno-évasion. On ne trouve pas dans le génome du BoHV-4 de gènes codant pour des cytokines ou des récepteurs à cytokines (contrairement aux SaHV-2, HHV-8 et EHV-2), pour des récepteurs à l'interleukine (récepteurs couplés aux protéines G) (contrairement aux SaHV-2, HHV-8, MuHV-4 et EHV-2), ou pour des

récepteurs à chimiokines telles les MIP- $\alpha/\beta$  (*Macrophage Inflammatory Proteins*) (contrairement au HHV-8). Le BoHV-4 ne dispose pas de gène codant pour une cycline D ou pour une protéine régulatrice du complément (contrairement aux SaHV-2 et HHV-8). Il est dépourvu des activités déhydrofolate réductase des SaHV-2, HHV-8 et CeHV-17 et thymidilate synthase des SaHV-2, HHV-8, CeHV-17 et AtHV-3.

#### L'herpèsvirus bovin 4 exprime des protéines anti-apoptotiques

Le BoHV-4 n'a jamais été associé à des désordres lymphoprolifératifs ou à une capacité transformante comme c'est le cas de nombreux gammaherpèsvirus. De plus amples études sont nécessaires pour affirmer que le BoHV-4 n'est pas impliqué dans l'un ou l'autre de ces processus. En effet, il a été montré que le BoHV-4 possède deux régulateurs potentiels de la survie cellulaire : une *v-bcl-2* (*viral B-cell lymphoma*) (ORF16) et une *vFLIP* (*viral FLICE Inhibitory Protein*) (ORF71). Ces gènes interviennent dans l'inhibition de l'apoptose cellulaire, une des étapes nécessaires à la transformation cellulaire. L'apoptose induite par FAS (*FLICE-associated signal*) et TNF (*Tumor Necrosis Factor*) est médiée par l'interaction entre le FADD (*FAS-Associated via Death Domain*) et la caspase 8. Il a été montré que la *vFLIP* du BoHV-4 contient des DEDs (*Death Effector Domains*) et inhibe l'apoptose induite par FAS et TNF (Wang *et al.*, 1997). Les protéines cellulaires de la famille des *bcl-2* ont une fonction anti-apoptotique mais peuvent acquérir une fonction pro-apoptotique après clivage par la caspase 8. Il a été montré que la *v-bcl-2* du BoHV-4 a perdu la fonction pro-apoptotique en résistant au clivage par la caspase 8 (Bellows *et al.*, 2000).

#### L'herpèsvirus bovin 4 possède 17 ORFs uniques, dont une séquence homologue au gène de la core 2 $\beta$ -1,6-Nacétylglucosaminyltransférase de type mucinique humaine

Le BoHV-4 contient 17 gènes uniques (Bo1 à 17). Sept d'entre-eux

Tableau II : ORFS du BOHV-4 et d'autres herpesvirus<sup>a</sup>

	ORF's du BOHV-4 <sup>f</sup>	polarité	Position <sup>c</sup>		Taille (aa)	SalHV-2 <sup>d</sup>		HHV-8 <sup>d</sup>		HHV-4	HSV-1 <sup>b</sup>	Description <sup>g</sup>	
			Start	Stop		Nid	ORF	Nid	ORF	Homologues supposés	Homologues supposés		
Bloc 1 <sup>e</sup>							1 (GTH)			BNLF1(LMP1) BNLF2(a/b) LMP2A		Protéine de membrane associée à la transformation	
							uRNAs 2					Protéine de membrane Dihydrofolate réductase	
		Bo1	-	635	445	62							
		3	+	614	4460	1288	38,73	uRNAs 3					Protéine de oligomère ou FGARAT (BORFA1) Homologue de CSF-1 Homologue Bo-2 Protéine de contrôle du complément (CCP)
								4a/b 5			4		
		Bo2	+	4828	4811	67							BORFA2
		Bo3	+	5286	5513	75							Thymidine kinase (DNA synthesis)
		6	+	5343	5547	1134	58,05	6	58,33	6	BLF2	UL25	MsL2P, Major single strand DNA binding-protein
		7	+	8352	11430	692	21,48	7	28	7	BLF3	UL28	Protéine de transport
		8	+	11420	14044	874	51,13	8	54,3	8	BAPF0		Protéine nucléaire
		9	+	14184	17201	1025	62,49	9	62,96	9	BLF4 BLF5	UL27 UL30	gB, Glycoprotéine B (gp110) DPL, DNA polymérase
		10	+	17297	18577	426	28,78	10 11	22,75 10 11		ORF4 Pag(LF1) Pag(LF2) Pag(LF3) BLF1		BORF0
											62 Z K3/K19 7D K4/K4.5 65		EPOL potentielle (gp64 chez EBV) Homologue de L6 Dihydrofolate réductase Homologue de E1 du BOHV-4 Thymidylate synthase Homologue de chimiotaxine (MP- $\alpha/\gamma$ ) Homologue de E1 du BOHV-4
		Bo4	-	19545	18848	165			25,97				DRF court de l'ARN (E1) Site de liaison pour transactivateur E2 ARN E1 (HHV-8 - homologue au E1 du BOHV-4)
		Bo5	-	19918	19414	167			27,05	K5(K1A)			DRF long de l'ARN E1, exon4 DRF long de l'ARN E1, exon2 DRF long de l'ARN E1, exon3
		Bo5d	-	20200	20015	62							DRF long de l'ARN E1, exon1
		Bo5b	-	20438	20288	31							
		Bo5a	-	20553	20538	5							
		Bo6	+	20495	20788	97							
		Bo7	-	21194	20943	116							
		Bo8	+	21519	21722	67							Récouvrement avec l'ARN tardif de 1,7kb Site de liaison pour transactivateur E2
	Bloc 2 <sup>e</sup>												Homologue de chimiotaxine (MP- $\alpha/\gamma$ ) Homologue de L17 E / super-antigène (gp78 chez HSV)
								13 14			67	BLF2	Homologue du CD55 v-Rel2 (anti-apoptotique), BORF2
			16	+	22971	23651	226	24,85	16	26,59	16		
		17	-	25261	23714	515	49,36	17	43,82	17	BVF2	UL26	
		18	+	25260	26078	272	50,79	18	47,84	18	BLF1, Sa/b		
		19	-	27706	26030	558	50	19	47,22	19	BVF1	UL25	Protéine de oligomère
		20	-	28220	27408	270	40,98	20	37,84	20	BORF1	UL24	Protéine de fusée
		21	+	28204	29541	445	34,72	21	32,5	21	BLF1	UL23	TK, Thymidine kinase
		22	+	29652	31675	707	38,18	22	32,47	22	BLF2	UL22	gH, Glycoprotéine H
		23	-	32874	31672	400	40,97	23	34,84	23	BVF1		
		24	-	35110	32852	752	50,9	24	48,58	24	BORF1		
		25	+	35100	39221	1373	68,03	25	66,54	25	BLF1	UL19	Protéine majeure de capside (MCP) (p135)
		26	+	39257	40171	304	60,07	26	54,6	26	BDL1	UL18	Protéine de capside
		27	+	40185	40823	212	24,75	27	22,22	27	BDL2		
		Bo9	+	40833	41132	99							
		29	-	42299	41136	682	61,73	29	60,65	29	BDL3		gI (p150)
		29a	+	42308	42550	80	36,49	30	49,29	30	BORF1, BORF1	UL15	Terminase (protéine de clivage et d'encapsidation)
		30	+	42484	43125	213	52,68	31	41,18	31	BDL5	UL15a/c	Exon 2 de l'ORF 29
		31	+	43071	44441	456	36,05	32	31,92	32	BDL4		
		32	+	44454	45432	332	50,76	33	36,48	33	BDL2	UL17	Protéine de clivage ou d'encapsidation
		28a	+	46330	45422	303		29a			BORF1	UL15a	Exon 1 de l'ORF 29
		34	+	46329	47315	328	44,76	34	42,81	34	BDL3	UL14	
		35	+	47287	47760	157	37,33	35	31,76	35	BDL3,5		
		36	+	47648	48952	434	37,44	36	33,57	36	BDL4	UL13	Enzyme (phosphotransférase) (TK)
		37	+	48960	50429	469	52,08	37	45,98	37	BDL5	UL12	Exonuclease alcaline (nuclof/tyrosine kinase)
	38	+	50381	50587	68	28,03	38	32,73	38	BDL1	UL11	Protéine de oligomère	
	39	+	51763	50654	369	50,82	39	54,08	39	BORF3	UL10	gM, Glycoprotéine M	
	40	+	51879	53252	457	33,64	40	27,58	40	BLF2	(UL9)	Complexe hélicase-primase	
	41	+	53585	53966	175	31,82	41	28,06	41	(BDL3)	(UL8)	Complexe hélicase-primase	
	42	-	54753	53878	291	43,56	42	36,59	42	BORF2	UL7		
	43	-	56380	54530	616	53,18	43	53,28	43	BORF1	UL6	Protéine mineure de capside	
	44	-	56328	58706	792	67,73	44	61,12	44	BDL4	UL5	Hélicase	
	45	-	59535	58810	241	33,19	45	28,96	45	BORF4		Inhibiteur BF-7 (gène Early)	
	46	-	60296	59535	253	61,51	46	57,31	46	BORF3	UL2	LDG (Linear DNA Glycosylase)	
	47	-	60736	60305	143	33,33	47	28,69	47	BORF2 BORF1	UL1	gL, Glycoprotéine L Homologue de fibrin-1	
Bloc 3 <sup>e</sup>	48	-	62387	60843	514	28,34	48	28,61	48	BORF2			
	49	-	63504	62803	299	24,49	49	21,86	49	BORF1			
	50	+			552	28,92	50	26,08	50	BLF1		g-transactivateur (Rta), E1 SD exon1 SD exon2	
	50a	+	62991	62993	1								
	50b	+	63529	65184	551								
Bloc 4 <sup>e</sup>							51			68 K8.1		gD protéine Glycoprotéine liant l'héparan sulfate gp42/38 gR-3C (protéine nucléaire) gR-3B (protéine nucléaire) gR-3A (protéine nucléaire) gp350/220	
		Bo10	+			237				BLF1 BLF2 BORF3/4 BORF2a/b BL/BLF3/1 BL/BLF1a/b BLF2		Glycoprotéine gp80, BORF01	
		Bo10a	+	65714	66242	176						Exon1 de Bo10	
		Bo10b	+	66325	66617	97						Exon2 de Bo10	
	52	-	67029	66643	128	38,05	52	38,02	52	BLF2			
	53	-	67367	67095	90	32,56	53	36,78	53	BLF1	(UL48a)	Signal peptide	
	54	+	67436	68284	282	35,97	54	32,86	54	BLF3	UL30	eUTPase	
	55	-	68945	68343	200	51,3	55	46,7	55	BORF1	UL31		
	56	+	68909	71440	843	48,79	56	46,03	56	BDL1 BDL2	UL32	Complexe hélicase-primase	

Tableau II : ORFs du BOHV-4 et d'autres herpesvirus<sup>a</sup>

	ORFs du BoHV-4 <sup>f</sup>	position <sup>c</sup>	Taille (aa)	SaHV-2 <sup>d</sup>		HHV-8 <sup>d</sup>		HHV-4 Homologues supposés	HSV-1 <sup>h</sup> Homologues supposés	Descriptions <sup>g</sup>
				%id	ORF	%id	ORF			
Bloc 4 <sup>e</sup>	57	=	420	32,42	57	32,23	57			Homologue du régulateur post-transcriptionnel ICS2
	57a	=	71534 71581 9		57		57			Éxon1 de l'ORF 57
	57b	=	71651 72888 411		57		57	BMF1 (Mta)	UL54	Éxon1 de l'ORF 57
										vFLF1 (viral interleukin regulatory factor)
	58	-	74364 73312 350	28,53	58	29,27	58	BMF2	UL43	Protéine à motifs riches en acides aminés hydrophobes
	59	-	75553 74378 391	37,13	59	42,97	59	BMF1	UL42	DNA polymérase (L-gène)
	60	-	76623 75706 305	66,23	60	63,93	60	BMF1	UL40	PKs, Ribonucléotidyl réductase (petite sous-unité)
	61	-	79038 78657 793	58,25	61	53,91	61	BORF2	UL39	PKs, Ribonucléotidyl réductase (grande sous-unité)
	62	-	80039 79020 339		62		62	BORF1	UL38	Assemblage de capside ou maturation de l'ADN
	63	=	79996 82815 939	35,06	63	33,3	63	BOLF1	UL37	Protéine de régulation
	64	=	82830 80539 2569	35,44	64	33,02	64	BPLF1	UL36	Grande protéine de régulation
	65	-	90947 80555 130	44,88	65	40,83	65	(BORF3)	UL35	Protéine de capside
	66	-	82218 80944 424	39,08	66	36,98	66	BORF2		
	67	-	82928 82158 256	58,12	67	47,24	67	BORF1	UL34	Protéine de régulation
	67.5	-	83324 82932 130	55,29	67.5	39,74	67.5	EBNA/BORF0,5	UL33	
	68	=	83204 84555 449	48,85	68	46,43	68	BOLF1	UL32	Glycoprotéine majeure d'enveloppe supposée
	69	=	84983 83438 297	50,33	69	48	69	BOLF2	UL31	
Bloc 5 <sup>e</sup>	Bo11	-	57		70					Homologue Bo1-2
	Bo11b	-	96200 86209 3							Région avec des répétitions (EBNA-2 (protéine nucléaire))
	Bo11a	-	97218 87067 54							EBNA2-LP (protéine nucléaire)
	Bo12	=	97972 88175 87							Homologue avec IL10
	Bo13	=	99993 88617 74							transcrits de la polymérase II / viral RNA
	71	-	99431 88883 182	23,42	71	27,41	K13/71			Kapsine (stéroïde)
	73	-	100337 89578 253	24,79	73	15	73			TS, Thymidylate synthétase
	75	-	104745 100828 1106	58,85	75	25,29	75	BORF1		ARNV tardif de 1,1kb : Site de liaison pour transactivateur ICS2
	Bo14	-	105340 104828 170							Éxon2 de Bo11
	Bo15	-	106592 106278 104							Éxon1 de Bo11
Bo16	=	106779 107048 89								
Bo17	=	107313 108635 440								v-FLF, antiapoptotique, BORF2
										Homologue de la cycline D
										HHV-8: LANA, Protéine E, BORF3
										or-2, homologue N-CAM
										GPCR homologue de récepteur à IL8
										Protéine de régulation ou l'ORFAT
										Protéine de liaison associée à la membrane
										Protéine riche en proline, BORF1
										BORF2
										β-1,6-N acétylglucosaminyltransférase, BORF3,4

<sup>a</sup> Sont pris en considération les ORFs des BoHV-4, SaHV-2, HHV-8 et HHV-4

<sup>b</sup> Seules les ORFs du HSV-1 présumées homologues à des ORFs du BoHV-4 sont représentées

<sup>c</sup> La position des ORFs du BoHV-4 est donnée à partir du premier nucléotide du codon start (ATG) jusqu'au dernier nucléotide du codon stop, en référence au premier nucléotide du LUR

<sup>d</sup> Les pourcentages d'identité (%id) des ORFs des SaHV-2 et HHV-8 comparés aux ORFs du BoHV-4 ont été calculés avec le programme GAP du portail GCG (Zimmermann *et al.*, 2001)

<sup>e</sup> Les blocs 1,2,3,4 et 5 désignent les blocs de gènes conservés entre les sous-familles ou genres d'herpèsvirus

<sup>f</sup> Les gènes spécifiques du BoHV-4 sont représentés sur fond grisé

<sup>g</sup> Abréviations utilisées: **BORF**, Bovine herpesvirus 4 ORF (ancienne nomenclature réservée aux ORFs des zones interblocs A à F du BoHV-4); **bZIP**, basic leucine zipper; **CSF1-R**, colony-stimulating factor 1 receptor; **EBERs**, Epstein-Barr virus early RNAs; **EBNA**, Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen; **LANA**; latency nuclear antigen; **LMP**, latency membrane protein; **ORF**, open reading frame; **vFLIP**, viral FLICE inhibitory protein; **STP**, saimiri transformation associated protein.

n'avaient jamais été décrits avant le séquençage complet du génome du BoHV-4 en 2001 (Bo1, 3, 6, 7, 12, 13 et 15) (Zimmermann *et al.*, 2001); les autres n'ont pas fait l'objet de caractérisations avancées jusqu'à présent, à l'exception de l'ORF Bo17. Les études récentes menées dans notre laboratoire montrent que le gène Bo17 est d'un intérêt exceptionnel. Le produit d'expression de ce gène est un homologue fonctionnel de la h-C2GnT-M (core 2 β-1,6-Nacétylglucosaminyltransférase de type mucinique humaine) (Vanderplasschen *et al.*, 2000) : une enzyme golgienne appartenant à la famille des β1,6GnTs (β-1,6 Nacétylglucosaminyltransférases). Tous les membres de cette famille enzymatique sont impliqués dans des processus biologiques majeurs, notamment liés à l'immunité et aux

différenciations cellulaires et tissulaires (Fukuda, 1994; Markine-Goriaynoff, 2001; 2003; Fukuda, 2002). Ceci laisse supposer que Bo17 pourrait jouer un rôle clef dans la biologie du BoHV-4. Le gène Bo17 étant à ce jour le seul gène viral connu pour exprimer une β1,6GnT, le BoHV-4 procure une opportunité unique pour étudier les fonctions d'une β1,6GnT exprimée dans le contexte d'une infection virale (Vanderplasschen *et al.*, 2000).

Par ailleurs, l'analyse phylogénique du gène Bo17 a permis d'estimer que son acquisition est survenue il y a approximativement 1,5 millions d'années (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003). Cette observation fait de Bo17 le gène le plus récemment acquis par un herpesvirus aux dépens d'un gène cellulaire. D'autre part, cette étude a

permis de démontrer que le gène Bo17 a été acquis d'un ancêtre du buffle africain et non pas d'un ancêtre des bovins domestiques (figure 6) (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003). En 1989, une étude de Rossiter et collègues indique que 93,6% des buffles africains sauvages possèdent des anticorps dirigés contre le BoHV-4 et que le sang de 25% de ces animaux permet de réaliser un isolement du virus. Considérées ensemble, ces données phylogéniques et épidémiologiques suggèrent que le BoHV-4 doit potentiellement être considéré comme un virus de buffle africain plutôt que de bovins domestiques. A ce titre, il pourrait être renommé *Syncerine herpesvirus 1* en vertu des règles émises par l'ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*). La séroprévalence exceptionnellement élevée observée chez les buffles africains

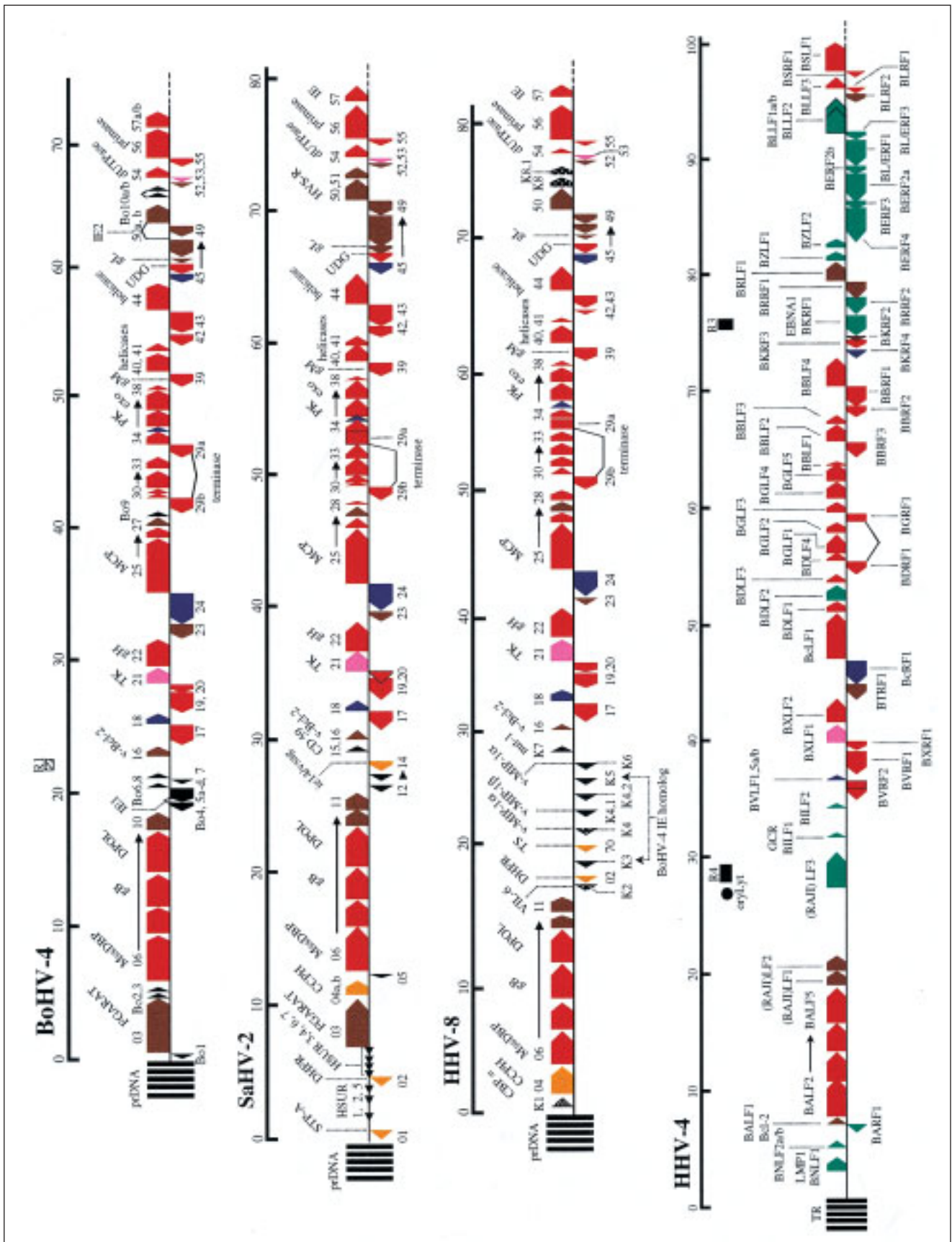
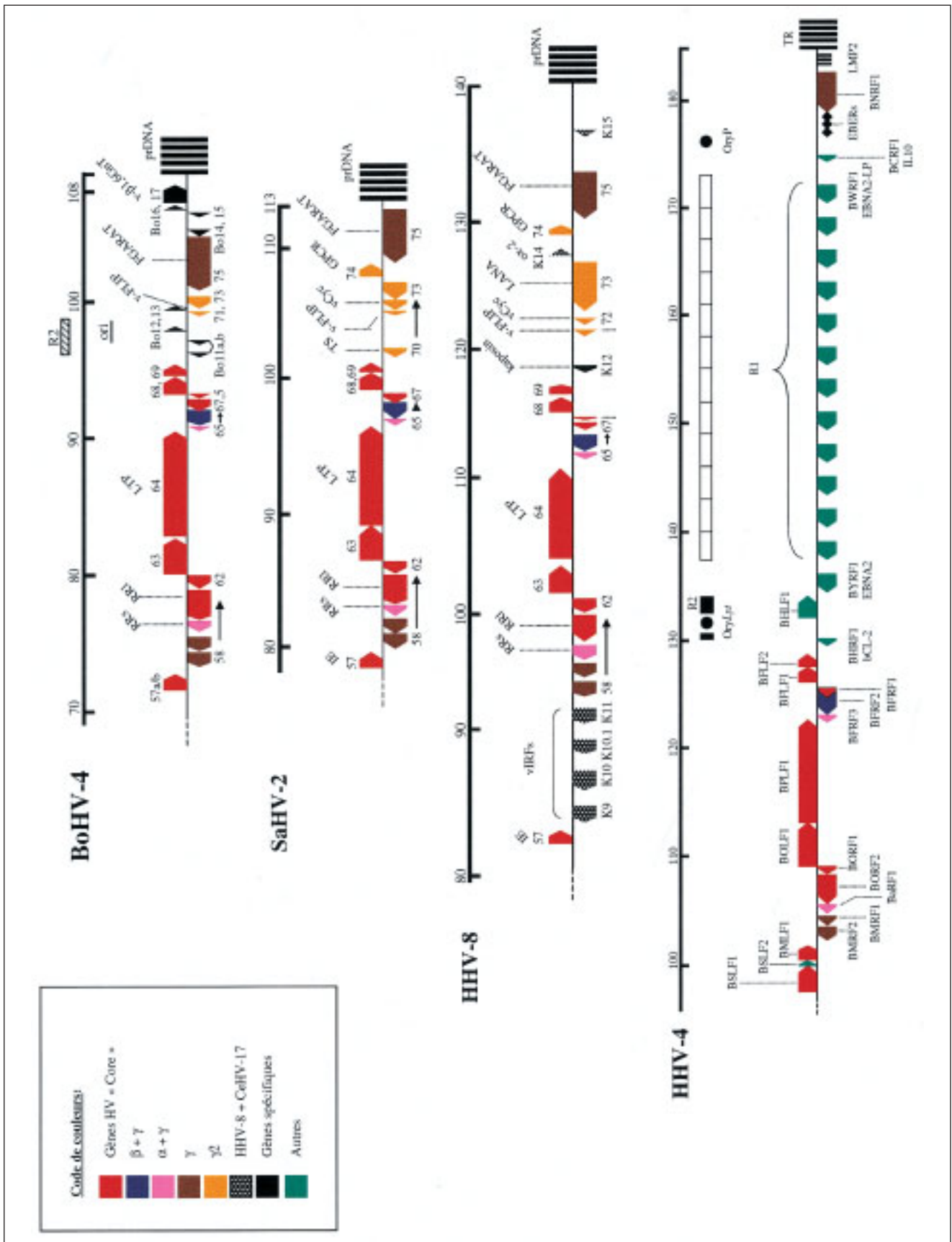


Figure 5. Alignement des ORFs de 3 rhadinovirus (BoHV-4, SaHV-2 et HHV-8) et d'un lymphocryptovirus (HHV-4).

Les ORFs potentielles, leur orientation et leur occurrence dans les différents genres et sous-familles d'herpèsvirus sont indiqués par des flèches colorées. Les chiffres indiquent le numéro des ORFs en rapport avec la nomenclature propre aux *rhadino*- et *lymphocryptovirus*. Les préfixes "Bo" et "K" se rapportent respectivement aux ORFs spécifiques du BoHV-4 et du HHV-8. Les gènes pour les U-RNAs (HSUR, HVS U RNA) du SaHV-2 sont indiqués par des pointes de flèches noires. Pour le BoHV-4, les indications ori et R1/2 indiquent respectivement l'origine de réplication lytique et les séquences répétées R1 et R2. Abréviations: **CCPH**, complément control protein homolog (**CBP**, complément binding protein); **CD59**, homologue du CD59 humain; **DHFR**, dihydrofolate réductase; **DPOL**, DNA polymérase; **dUTPase**, dUTP nucléotide hydrolase; **exo**, exonucléase alcaline; **FGARAT**,  $\alpha$ -N-formylglycineamide ribonucléotide aminotransférase; **gB/H/L/M**, glycoprotéines B,H,L,M; **GpcR**, *G protein-coupled receptor*; **vIL8R**, *viral interleu-*



*kine 8 receptor*; **HVS.R**, équivalent du transactivateur R du HHV-4 chez le HSV-2; **IE**, *Immediate-early* genes; **ie14/vsag**, *immediate early/14 viral superantigen*; **LANA**, *latency-associated nuclear antigen*; **LTP**, *large tegument protein*; **MCP**, *major capsid protein*; **MssDBP**, *major single strand DNA binding protein*; **nut-1**, *noncoding polyadenylated nuclear (PAN) RNA* (connu aussi sous le nom **T1.1**); **ox-2**, *N-CAM Ox-2 homolog*; **PK**, protéine kinase; **RRs** et **RRI**, respectivement, petite et grande sous-unités de la ribonucléotide réductase; **STP-A**, *saimiri transformation-associated protein of subgroup A*; **TK**, *thymidine kinase*; **TS**, *thymidylate synthétase*; **UDG**, *uracil DNA glycosidase*; **v-Bcl-2**, *viral B-cell lymphoma gene*; **vCyc**, *cycline D virale*; **v-FLIP**, *viral FLICE inhibitory protein* (inhibiteur de protéase pro-apoptique); **vIL-6**, *viral interleukine 6*; **vIRFs**, *viral interferon regulatory factors*; **v-MIP- $\alpha/\beta$** , *viral macrophage inflammatory proteins  $\alpha/\beta$  (CC Chemokine)*. Echelles en Kpb

sauvages envers le BoHV-4 pourrait résulter d'un avantage sélectif conféré par ce virus aux animaux infectés. Il a en effet été suggéré que les souches africaines de BoHV-4 pourraient conférer aux buffles africains infectés une protection vis-à-vis de l'infection létale par l'alcélaphine herpesvirus 1 (AIHV-1), un autre rhadinovirus africain antigéniquement apparenté au BoHV-4, bien que phylogénétiquement éloigné de ce dernier (Rossiter *et al.*, 1989). L'AIHV-1 est apathogène pour son hôte naturel, le gnou (*Connochaetes taurinus*), mais représente l'agent étiologique de la forme africaine du coryza gangreneux, une immunopathologie toujours létale pour bon nombre de ruminants africains, dont les buffles. L'AIHV-1 est ré-excrété par le gnou en période de stress et pourrait à ce titre représenter un atout pour les troupeaux de gnous. En effet, l'induction d'une morbidité chez les ruminants côtoyant les troupeaux de gnous aurait un double effet positif pour ces derniers, en réduisant la compétition pour les pâturages et en contribuant à diminuer la prédation vis-à-vis des jeunes veaux gnou par les grands carnassiers préférant se tourner vers les proies faciles que représentent les animaux atteints de coryza gangreneux (Rossiter *et al.*, 1988; Rossiter, communication personnelle, Dewals *et al.*, 2003). En ce

sens, la relation AIHV-1 / gnou peut être conçue comme une forme de symbiose. Cette relation de type symbiotique pourrait être à l'origine de l'émergence d'une autre forme de symbiose caractérisée par une protection du buffle africain par le BoHV-4 vis-à-vis de l'infection par l'AIHV-1. Dans leur ensemble, ces données suggèrent que le BoHV-4 est à l'origine un virus adapté aux buffles africains, impliqué dans un écosystème africain complexe faisant intervenir des virus (BoHV-4 et AIHV-1) et des artiodactyles (buffle africain et gnou) et transmis récemment aux bovins domestiques (Dewals *et al.*, 2003; Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003).

Finalement, bien qu'ayant une origine extrêmement récente, le gène Bo17 et sa fonction core 2  $\beta$ 1,6GnT semblent avoir été fixés dans l'espèce BoHV-4 (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003; Markine-Goriaynoff *et al.*, en préparation). Ces observations suggèrent que Bo17 est responsable d'une fonction biologique importante pour le virus. La délétion du gène Bo17 a révélé son caractère non essentiel pour la multiplication virale *in vitro* (Markine-Goriaynoff *et al.*, en préparation). Cette observation suggère que les fonctions biologiques de Bo17, responsables de la sélection positive des souches virales qui possèdent ce gène, s'exercent exclusivement *in vivo*.

## CONCLUSION

Cette revue traite du BoHV-4 tant pour ses implications en santé animale que pour son intérêt en sciences fondamentales. En ce qui concerne les aspects cliniques de l'infection par le BoHV-4, il reste encore difficile de dire aujourd'hui si ce virus est réellement impliqué dans certaines pathologies bovines. Il faut cependant noter la haute séroprévalence observée à l'encontre du BoHV-4, notamment en Belgique mais aussi dans le reste du monde. De plus en plus d'études incriminent le BoHV-4 dans les pathologies de la sphère génitale de nos bovins domestiques. Le rôle pathogène du BoHV-4 ne doit pas être exclu: au vu de la propriété de certains rhadinovirus de s'atténuer très rapidement en passage de culture, il se pourrait qu'un phénomène de ce genre soit responsable du manque de reproductibilité des expériences visant à déterminer le pouvoir pathogène du BoHV-4 par épreuve d'inoculation.

Le BoHV-4 s'avère représenter un virus fascinant en sciences fondamentales. Il s'agit du premier  $\gamma$ -herpesvirus décrit pour utiliser l'héparan sulfate comme récepteur d'entrée (Vanderplasschen *et al.*, 1993). Le BoHV-4 est le seul  $\gamma$ -herpesvirus dépendant de la phase S du cycle cel-

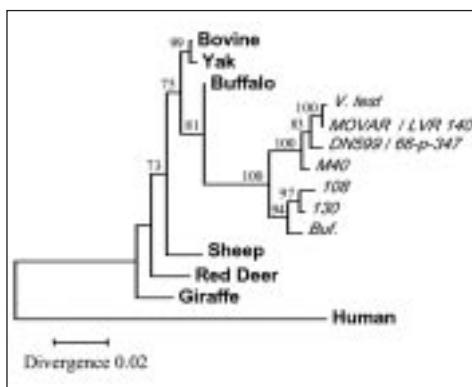


Figure 6 : Relation phylogénétique entre le gène Bo17 du BoHV-4 et les séquences génomiques de la C2GnT-M des ruminants.

L'analyse a été réalisée par Maximum Likelihood en prenant la séquence humaine comme Outgroup. Les souches de BoHV-4 sont représentées en italique. Les valeurs indiquées sur les branches internes se réfèrent aux pourcentages de réplicats obtenus par bootstrap pour lesquels ce branchement était obtenu; seules les valeurs supérieures à 60% sont indiquées. Reproduit de Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003, avec l'aimable autorisation de Journal of Virology.

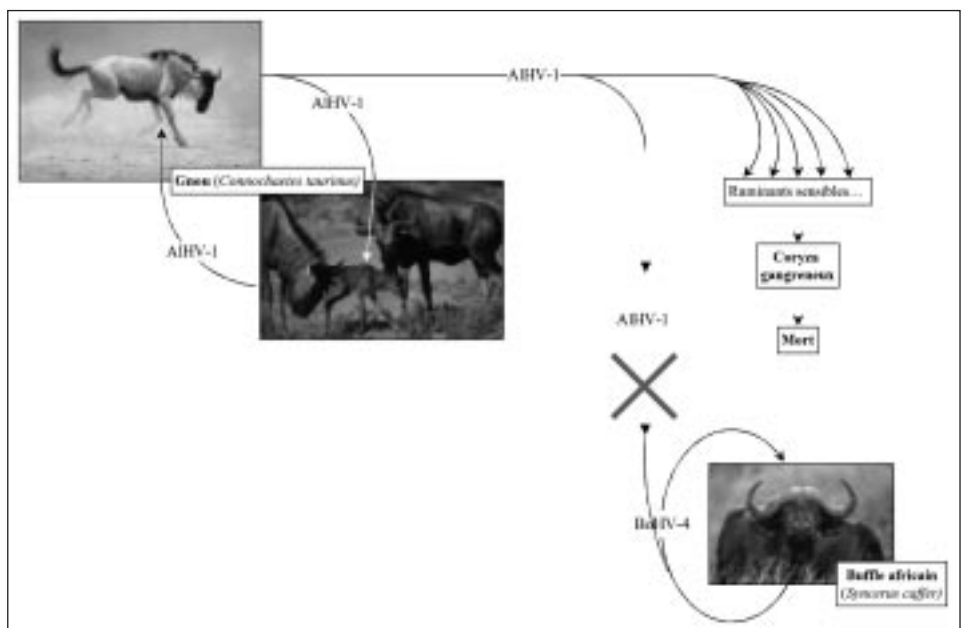


Figure 7. Représentation schématique selon laquelle le buffle africain, contrairement aux autres espèces de ruminants, serait protégé de l'herpesvirus alcélaphin 1 grâce à une relation symbiotique avec l'herpesvirus bovin 4 antigéniquement apparenté.

lulaire (Vanderplasschen *et al.*, 1995). Il est le seul virus décrit pour exprimer une  $\beta$ 1,6GnT (Vanderplasschen *et al.*, 2000); les glycosyltransférases de cette famille sont impliquées dans des processus biologiques majeurs pour la cellule, ce qui laisse présager que son gène de  $\beta$ 1,6GnT a probablement un rôle biologique important pour le BoHV-4. Ce virus a permis la première identification de l'origine d'un gène dérivé d'un gène cellulaire chez un herpesvirus (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003). Cette découverte a permis, et ce pour la première fois en herpesvirologie, de réaliser une étude évolutive qui ne repose pas sur le postulat de co-spéciation entre les virus et leurs hôtes (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'acquisition de ce gène Bo17 semble représenter l'exemple le plus récent d'acquisition d'un gène dans la famille des herpesvirus (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003). Le génome du BoHV-4 a récemment été entièrement séquencé (Zimmermann *et al.*, 2001) et ce virus constitue un candidat de choix pour la création de vecteurs, en vaccinologie notamment. A l'avenir, il sera intéressant de déterminer si les souches africaines de BoHV-4 sont capables de conférer une résistance à l'infection mortelle par le virus de la forme africaine du

coryza gangreneux (Dewals *et al.*, 2003). En conclusion, le BoHV-4 est un virus d'un intérêt exceptionnel pour la recherche fondamentale et dont le pouvoir pathogène reste à investiguer.

#### REMERCIEMENTS

Le Dr Alain Vanderplasschen est Maître de recherches du Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS). Les Drs Laurent Gillet et Nicolas Markine-Goriaynoff sont aspirants du FNRS. Katalin de Fays est boursière du Fonds pour la formation à la recherche dans l'industrie et dans l'agriculture. Nous remercions le docteur Paul B. Rossiter (FAO, Nairobi, Kenya) pour ses précieux conseils et observations relatives aux souches africaines de BoHV-4.

#### Bovine herpesvirus 4

#### SUMMARY

Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) belongs to the *Herpesviridae* family, *Gammaherpesvirinae* subfamily, *Rhadinovirus* genus like human herpesvirus 8 (HHV-

8), the causative agent of Kaposi's sarcoma. BoHV-4 has a worldwide distribution in the cattle population. It has been isolated from cattle showing various clinical signs as well as from healthy cattle. The interest of the scientific community for BoHV-4 is explained by two reasons. Firstly, BoHV-4 represents an homologous virus/host species model to study the biology of gammaherpesviruses. Secondly, the use of BoHV-4 as a recombinant vector for expression both *in vitro* and *in vivo* has been proposed. For these reasons, a considerable amount of data has been collected on this virus. In the present paper, the authors will present a general overview of the literature published on this virus addressing clinical, epidemiological and fundamental aspects of BoHV-4. Finally, in the light of their recent phylogenetic data, the authors will discuss the origin and the host species of BoHV-4 leading to the conclusion that this virus should be considered as a virus of the African buffalo rather than cattle.

---

#### BIBLIOGRAPHIE

- ALBRECHT J.C., NICHOLAS J., BILLER D., CAMERON K.R., BIESINGER B., NEWMAN C., WITTMANN S., CRAXTON M.A., COLEMAN H., FLECKENSTEIN B. Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J. Virol.*, 1992, **66**, 5047-5058.
- ALBRECHT J.C. Primary structure of the Herpesvirus ateles genome. *J. Virol.*, 2000, **74**, 1033-1037.
- ALEXANDER L., DENEKAMP L., KNAPP A., AUERBACH M.R., DAMANIA B., DESROSIERS R.C. The primary sequence of rhesus monkey rhadinovirus isolate 26-95 : sequence similarities to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and rhesus monkey rhadinovirus isolate 17577. *J. Virol.*, 2000, **74**, 3388-3398.
- ALEXANDER R.A., PLOWRIGHT W., HAIG D.A. Cytopathogenic agents associated with lumpy skin disease of cattle. *Bull. Epiz. Dis. Afr.*, 1957, **5**, 489-492.
- ANSON M.A., BENFIELD D.A., MCADARAGH J.P. Bovine herpesvirus-5 (DN599) antigens in cells derived from bovine ocular squamous cell carcinoma. *Can. J. Comp. Med.*, 1982, **46**, 334-337.
- ARRAND J.R., RYMO L., WALSH J.E., BJORCK E., LINDAHL T., GRIFFIN B.E. Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 2999-3014.
- ASANO A., INOSHIMA Y., MURAKAMI K., IKETANI Y., YAMAMOTO Y., SENTSU H. Latency and persistence of bovine herpesvirus type 4, strain b11-41, in bovine nervous tissues. *J. Vet. Med. Sci.*, 2003, **65**, 87-93.
- AUGSBURGER H.R., METZLER A.E. In vitro growth characteristics of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) as revealed by indirect immunofluorescence assay with monoclonal antibodies and polyvalent antisera. *Arch. Virol.*, 1989, **104**, 309-321.
- BABIUK L.A., ROUSE B.T. Ribonucleotides in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. *J. Gen. Virol.*, 1976, **31**, 221-230.
- BAER R., BANKIER A.T., BIGGIN M.D., DEININGER P.L., FARRELL P.J., GIBSON T.J., HATFULL G., HUDSON G.S., SATCHWELL S.C., SEGUIN C., ET AL.

- DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 1984, **310**, 207-211.
- BAINES J.D., POON A.P., ROVNAK J., ROIZMAN B. The herpes simplex virus 1 UL15 gene encodes two proteins and is required for cleavage of genomic viral DNA. *J. Virol.*, 1994, **68**, 8118-8124.
- BALLESTAS M.E., CHATIS P.A., KAYE K.M. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science*, 1999, **284**, 641-644.
- BARAHONA H.H., MELENDEZ L.V., KING N.W., DANIEL M.D., FRASER C.E.O., PREVILLE A.C. Herpesvirus aotus type 2 : a new viral agent from owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Infect. Dis.*, 1973, **127**, 171-178.
- BARTHA A., JUHASZ M., LIEBERMANN H. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.*, 1966, **16**, 357-358.
- BARTHA A., JUHASZ M., LIEBERMANN H., HANTSCHEL H., SCHULZE P. Isolation and properties of a bovine herpesvirus from a calf with respiratory disease and keratoconjunctivitis. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 1967, **21**, 615-623.
- BARTHA A., FADOL A.M., LIEBERMANN H., LUDWIG H., MOHANTY S.B., OSORIO F.A., REED D.E., STORZ J., STRAUB O.C., VAN DER MAATEN M.J., ET AL. Problems concerning the taxonomy of the 'Movar-type' bovine herpesviruses. *Intervirology*, 1987, **28**, 1-7.
- BECKER Y. Evolution of viruses by acquisition of cellular RNA or DNA nucleotide sequences and genes: an introduction. *Virus Genes*, 2000, **21**, 7-12.
- BELAK S., PALFI V. Characterization of a herpesvirus isolated from spontaneously degenerated bovine kidney cell culture. *Acta Vet. Hung.*, 1974, **24**, 249-253.
- BELLO L.J., DAVISON A.J., GLENN M.A., WHITEHOUSE A., RETHMEIER N., SCHULZ T.F., BARKLIE CLEMENTS J. The human herpesvirus-8 ORF 57 gene and its properties. *J. Gen. Virol.*, 1999, **80**, 3207-3215.
- BELLOWS D.S., CHAU B.N., LEE P., LAZEBNIK Y., BURNS W.H., HARDWICK J.M. Antiapoptotic herpesvirus Bcl-2 homologs escape caspase-mediated conversion to proapoptotic proteins. *J. Virol.*, 2000, **74**, 5024-5031.
- BERGQUAM E.P., AVERY N., SHIIGI S.M., AXTHELM M.K., WONG S.W. Rhesus rhadinovirus establishes a latent infection in B lymphocytes *in vivo*. *J. Virol.*, 1999, **73**, 7874-7876.
- BERMUDEZ-CRUZ R., ZHANG L., VAN SANTEN V.L. Characterization of an abundant, unique 1.7-kilobase bovine herpesvirus 4 (BHV-4) late RNA and mapping of a BHV-4 IE2 transactivator-binding site in its promoter-regulatory region. *J. Virol.*, 1997, **71**, 527-538.
- BERMUDEZ-CRUZ R., ZHANG L., VAN SANTEN V.L. Characterization of a bovine herpesvirus 4(BHV-4) 1.1-kb RNA and its transactivation by BHV-4 immediate-early 2 gene product. *Arch. Virol.*, 1998, **143**, 2391-2412.
- BOERNER B., WEIGELT W., BUHK H.J., CASTRUCCI G., LUDWIG H. A sensitive and specific PCR/Southern blot assay for detection of bovine herpesvirus 4 in calves infected experimentally. *J. Virol. Methods*, 1999, **83**, 169-180.
- BORCHERS K., BRACKMANN J., WOLF O., RUDOLPH M., GLATZEL P., KRASINSKA M., KRASINSKI Z.A., FROLICH K. Virologic investigations of free-living European bison (*Bison bonasus*) from the Bialowieza Primeval Forest, Poland. *J. Wildl. Dis.*, 2002, **38**, 533-538.
- BORZA C.M., HUTT-FLETCHER L.M. Epstein-Barr virus recombinant lacking expression of glycoprotein gp150 infects B cells normally but is enhanced for infection of epithelial cells. *J. Virol.*, 1998, **72**, 7577-7582.
- BRESNAHAN W.A., SHENK T. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science*, 2000, **288**, 2373-2376.
- BROLL H., FINSTERBUSCH T., BUHK H.J., GOLTZ M. Genetic analysis of the bovine herpesvirus type 4 gene locus for the putative terminase. *Virus Genes*, 1999a, **19**, 243-250.
- BROLL H., BUHK H.J., ZIMMERMANN W., GOLTZ M. Structure and function of the prDNA and the genomic termini of the gamma2-herpesvirus bovine herpesvirus type 4. *J. Gen. Virol.*, 1999b, **80**, 979-986.
- BROWNE H., BELL S., MINSON T., WILSON D.W. An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions : evidence for reenvolvement during egress. *J. Virol.*, 1996, **70**, 4311-4316.
- BUBLLOT M., VAN BRESSEM M.F., THIRY E., DUBUISSON J., PASTORET P.-P. Bovine herpesvirus 4 genome: cloning, mapping and strain variation analysis. *J. Gen. Virol.*, 1990, **71**, 133-142.
- BUBLLOT M., DUBUISSON J., VAN BRESSEM M.F., DANYI S., PASTORET P.-P., THIRY E. Antigenic and genomic identity between simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4. *J. Gen. Virol.*, 1991a, **72**, 715-719.
- BUBLLOT M., WELLEMAN G., VAN BRESSEM M.F., DUBUISSON J., PASTORET P.-P., THIRY E. Genomic diversity among bovine herpesvirus 4 field isolates. *Arch. Virol.*, 1991b, **116**, 1-18.
- BUBLLOT M., LOMONTE P., LEQUARRE A.S., ALBRECHT J.C., NICHOLAS J., FLECKENSTEIN B., PASTORET P.-P., THIRY E. Genetic relationships between bovine herpesvirus 4 and the gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *Virology*, 1992, **190**, 654-665.
- CAMERON K.R., STAMMINGER T., CRAXTON M., BODEMER W., HONESS R.W., FLECKENSTEIN B. The 160,000-Mr virion protein encoded at the right end of the herpesvirus saimiri genome is homologous to the 140,000-Mr membrane antigen encoded at the left end of the Epstein-Barr virus genome. *J. Virol.*, 1987, **61**, 2063-2070.
- CASTRUCCI G., FRIGERI F., CILLI V., DONELLI G., FERRARI M., CHICCHINI U., BORDONI E. A study of a herpesvirus isolated from dairy cattle with a history of reproductive disorders. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1986, **9**, 13-21.



- CASTRUCCI G., FRIGERI F., FERRARI M., CILLI V., ALDROVANDI V., RAMPICHINI L., GATTI R. A study of the pathogenesis of bovid herpesvirus-4 in calves. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, 1987a, **34**, 473-479.
- CASTRUCCI G., FRIGERI F., FERRARI M., RANUCCI S., ALDROVANDI V., CILLI V., RAMPICHINI L., GATTI R. Experimental infection of calves with strains of Bovid herpesvirus-4. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1987b, **10**, 41-49.
- CASTRUCCI G., FRIGERI F., FERRARI M., PEDINI B., ALDROVANDI V., CILLI V., RAMPICHINI L., GATTI R. Reactivation in calves of latent infection by Bovid herpesvirus-4. *Microbiologica*, 1987c, **10**, 37-45.
- CASTRUCCI G., FRIGERI F., FERRARI M., ALDROVANDI V., DILUCA D., GATTI R. Comparative study of two strains of Bovid herpesvirus-4. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1988, **11**, 143-151.
- CASTRUCCI G., FERRARI M., TRALDI V., TARTAGLIONE E. Effects in calves of mixed infections with bovine viral diarrhoea virus and several other bovine viruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1992, **15**, 261-270.
- CAVIRANI S., ALLEGRI G., FLAMMINI C.F. Tipizzazione sierologica di stipiti di bovid herpesvirus-4 (BHV-4) isolati in corso di glossite ulcerativa cronica della bovina da latte e comportamento dell'infezione sperimentale. *Selezione Veterinaria*, 1990, **31**, 1261-1269.
- CAVIRANI S., MARTELLI P., CABASSI C.S., LAVAZZA A., ALLEGRI G., FLAMMINI C.F. Isolation of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) from dairy cows with digital dermatitis. In: Proceedings of the XIX World buiatric Congress, 1996, 121.
- CHANG L.Y., VAN SANTEN V.L. Immediate-early, early, and late RNAs in bovine herpesvirus-4-infected cells. *Virology*, 1992, **191**, 909-920.
- CHANG Y., CESARMAN E., PESSIN M.S., LEE F., CULPEPPER J., KNOWLES D.M., MOORE P.S. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, 1994, **266**, 1865-1869.
- COLLINS C.M., MEDVECZKY M.M., LUND T., MEDVECZKY P.G. The terminal repeats and latency-associated nuclear antigen of herpesvirus saimiri are essential for episomal persistence of the viral genome. *J. Gen. Virol.*, 2002, **83**, 2269-2278.
- COOPER M., GOODWIN D.J., HALL K.T., STEVENSON A.J., MEREDITH D.M., MARKHAM A.F., WHITEHOUSE A. The gene product encoded by ORF 57 of herpesvirus saimiri regulates the redistribution of the splicing factor SC-35. *J. Gen. Virol.*, 1999, **80**, 1311-1316.
- CZAPLICKI G., THIRY E. An association exists between bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Prev. Vet. Med.*, 1998, **33**, 235-240.
- DARLINGTON R.W., MOSS L.H., 3RD. Herpesvirus envelopment. *J. Virol.*, 1968, **2**, 48-55.
- DAVISON A.J. Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.*, 2002, **86**, 69-88.
- DEWALS B., BOUDRY C., MARKINE-GORIAYNOFF N., DESMECHT D., PASTORET P.-P., VANDERPLAS-SCHEN A. L'herpèsvirus alcélapphin 1, l'agent responsable de la forme africaine du coryza gangreneux. *Ann. Méd. Vét.*, 2003, **147**, 373-386.
- DIJKSTRA J.M., VISSER N., METTENLEITER T.C., KLUPP B.G. Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *J. Virol.*, 1996, **70**, 5684-5688.
- DIJKSTRA J.M., GERDTS V., KLUPP B.G., METTENLEITER T.C. Deletion of glycoprotein gM of pseudorabies virus results in attenuation for the natural host. *J. Gen. Virol.*, 1997, **78**, 2147-2151.
- DONOFRIO G., CAVIRANI S., FLAMMINI C.F., SCATOZZA F. Molecular typing of a BHV-4 (bovine herpesvirus 4) field isolate. *Vet. Res. Commun.*, 2000a, **24**, 411-422.
- DONOFRIO G., CAVIRANI S., VAN SANTEN V.L. Establishment of a cell line persistently infected with bovine herpesvirus-4 by use of a recombinant virus. *J. Gen. Virol.*, 2000b, **81**, 1807-1814.
- DONOFRIO G., FLAMMINI C.F., SCATOZZA F., CAVIRANI S. Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2000c, **38**, 4668-4671.
- DONOFRIO G., VAN SANTEN V.L. A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus-4 persistent infection. *J. Gen. Virol.*, 2001, **82**, 1181-1185.
- DRUMMER H.E., REUBEL G.H., STUDDERT M.J. Equine gammaherpesvirus 2 (EHV2) is latent in B lymphocytes. *Arch. Virol.*, 1996, **141**, 495-504.
- DUBUISSON J., THIRY E., THOMAS I., COIGNOUL F., BUBLLOT M., VAN HEULES G., DEKEGEL D., PASTORET P.-P. Infection expérimentale de taureaux par injection intratesticulaire d'une souche de bovid herpesvirus 4 isolée d'un cas d'orchite. *Ann. Méd. Vét.*, 1987a, **131**, 37-48.
- DUBUISSON J., THIRY E., BUBLLOT M., PASTORET P.-P. Intervention du complément dans la neutralisation du Bovid herpesvirus 4. *Ann. Méd. Vét.*, 1987b, **131**, 69-73.
- DUBUISSON J., THIRY E., THALASSO F., BUBLLOT M., PASTORET P.-P. Biological and biochemical comparison of bovid herpesvirus-4 strains. *Vet. Microbiol.*, 1988, **16**, 339-349.
- DUBUISSON J., THIRY E., BUBLLOT M., THOMAS I., VAN BRESSEM M.F., COIGNOUL F., PASTORET P.-P. Experimental infection of bulls with a genital isolate of bovine herpesvirus-4 and reactivation of latent virus with dexamethasone. *Vet. Microbiol.*, 1989a, **21**, 97-114.
- DUBUISSON J., THIRY E., BUBLLOT M., SNEYERS M., BOULANGER D., GUILLAUME J., PASTORET P.-P. Production and characterization of monoclonal antibodies to bovid herpesvirus-4. *Vet. Microbiol.*, 1989b, **19**, 305-315.
- DUBUISSON J., BOULANGER D., BUBLLOT M., THIRY E., PASTORET P.-P. Proteins specified by bovine herpesvirus type 4 : structural proteins of the virion and identification of two major glycoproteins by using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 1989c, **70**, 1743-1753.
- DUBUISSON J., GUILLAUME J., BOULANGER D., THIRY E., BUBLLOT M., PASTORET P.-P. Neutralization

- of bovine herpesvirus type 4 by pairs of monoclonal antibodies raised against two glycoproteins and identification of antigenic determinants involved in neutralization. *J. Gen. Virol.*, 1990, **71**, 647-653.
- DUBUISSON J., DANYI S., BUBLLOT M., PASTORET P.-P., THIRY E. Comparison of proteins of simian herpesvirus aotus type 2 and bovine herpesvirus type 4. *J. Gen. Virol.*, 1991a, **72**, 1145-1150.
- DUBUISSON J., PASTORET P.-P., THIRY E. Temporal control of bovine herpesvirus type 4 glycoprotein synthesis. *J. Gen. Virol.*, 1991b, **72**, 1429-1434.
- DUBUISSON J., BUBLLOT M., WELLEMAN G., PASTORET P.-P., THIRY E. Bovine herpesvirus 4 isolates : a comparison of three major glycoproteins. *Vet. Microbiol.*, 1991c, **29**, 251-259.
- DUBUISSON J., KOROMYSLOV I., PASTORET P.-P., THIRY E. Proteins of bovine herpesvirus type 4 released into the culture medium of productively infected cells : identification of a 135K glycoprotein involved in viral attachment. *J. Gen. Virol.*, 1992a, **73**, 189-194.
- DUBUISSON J., PASTORET P.-P., THIRY E. Identification and characterization of glycoprotein gp1 of bovine herpesvirus type 4. *J. Gen. Virol.*, 1992b, **73**, 1293-1296.
- EDWARDS S., NEWMAN R.H. Detection of antibodies to bovid herpesvirus 4 by ELISA. *Vet. Microbiol.*, 1985, **10**, 149-154.
- EGELHOF S., BARTHA A., MAGYAR G. The existence of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) in lions. In : Proceedings of the XVI International Herpesvirus Workshop. *Pacific Groove, CA*, 1991, 245.
- EGYED L., BALLAGI-PORDANY A., BARTHA A., BELAK S. Studies of *in vivo* distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 1091-1095.
- EGYED L., KLUGE J.P., BARTHA A. Histological studies of bovine herpesvirus type 4 infection in non-ruminant species. *Vet. Microbiol.*, 1997, **57**, 283-289.
- EGYED L., BARTHA A. PCR studies on the potential sites for latency of BHV-4 in calves. *Vet. Res. Commun.*, 1998, **22**, 209-216.
- EGYED L. Replication of bovine herpesvirus type 4 in human cells *in vitro*. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 2109-2111.
- EGYED L., BERENCSI G., BARTHA A. Periodic reappearance of bovine herpesvirus type 4 DNA in the sera of naturally and experimentally infected rabbits and calves. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, **22**, 199-206.
- EGYED L. Bovine herpesvirus type 4 : a special herpesvirus (review article). *Acta Vet. Hung.*, 2000, **48**, 501-513.
- EHLERS B., BUHK H.J., LUDWIG H. Analysis of bovine cytomegalovirus genome structure : cloning and mapping of the monomeric polyrepetitive DNA unit, and comparison of European and American strains. *J. Gen. Virol.*, 1985, **66**, 55-68.
- ENSSER A., PFLANZ R., FLECKENSTEIN B. Primary structure of the alcelaphine herpesvirus 1 genome. *J. Virol.*, 1997, **71**, 6517-6525.
- ESSMAIL M., BAKER D., COLLINS J., VANDEWOUDE S., SALMAN M., HEGAZY A.A. Dot immunobinding assay for detection of bovine herpesvirus 4 antibodies in rabbits. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1999, **11**, 237-239.
- EUGSTER A.K. Isolation of bovine herpesvirus III from diarrhetic feces. *Vet. Microbiol.*, 1978/1979, **3**, 199-204.
- EVERMANN J.F., MUELLER G.M., DILBECK P.M. Clinical and diagnostic implications of bovid herpesvirus type 4 (bovine cytomegalovirus) infections. *Amer. Assoc. Vet. Lab. Diag. Proc.*, 1985, **27**, 125-136.
- EVERMANN J.F., HENRY B.E. Herpetic infections of cattle : a comparison of bovine cytomegalovirus and bovine rhinotracheitis. *Comp., Food Animal*, 1989, **11**, 205-215.
- EYANGA E., JETTEUR P., THIRY E., WELLEMAN G., DUBUISSON J., VAN OPDENBOSCH E., MAKUMBU S., PASTORET P.-P. Research on antibodies against BHV-1, BHV-2, BHV-4, BVD-MD virus, bovine adenovirus A and B, rotavirus and coronavirus in cattle in western Zaire: complementary results. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 1989, **42**, 155-161.
- FABRICANT C.G., GILLESPIE J.H., KROOK L. Intracellular and extracellular mineral crystal formation induced by viral infection of cell cultures. *Infect. Immun.*, 1971, **3**, 416-419.
- FABRICANT C.G., KROOK L., GILLESPIE J.H. Virus-induced cholesterol crystals. *Science*, 1973, **181**, 566-567.
- FABRICANT C.G., GILLESPIE J.H. Identification and characterization of a second feline herpesvirus. *Infect. Immun.*, 1974, **9**, 460-466.
- FABRICANT C.G. Herpesvirus-induced urolithiasis in specific-pathogen-free male cats. *Am. J. Vet. Res.*, 1977, **38**, 1837-1842.
- FABRICANT C.G. Serological responses to the cell associated herpesvirus and the manx calicivirus of SPF male cats with herpesvirus-induced urolithiasis. *Cornell Vet.*, 1981, **71**, 59-68.
- FITTON J., BEENHAM J., EDWARDS S. Bovid herpesvirus-4 antibody in cattle in Great Britain. *Vet. Rec.*, 1990, **126**, 173.
- FLANO E., HUSAIN S.M., SAMPLE J.T., WOODLAND D.L., BLACKMAN M.A. Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, and macrophages. *J. Immunol.*, 2000, **165**, 1074-1081.
- FLANO E., KIM I.J., WOODLAND D.L., BLACKMAN M.A. gamma-Herpesvirus Latency Is Preferentially Maintained in Splenic Germinal Center and Memory B Cells. *J. Exp. Med.*, 2002, **196**, 1363-1372.
- FLINT S.J., RACANIELLO V.R., ENQUIST L.W., SKALKKA A.M., KRUG R.M. Latent infections. In : Principle of Virology : molecular biology, pathogenesis, and control. American Society for Microbiology : Washington, D. C., 2000a, 540-546.
- FLINT S.J., RACANIELLO V.R., ENQUIST L.W., SKALKKA A.M., KRUG R.M. Principle of Virology: molecular biology, pathogenesis, and control. American Society for Microbiology : Washington, D. C., 2000b, 804p.

- FRAZIER K., PENCE M., MAUEL M.J., LIGGETT A., HINES M.E., 2ND, SANGSTER L., LEHMKUHL H.D., MILLER D., STYER E., WEST J., BALDWIN C.A. Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2001, **13**, 502-508.
- FRAZIER K.S., BALDWIN C.A., PENCE M., WEST J., BERNARD J., LIGGETT A., MILLER D., HINES M.E., 2ND. Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic bovine herpesvirus-4. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2002, **14**, 457-462.
- FUCHS P.G., RUGER R., PFISTER H., FLECKENSTEIN B. Genome organization of herpesvirus aotus type 2. *J. Virol.*, 1985, **53**, 13-18.
- FUKUDA M. Cell surface carbohydrates : cell-type specific expression. In: Fukuda M., Hindsgaul O. (Eds.), *Molecular Glycobiology*. Oxford University Press : Oxford, 1994, 1-52.
- FUKUDA M. Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1573**, 394-405.
- GALIK P.K., VAN SANTEN V.L., STRINGFELLOW D.A., BIRD R.C., WRIGHT J.C., SMITH P.C. Development of a DNA probe for identification of bovine herpesvirus 4. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 653-659.
- GARBER D.A., BEVERLEY S.M., COEN D.M. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology*, 1993, **197**, 459-462.
- GIBBS E.P.J., RWEYEMAMU M.M. Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bull.*, 1977, **47**, 317-342.
- GODFROID J., CZAPLICKI G., KERKHOFS P., WEYNANTS V., WELLEMANS G., THIRY E., LETESSON J.-J. Assessment of the cell-mediated immunity in cattle infection after bovine herpesvirus 4 infection, using an *in vitro* antigen-specific interferon-gamma assay. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 133-141.
- GOLTZ M., BROLL H., MANKERTZ A., WEIGELT W., LUDWIG H., BUHK H.J., BORCHERS K. Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4 : its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses. *Virus Genes*, 1994, **9**, 53-59.
- GOODWIN D.J., HALL K.T., GILES M.S., CALDERWOOD M.A., MARKHAM A.F., WHITEHOUSE A. The carboxy terminus of the herpesvirus saimiri ORF 57 gene contains domains that are required for transactivation and transrepression. *J. Gen. Virol.*, 2000, **81**, 2253-2265.
- GRANZOW H., WEILAND F., JONS A., KLUPP B.G., KARGER A., METTENLEITER T.C. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture : a reassessment. *J. Virol.*, 1997, **71**, 2072-2082.
- GRANZOW H., KLUPP B.G., FUCHS W., VEITS J., OSTERRIEDER N., METTENLEITER T.C. Egress of alpha herpesviruses : comparative ultrastructural study. *J. Virol.*, 2001, **75**, 3675-3684.
- GRECO A., BAUSCH N., COUTE Y., DIAZ J.J. Characterization by two-dimensional gel electrophoresis of host proteins whose synthesis is sustained or stimulated during the course of herpes simplex virus type 1 infection. *Electrophoresis*, 2000, **21**, 2522-2530.
- GUO W.Z., SHEN D.T., EVERMANN J.F., GORHAM J.R. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a complement-fixation test for the detection of IgG to bovine herpesvirus type 4 (bovine cytomegalovirus). *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 667-670.
- HALL K.T., GILES M.S., CALDERWOOD M.A., GOODWIN D.J., MATTHEWS D.A., WHITEHOUSE A. The Herpesvirus Saimiri open reading frame 73 gene product interacts with the cellular protein p32. *J. Virol.*, 2002, **76**, 11612-11622.
- HAMMERSCHMIDT W., SUGDEN B. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell*, 1988, **55**, 427-433.
- HANDLEY J.A., SARGAN D.R., HERRING A.J., REID H.W. Identification of a region of the alcelaphine herpesvirus-1 genome associated with virulence for rabbits. *Vet. Microbiol.*, 1995, **47**, 167-181.
- HOLZERLANDT R., ORENGO C., KELLAM P., ALBA M.M. Identification of new herpesvirus gene homologs in the human genome. *Genome Res.*, 2002, **12**, 1739-1748.
- HOMAN E.J., EASTERDAY B.C. Further studies of naturally occurring latent bovine herpesvirus infection. *Am. J. Vet. Res.*, 1981, **42**, 1811-1813.
- HONESS R.W., ROIZMAN B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.*, 1974, **14**, 8-19.
- HONESS R.W., ROIZMAN B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis : sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1975, **72**, 1276-1280.
- HONESS R.W. Herpes simplex and "the herpes complex" : diverse observations and a unifying hypothesis. The eighth Fleming lecture. *J. Gen. Virol.*, 1984, **65**, 2077-2107.
- HONESS R.W., GOMPELS U.A., BARRELL B.G., CRAXTON M., CAMERON K.R., STADEN R., CHANG Y.N., HAYWARD G.S. Deviations from expected frequencies of CpG dinucleotides in herpesvirus DNAs may be diagnostic of differences in the states of their latent genomes. *J. Gen. Virol.*, 1989, **70**, 837-855.
- HOUSE J.A., WILSON T.M., EL NAKASHLY S., KARIM I.A., ISMAIL I., EL DANAF N., MOUSSA A.M., AYOUB N.N. The isolation of lumpy skin disease virus and bovine herpesvirus-4 from cattle in Egypt. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1990, **2**, 111-115.
- JOHNSON D.C., SPEAR P.G. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J. Virol.*, 1982, **43**, 1102-1112.
- JONES P.C., ROIZMAN B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *J. Virol.*, 1979, **31**, 299-314.
- JONS A., DIJKSTRA J.M., METTENLEITER T.C. Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J. Virol.*, 1998, **72**, 550-557.

- KAMINJOLO J.S., MUGERA G.M., ROSTED A.F. Isolation of a Herpes-type Virus from some Tumours of Bovine Origin. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, 1972, **19**, 626-632.
- KENDRICK J.W., OSBURN B.I., KRONLUND N. Pathogenicity studies of a bovine herpesvirus. *Theriogenology*, 1976, **6**, 447-462.
- KIT S. Thymidine kinase. *Microbiol. Sci.*, 1985, **2**, 369-375.
- KIT S., KIT M., ICHIMURA H., CRANDELL R., MCCONNELL S. Induction of thymidine kinase activity by viruses with group B DNA genomes: bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 4). *Virus Res.*, 1986, **4**, 197-212.
- KOKLES R. Zum Vorkommen Von Herpes-Orphan-Virusinfektionen des Rindes. *Monat. Vet. Med.*, 1986, **41**, 551-555.
- KOKLES R., PELLINGHOFF B. Zur charakterisierung von Bovinen Herpes-Orphan-Virusisolationen. *Monat. Vet. Med.*, 1987, **42**, 505-509.
- KROGMAN L.A., MCADARAGH J.P. Recrudescence of bovine herpesvirus-5 in experimentally infected calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, **43**, 336-338.
- KRUGER J.M., OSBORNE C.A., WHETSTONE C.A., GOYAL S.M., SEMBLAK R.A. Genetic and serologic analysis of feline cell-associated herpesvirus- induced infection of the urinary tract in conventionally reared cats. *Am. J. Vet. Res.*, 1989, **50**, 2023-2027.
- KRUGER J.M., OSBORNE C.A., GOYAL S.M., POMEROY K.A., O'BRIEN T.D. Clinicopathologic and pathologic findings of herpesvirus-induced urinary tract infection in conventionally reared cats. *Am. J. Vet. Res.*, 1990a, **51**, 1649-1655.
- KRUGER J.M., OSBORNE C.A., GOYAL S.M., O'BRIEN T.D., POMEROY K.A., SEMBLAK R.A. Clinicopathologic analysis of herpesvirus-induced urinary tract infection in specific-pathogen-free cats given methylprednisolone. *Am. J. Vet. Res.*, 1990b, **51**, 878-885.
- KRUGER J.M., OSBORNE C.A., GOYAL S.M., WICKSTROM S.L., JOHNSTON G.R., FLETCHER T.F., BROWN P.A. Clinical evaluation of cats with lower urinary tract disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, **199**, 211-216.
- KRUGER J.M., OSBORNE C.A. Recurrent, nonobstructive, idiopathic feline lower urinary tract disease : an illustrative case report. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1995, **31**, 312-316.
- KRUGER J.M., VENTA P.J., SWENSON C.L., SYRING R., GIBBONS-BURGENER S.N., RICHTER M., MAES R.K. Prevalence of bovine herpesvirus-4 infection in cats in Central Michigan. *J. Vet. Intern. Med.*, 2000, **14**, 593-597.
- KUNG S.H., MEDVECZKY P.G. Identification of a herpesvirus Saimiri cis-acting DNA fragment that permits stable replication of episomes in transformed T cells. *J. Virol.*, 1996, **70**, 1738-1744.
- KURILLA M.G., HEINEMAN T., DAVENPORT L.C., KIEFF E., HUTT-FLETCHER L.M. A novel Epstein-Barr virus glycoprotein gp150 expressed from the BDLF3 open reading frame. *Virology*, 1995, **209**, 108-121.
- KWANG M.J. Virus isolation and serological investigation of bovine herpesvirus type 4 in Taiwan. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.*, 1999, **25**, 50-54.
- LAKE C.M., MOLESWORTH S.J., HUTT-FLETCHER L.M. The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3. *J. Virol.*, 1998, **72**, 5559-5564.
- LEVINGS R.L., KAEBERLE M.L., REED D.E. Cross-reactions of bovine herpesvirus 1 antigens with those of other cattle herpesviruses. *Vet. Microbiol.*, 1984, **9**, 329-344.
- LI H., SHEN D.T., BURGER D., DAVIS W.C., GORHAM J.R. Analysis of bovine herpesvirus 4 (DN 599) major antigens with monoclonal antibodies and polyclonal immune serum. *Arch. Virol.*, 1991, **119**, 225-238.
- LIEBERMANN H., SCHULZE P., KOKLES R., HANTSCHHEL H. Isolation and identification of another new bovine herpesvirus. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 1967, **21**, 761-776.
- LIN T.M., SHI G.Y., TSAI C.F., SU H.J., GUO Y.L., WU H.L. Susceptibility of endothelial cells to bovine herpesvirus type 4 (BHV-4). *J. Virol. Methods*, 1997, **63**, 219-225.
- LIN T.M., SHI G.Y., JIANG S.J., TSAI C.F., HWANG B.J., HSIEH C.T., WU H.L. Persistent infection of bovine herpesvirus type 4 in bovine endothelial cell cultures. *Vet. Microbiol.*, 1999, **70**, 41-53.
- LIN T.M., JIANG M.J., ENG H.L., SHI G.Y., LAI L.C., HUANG B.J., HUANG K.Y., WU H.L. Experimental infection with bovine herpesvirus-4 enhances atherosclerotic process in rabbits. *Lab. Invest.*, 2000, **80**, 3-11.
- LOMONTE P. Etude de l'organisation génomique de l'herpèsvirus bovin de type 4 et les produits d'expression des gènes gB, gL, Borf D1 (Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur en Biochimie). Université de Liège : Liège, 1997, 171 p.
- LOMONTE P., BUBLLOT M., PASTORET P.-P., THIRY E. Location and characterization of the bovine herpesvirus type 4 thymidine kinase gene ; comparison with thymidine kinase genes of other herpesviruses. *Arch. Virol.*, 1992, **127**, 327-337.
- LOMONTE P., BUBLLOT M., VAN SANTEN V., KEIL G.M., PASTORET P.-P., THIRY E. Analysis of bovine herpesvirus 4 genomic regions located outside the conserved gammaherpesvirus gene blocks. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 1835-1841.
- LOMONTE P., BUBLLOT M., VAN SANTEN V., KEIL G., PASTORET P.-P., THIRY E. Bovine herpesvirus 4 : genomic organization and relationship with two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *Vet. Microbiol.*, 1996, **53**, 79-89.
- LOMONTE P., FILEE P., LYAKU J.R., BUBLLOT M., PASTORET P.-P., THIRY E. Glycoprotein B of bovine herpesvirus 4 is a major component of the virion, unlike that of two other gammaherpesviruses, Epstein-Barr virus and murine gammaherpesvirus 68. *J. Virol.*, 1997a, **71**, 3332-3335.
- LOMONTE P., FILEE P., LYAKU J.R., BUBLLOT M., PASTORET P.-P., THIRY E. Analysis of the biochemical pro-

- erties of, and complex formation between, glycoproteins H and L of the gamma2 herpesvirus bovine herpesvirus-4. *J. Gen. Virol.*, 1997b, **78**, 2015-2023.
- LOPEZ O.J., GALEOTA J.A., OSORIO F.A. Bovine herpesvirus type-4 (BHV-4) persistently infects cells of the marginal zone of spleen in cattle. *Microb. Pathog.*, 1996, **21**, 47-58.
- LORETU K., MARINOV P., GENOV I., BOHNEL H. Virus isolations from cases of infectious bovine pustulo-vulvovaginitis and posthitis (IPV/IPB) in cattle in Tanzania. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 1974, **22**, 303-310.
- LUDWIG H. Bovine herpesviruses. In: Roizman B. (Eds.), *The herpesviruses*. Plenum Press: London, 1983.
- LUINI M., FABBI M., CERVIO G. Isolamento di un herpesvirus da lesioni erosive linguali del bovino. *Estratto sel. Vet.*, 1985, **26**, 1131-1133.
- LUINI M., FIONI E. Frequency of bovid-herpesvirus-4 (BHV 4) infection in cattle in some regions of Northern Italy. In: Abstracts of the 9th International Symposium of W.A.V.M.I., 1986a, 40.
- LUINI M., FIONI E. Frequency of bovid-herpesvirus-4 (BHV 4) infection in cattle in Lombardia and Emilia Romagna (Abstract). *Atti Società It. Buiat.*, 1986b, **18**, 329-339.
- LUKAC D.M., KIRSHNER J.R., GANEM D. Transcriptional activation by the product of open reading frame 50 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is required for lytic viral reactivation in B cells. *J. Virol.*, 1999, **73**, 9348-9361.
- LUPTON S., LEVINE A.J. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, **5**, 2533-2542.
- LUTHER P.D., BRADLEY P.G., HAIG D.A. The isolation and characterization of a herpesvirus from calf kidney cell cultures. *Res. Vet. Sci.*, 1971, **12**, 496-498.
- MARCHOT P., THIRY E., JETTEUR P., LEROY P. Serological survey on the prevalence of bovine type-4 herpesvirus infection in cattle in the Accra plains of Ghana. *Rev. Elev. Méd. Vet. Pays Trop.*, 1991, **44**, 405-406.
- MARE J., VAN RESENBURG S.J. The isolation of viruses associated with infertility in cattle: a preliminary report. *J. S. Afr. Vet. Med. Ass.*, 1961, **32**, 201-210.
- MARINOV P., GENOV I., BONEL K., LORETU K. Isolation of viruses from semen of cattle bulls and their effect on fertility of cows. *Vet. Med. Nauki*, 1974, **11**, 26-33.
- MARKINE-GORAYNOFF N. Etude du gène Bo17 de l'herpèsvirus bovin 4 (mémoire défendu en vue de l'obtention d'un Diplôme d'études approfondies en Sciences vétérinaires). Université de Liège: Liège, 2001, 80 p.
- MARKINE-GORAYNOFF N. Etude du gène Bo17 de l'herpèsvirus bovin 4 (Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Vétérinaires). Université de Liège: Liège, 2003, 150 p.
- MARKINE-GORAYNOFF N., GEORGIN J.P., GOLTZ M., ZIMMERMANN W., BROLL H., WAMWAYI H.M., PASTORET P.-P., SHARP P.M., VANDERPLASSCHEN A. The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-mucin encoded by bovine herpesvirus 4 was acquired from an ancestor of the African buffalo. *J. Virol.*, 2003, **77**, 1784-1792.
- MARKINE-GORAYNOFF N., GILLET L., HAARR L., PASTORET P.-P., VANDERPLASSCHEN A. Encoding a functional core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-M is a general feature of bovine herpesvirus 4 strains, non essential for viral replication *in vitro*. En préparation.
- MASSE M.J., JONS A., DIJKSTRA J.M., METTENLEITER T.C., FLAMAND A. Glycoproteins gM and gN of pseudorabies virus are dispensable for viral penetration and propagation in the nervous systems of adult mice. *J. Virol.*, 1999, **73**, 10503-10507.
- MCCOY S.B., MOHANTY S.B., ROCKEMAN D.D. Electron microscope autoradiographic study of bovine herpesvirus 4. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, 1985, **32**, 368-374.
- MCGEACH D.J., COOK S., DOLAN A., JAMIESON F.E., TELFORD E.A. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J. Mol. Biol.*, 1995, **247**, 443-458.
- MCGEACH D.J., DOLAN A., RALPH A.C. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J. Virol.*, 2000, **74**, 10401-10406.
- MCGEACH D.J. Molecular evolution of the gamma-Herpesvirinae. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2001, **356**, 421-435.
- MCGOWAN A.C., MURRAY R.D. Health status of bulls used for natural breeding on farms in south west Scotland. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, 1999, **46**, 311-321.
- MEERSSCHAERT C., THIRY E., PASTORET P.-P. Epizootologie des infections à herpèsvirus chez les ruminants sauvages. II. Les virus de la thélite herpétique bovine et du coryza gangréneux et les autres herpèsvirus isolés des ruminants. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1988, **41**, 235-242.
- METTENLEITER T.C. Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.*, 2002, **76**, 1537-1547.
- METZLER A.E., WYLER R. Prevalence of bovine herpesvirus 4 in the Swiss cattle population and possible serologic cross reaction with bovine herpesvirus 1 (IBR/IPV virus). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 1986a, **128**, 459-467.
- METZLER A.E., WYLER R. Prävalenz des bovinen Herpesvirus 4 in der schweizerischen Rinder-Population und mögliche serologische Kreuzreaktion mit dem bovinen Herpesvirus 1. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 1986b, **128**, 459-467.
- METZLER A.E., OSSENT P., GUSCETTI F., RUBEL A., LANG E.M. Serological evidence of herpesvirus infection in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Wildl. Dis.*, 1990, **26**, 41-49.
- MINSON A.C., DAVISON A., EBERLE R., DESROSIERS R.C., FLECKENSTEIN B., MCGEACH D.J., PELLET P.E., ROIZMAN B., STUDDERT D.M.J. Family Herpesvirus. In: van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeach D.J., Pringle C.R.,

- Wickner R.B. (Eds.), Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press : London, 2000, 203-225.
- MOHANTY S.B., HAMMOND R.C., LILLIE M.G. A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. *Arch. Gesamt. Virusforsch.*, 1971, **34**, 394-395.
- MOHANTY S.B., LILLIE M.G., INGLING A.L., HAMMOND R.C. Effects of an experimentally induced herpesvirus infection in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1972, **161**, 1008-1011.
- MOHANTY S.B. A rapid embedding technique for electron microscopic study of a bovine herpesvirus. *Zentralbl. Bakteriol. [Orig A]*, 1973, **224**, 61-64.
- MOHANTY S.B., ROCKEMANN D.D., SNYDER D.B. Serologic cross-reaction between bovine herpesviruses 1 and 4 by the enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiologica*, 1984, **7**, 179-186.
- MORENO-LOPEZ J., GOLTZ M., REHBINDER C., VALSALA K.V., LUDWIG H. A bovine herpesvirus (BHV-4) as passenger virus in ethmoidal tumours in Indian cattle. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, 1989, **36**, 481-486.
- MUNZ E., GOEBEL E., RWEYEMAMU M.M. Electron microscopical studies on "non-syncytia forming" bovine herpes viruses isolated in Tanzania. *J. Comp. Pathol.*, 1974, **84**, 485-494.
- NAEEM K., GOYAL S.M., WERDIN R.E. Prevalence of bovid herpesvirus-4 and its antibody in cattle in Minnesota. *Am. J. Vet. Res.*, 1989, **50**, 1931-1935.
- NAEEM K., CAYWOOD D.D., WERDIN R.E., GOYAL S.M. Evaluation of pregnant rabbits as a laboratory model for bovid herpesvirus-4 infection. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 640-644.
- NAEEM K., GOYAL S.M. A dot immunobinding assay on nitrocellulose for the detection of bovid herpesvirus-4 antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1990, **2**, 107-110.
- NAEEM K., CAYWOOD D.D., GOYAL S.M., WERDIN R.E., MURTAUGH M.P. Variation in the pathogenic potential and molecular characteristics of bovid herpesvirus-4 isolates. *Vet. Microbiol.*, 1991a, **27**, 1-18.
- NAEEM K., MURTAUGH M.P., GOYAL S.M. Tissue distribution of bovid herpesvirus-4 in inoculated rabbits and its detection by DNA hybridization and polymerase chain reaction. *Arch. Virol.*, 1991b, **119**, 239-255.
- NAKANE T., HARA T., SAIKA K., HIROSE O., KAZAMA T. Isolation of bovine herpesvirus type 4 from the spinal cord of a cow. In : *Abstract book of the 129th Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science*, 2000.
- NEIPEL F., ALBRECHT J.C., FLECKENSTEIN B. Human herpesvirus 8--the first human Rhadinovirus. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1998, **23**, 73-77.
- NEUHIERL B., FEEDERLE R., HAMMERSCHMIDT W., DELECLUSE H.J. Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 15036-15041.
- NICHOLAS J. Evolutionary aspects of oncogenic herpesviruses. *Mol. Pathol.*, 2000, **53**, 222-237.
- OSORIO F.A., REED D.E., ROCK D.L. Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4 : acute and persistent infection. *Vet. Microbiol.*, 1982, **7**, 503-513.
- OSORIO F.A., REED D.E. Experimental inoculation of cattle with bovine herpesvirus-4 : evidence for a lymphoid-associated persistent infection. *Am. J. Vet. Res.*, 1983, **44**, 975-980.
- OSORIO F.A., ROCK D.L., REED D.E. Studies on the pathogenesis of a bovine cytomegalo-like virus in an experimental host. *J. Gen. Virol.*, 1985a, **66**, 1941-1951.
- OSORIO F.A., REED D.E., VAN DER MAATEN M.J., METZ C.A. Comparison of the herpesviruses of cattle by DNA restriction endonuclease analysis and serologic analysis. *Am. J. Vet. Res.*, 1985b, **46**, 2104-2109.
- OSORIO F.A., GALEOTA-WHEELER J.A., REED D.E., LOPEZ O. About the cellular tropism of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus type 4. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 3253-3254.
- PARKS J.B., KENDRICK J.W. The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 1973, **41**, 211-215.
- PETERSON R.B., GOYAL S.M. Propagation and quantitation of animal herpesviruses in eight cell culture systems. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1988, **11**, 93-98.
- PHILLIPS R.M., EDWARDS A.J., SMITH J.C. The isolation of bovine herpesvirus 3 (DN-599) and a serological survey of feedlot cattle for antibodies to this virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1983, 393-398.
- PHILLIPS R.M., NASSAR R.F. A serological study of human herpesvirus simplex 1 and bovine herpesvirus 1, 2 and 4 in Kansas cattle. *Bovine Pract.*, 1989, **24**, 14-17.
- PLOWRIGHT W., MACADAM R.F.M., ARMSTRONG J.A. Growth and characterisation of the virus of bovine malignant catarrhal fever in East Africa. *J. Gen. Microbiol.*, 1965, **39**, 253-266.
- PLOWRIGHT W. Malignant catarrhal fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1968, **152**, 795-803.
- POFFENBERGER K.L., ROIZMAN B. A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1 : presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J. Virol.*, 1985, **53**, 587-595.
- POTGIETER L.N., MARE C.J. Assay and antigenic interrelationships of the recently isolated bovine herpesviruses, DN599, FTC, and V11. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 1974, **46**, 238-247.
- RAFTERY M., MULLER A., SCHONRICH G. Herpesvirus homologues of cellular genes. *Virus Genes*, 2000, **21**, 65-75.
- REED D.E., LANGPAP T.J., ANSON M.A. Characterization of herpesviruses isolated from lactating dairy cows with mammary pustular dermatitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1977, **38**, 1631-1634.
- REED D.E., LANGPAP T.J., BERGELAND M.E. Bovine abortion associated with mixed Movar 33/63 type herpesvirus and bovine viral diarrhoea virus infection. *Cornell Vet.*, 1979, **69**, 54-66.

- RICH L.J., FABRICANT C.G. Urethral obstruction in male cats : transmission studies. *Can. J. Comp. Med.*, 1969, **33**, 164-165.
- ROIZMAN B., DESROSIERS R.C., FLECKENSTEIN B., LOPEZ C., MINSON A.C., STUDDERT M.J. The family *Herpesviridae*. *Arch. Virol.*, 1992, **123**, 425-449.
- ROIZMAN B., KNIPE D.M. Herpes simplex viruses and their replication. In : Knipe D.M. , Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology* (4th edition). Lippincott Williams & Wilkins Publishers : Philadelphia, 2001, 2399-2460.
- ROIZMAN B., PELLET P.E. The family *Herpesviridae* : a brief introduction. In : Knipe D.M. , Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology* (4th edition). Lippincott Williams & Wilkins Publishers : Philadelphia, 2001, 2381-2397.
- ROSSITER P.B., MUSHI E.Z., PLOWRIGHT W. The development of antibodies in rabbits and cattle infected experimentally with an african strain of malignant catarrhal fever virus. *Vet. Microbiol.*, 1977, **2**, 57-66.
- ROSSITER P.B., GUMM I.D., MIRANGI P.K. Immunological relationships between malignant catarrhal fever virus (alcelaphine herpesvirus 1) and bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 3). *Vet. Microbiol.*, 1988, **16**, 211-218.
- ROSSITER P.B., GUMM I.D., STAGG D.A., CONRAD P.A., MUKOLWE S., DAVIES F.G., WHITE H. Isolation of bovine herpesvirus-3 from African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Res. Vet. Sci.*, 1989, **46**, 337-343.
- RUDOLPH J., OSTERRIEDER N. Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread. *Virology*, 2002, **293**, 356-367.
- RÜGER R., DANIEL M.D., FLECKENSTEIN B. Herpesvirus aotus type 2, a virus related to the oncogenic herpesviruses of new world primates. *Zentralbl. Bakter. Parasit. Infektionskrankh. Hyg., Abteilung. I, Originale A*, 1980, **246**, 241.
- RUSO J.J., BOHENZKY R.A., CHIEN M.C., CHEN J., YAN M., MADDALENA D., PARRY J.P., PERUZZI D., EDELMAN I.S., CHANG Y., MOORE P.S. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 14862-14867.
- RWEYEMAMU M.M., LORETU K. Isolation of "non-syn-cytia forming" herpes viruses from cattle in Tanzania. *J. Comp. Pathol.*, 1973, **83**, 377-386.
- SASS B., MOHANTY S.B., HETRICK F.M. Fluorescent antibody study of a new bovine herpesvirus (strain DN-599). *Am. J. Vet. Res.*, 1974, **35**, 1343-1346.
- SCHULZE P.H., LIEBERMANN H., HANTSCHHEL H., BARTHA A., JUHASZ M. Licht- und elektronmikroskopische Untersuchungen an einem neuartigen bovinen Herpesvirus. *Arch. Exp. Veterinaermed.*, 1967, **21**, 747-759.
- SCIORTINO M.T., PERRI D., MEDICI M.A., FOTI M., ORLANDELLA B.M., MASTINO A. The gamma-2-herpesvirus bovine herpesvirus 4 causes apoptotic infection in permissive cell lines. *Virology*, 2000, **277**, 27-39.
- SEARLES R.P., BERGQUAM E.P., AXTHELM M.K., WONG S.W. Sequence and genomic analysis of a Rhesus macaque rhadinovirus with similarity to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *J. Virol.*, 1999, **73**, 3040-3053.
- SIMAS J.P., EFSTATHIOU S. Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 1998, **6**, 276-282.
- SMITH J.D. An additional role for the outer nuclear membrane in the morphogenesis of herpes simplex virus. *Intervirology*, 1980, **13**, 312-316.
- SMITH P.C., CUTLIP R.C., RITCHIE A.E., YOUNG J.K. A bovine herpesvirus associated with a disease of the upper respiratory tract of feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1972, **161**, 1134-1141.
- SODEIK B., EBERSOLD M.W., HELENIUS A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.*, 1997, **136**, 1007-1021.
- SPIRIG C., ACKERMANN M., MULLER H.K., BRUCKNER L., KIHM U. Serologic and virologic studies of selected cattle with antibodies to bovine herpesviruses. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 1989, **131**, 195-204.
- STACZEK J. Animal cytomegaloviruses. *Microbiol. Rev.*, 1990, **54**, 247-265.
- STEVENS G.S. Latency. In : Granoff A., Webster R.G. (eds.), *Encyclopedia of Virology*. Academic press : San Diego, 1999, 897-900.
- STORZ J. Comments on malignant catarrhal fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1968, **152**, 804-806.
- STORZ J., EHLERS B., TODD W.J., LUDWIG H. Bovine cytomegaloviruses : identification and differential properties. *J. Gen. Virol.*, 1984, **65**, 697-706.
- SULLIVAN D.C., ALLEN G.P., O'CALLAGHAN D.J. Synthesis and processing of equine herpesvirus type 1 glycoprotein 14. *Virology*, 1989, **173**, 638-646.
- SUNIL-CHANDRA N.P., EFSTATHIOU S., NASH A.A. Murine gammaherpesvirus 68 establishes a latent infection in mouse B lymphocytes *in vivo*. *J. Gen. Virol.*, 1992, **73**, 3275-3279.
- TELFORD E.A., WATSON M.S., AIRD H.C., PERRY J., DAVISON A.J. The DNA sequence of equine herpesvirus 2. *J. Mol. Biol.*, 1995, **249**, 520-528.
- THEODORIDIS A. Preliminary characterization of viruses isolated from cases of epididymitis and vaginitis in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1978, **45**, 187-195.
- THEODORIDIS A. Studies on bovine herpesviruses. Part 1. Isolation and characterization of viruses isolated from the genital tract of cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1985, **52**, 239-254.
- THIRY E., PASTORET P.-P., DESSY-DOIZE C., HANZEN C., CALBERG-BACQ C.M., DAGENAIX L., VINDEVOGEL H., ECTORS F. Réactivation d'un herpesvirus en culture de cellules testiculaires prélevées chez un taureau atteint d'orchite et d'azoospermie. *Ann. Méd. Vét.*, 1981a, **125**, 207-214.

- THIRY E., PASTORET P.-P., DESSY-DOIZE C., HANZEN C., CALBERG-BACQ C.M. Herpesvirus in infertile bull's testicle. *Vet. rec.*, 1981b, **108**, 426.
- THIRY E., VERCOUTER M., DUBUISSON J., BARRAT J., SEPULCHRE C., GERARDY C., MEERSCHAERT C., COLLIN B., BLANCOU J., PASTORET P.-P. Serological survey of herpesvirus infections in wild ruminants of France and Belgium. *J. Wildl. Dis.*, 1988, **24**, 268-273.
- THIRY E., BUBLLOT M., DUBUISSON J., PASTORET P.-P. Bovine herpesvirus-4 (BHV-4) infections of cattle. In : Wittmann G. (Eds.), Herpesvirus diseases of cattle, horse and pigs : developments in veterinary virology. Kluwer academic Publishers : Boston, 1989, 96-115.
- THIRY E., DUBUISSON J., BUBLLOT M., VAN BRESSEM M.F., PASTORET P.-P. The biology of bovine herpesvirus-4 infection of cattle. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 1990, **97**, 72-77.
- THIRY E., CHAPPUIS G., BUBLLOT M., VAN BRESSEM M.F., DUBUISSON J., PASTORET P.-P. Failure to infect cats with bovine herpesvirus type-4 strain Movar 33/63. *Vet. Rec.*, 1991, **128**, 614-615.
- THIRY E., BUBLLOT M., DUBUISSON J., LEQUARRE A.S., LOMONTE P., VAN BRESSEM M.F., VANDERPLASSCHEN A., PASTORET P.-P. La biologie du bovine herpesvirus 4. *Ann. Méd. Vét.*, 1992a, **136**, 617-624.
- THIRY E., BUBLLOT M., DUBUISSON J., VAN BRESSEM M.F., LEQUARRE A.S., LOMONTE P., VANDERPLASSCHEN A., PASTORET P.-P. Molecular biology of bovine herpesvirus type 4. *Vet. Microbiol.*, 1992b, **33**, 79-92.
- THIRY E., BARANOWSKI E., LOMONTE P., VANDERPLASSCHEN A., BUBLLOT M., DUBUISSON J., PASTORET P.-P. Les glycoprotéines des herpesvirus bovins 1 et 4. In : El Hassane Diop P., Kaekenbeeck A. (Eds.), Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. John Libbey Eurotext : Paris, 1994, 245-257.
- THIRY E., MARKINE-GORIAYNOFF N., MINNER F., PASTORET P.-P., VANDERPLASSCHEN A. L'herpesvirus bovin de type 4 : virus pathogène ou passager ? *Point vet.*, 2000, **31**, 49-55.
- TISCHER B.K., SCHUMACHER D., MESSERLE M., WAGNER M., OSTERRIEDER N. The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J. Gen. Virol.*, 2002, **83**, 997-1003.
- TODD W.J., STORZ J. Morphogenesis of a cytomegalovirus from an american bison affected with malignant catarrhal fever. *J. Gen. Virol.*, 1983, **64**, 1025-1030.
- TOHO T., KANAYA K., OKI Y. Experimental transmission to calf and goat of the virus associated with the cultured T-cell lymphoma cell line from the calf type of bovine leukaemia. I. Detection of antibodies to BTLA by immunofluorescence assay. *Bull. Nipp. Vet. Zootech. Coll.*, 1985, **34**, 23-26.
- TRUMAN D. Bovines herpesvirus typ 4 (BHV-4) eine studie zur Biologie und Verbreitung. Inaugural-Dissertation Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freie Universität Berlin, Universität Berlin, Berlin, 1985, p 285.
- TRUMAN D., LUDWIG H., STORZ J. Bovine herpesvirus type 4 (BHV-4) : studies on biology and transmission in cattle herds and insemination bulls. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, 1986, **33**, 485-501.
- VAN MALDEREN G., VAN OPDENBOSCH E., WELLEMANS G. Bovien herpes virus 1 en 4 : een sero-epidemiologisch onderzoek van de Belgische Rundveestapel. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 1987, **56**, 364-371.
- VAN OPDENBOSCH E., WELLEMANS G., ANTOINE H., BROERS A., CHARLIER G. Chronic metritis, associated with various symptoms : an immunodepressive herpes virus (LVR 140) as etiological agent? *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 1984, **53**, 21-30.
- VAN OPDENBOSCH E., WELLEMANS G., OUDEWATER J. Toevallige isolatie van het bovine herpesvirus 4 uit de long van een schaap. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 1986a, **55**, 432.
- VAN OPDENBOSCH E., WELLEMANS G., THEYS H., VERHEES I. Occurrence of subclinical virus infection in veal calves and their influence on weight gain. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 1986b, **50**, 17-20.
- VAN OPDENBOSCH E., WELLEMANS G., OOMS L.A., DEGRYSE A.D. BHV4 (bovine herpes virus 4) related disorders in Belgian cattle : a study of two problem herds. *Vet. Res. Commun.*, 1988, **12**, 347-353.
- VAN SANTEN V.L. Characterization of the bovine herpesvirus 4 major immediate-early transcript. *J. Virol.*, 1991, **65**, 5211-5224.
- VAN SANTEN V.L. Characterization of a bovine herpesvirus 4 immediate-early RNA encoding a homolog of the Epstein-Barr virus R transactivator. *J. Virol.*, 1993, **67**, 773-784.
- VANDERPLASSCHEN A., BUBLLOT M., DUBUISSON J., PASTORET P.-P., THIRY E. Attachment of the gamma-herpesvirus bovine herpesvirus 4 is mediated by the interaction of gp8 glycoprotein with heparinlike moieties on the cell surface. *Virology*, 1993, **196**, 232-240.
- VANDERPLASSCHEN A., GOLTZ M., LYAKU J., BENARAF A.C., BUHK H.J., THIRY E., PASTORET P.-P. The replication *in vitro* of the gammaherpesvirus bovine herpesvirus 4 is restricted by its DNA synthesis dependence on the S phase of the cell cycle. *Virology*, 1995, **213**, 328-340.
- VANDERPLASSCHEN A., MARKINE-GORIAYNOFF N., LOMONTE P., SUZUKI M., HIRAOKA N., YEH J.C., BUREAU F., WILLEMS L., THIRY E., FUKUDA M., PASTORET P.-P. A multipotential beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase is encoded by bovine herpesvirus type 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 5756-5761.
- VIRGIN H.W., LATREILLE P., WAMSLEY P., HALLSWORTH K., WECK K.E., DAL CANTO A.J., SPECK S.H. Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *J. Virol.*, 1997, **71**, 5894-5904.
- WANG G.H., BERTIN J., WANG Y., MARTIN D.A., WANG J., TOMASELLI K.J., ARMSTRONG R.C., COHEN J.I. Bovine herpesvirus 4 BORFE2 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis and contains death effector domains shared with other gamma-2 herpesviruses. *J. Virol.*, 1997, **71**, 8928-8932.



- WECK K.E., KIM S.S., VIRGIN H.I., SPECK S.H. Macrophages are the major reservoir of latent murine gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells. *J. Virol.*, 1999, **73**, 3273-3283.
- WELLEMANS G., ANTOINE H., BROES A., CHARLIER G., VAN OPDENBOSCH E. Isolement d'un virus Herpès chez des bovins atteints de métrite post-partum. *Ann. Méd. Vét.*, 1983, **127**, 481-482.
- WELLEMANS G. Symptomatologie variée apparaissant lors des métrites chroniques associées à un virus herpès chez les bovins. *Ann. Méd. Vét.*, 1984, **128**, 614-615.
- WELLEMANS G., VAN OPDENBOSCH E., MAMMERICKX M. Experimental inoculation of bovine herpesvirus 4 (strain LVR 140) in pregnant and nonpregnant cows. *Ann. Rech. Vet.*, 1986, **17**, 89-94.
- WELLEMANS G., VAN OPDENBOSCH E. Transmission horizontale du virus BHV-4 à des génisses. *Ann. Méd. Vét.*, 1987, **121**, 487-491.
- WELLEMANS G., VAN OPDENBOSCH E. Association entre l'infection par le BHV-4 et l'avortement chez la vache. *Ann. Méd. Vét.*, 1989, **133**, 347-350.
- WELLENBERG G.J., VAN ROOIJ E.M., MAISSAN J., VAN OIRSCHOT J.T. Evaluation of newly developed immunoperoxidase monolayer assays for detection of antibodies against bovine herpesvirus 4. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1999, **6**, 447-451.
- WELLENBERG G.J., VAN DER POEL W.H.M., VAN DER VORST T.J.K., VAN VALKENGOED P.H.R., SCHUKKEN Y.H., WAGENAAR F., VAN OIRSCHOT J.T. Bovine herpesvirus 4 in bovine clinical mastitis. *Vet. Rec.*, 2000, **147**, 222-225.
- WELLENBERG G.J., VERSTRATEN E.R., BELAK S., VERSCHUREN S.B., RIJSEWIJK F.A., PESHEV R., VAN OIRSCHOT J.T. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. *J. Virol. Methods*, 2001, **97**, 101-112.
- WELLENBERG G.J. Bovine herpesvirus 4 infections and bovine mastitis (Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur en *Sciences Vétérinaire*). University of Utrecht : Lelystad, 2002, 187 p.
- WELLENBERG G.J., BRUSCHKE C.J., WISSELINK H.J., BARKEMA H.W., VAN OIRSCHOT J.T. Simultaneous intramammary and intranasal inoculation of lactating cows with bovine herpesvirus 4 induce subclinical mastitis. *Vet. Microbiol.*, 2002a, **86**, 115-129.
- WELLENBERG G.J., VAN DER POEL W.H., VAN OIRSCHOT J.T. Viral infections and bovine mastitis : a review. *Vet. Microbiol.*, 2002b, **88**, 27-45.
- WOLDEMESKEL M., KEBEDE E., YIGEZU L., POTGIETER L.N. Prevalence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine herpesvirus-4 (BHV-4) in cattle from Ethiopia. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 2000, **107**, 464-466.
- YAMAMOTO Y., MURAKAMI K., INOSHIMA Y., NAKANE T., SAIKA K., SENTSUI H. Characterization of a bovine herpesvirus type 4 isolated from the spinal cord of a cow with astasia. *Arch. Virol.*, 2000, **145**, 2363-2370.
- YATES J., WARREN N., REISMAN D., SUGDEN B. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 3806-3810.
- ZHANG L., VAN SANTEN V.L. Interaction of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) immediate early 2 gene product with BHV-4 thymidine kinase promoter-regulatory region. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**, 2433-2445.
- ZIMMERMANN W., BROLL H., EHLERS B., BUHK H.J., ROSENTHAL A., GOLTZ M. Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine *Rhadinovirus*, and identification of an origin of DNA replication. *J. Virol.*, 2001, **75**, 1186-1194.