

Etude de la stabilité antigénique d'une souche non cytopathogène de virus BVD chez des animaux infectés expérimentalement de manière persistante

B. MIGNON*, A. SCHWERS**, S. WAXWEILER*, D. BOULANGER*¹, J. DUBUISSON*², J. BROWNLIE***, P.P. PASTORET*

* Service de Virologie, Immunologie et Pathologie des Maladies virales, Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège, Institut de Chimie (B6), Local R80 SART TILMAN B-4000 LIEGE, Belgique.

** Service de Génétique Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège, rue des Vétérinaires 45, 1070 BRUXELLES

*** AFRC Institute for Animal Disease Research Compton, Newbury, Berkshire RG16 ONN, UK

¹ D. BOULANGER est boursière IRSIA

² J. DUBUISSON est aspirant du FNRS

Travail subventionné par l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.).

INTRODUCTION

Le pestivirus BVD/MD (ou BVDV), responsable de la diarrhée virale bovine (BVD) et de la maladie des muqueuses (MD) est un virus enveloppé à ARN monocaténaire de polarité positive appartenant au genre Pestivirus (COLLETT *et al.*, 1989; BOULANGER *et al.*, 1990). Il s'agit d'un agent pathogène majeur pour le bétail (PASTORET *et al.*, 1986) qui représente un enjeu économique de première importance (PASTORET *et al.*, 1989).

Lors de l'infection d'une femelle gestante sensible par une souche de virus BVD/MD non cytopathogène, une virémie transitoire s'installe permettant la contamination du fœtus

(transmission épigénétique). Le devenir de celui-ci dépend de la pathogénicité de la souche virale et du stade de la gestation. Avant que le fœtus ne soit immunocompétent, aux alentours du 120^e jour, l'infection peut donner lieu à la naissance de veaux infectés de manière persistante (BROWNLIE *et al.*, 1984; McCLURKIN *et al.*, 1984) spécifiquement immunotolérants vis-à-vis de la souche non cytopathogène qu'ils hébergent (BROWNLIE *et al.*, 1987). Ces veaux apparemment sains excrètent continuellement le virus à de hauts titres et contaminent le reste du troupeau de façon silencieuse; de plus, lors de surinfection par une souche cytopathogène antigéniquement identique, ils peuvent

RESUME

Quatre fœtus ont été inoculés *in utero* au 78^e jour de gestation au moyen d'une souche de BVDV non cytopathogène en vue d'obtenir des veaux virémiques persistants et d'étudier chez eux, à partir de prélèvements de la fraction mononucléée des leucocytes sanguins (buffy coat), la stabilité antigénique de cette souche virale, à l'aide d'un test d'immunofluorescence indirecte utilisant seize anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine de 48 kilodaltons (kd) et cinq anticorps monoclonaux reconnaissant la protéine fonctionnelle de 80 kd.

Dès la naissance et ultérieurement, du virus a été isolé à partir du buffy coat et des sécrétions nasales chez trois veaux dépourvus d'anticorps neutralisant le BVDV, ce qui indique qu'ils étaient infectés de manière persistante par le virus. Celui-ci a montré une grande stabilité antigénique durant les deux premières années de vie des trois veaux. La bonne conservation des épitopes de la protéine de 48 kd et de celle de 80 kd pourrait résulter d'une pression du système immunitaire limitant l'émergence des mutants, dont le rôle a été postulé dans l'apparition de la maladie des muqueuses.

succomber de maladie des muqueuses (BOLIN *et al.*, 1985b; BROWNLIE *et al.*, 1987; HOWARD *et al.*, 1987).

Afin d'éclaircir davantage les mécanismes pathogéniques de l'infection, plusieurs auteurs se sont attachés à comparer entre elles, selon des voies d'approche et des points de vue différents, les souches cytopathogènes et les souches non cytopathogènes de BVDV. Ainsi, DONIS et DUBOVI (1987) et POCOCH *et al.* (1987) ont montré que seul le biotype cytopathogène induit la synthèse d'une protéine fonctionnelle de 80 kd, alors que son précurseur de 120 kd est présent chez les deux biotypes. D'autre part, une grande similitude antigénique entre les 2 biotypes d'une même souche virale isolée de plusieurs cas de maladie des muqueuses a été mise en évidence grâce à l'utilisation de sérums polyclonaux (HOWARD *et al.*, 1987) ou d'anticorps monoclonaux dirigés contre les deux glycoprotéines majeures de 53 kd et 48 kd (CORAPI *et al.*, 1988). Ces constatations renforcent l'hypothèse de HOWARD *et al.*, (1987) selon laquelle la souche cytopathogène surinfectante pourrait provenir d'une mutation de la souche non cytopathogène hébergée par l'animal virémique persistant. Néanmoins, alors que la variabilité antigénique parmi les souches de BVDV est relativement grande (McCLURKIN *et al.*, 1984; BOLIN *et al.*, 1985a), elle apparaît peu importante au sein de différents isolats issus d'animaux atteints de maladie des muqueuses dans une même exploitation (CORAPI *et al.*, 1988). Il est dès lors apparu intéressant d'étudier la variabilité antigénique d'une souche particulière de virus BVD chez des animaux virémiques persistants dans des conditions expérimentales.

Dans cette expérience, l'obtention de veaux virémiques persistants a été tentée afin d'étudier chez eux, à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés à la fois contre une glycoprotéine de surface et une protéine fonctionnelle, la stabilité antigénique de la souche non cytopathogène utilisée pour leur inoculation.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Cinq génisses de race pie-noire, exemptes d'infection persistante par le virus BVD et possédant des anticorps envers ce virus ont été revaccinées contre le virus BVD (vaccin Rispoval®, Norden). Après contrôle gynécologique et synchronisation d'oestrus, les cinq génisses ont été inséminées.

Quatre foetus ont été inoculés *in utero* au 78^e jour de gestation à l'aide de la souche Pe 515. Le 5^e bovin a été utilisé comme témoin. La technique opératoire était la suivante : après laparotomie sur le flanc gauche, la suspension virale a été injectée dans la nuque du foetus repéré au travers de la paroi utérine; la plaie a été suturée au moyen d'un fil non résorbable qui a été retiré après une dizaine de jours.

Des prélèvements de sérum pour le dosage des anticorps anti BVDV et de la fraction mononucléée des leucocytes sanguins (buffy coat) pour la détection du virus BVD ont été effectués chez toutes les génisses, lors de la constitution du lot, régulièrement avant et après inoculation. Un fouiller rectal a permis de contrôler la gestation 2 mois après l'infection.

Tous les veaux ont reçu un à deux litres de colostrum maternel dans l'heure suivant la naissance, puis une seconde fois dans les douze heures suivantes. Les prélèvements suivant ont été réalisés immédiatement après la naissance (avant la première prise de colostrum), à intervalle de douze heures pendant trois jours puis une fois par semaine jusqu'à l'âge de trois mois : du sérum (pour le dosage des anticorps anti BVDV), du buffy coat, des matières fécales et un écouvillonnage nasal (pour l'isolement de BVDV).

Chez les veaux inoculés *in utero*, du buffy coat a été prélevé aux 10^e, 16^e, 19^e et 23^e mois après la naissance.

Virus et cellules

La souche de virus BVD Pe 515 non cytopathogène provenait de l'Institute for Animal Disease Research, Compton, Grande Bretagne). Ce virus a été cultivé sur cellules testiculaires et cellules MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) indemnes de BVDV, selon la technique décrite par WAXWEILER *et al.* (1989).

Anticorps monoclonaux

Seize anticorps monoclonaux produits contre la souche New York (virus BVD non cytopathogène) et cinq anticorps monoclonaux produits contre la souche Osloss (virus BVD cytopathogène) ont été utilisés (Tableau 1). Les hybridomes sélectionnés par un test d'immunofluorescence indirecte et clonés à trois reprises en agarose semi-solide ont été cultivés *in vitro* dans du milieu DMEM contenant 10 % de sérum de cheval. La production en masse des différents anticorps monoclonaux a été réalisée par récolte de surnageants de culture qui ont été ensuite précipités au sulfate d'am-

TABLEAU 1
Caractérisation des anticorps monoclonaux spécifiques du BVDV (BOULANGER *et al.*, soumis pour publication)

Anticorps monoclonal	Isotype	Protéine reconnue (en radio immunoprécipitation)
NY 1	IgG ₁	48 kd
NY 2	IgG ₁	48 kd
NY 3	IgG ₁	48 kd
NY 4	IgG ₁	48 kd
NY 5	IgG ₁	48 kd
NY 6	IgG ₁	48 kd
NY 7	IgG ₁	48 kd
NY 8	IgG ₁	48 kd
NY 9	IgG _{2a}	48 kd
NY 10	IgG ₁	48 kd
NY 11	IgG ₁	48 kd
NY 12	IgG ₁	48 kd
NY 13	IgG ₁	48 kd
NY 14	IgG ₁	48 kd
NY 15	IgG ₁	48 kd
NY 16	IgG ₁	48 kd
OS-c 1	IgG ₁	80 kd
OS-c 2	IgG ₁	80 kd
OS-c 3	IgG ₁	80 kd
OS-c 4	IgG ₁	80 kd
OS-c 5	IgG ₁	80 kd

monium à demi-saturation et ainsi concentrés vingt fois après avoir été redissouts dans du PBS (3 mM KCL, 1,5 mM KH₂PO₄, O, 14 M NaCl, 6,5 mM Na₂HPO₄ (2H₂O), pH 7,4).

Isolement de virus BVD

Le virus a été détecté dans le buffy coat, selon la méthode décrite par WAXWEILER *et al.* (1989). Brièvement, le prélèvement est inoculé sur une culture cellulaire sensible et passé à deux reprises

sur le même type cellulaire pour amplifier la population virale; la présence de virus est révélée par immunofluorescence indirecte en utilisant soit un sérum bovin dirigé contre la souche Pe 515 à la dilution 1/100, soit un anticorps monoclonal dirigé contre le virus BVD.

La procédure d'isolement du virus BVD est identique pour les écouvillons nasaux et les matières fécales; ce dernier prélèvement a subi au préalable une centrifugation (2.500 g, 30 minutes, 4° C) au terme de laquelle le surnageant a été filtré (Minisart 0,2 µm, Sartorius).

Séroneutralisation

Les tests de séroneutralisation ont été réalisés selon la technique décrite par WAXWEILER *et al.* (1989).

Immunofluorescence indirecte

Des cellules MDBK indemmes de contamination par du virus BVD ont été cultivées en plaques de 96 cupules à 37° C (atmosphère humide, 5 % de CO₂). Lorsque le tapis cellulaire était confluent, le milieu de culture (MEM, Minimal Essential Medium, supplémenté de 5 % de NBCS traité à la β-propiolactone) a été aspiré, le tapis rincé deux fois au MEM et inoculé par une suspension virale titrant au moins 500 TCID₅₀ par ml (50 µl par puits) contenant la souche Pe 515 (de départ ou réisolée des différents prélèvements de buffy coat après un ou deux passages sur cellules MDBK); des puits non inoculés ont servi de témoin. Après une heure d'adsorption, le milieu d'infection (MEM additionné de 2 % de HS) a été recouvert par du MEM (150 µl par puits) contenant 12,8 g/litre de carboxyméthylcellulose. Après 3 jours d'incubation à 37° C, les microplaques ont été lavées au PBS et fixées à l'acétone (95 % acétone/5 % eau) pendant 45 minutes à -20° C. Après séchage, les cellules fixées ont été incubées pendant 30 minutes à 37° C, en présence de deux dilutions (1/1 et 1/10) de chacun des 21 anticorps monoclonaux précipités au sulfate ammonique. Les microplaques ont été lavées quatre fois à l'aide de PBS et incubées comme précédemment avec un sérum de lapin anti-immunoglobulines bovines couplé à de l'isothiocyanate de fluorescéine (Dakopatts, Glostrup, Danemark). Les microplaques ont à nouveau été lavées à quatre reprises puis une dernière fois à l'aide d'eau distillée. La réactivité des différents anticorps monoclonaux contre les

différents prélèvements de buffy coat a été évaluée par lecture au microscope à fluorescence.

RESULTATS

Obtention d'animaux infectés de manière persistante par le virus BVD

Parmi les cinq génisses, trois demeureraient gestantes lors du contrôle effectué deux mois après l'infection. L'animal témoin - qui portait des foetus jumeaux et a avorté entre-temps - et une génisse infectée ont donc été réinséminés. L'un d'entre eux a de nouveau avorté en fin de gestation. Finalement, quatre veaux sont nés dont trois inoculés *in utero* et un non inoculé, témoin non contemporain des trois précédents.

A la naissance, les trois veaux inoculés *in utero* étaient virémiques et dépourvus d'anticorps anti BVDV; le veau non inoculé était exempt d'infection persistante et sans anticorps anti BVDV. Chez les quatre veaux, les taux d'anticorps circulants anti BVDV étaient supérieurs à 1/256 en neutralisation douze heures après la première prise de colostrum. Chez les veaux virémiques, ils ont diminué significativement une à deux semaines après la naissance pour devenir quasi nuls vers l'âge de cinq semaines, tandis que chez le veau témoin ils sont restés supérieurs à 1/256 après six semaines. Du virus BVD non cytopathogène a pu être réisolé du buffy coat et des sécrétions nasales des trois veaux infectés de manière persistante, immédiatement après la naissance et au cours des 72 heures suivantes (malgré la présence d'anticorps circulants anti BVDV d'origine colostrale). Ensuite, la virémie est devenue temporairement indétectable. Aucun virus BVD n'a été isolé des matières fécales. Les examens virologiques sont demeurés négatifs chez le veau témoin.

Etude de la stabilité antigénique de la souche Pe 515 chez les animaux infectés de manière persistante à l'aide d'anticorps monoclonaux

L'ensemble des 21 anticorps monoclonaux testés en immunofluores-

cence indirecte contre la souche Pe 515 non cytopathogène de départ a reconnu cette souche, ainsi que le virus réisolé du buffy coat des trois veaux virémiques à différents intervalles de temps couvrant une période d'environ deux ans après leur naissance (tableau 2).

TABLEAU 2
Spectre de réactivité des 21 anticorps monoclonaux contre des isolats séquentiels de la souche Pe 515 non cytopathogène

Prélèvements	veaux virémiques persistants		
	veau 1	veau 2	veau 3
MOIS 10	+	+	+
MOIS 16	N.T.	+	+
MOIS 19	+	+	+
MOIS 23	+	+	+

N.T. : non testé

DISCUSSION

Des animaux infectés de manière persistante par une souche non cytopathogène de virus BVD ont été obtenus par inoculation *in utero* au 78^e jour de gestation. La souche infectante a montré une grande stabilité antigénique durant les 2 premières années de vie des animaux testés.

Trois génisses, dont les foetus ont été inoculés au 78^e jour de gestation, ont donné naissance chacune à un veau cliniquement sain. Cependant, à la naissance et ultérieurement, du virus BVD non cytopathogène a été isolé des leucocytes sanguins chez les trois veaux par ailleurs dépourvus d'anticorps neutralisant le BVDV. Cette situation, caractéristique d'un animal virémique persistant et immunotolérant envers la souche qu'il héberge (WAXWEILER *et al.*, 1989), a également été obtenue par McClurkin *et al.* (1984) à l'aide d'une autre souche (7443) non cytopathogène.

Ces auteurs signalent néanmoins la naissance d'un veau normal duquel aucun virus BVD n'a pu être isolé et séropositif envers ce même virus dès la naissance, ce résultat pourrait être dû au fait que le foetus était immunocompétent au moment de son inoculation (au 125^e jour de gestation).

Les anticorps colostraux spécifiques du BVDV ont bien été résorbés chez les trois veaux infectés persistants ainsi que chez le veau témoin comme en témoignent les taux d'anticorps circulants anti BVDV supérieurs à 1/256 en neutralisation douze heures après la première prise de colostrum. Cependant, alors que chez le veau témoin cette immunité passive maternelle s'est maintenue au-delà de six semaines, chez les trois veaux infectés persistants, le taux d'anticorps colostraux anti BVDV a chuté vers l'âge de deux semaines et est devenu quasi nul après cinq semaines; il est possible que chez les animaux virémiques persistants, les anticorps circulants d'origine maternelle soient captés par le virus et ensuite éliminés sous forme d'immun-complexes, ce qui par ailleurs expliquerait l'impossibilité temporaire de réisoler du virus BVD dans le buffy coat à partir de 72 heures après la naissance. C'est à cause de cette interférence possible entre les anticorps d'origine colostrale et le virus que WAXWEILER *et al.* (1989) entament le diagnostic de l'infection persistante après l'âge de six mois. L'isolement de virus BVD non cytopathogène à partir du buffy coat mais aussi des sécrétions nasales indique que le virus emprunte une phase de virémie avant de coloniser la plupart des organes à partir desquels le biotype non cytopathogène peut être isolé (CLARKE *et al.*, 1987; BIELEFELDT OHMANN *et al.*, 1987), même si, dans notre expérience, aucun virus BVD n'a pu être isolé des matières fécales.

L'utilisation, dans un test d'immunofluorescence indirecte, d'un ensemble de 21 anticorps monoclonaux a démontré une très grande stabilité antigénique de la souche Pe 515 non cytopathogène chez les trois veaux infectés persistants par cette souche et durant une période de presque deux années. Ce résultat corrobore les observations de CORAPI *et al.* (1988) qui notent un manque de variabilité antigénique parmi différents isolats biologiques d'une même souche virale chez des animaux localisés dans une même ferme. Ces auteurs, cependant, n'avaient à leur disposition que des anticorps monoclonaux dirigés contre des glycopro-

téines du virus BVD. Dans cette expérience-ci, seize anticorps dirigés contre la glycoprotéine de 48 kd et cinq anticorps dirigés contre la protéine non structurale de 80 kd et son précurseur de 120 kd ont été utilisés. Ces anticorps testés en immunofluorescence indirecte sur différentes souches de virus BVD (BOULANGER *et al.*, 1990) ont tous montré un profil de réactivité différent, ce qui suggère qu'ils sont dirigés contre des épitopes différents sur les protéines respectives de 48 kd et 80 kd. Les cinq anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de 80 kd et son précurseur 120 kd ont permis de constater la bonne conservation des épitopes de ces protéines qui sont directement incriminées dans la pathogénèse de la maladie des muqueuses. En effet, seuls les animaux infectés de manière persistante par une souche non cytopathogène de virus BVD envers laquelle ils sont spécifiquement immunotolérants constituent d'éventuels candidats à la maladie des muqueuses typique; différentes hypothèses pour expliquer l'apparition de cette dernière ont été émises.

Ainsi HOWARD *et al.* (1987) ont postulé que la souche cytopathogène réisolée de l'animal atteint de maladie des muqueuses pourrait provenir, par mutation, de la souche non cytopathogène persistante qui ne diffère de la première que par l'absence d'une protéine structurale de 80 kd (DONIS et DUBOVI, 1987). La très grande similitude antigénique entre les deux biotypes issus d'un même animal (HOWARD *et al.*, 1987; CORAPI *et al.*, 1988) s'accorde également avec cette hypothèse. Néanmoins, le changement de biotype reste *in vivo* un événement rare (DONIS et DUBOVI, 1987), alors que le taux de mutation des virus à ARN est théoriquement élevé. L'émergence de mutants pourrait donc être freinée par une pression du système immunitaire telle que les épitopes majeurs du virus soient conservés, aussi bien ceux des glycoprotéines d'enveloppe que ceux des protéines non structurales. En conclusion, puisqu'il existe une modification, qui pourrait être une mutation (HOWARD *et al.*, 1987) ou une recombinaison (MEYERS *et al.*, 1989) de la protéine

de 120 kd induisant l'apparition du biotype cytopathogène, il serait intéressant d'étudier la variabilité antigénique de cette protéine au sein de couples cytopathogène - non cytopathogène afin de localiser le ou les endroits de modification qui conduisent au clivage de ce précurseur et à l'apparition, chez le biotype cytopathogène, de la protéine de 80 kd.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Docteur Etienne THIRY pour ses conseils, Lucie KARELLE et Maria LONCAR pour leur précieuse collaboration technique, ainsi que Liliane KASPRZAK pour le travail dactylographique.

SUMMARY

Study of the antigenic stability of a non-cytopathic BVD virus strain in experimentally persistently infected heifers

Four fetuses were inoculated *in utero* at day 78 of gestation with a non cytopathic BVDV strain (Pe 515) to obtain persistently BVDV infected calves. The antigenic stability of the BVDV strain was investigated by indirect immunofluorescence using the virus isolated from the buffy coat of the infected calves as antigen. Sixteen monoclonal antibodies directed against the 48 kilodalton (K) glycoprotein and five monoclonal antibodies raised against the non structural 80 K protein were used in this study.

At various times after birth, virus was isolated from the buffy coat and nasal secretions of three BVDV seronegative calves, indicating that they were persistently infected with the BVDV. The virus was antigenically stable during the first two years of life of the animals. The lack of observed epitope variation of the 48 K and 80 K proteins could be the result of an immune pressure that limit the emergence of mutants, the role of which has been proposed for causing mucosal disease.

BIBLIOGRAPHIE

- BIELEFELDT OHMANN H., RONSHOLT L. and BLOCH B. Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J. gen. Virol.*, 1987, **68**, 1971-1982.
- BOLIN S.R., McCLURKIN A.W., CUTLIP R.C., CORIA M.F. Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 1985a, **46**, 2467-2470.
- BOLIN S.R., McCLURKIN A.W., CUTLIP R.C., CORIA M.F. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 1985b, **46**, 573-576.
- BOULANGER D., MIGNON B., WAXWEILER S., KARELLE-BUI THI L., LONCAR M., DUBUISSON J., KOROMYSLOV I., THIRY E., PASTORET P.P. Nouveautés sur le pestivirus BVD/MD, et sur l'infection asymptomatique qu'il provoque chez les bovins. *Ann. Méd. Vét.*, 1989, sous presse.
- BOULANGER D., WAXWEILER S., KARELLE L., LONCAR M., MIGNON B., DUBUISSON J., THIRY E., PASTORET P.P. Neutralizing monoclonal antibodies to the 48 kd protein of bovine viral diarrhoea virus do not block virus attachment but a step subsequent to adsorption. Soumis pour publication.
- BROWNLIE J., CLARKE M.C., HOWARD C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.*, 1984, **114**, 535-536.
- BROWNLIE J., CLARKE M.C., HOWARD C.J., POCOCK D.H. Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vét.*, 1987, **18**, 157-166 (numéro spécial : meeting on Pestivirus, 8th april 1986, Liège).
In : Agriculture, Pestivirus infections of ruminants. Ed. by J.W. HARKNESS. Commission of the European Communities, 3-10, 1987.
- COLLETT M.S., MOENNIG V. and HORZINEK M.C. Recent advances in pestivirus research. *J. Gen. Virol.*, **70**, 253-266, 1989.
- CORAPI W.V., DONIS R.O. and DUBOVI E.J. Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. *J. Virol.*, 1988, **62**, 2823-2827.
- DONIS R.O. and dubovi E.J. Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology*, 1987, **158**, 168-173.
- HOWARD C.J., BROWNLIE J., CLARKE M.C. Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Vet. Microbiol.*, 1987, **13**, 361-369.
- McCLURKIN A.W., LITLEDIKE E.T., CUTLIP R.C., FRANK G.H., CORIA M.F., BOLIN S.R. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Comp. Med.*, 1984, **48**, 156-161.
- MEYERS G., RUMENAPF T., THIEL H.J. Ubiquitine in a togavirus. *Nature*, 1989b, **341**, 491.
- PASTORET P.P., THIRY E., SCHWERS A., DUBUISSON J. Epidémiologie et physiopathologie de l'infection par le virus BVD. *In* : Pestiviroses des ovins et des bovins : nouvelles connaissances, utilisation comme stratégie de contrôle, 1986, 87-104.
- PASTORET P.P., DETAL G., DIVE M., MAXWEILER S., THIRY E., WELLEMAN G., MARCOURT J., MAGONET P., DERNELLE E. Mesure à prendre au centre de sélection bovine de Ciney en vue de répondre aux nouvelles normes sanitaires imposées par la Commission des Communautés européennes. *Ann. Méd. Vét.*, 1989, **133**, 247-256.
- POCOCK D.H., HOWARD C.J., CLARKE M.C. and BROWNLIE J. Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine virus diarrhoea virus. *Arch. Virol.*, 1987, **94**, 43-53.
- WAXWEILER S., KARELLE-BUI THI L., SNEYERS M., LAMBERT A.F., DELCHAMBRE M., DUBUISSON J., THIRY E., ANTOINE H., DIVE M., DETAL G., PASTORET P.P. Circulation de souches non-cytopathogènes du virus BVD/MD dans des lots de taurillons. *Ann. Méd. Vét.*, 1989, **133**, 681-690.