

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine Vétérinaire

Titre de la thèse en français :

Etude de la recombinaison et des intermédiaires de réplication de l'ADN chez l'herpèsvirus bovin 1

Titre de la thèse en anglais : Study of recombination and DNA replicative forms of bovine herpesvirus 1

Candidat : Dr. Frédéric Schynts

Promoteur : Prof. Etienne Thiry

Co-promoteur : -

Département et Service : département des Maladies Infectieuses et Parasitaires, service de Virologie.

Date de la défense publique : le 11 décembre 2002

Composition du Jury : C. Dessy-Doize, J. Piette, E. Thiry, A. Epstein, H. Nauwynck, M. Georges, J. Mainil, B. Losson, A. Vanderplasschen, C. Charlier.

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

L'herpèsvirus bovin 1 (BoHV-1) appartient à la famille des *Herpesviridae*. Le génome des herpèsvirus est constitué d'une molécule d'ADN double brin. Cet ADN est compris dans une capside de symétrie icosaédrique entourée d'une bicouche lipidique (enveloppe) au sein de laquelle les glycoprotéines virales sont ancrées. Après infection par voie intranasale, le BoHV-1 est responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR). La vaccination permet de conférer une protection clinique du bovin. Actuellement, les vaccins disponibles sont délétés dans le gène codant pour la glycoprotéine E (gE) permettant, grâce à un test de détection des anticorps dirigés contre gE, la différenciation sérologique entre animaux vaccinés et animaux infectés. L'utilisation de vaccins vivants délétés en gE soulève la question du risque de recombinaison entre souches vaccinales et souches sauvages qui pourrait conduire à l'apparition de virus recombinants délétés en gE conservant la virulence de la souche sauvage.

La recombinaison d'ADN entre souches d'un même herpèsvirus semble être un mécanisme de variabilité génétique jouant un rôle dans leur évolution. Elle a été étudiée à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cependant, l'approche *in vitro* ne reflète que partiellement la situation naturelle *in vivo*. *In vivo*, les études menées sur le virus herpes simplex 1 (HSV-1) et le virus de la maladie d'Aujeszky (PRV) ont démontré que deux souches non virulentes peuvent interagir *in vivo* conduisant à la mort des animaux coinoculés suite à l'apparition de virus recombinants virulents. Cependant les

approches méthodologiques utilisées afin d'étudier la recombinaison *in vivo* n'ont pas permis l'investigation de certains aspects liés à la recombinaison comme, par exemple, la détermination de l'évolution des proportions relatives des populations virales parentales et recombinantes au cours de la totalité de la période d'excrétion chez l'animal coinoculé. De plus, les herpèsvirus s'établissent à l'état latent chez l'hôte infecté et peuvent périodiquement être réactivés et réexcrétés. Dans ce contexte, aucune étude n'a investigué le devenir des recombinants après passage à l'état latent. La biologie de l'infection du bovin par le BoHV-1 rend ce virus un excellent candidat afin d'étudier la recombinaison *in vivo* chez les herpèsvirus afin de déterminer (i) la nature des virus résultant de la coinoculation, sur le site naturel d'infection, de deux souches distinguables, (ii) l'évolution des différentes populations virales (parentales et recombinantes) au cours de la période d'excrétion virale suivant cette coinoculation, (iii) la possibilité de persistance à l'état latent des populations virales recombinantes la possibilité de leur dissémination après réactivation.

Ce travail a donc été entamé afin d'étudier la recombinaison chez le BoHV-1 suivant deux approches méthodologiques complémentaires :

- L'étude *in vivo* de la recombinaison, dans le modèle animal parfaitement homologue qu'est le bovin, par la coinfection, par voie intranasale, de deux souches génétiquement distinctes du BoHV-1 dont une délétée dans le gène codant pour la glycoprotéine C et l'autre délétée dans le gène codant pour la glycoprotéine E.

- L'étude *in vitro* de l'inversion de segments génomiques chez le BoHV-1, conséquence directe de la recombinaison homologue entre séquences d'ADN répétées inversées présentes dans l'ADN viral.

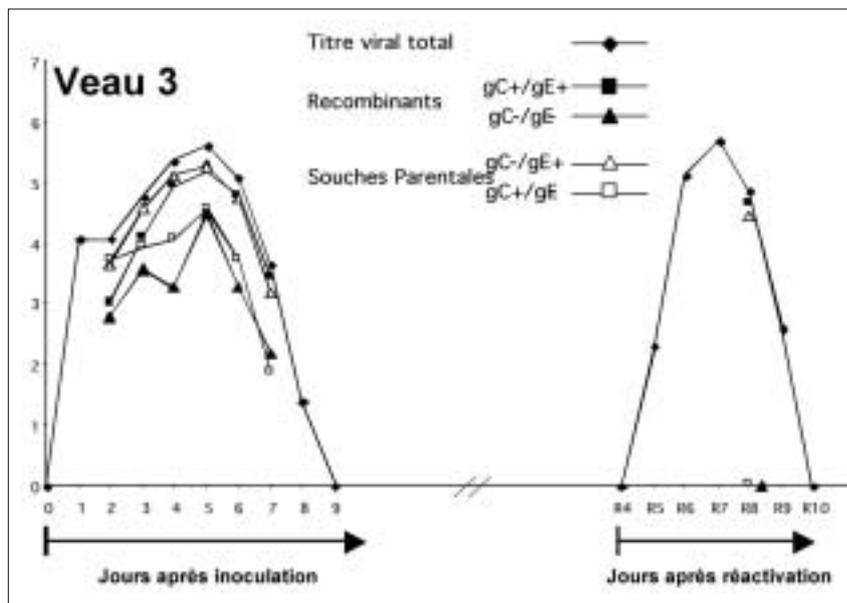
RÉSULTATS

1: Etude *in vivo* de la recombinaison chez le BoHV-1

De manière à étudier la recombinaison *in vivo* chez le BoHV-1, deux souches mutantes ont été utilisées: la souche Lam gC-, délétée dans le gène codant pour la glycoprotéine gC (gC-/gE+) et la souche Lam gE-, délétée dans le gène codant pour la glycoprotéine gE (gC+/gE-). La recombinaison entre ces deux souches parentales doit théoriquement générer des virus recombinants de deux types. Les premiers positifs pour gC et gE (gC+/gE+) et les seconds négatifs pour ces deux glycoprotéines (gC-/gE-).

Dix veaux (groupe A) ont été coinoculés par voie intranasale par les souches Lam gC- et Lam gE-. Comme contrôles, 5 veaux (groupe B) ont été inoculés par la souche Lam gC- et 5 veaux (groupe C) ont été inoculés par la souche Lam gE-. De manière à réactiver une éventuelle infection latente, une réactivation expérimentale a été réalisée à la dexaméthasone 12 semaines après inoculation. Durant ces deux périodes, des écouvillons nasaux ont été prélevés quotidiennement pendant 14 jours chez tous les veaux afin d'estimer l'excrétion et la réexcrétion virale. Les virus présents dans les écouvillons nasaux prélevés ont été isolés et caractérisés comme virus parentaux ou recombinants grâce au développement d'une méthodologie alliant PCR (caractérisation génotypique) et immunofluorescence (caractérisation phénotypique). Brièvement, le test PCR développé co-amplifie simultanément une séquence d'ADN du gène gC et une séquence d'ADN du gène gE tandis que le test immunofluorescent utilise deux anticorps monoclonaux, un dirigé contre gC et l'autre contre gE.

Après inoculation, le BoHV-1 a été détecté dans les sécrétions nasales de tous les veaux des groupes A, B et C. Tous les veaux des groupes A et B ont réexcrété du BoHV-1 après réactivation. Dans le groupe C, 4 des 5 veaux ont réexcrété la souche gC+/gE- après réactivation. La caractérisation de 20 isolats viraux à partir des écouvillons nasaux prélevés le jour 5 après coinoculation chez les veaux du groupe A a démontré que des virus recombinants des deux types (gC+/gE+ et gC-/gE-) ont été générés chez tous les veaux coinoculés. Afin de déterminer l'évolution des différentes populations virales durant la période d'excrétion, 3 veaux du groupe A ont été sélectionnés de manière aléatoire. Les virus présents dans les écouvillons nasaux contenant du BoHV-1 ont été isolés et caractérisés de manière à décomposer la courbe d'excrétion totale de chaque veau en 4 sous courbes représentant l'évolution des 4 populations virales durant l'entièreté de la période d'excrétion (la Figure 1 montre les résultats obtenus pour le veau 3. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les veaux 1 et 2). Les résultats démontrent que (i) la recombinaison a lieu précocement, des virus recombinants ayant été détectés deux jours après coinoculation, (ii) les proportions relatives des différentes populations virales (parentales et recombinantes) évoluent au cours de la période d'excrétion virale vers une situation où deux d'entre elles prédominent (la parentale gC-/gE+ et la recombinante gC+/gE+) sans totalement éliminer la présence des deux autres (la parentale gC+/gE- et la recombinante gC-/gE-). Finalement, la caractérisation des virus isolés à partir des écouvillons nasaux prélevés au jour 8 après réactivation démontre que seulement 2 des 4 populations ont été détectées (gC+/gE+ et gC-/gE+). En effet, les populations gC+/gE- et gC-/gE- n'ont pas été détectées après réactivation alors que la population gC+/gE-, inoculée seule (groupe C), a été détectée dans les écouvillons nasaux de 4 des 5 veaux de ce groupe après réactivation.



Evolution des populations virales chez un veau coinoculé par les souches gC-/gE+ et gC+/gE-. Ce veau a été inoculé au jour 0. Une réactivation expérimentale a été réalisée 12 semaines après coinoculation. Des écouvillons nasaux ont été prélevés quotidiennement et le titre viral total a été déterminé pour la période d'excrétion (courbe de gauche) et de réexcrétion (courbe de droite). Les virus présents dans les écouvillons nasaux prélevés du jour 2 à 7 après inoculation et le jour 8 après réactivation ont été caractérisés de manière à déterminer les proportions relatives de chaque population virale et son évolution. Les titres sont exprimés en logarithme d'unités formant plages par 100 mg de sécrétion nasale.

2: Etude *in vitro* de l'inversion de segments génomiques chez le BoHV-1, conséquence directe de la recombinaison durant la réplication de l'ADN viral

Les génomes des herpesvirus sont caractérisés par la présence de séquences répétées directes ou inversées qui a conduit à les répartir en 6 classes génomiques (nommées A à F). Les génomes de classe D comprennent un segment d'ADN unique long (L) et un court (S). Ce dernier est flanqué de deux séquences répétées inversées. La réplication de l'ADN produit des concatémères, constitués de génomes unitaires liés les uns aux autres de façon covalente dans un arrangement tête-à-queue, qui sont clivés durant le processus d'encapsidation de l'ADN dans la capsid. Les génomes de classe D encapsidés comprennent des quantités équimolaires de deux isomères suite à l'inversion libre du segment S (l'inversion de segments génomiques chez les herpesvirus a été attribuée à des événements de recombinaison entre les séquences répétées inversées). Le segment L quant à lui reste fixé de façon prédominante dans une orientation prototype (P). Cependant, de faibles quantités de génomes ayant le segment L dans une orientation inversée (I_L) ont été détectées chez certains génomes de classe D. La présence des génomes I_L a été attribuée à des inversions peu fréquentes du segment L. Cependant, la détection d'inversions fréquentes du segment L dans les concatémères de l'herpesvirus équin 1 (Slobedman et Simmons, 1997) suggère que la limitation pourrait être davantage une conséquence d'un défaut de clivage ou d'encapsidation que d'inversion. Lors de cette étude, les structures de l'ADN encapsidé et concatémérique d'un autre génome de classe D, le BoHV-1, ont été déterminées. Il a été démontré que l'ADN encapsidé du BoHV-1 contient de faibles quantités de génomes I_L , tandis que l'ADN concatémérique contient des quantités équimolaires de segments L dans les deux orientations possibles, confirmant pour la première fois que, durant la réplication de l'ADN viral, les génomes I_L sont formés de façon aussi efficace que les génomes P suite à des événements de recombinaison. Ce résultat indique clairement que les faibles taux de génomes I_L présents dans l'ADN encapsidé du BoHV-1 sont davantage liés à un défaut de clivage et/ou d'encapsidation de ces formes génomiques qu'à un défaut au niveau de leur formation. De plus, les résultats obtenus démontrent que les extrémités des concatémères du BoHV-1 contiennent une prépondérance de terminaisons génomiques précurseurs des génomes P comparable à la prépondérance des génomes P encapsidés. En conséquence, la limitation de formation des génomes I_L semble être liée à un défaut au niveau du clivage du concatémère. Ces résultats ont des implications importantes pour les mécanismes par lesquels l'ADN des herpesvirus est clivé et encapsidé. Ils confirment également l'importante capacité de recombinaison du génome des herpesvirus.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1: Etude *in vivo* de la recombinaison chez le BoHV-1

Les résultats obtenus chez les veaux inoculés par la souche gC+/gE- (groupe C) ont permis de confirmer que la délétion en gE n'affecte pas (i) la multiplication virale après inoculation intranasale; (ii) l'établissement à l'état latent; (iii) la réactivation et la réexcration virales après traitement à la dexaméthasone. Ils démontrent la possibilité de dissémination des souches vaccinales délétées. Dans ce contexte, le développement d'un test PCR amplifiant simultanément un fragment des gènes gE et gC apporte donc un outil diagnostic important permettant la surveillance de la dissémination des souches vaccinales sur le terrain. De plus, les souches vaccinales gE- pouvant se disséminer, elles n'offrent pas à l'heure actuelle une sécurité d'emploi totale. Une des perspectives du travail pourrait donc être la mise au point d'un vaccin, toujours délété en gE mais également délété en une autre glycoprotéine virale comme par exemple, gM. En effet, il vient d'être démontré chez le PRV que la délétion simultanée de gE et gM inhibe complètement l'enveloppement lors de la multiplication virale (Fuchs *et al.*, 2002). L'utilisation d'une telle souche comme vaccin permettrait le développement d'une réponse immune protectrice, tout en conservant la spécificité du marqueur gE et en diminuant drastiquement la possibilité de dissémination des souches vaccinales.

L'étude de la recombinaison *in vivo* entre deux souches du BoHV-1 (groupe A) a permis de démontrer que (i) la recombinaison *in vivo* a lieu rapidement après coinoculation et est fréquente; (ii) les proportions relatives des différentes populations virales (parentales et recombinantes) évoluent durant la période d'excrétion virale chez l'animal coinoculé; (iii) après passage à l'état latent, les virus résultant de la coinoculation sont directement soumis à un processus sélectif chez l'animal coinoculé.

Les glycoprotéines gC et gE du BoHV-1 sont impliquées respectivement dans la phase d'attachement initiale du virus à la cellule (Liang *et al.*, 1991) et dans le passage direct du virus de cellule-à-cellule (Rebordosa *et al.*, 1996) tout comme les glycoprotéines homologues du PRV et de l'HSV-1. La détection de grandes quantités de virus recombinants doublement positifs n'est pas surprenante en soi, ces virus possédant les caractéristiques des souches sauvages. Par contre, la détection de recombinants doublement négatifs, même en faibles quantités, chez tous les animaux coinoculés, est surprenante à la lumière de deux études démontrant que cette double délétion chez le PRV affectait de manière drastique la capacité de réplication à la fois *in vitro* et *in vivo* (Zsak *et al.*, 1992; Nauwynck *et al.*, 1999). De manière à réconcilier ces résultats apparemment contradictoires, nous posons l'hypothèse d'une transcomplémentation phénotypique des recombinants de ce type, pouvant expliquer leur détection aisée dans nos conditions expérimentales. En effet, ils ont été générés obligatoirement dans une cellule coinoculée par les deux souches parentales, exprimant à la fois gC et gE. Cette transcomplémentation leur permettant ainsi d'interagir avec leur environnement

aussi efficacement qu'une souche sauvage. Une des perspectives de ce travail sera de vérifier cette hypothèse en comparant la capacité de réplication de la souche gC-/gE- en présence ou en l'absence d'une souche sauvage.

Les résultats indiquent également que seulement 2 des 4 populations virales présentes lors de la phase d'excrétion virale ont été détectées au niveau de la muqueuse nasale après réactivation. En effet, aucun virus parental gC+/gE- ou recombinant gC-/gE- n'ont été détectés après réactivation bien que la souche gC+/gE-, inoculée seule (groupe C), ait été détectée après réactivation. La possibilité qu'une souche gE- soit réactivée chez des veaux simultanément infectés porteurs latents d'une souche gE+ est donc extrêmement faible. Les conséquences épidémiologiques de cette observation sont importantes dans le contexte de l'utilisation des vaccins marqués. En effet, le risque d'apparition et de dissémination, après passage à l'état latent, d'une souche recombinante délétée dans le gène gE, bien que ne pouvant être réduit à zéro, est extrêmement faible.

2: Etude *in vitro* de l'inversion de segments génomiques chez le BoHV-1, conséquence directe de la recombinaison durant la réplication de l'ADN viral

La recombinaison est intimement liée à la réplication de l'ADN viral au sein de la cellule infectée (Roizman et Knipe, 2001). La détermination de la structure de l'ADN encapsidé et des intermédiaires de réplication de l'ADN du BoHV-1 a donc été réalisée.

De faibles quantités des génomes encapsidés du BoHV-1 possèdent un segment L en orientation inversée (génomes I_L) comme cela a été démontré dans le cas de certains herpesvirus de classe D comme le VZV (Davison, 1984; Kinchington *et al.*, 1985) et le PRV (DeMarchi *et al.*, 1990) mais pas pour l'EHV-1 (Chowdhury *et al.*, 1990; Yalamanchili et O'Callaghan, 1990; Slobedman et Simmons, 1997). Les mécanismes responsables de la présence de génomes I_L dans l'ADN encapsidé de certains herpesvirus de classe D restant inconnus, la structure des concatémères du BoHV-1 a été déterminée afin de quantifier l'inversion du segment L. Les résultats obtenus démontrent que des quantités équimolaires de génomes I_L et P sont formées durant la réplication de l'ADN viral des génomes de classe D suite à des événements de recombinaison homologues fréquents entre séquences répétées inversées.

L'analyse des fragments d'ADN terminaux présents aux extrémités de l'ADN concatémérique du BoHV-1 et de l'EHV-1 (Slobedman et Simmons, 1997) démontre que de faibles quantités de fragments terminaux précurseurs des génomes I_L sont présents aux extrémités des concatémères du BoHV-1 alors que le même type de fragments terminaux est présent en grande quantité dans le cas de l'EHV-1. Le clivage des jonctions entre unités génomiques adjacentes conduisant à la formation de génomes I_L dans l'ADN concatémérique est donc fortement inhibé dans le cas du BoHV-1 mais pas dans le cas de l'EHV-1. Ce résultat suggère que les faibles quantités de génomes I_L encapsidés dans le cas du BoHV-1 sont davantage attribuables à une

restriction de clivage tandis que dans le cas de l'EHV-1 l'absence complète de génomes I_L encapsidés est davantage attribuable à une restriction au niveau de l'encapsidation.

Chez les herpesvirus, le processus du clivage et de l'encapsidation de l'ADN à partir de l'ADN concatémérique est dirigé par la présence de séquences agissant en *cis*, *pac1* et *pac2* (Deiss et Frenkel, 1986; Deiss *et al.*, 1986; McVoy *et al.*, 1998; 2000). Aussi, les terminaisons du segment L des génomes I_L chez les herpesvirus de classe D ont été analysées de manière à estimer si des homologies de séquence à *pac2* (séquence se trouvant à l'extrémité P du génome) peuvent expliquer les différences observées dans le clivage et l'encapsidation des génomes de classe D. Cette analyse a permis la reconnaissance d'un motif particulier de la séquence *pac2* présent aux extrémités I_L des génomes encapsidant de faibles quantités de génomes I_L (VZV, PRV, BoHV-1) mais absent chez l'EHV-1. Ce motif pourrait ainsi être responsable de l'initiation de l'encapsidation des génomes I_L observée chez ces trois espèces virales. De plus, une séquence riche en A et T pouvant expliquer le clivage fréquent des génomes I_L à partir de l'ADN concatémérique a été identifiée chez l'EHV-1 tandis que le même type de séquence est complètement absent dans le cas du BoHV-1 pour lequel le clivage à ce niveau est fortement inhibé.

Ces observations permettent de poser l'hypothèse que des séquences distinctes sont impliquées dans le clivage et l'encapsidation. L'analyse des fragments terminaux des concatémères du PRV et du VZV, ces deux virus possédant une séquence riche en A à l'extrémité I_L de leur génome, ainsi que des études de mutagenèse au niveau de ces séquences chez les génomes de classe D, permettront de vérifier cette hypothèse. La compréhension des mécanismes de clivage et d'encapsidation est rendue d'autant plus nécessaire suite au développement croissant d'agents thérapeutiques visant cette étape cruciale du cycle viral des herpesvirus.

Les résultats obtenus lors de cette partie du travail ont également démontré que la recombinaison avait lieu fréquemment entre concatémères ou au sein d'un même concatémère suite à l'observation fréquente de l'inversion des segments L adjacents. De plus, la structure des intermédiaires de réplication générés suite à l'infection d'une souche du BoHV-1 ayant été déterminée, la recombinaison entre deux souches distinctes du BoHV-1 pourra être investiguée suite à l'analyse de la structure des concatémères générés à la suite de leur coinoculation.

Les résultats obtenus lors de ce travail démontrent la forte capacité de recombinaison du génome du BoHV-1 en situation de coinoculation simultanée. Il sera également très intéressant de déterminer l'effet d'une augmentation de l'intervalle de temps entre l'infection cellulaire par une première souche virale et par une seconde sur la recombinaison entre ces souches. Cette approche reflétant davantage les situations qui existent sur le terrain. En effet, la probabilité d'une coinoculation simultanée par deux souches virales distinctes reste faible.

REMERCIEMENTS:

La réalisation de cette thèse a été rendue possible grâce aux financements du Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture (Administration Recherche et Développement), du Fonds de la Recherche Scientifique et Médicale (FRSM), et du Fonds de la Recherche Fondamentale et Collective (FRFC).

ment), du Fonds de la Recherche Scientifique et Médicale (FRSM), et du Fonds de la Recherche Fondamentale et Collective (FRFC).

RÉFÉRENCES

- DAVISON A.J. Structure of the genome termini of varicella-zoster virus. *J. Gen. Virol.*, 1984, **65**, 1969-1977.
- DEISS L.P., CHOU J., FRENKEL N. Functional domains within the a sequence involved in the cleavage-packaging of herpes simplex virus DNA. *J. Virol.*, 1986, **59**, 605-618.
- DEMARCHI J.M., LU Z.Q., RALL G., KUPERSHMIT S., BEN-PORAT T. Structural organization of the termini of the L and S components of the genome of pseudorabies virus. *J. Virol.*, 1990, **64**, 4968-4977.
- LIANG X.P., BABIUK L.A., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., FITZPATRICK D.R., ZAMB T.J. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. *J. Virol.*, 1991, **65**, 1124-1132.
- McVOY M.A., NIXON D.E., ADLER S.P., MOCARSKI E.S. Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J. Virol.*, 1998, **72**, 48-56.
- McVOY M.A., NIXON D.E., HUR J.K., ADLER S.P. The ends on herpesvirus DNA replicative concatemers contain pac2 cis cleavage/packaging elements and their formation is controlled by terminal cis sequences. *J. Virol.*, 2000, **74**, 1587-1592.
- NAUWYNCK H.J., LABARQUE G.G., PENSAERT M.B. Efficacy of an intranasal immunization with gEgC and gEgI double-deletion mutants of Aujeszky's disease virus in maternally immune pigs and the effects of a successive intramuscular booster with commercial vaccines. *J. Vet. Med. B*, 1999, **46**, 713-722.
- REBORDOSA X., PINOL J., PEREZ-PONS J.A., LLOBERAS J., NAVAL J., SERRA-HARTMANN X., ESPUNA E., QUEROL E. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Res.*, 1996, **45**, 59-68.
- ROIZMAN B., Knipe D.M. Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*. 4th Ed. Lippincott, Williams and Wilkins: Philadelphia, 2001, 2399-2459.
- SLOBEDMAN B., SIMMONS A. Concatemeric intermediates of equine herpesvirus type 1 DNA replication contain frequent inversions of adjacent long segments of the viral genome. *Virology*, 1997, **229**, 415-420.
- ZSAK L., ZUCKERMANN F., SUGG N., BEN-PORAT T. Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *J. Virol.*, 1992, **66**, 2316-2325.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- SCHYNTS F., BARANOWSKI E., LEMAIRE M., THIRY E. A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Vet. Microbiol.*, 1999, **66**, 187-195.
- SCHYNTS F., VANDERPLASSCHEN A., HANON E., RIJSEWIJK F.A.M., VAN OIRSCHOT J.T., THIRY E. Use of PCR and immunofluorescence to detect bovine herpesvirus 1 recombinants. *J. Virol. Methods*, 2001, **92**, 99-104.
- SCHYNTS F., MEURENS F., MUYLKENS B., EPSTEIN A.L., McVOY M.A., THIRY E. Réplication, clivage/encapsidation et recombinaison de l'ADN des herpesvirus. *Virologie*, 2002, **6**, 343-352.
- SCHYNTS F., McVOY M.A., MEURENS F., DETRY B., EPSTEIN A.L., THIRY E. The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. *Virology*, 2003, **314**, 326-335.
- SCHYNTS F., MEURENS F., DETRY B., VANDERPLASSCHEN A., THIRY E. Rise and survival of bovine herpesvirus 1 recombinants after primary infection and reactivation from latency. *J. Virol.*, 2003, sous presse.