

Données récentes sur la biologie moléculaire du pestivirus responsable de la maladie des muqueuses (BVD/MD)

D. Boulanger, B. Mignon, S. Waxweiler, P.-P. Pastoret

Service de Virologie-Immunologie,
Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège,
Institut de chimie, Bât. B6, R80,
Sart Tilman, 4000 Liège.

Manuscrit déposé le 12/12/1991.

INTRODUCTION

Le genre pestivirus regroupe 3 virus connus depuis de nombreuses années : le virus de la peste porcine classique, Hog Cholera Virus (HCV) dont l'infection avait déjà été décrite au 19^e siècle, le virus responsable de la diarrhée virale bovine (BVDV) et de la maladie des muqueuses, infections décrites respectivement par OLAFSON *et al.* en 1946 et RAMSEY et CHIVERS en 1953, et le virus de la maladie des frontières, Border Disease Virus (BDV), chez le mouton, décrite quelques années plus tard (HUGHES *et al.*, 1959). Deux biotypes du BVDV (cytopathogène et non cytopathogène), distinguables en culture cellulaire, ont été isolés chez les bovins atteints de maladie des muqueuses alors que les animaux infectés de manière persistante n'hébergent que le biotype non cytopathogène (BROWNLIE *et al.*, 1984).

L'historique, ainsi que la pathogénie et l'épidémiologie de ces infections ont déjà fait l'objet de plusieurs publications récentes (MOENNIG, 1990; BROWNLIE, 1990; BOULANGER *et al.*, 1990). Cet article sera donc consacré essentiellement à une synthèse des connaissances de la biologie moléculaire de ces virus. En effet, depuis que les techniques de l'ingénierie génétique ont été appliquées à l'étude des pestivirus, des progrès très rapides ont été réalisés dans ce domaine.

TAXONOMIE

Les pestivirus, virus enveloppés à ARN monocaténaire infectieux, de polarité positive, classés auparavant dans la famille des *Togaviridae* (WESTAWAY, *et al.*, 1985a), s'en distinguent par l'absence d'ARN subgénomique et d'une queue polyadénylée à leur extrémité 3' (PURCHIO *et al.*, 1983; RENARD

RESUME

Cet article de synthèse regroupe les données récentes concernant la taxonomie, l'organisation génomique, la stratégie d'expression et une description des protéines des pestivirus, ainsi que les différentes hypothèses avancées afin d'expliquer le déclenchement de la maladie des muqueuses chez les bovins.

et al., 1985) ainsi que par leur organisation génomique décrite ci-dessous (COLLETT *et al.*, 1988c). Ces différences fondamentales ont poussé le comité international de taxonomie des virus à reclasser le genre pestivirus dans la famille des *Flaviviridae* créée en 1985 (WESTAWAY, *et al.*, 1985b) et qui, jusqu'à présent, ne comprenait qu'un seul genre viral, les flavivirus (HORIZINEK, 1991).

ORGANISATION GENOMIQUE ET STRATEGIE D'EXPRESSION

Le génome de 2 souches de BVDV (OSLOSS cytopathogène : RENARD *et al.*, 1987 et NADL : COLLETT *et al.*, 1988c) et de 2 souches de HCV (Alfort : MEYERS *et al.*, 1989a et Brescia : MOORMANN *et al.*, 1990) ont été clonés et séquencés. Chez ces 2 espèces virales; une seule phase de lecture ouverte couvrant pratiquement toute la longueur du RNA (12 à 13 kb) et pou-

vant coder pour environ 450kD en protéines a été mise en évidence (COLLETT *et al.*, 1988c; MEYERS *et al.*, 1989a; MOORMANN *et al.*, 1990). Deux courtes phases de lecture ouvertes ont également été décrites chez la souche bovine NADL en amont de la longue phase de lecture ouverte, mais elles ne semblent pas être fonctionnelles (WISKER-CHEN *et al.*, 1991; COLLETT *et al.*, 1988c). L'étude de l'organisation génomique du BVDV (COLLETT *et al.*, 1988b et 1991) suggère que, comme chez les flavivirus, les protéines de structure sont codées par le premier tiers du génome à l'extrémité 5', tandis que les protéines non structurales sont codées par les 2/3 restants.

Grâce à l'utilisation de sérums dirigés contre des protéines de fusion produites chez *E. Coli*, COLLETT *et al.*, (1988b) avaient établi une carte génomique préliminaire du BVDV comprenant cependant 2 régions codant pour des polypeptides non identifiés (Fig. 1A). Afin de compléter cette carte, ces mêmes auteurs ont ensuite produit des sérums dirigés contre des peptides synthétiques correspondant à des séquences critiques de 15 à 20 acides aminés et ont proposé une représentation schématique plus complète de l'organisation génomique du BVDV (Fig. 1B) (COLLETT *et al.*, 1991).

Les différentes protéines virales seraient produites suite à une série de clivages réalisés par des protéases d'origine virale ou cellulaire. Selon ces auteurs, lors de la traduction, la polyprotéine serait tout d'abord clivée en 2 protéines stables (p20 et p125) et 2 précurseurs Prgp140 (précurseur des glycoprotéines) et Prp175 qui subiraient ensuite plusieurs clivages successifs pour donner les protéines virales mûres.

La première protéine virale produite par l'extrémité 5' du génome serait une protéine non glycosylée de 20 kD (p20) de stabilité médiocre (1/2 vie d'environ 110 min) (COLLETT *et al.*, 1988b). La deuxième protéine produite, Prgp140, serait le précurseur des glycoprotéines virales et serait rapidement transformé en un autre précurseur

(Prgp116) lui-même clivé en gp53, protéine majeure de l'enveloppe virale et Prp78 donnant, après clivage de son extrémité N terminale, la gp62, précurseur des 2 autres glycoprotéines virales gp48 et gp25. Les 2/3 restants du génome coderaient pour des protéines non structurales dont la première, p125, présente la particularité d'être clivée uniquement chez le biotype cytopathogène en p54 et p80. Cette région a été repositionnée par COLLETT *et al.*, (1991) directement après les gènes codant pour les glycoprotéines (Fig. 1B), alors que dans le premier schéma présenté par ces mêmes auteurs (COLLETT *et al.*, 1988b), une région fortement hydrophobe (30kD) séparait les gènes codant pour la gp53 et la p54 (Fig. 1A).

Le dernier précurseur synthétisé lors de la traduction, Prp175, subirait 2 types de clivage à son extrémité N terminale : une protéine de 10 kD serait libérée ainsi qu'un pré-

curseur de 165kD (Prp165) lui-même clivé en une protéine d'environ 32kD, non encore mise en évidence et un précurseur de 133kD pouvant aussi résulter d'un clivage de la Prp165 avec formation également d'une protéine p42 de 1/2 vie très courte et donnant la protéine de 10 kD et l'hypothétique protéine de 32kD. Le précurseur p133 a lui aussi une courte 1/2 vie et est clivé en 2 protéines matures p58 et p75 (Fig. 1B).

AKKINA (1991), utilisant les mêmes réactifs que l'équipe précédente propose cependant une carte génomique légèrement différente (Fig. 1C). Selon ce schéma, la protéine p130 (équivalente à la p125 de COLLETT) aurait un précurseur p175 dont l'extrémité N terminale couvrirait la région de 30 kD décrite initialement par COLLETT *et al.* (1988b) et pour laquelle aucune protéine n'avait pu être mise en évidence. AKKINA décrit également 2 types de clivage du dernier précur-

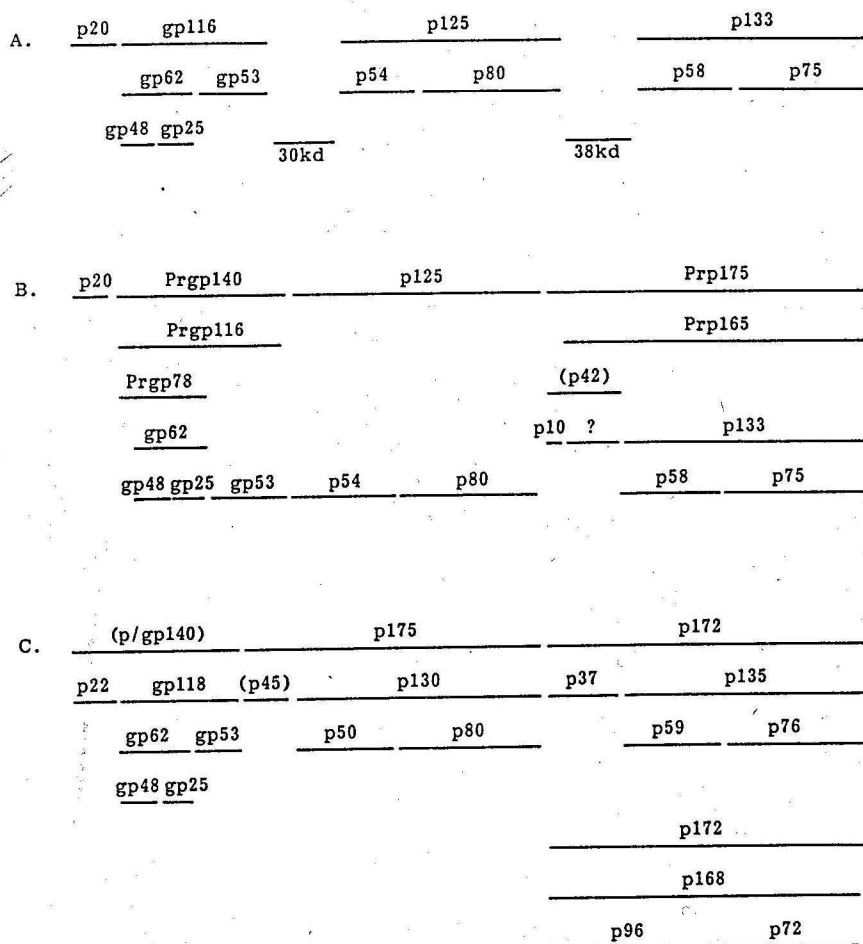


Figure 1

Organisation génomique du BVDV

A. d'après COLLETT *et al.*, 1988b; B. d'après COLLETT *et al.*, 1991; C. d'après AKKINA, 1991.

seur: le premier, identique à celui proposé par COLLETT *et al.* (1991), cliverait le précurseur p172 en p37 et p135, clivée elle-même en p59 et p76. Le deuxième mécanisme conduirait à l'obtention d'une p96 couvrant les régions codant pour la p37 et la p59 et d'une p72 correspondant à la p76 dont l'extrémité C terminale aurait été légèrement raccourcie (Fig. 1C).

PROTEINES VIRALES

Un grand nombre des protéines virales et des précurseurs mis en évidence par COLLETT *et al.* (1991) et AKKINA (1991) ont pu être identifiés en culture cellulaire, soit directement, par électrophorèse des protéines virales marquées radioactivement, produites lors d'un choc hypertonique inhibant l'initiation de la traduction des protéines cellulaires (DONIS et DUBOVI, 1987a et b; DONIS *et al.*, 1991), soit indirectement, par radioimmunoprécipitations réalisées à l'aide de sérums polyclonaux ou d'anticorps monoclonaux. Certaines de ces protéines virales ont été caractérisées et leurs fonctions ont été étudiées directement ou suggérées par comparaison avec des protéines de séquence et de fonction connues, plus particulièrement les protéines des flavivirus:

-p20:

Selon COLLETT *et al.* (1988b), l'extrémité 5' du génome coderait pour une protéine non glycosylée de 20kD. Cette région correspond, chez les flavivirus, à celle codant pour la protéine de capsid et le précurseur de la protéine de matrice (COLLETT *et al.*, 1988a). L'hypothèse selon laquelle la p20 serait la protéine de nucléocapsid des pestivirus a donc été suggérée (COLLETT *et al.*, 1988a). Une étude plus approfondie de cette protéine a montré que, tout comme la protéine de capsid des alphavirus (*Togaviridae*), elle possédait une activité d'autoprotéase responsable du clivage entre son extrémité C terminale et le précurseur des glycoprotéines. Grâce à des expériences de mutation dirigée, l'emplacement du site catalytique et du site du clivage ont été proposés (WISKERCHEN

et al., 1991). Cependant, selon THIEL *et al.* (1991), cette protéine serait absente dans les particules virales et serait donc essentiellement une protéine non structurale. Par contre, ces mêmes auteurs ont mis en évidence dans les virions une protéine p14 qui serait codée par une courte séquence en aval de la p20 et qui correspondrait à la protéine de capsid.

-glycoprotéines virales:

Outre la protéine de capsid, les virions seraient constitués de trois glycoprotéines d'enveloppe (THIEL *et al.*, 1991): une gp48 (ou gp44/48 chez HCV), une gp25 (gp33 chez HCV) montrant un caractère fortement hydrophobe ce qui suggère une localisation transmembranaire, et une gp53 (gp55 chez HCV) couplée à la gp25 par des liaisons disulfures (WEILAND *et al.*, 1990). De telles liaisons ont également été démontrées chez HCV formant des hétérodimères gp33-gp55 et des homodimères gp55 et gp44/48 (RUMENAPF *et al.*, 1991).

La gp53 semble jouer un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire du bovin puisqu'elle est la cible d'anticorps monoclonaux neutralisants (MAGAR *et al.*, 1988; BOLIN *et al.*, 1988; DONIS *et al.*, 1988; WEILAND *et al.*, 1989). De plus, des souris immunisées à l'aide de virus recombinant de la vaccine contenant un fragment du gène de la gp53 ont produit des anticorps neutralisants spécifiques du BVDV (DUBOVI *et al.*, 1987). Les mêmes résultats ont été obtenus chez la souris et le porc immunisés à l'aide d'un virus recombinant de la vaccine contenant les gènes de toutes les protéines de structure du HCV (RUMENAPF *et al.*, 1991). La fonction de la gp53, ainsi que celle de la gp48, n'est cependant pas encore élucidée. La gp48 ne semble pas jouer un rôle déterminant dans la neutralisation virale, puisque peu d'anticorps monoclonaux anti-gp48 neutralisants ont été décrits (XUE *et al.*, 1990; BOULANGER *et al.*, 1991) et que leur titre neutralisant est généralement assez faible. Cette protéine pourrait cependant intervenir dans d'autres mécanismes mis en oeuvre par le système immuni-

taire de l'animal. En effet, une immunisation des porcs à l'aide de virus recombinant contenant les gènes des protéines de structure à l'exclusion de l'équivalent de la gp53, entraîne une protection de l'animal sans détection d'anticorps neutralisants (RUMENAPF *et al.*, 1991).

-p54:

La protéine p54 contient une séquence riche en Cys similaire aux séquences des protéines en doigt de Zn pouvant interagir avec les acides nucléiques (DE MOERLOOZE *et al.*, 1990). De plus, la comparaison de plusieurs souches de pestivirus a mis en évidence la présence, chez certaines souches cytopathogènes de BVDV, d'insertions de gènes cellulaires localisées dans la région codant pour l'extrémité C terminale de la p54 et se traduisant par une modification du poids moléculaire de cette protéine et de ses précurseurs (AKKINA, 1991). Chez la souche NADL, la séquence insérée correspond au gène d'une protéine cellulaire non identifiée (MEYERS *et al.*, 1989a et b), tandis que chez la souche OSc, l'insert code pour un monomère d'ubiquitine animale (MEYERS *et al.*, 1989b; BROWNLIE, 1990). MEYERS *et al.* (1991) décrivent également, chez une souche cytopathogène isolée d'un animal atteint de maladie des muqueuses, l'insertion d'une séquence correspondant à un monomère complet d'ubiquitine, un fragment d'un second monomère et une duplication de la séquence virale codant pour la p80. La p125 codée en amont de l'insertion ne serait pas clivée et la p54 ne serait donc pas exprimée par cette souche. D'autres souches virales cytopathogènes ne semblent cependant pas contenir de telles insertions (DE MOERLOOZE *et al.*, 1990).

-p80:

La protéine p80, ainsi que son précurseur p125, analogue à la protéine NS3 des flavivirus, posséderait comme cette dernière une activité hélicase localisée à l'extrémité C terminale et une activité de sérine protéase similaire à celle de la trypsine localisée à son extrémité N terminale (GORBALENYA *et al.*,

1989; BAZAN et FLETTERICK, 1989). Deux segments homologues en acides aminés ont été démontrés au niveau du gène qui coderait pour l'hélicase des pestivirus, du virus de l'hépatite C et d'un virus de plantes (potyvirus) (MILLER et PURCELL, 1990; LAIN *et al.*, 1990).

WISKERCHEN et COLLETT (1991) ont démontré que l'activité protéolytique de la p80 est responsable du clivage entre les différentes protéines non structurales. Par mutation dirigée, ces mêmes auteurs ont également démontré le rôle déterminant pour cette activité protéolytique de la Ser 1842, dont l'appartenance au site catalytique avait déjà été soupçonnée par BAZAN et FLETTERICK (1989) et GORBALENYA *et al.* (1989).

-p75:

Cette protéine pourrait être l'ARN polymérase du BVDV, puisqu'une séquence Gly-Asp-Asp, commune à toutes les ARN polymérases ARN dépendantes virales étudiées, a été observée dans cette protéine. Cette séquence est d'ailleurs conservée également chez HCV et chez la protéine NS5 des flavivirus, analogue à la p75 des pestivirus (COLLETT *et al.*, 1988a).

DECLENCHEMENT DE LA MALADIE DES MUQUEUSES

Seuls les animaux infectés de manière persistante, suite à une transmission transplacentaire du biotype non cytopathogène, sont susceptibles de développer la maladie des muqueuses à issue toujours fatale. Le déclenchement de cette maladie est associé à l'apparition d'une souche cytopathogène antigéniquement identique à la souche non cytopathogène hébergée. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées sur l'origine de cette souche cytopathogène:

- une origine exogène: l'animal infecté de manière persistante serait surinfecté par la souche cytopathogène homologue à la souche non cy-

topathogène qu'il héberge et provenant d'un animal atteint de maladie des muqueuses. Une surinfection peut également avoir lieu suite à une vaccination à l'aide de virus atténué (PASTORET *et al.*, 1986);

- une origine endogène expliquant la genèse des souches cytopathogènes: CORAPI *et al.* (1988) ont montré à l'aide d'une gamme d'anticorps monoclonaux que les 2 biotypes d'une souche virale de BVDV isolée chez un animal atteint de maladie des muqueuses étaient antigéniquement semblables. Deux hypothèses ont alors été avancées. Selon la première, les souches cytopathogènes dériveraient des souches non cytopathogènes après mutation au niveau du site catalytique ou au niveau du site de clivage (BROWNLIE *et al.*, 1987). Une mutation au niveau du site catalytique est cependant peu probable, puisqu'il a été montré que l'activité protéolytique de la p80 est responsable du clivage de la plupart des protéines non structurales du BVDV (WISKERCHEN et COLLETT, 1991) et qu'un seul de ces clivages est altéré chez les souches cytopathogènes. La deuxième hypothèse, impliquant un phénomène original de recombinaison entre des séquences nucléotidiques cellulaires et le génome des souches non cytopathogènes, se base sur la mise en évidence d'insertions de séquences nucléotidiques cellulaires dans le gène de la p54 (voir plus haut) et qui seraient responsables du clivage de la p125 (MEYERS *et al.*, 1991). A l'heure actuelle, de telles insertions ont été décelées chez plusieurs souches cytopathogènes (MEYERS *et al.*, 1991), mais leur absence chez d'autres souches (DE MOERLOOZE *et al.*, 1990) indique que cette dernière hypothèse ne peut pas à elle seule expliquer l'apparition du biotype cytopathogène.

Comme les deux biotypes du BVDV se distinguent uniquement par le clivage de la p125 chez le biotype cytopathogène, l'apparition de la cytopathogénicité doit donc être liée à une ou des propriétés des protéines issues du clivage, distinctes de celle(s) du précurseur:

- le caractère cytopathogène pourrait par exemple être dû à la présence du domaine en doigt de Zn chez la p54, dont l'activité serait modifiée chez son précurseur en raison d'une conformation différente (DE MOERLOOZE *et al.*, 1990).

- la cytopathogénicité pourrait au contraire résulter de l'activité protéolytique de la p80. Or, cette protéine montre probablement une distribution intracellulaire différente chez les deux biotypes. En effet, elle est libre chez le biotype cytopathogène, tandis que chez le biotype non cytopathogène, elle est liée à la p54 qui possède une extrémité N terminale très hydrophobe, suggérant son association avec des membranes, ainsi qu'une séquence en doigt de Zn, suggérant son association avec des acides nucléiques (WISKERCHEN et COLLETT, 1991).

CONCLUSIONS

Malgré les progrès spectaculaires réalisés ces dernières années dans l'étude des pestivirus, les mêmes énigmes restent d'actualité: Combien de protéines sont codées par les pestivirus? Quelles sont leurs fonctions? Le déclenchement de la maladie des muqueuses, associée à l'apparition d'un biotype cytopathogène, peut-il s'expliquer par un seul mécanisme pour toutes les souches ou le clivage de la p125 résulte-t-il tantôt d'une mutation, tantôt d'un phénomène de recombinaison dont les conséquences varieraient d'une souche à l'autre? L'étude d'un plus grand nombre de génomes viraux serait donc nécessaire afin d'éclaircir les mécanismes présidant à l'apparition du biotype cytopathogène du virus BVD.

SUMMARY

Recent data regarding the molecular biology of the pestivirus responsible for mucosal disease (BVD-MD).

This synthesis groups recent data regarding taxonomy, genomic organization, expression strategy and a description of the viral proteins of pestiviruses as well as the different hypothesis to explain the starting of the mucosal disease in bovine.

BIBLIOGRAPHIE

- AKKINA R.K. Pestivirus bovine viral diarrhoea virus polypeptides: identification of new precursor proteins and alternative cleavage pathways. *Virus Res.*, 1991, **19**, 67-82.
- BAZAN J.F. and FLETTERICK R.J. Detection of a trypsin-like serine protease domain in Flaviviruses and Pestiviruses. *Virol.*, 1989, **171**, 637-639.
- BOLIN S., MOENNIG V., KELSO GOURLEY N.E. and RIDPATH J. Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups. *Arch. Virol.*, 1988, **99**, 117-123.
- 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.*, 1990, **134**, 137-144.
- BOULANGER D., WAXWEILER S., KARELLE L., LONCAR M., MIGNON B., DUBUISSON J., THIRY E. and PASTORET P.-P. Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum. *J. gen. Virol.*, 1991, **72**, 1195-1198.
- BROWNLIE J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, 1990, **23**, 371-382.
- BROWNLIE J., CLARKE M.C. and HOWARD C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.*, 1984, **114**, 535.
- BROWNLIE J., CLARKE M.C., HOWARD C.J. and 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).
- COLLETT M.S., ANDERSON D.K. and RETZEL E. Comparisons of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhoea Virus with members of the Flaviviridae. *J. gen. Virol.*, 1988a, **69**, 2637-2643.
- COLLETT M.S., LARSON R., BELZER S. and RETZEL E. Proteins encoded by Bovine Diarrhoea Virus: The genomic organization of a Pestivirus. *Virology*, 1988b, **165**, 200-208.
- COLLETT M.S., LARSON R., GOLD C., STRICK D., ANDERSON D.K. and PURCHIO A.F. Molecular cloning and nucleotide sequence of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Virology*, 1988c, **165**, 191-199.
- COLLETT M.S., WISKERCHEN M., WELNIAK E. and BELZER S.K. Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch. virol.*, 1991, **Suppl. 3**, 19-27.
- 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.
- DE MOERLOOZE L., DESPORT M., RENARD A., LECOMTE C., BROWNLIE J. and MARTIAL J.A. The coding region for the 54-kDa protein of several Pestiviruses lacks host insertions but reveals a Zinc «finger-like» domain. *Virology*, 1990, **177**, 812-815.
- DONIS R.O., CORAPI W.V. and DUBOVI E.J. Bovine viral diarrhoea virus proteins and their antigenic analyses. *Arch. Virol.*, 1991, **Suppl 3**, 29-40.
- DONIS R.O., CORAPI W. and DUBOVI E.J. Neutralizing monoclonal antibodies to Bovine Viral Diarrhoea Virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. gen. Virol.*, 1988, **69**, 77-86.
- DONIS R.O. and DUBOVI E.J. Characterization of Bovine Viral Diarrhoea-Mucosal Disease Virus-specific proteins in bovine cells. *J. gen. Virol.*, 1987a, **68**, 1597-1605.
- DONIS R.O. and DUBOVI E.J. Glycoproteins of Bovine Viral Diarrhoea-Mucosal Disease Virus in infected bovine cells. *J. gen. Virol.*, 1987b, **68**, 1607-1616.
- DUBOVI E.J., DONIS R.O., WHITE R.T., CORDELL B. and DALE B. Expression of a glycoprotein antigen of Bovine Viral Diarrhoea Virus that elicits neutralizing antibody production in mice. *Vaccines 87*, 435-439, 1987, Ed. by Chanock R.M., Lerner R.A., Brown F. and Ginsberg H. New-York: Cold spring Harbor Laboratory.
- GORBALENYA A.E., DONCHENKO A.P., KOONIN E.V. and BLINOV V.M. N-terminal of putative helicases of flavi- and pestivirus may be a serine protease. *Nucleic Acids Res.*, 1989, **17**, 3889-3897.
- HORZINEK M.C. Pestiviruses - taxonomic perspectives. *Arch. Virol.*, 1991, **suppl. 3**, 1-5.
- 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. Microb.*, 1987, 361-369.
- HUGUES L.E., KERSHAW I.G. B¹ or Border disease. An undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.*, 1959, **71**, 313-317.
- LAIN S., RIECHMANN J.L. and GARCIA S.A. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucl. Acids Res.*, 1990, **18**, 7003-7006.
- MAGAR R., MINOCHA H.C., LECOMTE J. Bovine viral diarrhoea virus proteins: heterogeneity of cytopathogenic and non-cytopathogenic strains and evidence of a 53K glycoprotein neutralization epitope. *Vet. Microb.*, 1988, **16**, 303-314.
- MEYERS G., RÜMENAPF T., and THIEL H.-J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of Hog Cholera Virus. *Virol.*, 1989a, **171**, 555-567.
- MEYERS G., RÜMENAPF T. and THIEL H.-J. Ubiquitin in a togavirus. *Nature*, 1989b, **341**, 491.
- MEYERS G., TAUTZ N., DUBOVI E.J. and THIEL H.-J. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virol.*, 1991, **180**, 602-616.

- MILLER R.H. and PURCELL R.H. Hepatitis C virus shares amino acids sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plants virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 2057-2061.
- MOENNIG V. Pestiviruses: a review. *Vet. Microb.*, 1990, **23**, 35-54.
- MOORMANN R.J.M., WARMERDAM P.A.M., VAN DER MEER B., SCHAAPER W.M.M., WENSVOORT G. and HULST M.M. Molecular cloning and nucleotide sequence of Hog Cholera Virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology*, 1990, **177**, 184-198.
- OLAFSON P., Mc CALLUM A.D., FOX F.H. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell. Vet.*, 1946, **36**, 205-213.
- PASTORET P.-P., THIRY E., SCHWERS A., DUBUISSON J. Epidémiologie et physiopathologie de l'infection par le virus BVD. Congrès, Société française de buiatrie; 6-7/11/1986, Paris. In: pestiviroses des ovins et des bovins: nouvelles connaissances, utilisation pour une stratégie de contrôle, 87-104.
- PURCHIO A.F., LARSON R., COLLETT M.S. Characterization of bovine viral diarrhea virus proteins. *J. Virol.*, 1984, **50**, 666-669.
- RAMSEY F.K. and CHIVERS W.H. Mucosal disease of cattle. *North. Amer. Vet.*, 1953, **34**, 629-633.
- RENARD A., GUIOT C., SCHMETZ D., DAGENAIS L., PASTORET P.-P., DINA D., MARTIAL J.A. Molecular cloning of bovine viral diarrhea virus sequences. *DNA*, 1985, **4**, 429-438.
- RENARD A., DINA D., MARTIAL J. Vaccines and diagnostics derived from bovine diarrhea virus. European Patent Application number 86870095.6 publication number 0208672. 14/1/1987.
- RÜMENAPF T., STARK R., MEYERS G. and THIEL H.-J. Structural proteins of Hog Cholera Virus expressed by Vaccinia Virus: further characterization and induction of protective immunity. *J. Virol.*, 1991, **65**, 589-597.
- THIEL H.-J., STARK R., WEILAND E., RÜMENAPF T. and MEYERS G. Hog Cholera Virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.*, 1991, **65**, 4705-4712.
- WEILAND E., STARK R., HAAS B., RÜMENAPF T., MEYERS G. and THIEL H.-J. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.*, 1990, **64**, 3563-3569.
- WESTAWAY E.G., BRINTON M.A., GAIDAMOVICH S. Ya., HORZINEK M.C., IGARASHI L., KAARIAINEN L., LVOV D.K., PORTERFIELD J.S., RUSSELL P.K., TRENT D.W. Togaviridae. *Intervirology*, 1985a, **24**, 125-139.
- WESTAWAY E.G., BRINTON M.A., GAIDAMOVICH S. Ya., HORZINEK M.C., IGARASHI L., KAARIAINEN L., LVOV D.K., PORTERFIELD J.S., RUSSELL P.K., TRENT D.W. Flaviviridae. *Intervirology*, 1985b, **24**, 183-192.
- WISKERCHEN M., BELZER S.K. and COLLETT M.S. Pestivirus gene expression: the first protein product of the Bovine Viral Diarrhea Virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.*, 1991, **65**, 4508-4514.
- WISKERCHEN M. and COLLETT M.S. Pestivirus gene expression: protein p80 of Bovine Viral Diarrhea Virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology*, 1991, **184**, 341-350.
- XUE W., BLECHA F. and MINOCHA H.C. Antigenic variations in bovine viral diarrhea viruses detected by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 1688-1693.