

# THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

## Résumé

**Orientation :** Médecine vétérinaire

**Titre de la thèse en Français :** Influence du délai de surinfection et de la parenté génétique sur la recombinaison de l'herpèsvirus bovin 1

**Titre de la thèse en Anglais :** Influence of superinfection delay and genetic relatedness on bovine herpesvirus 1 recombination

**Candidat :** François Meurens

**Promoteur :** Prof. Etienne Thiry

**Département et Service :** Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Virologie, Pathologies des Maladies virales et Epidémiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

**Date de la défense publique :** 10 septembre 2004

### Composition du Jury :

**Membres internes à la Faculté de Médecine vétérinaire :** D. Desmecht, J-M. Godeau, M. Georges, J. Mainil, R. Matagne, F. Rollin, E. Thiry, A. Vanderplasschen

**Membres externes à la Faculté de Médecine vétérinaire :** H. Nauwynck (Université de Gand), L. Willems (Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux)

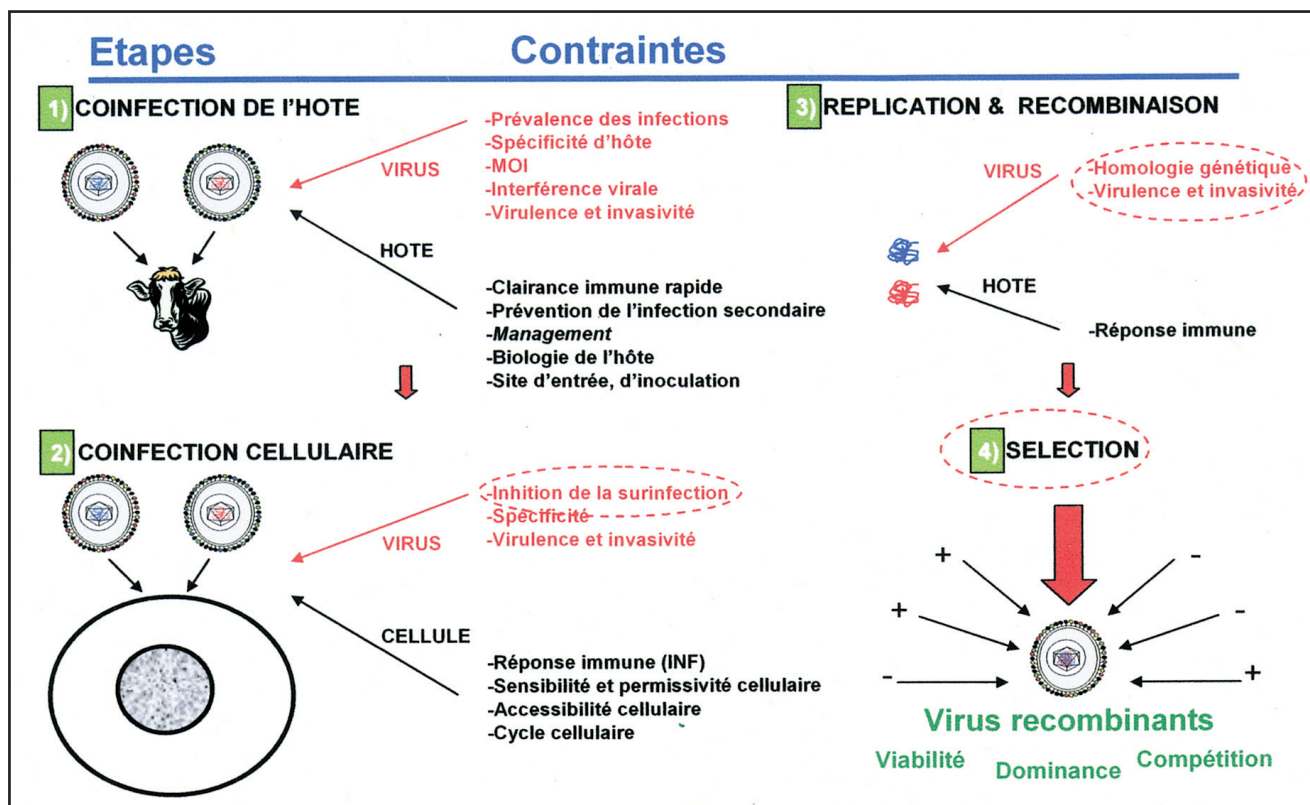
## DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (herpèsvirus bovin 1, BoHV-1) appartient à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. Ce virus est responsable de pertes économiques importantes chez le bétail. Il infecte les bovins essentiellement par voie respiratoire et induit une infection latente principalement dans les neurones sensitifs du ganglion trijumeau. La pathogénie de l'infection explique qu'il existe naturellement des situations de coinfections respiratoires aptes à générer des virus recombinants par recombinaison intermoléculaire. Cette situation est rendue plus complexe encore par la vaccination, couramment pratiquée par l'injection intranasale de virus vivants atténués porteurs d'une délétion dans le gène de la glycoprotéine gE. Selon les études, les alphaherpèsvirus sont capables de produire de 1 à 30 % de virus recombinants de nouvelle génération. Ce taux de génération de virus recombinants est une donnée classiquement mesurée. Cependant, il ne donne qu'une estimation de la proportion de virus recombinants, à l'issue

du cycle de multiplication virale, et il ignore les événements qui se produisent dans la cellule infectée. Le mécanisme de la recombinaison en lui-même, dans la cellule infectée, et les facteurs l'influençant demandent à être explorés d'autant plus que le taux de mutation est très faible chez les herpèsvirus et il est vraisemblable que la recombinaison joue un rôle prépondérant dans leur évolution génétique.

La recombinaison a été décrite aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* chez de nombreux alphaherpèsvirus comme les Herpèsvirus simplex 1 et 2 (HSV-1 et -2) (Javier *et al.*, 1986), le virus responsable de la maladie d'Aujeszky (PrV) (Glazenburg *et al.*, 1994), l'herpèsvirus félin 1 (FeHV-1) (Fujita *et al.*, 1998), le BoHV-1 (Schynts *et al.*, 2003) et le virus de la varicelle et du zona (VZV) (Dohner *et al.*, 1988). Timbury et Subak-Sharpe (1973) ont été les premiers avec l'HSV-1 et l'HSV-2 à démontrer que la recombinaison interspécifique pouvait avoir lieu entre différentes espèces d'alphaherpèsvirus.

A ce jour, peu d'études se sont focalisées sur la caractérisation des paramètres influençant les taux de recombinaison. En



**Figure 1 :** représentation des facteurs pouvant influencer la recombinaison entre alphaherpèsvirus. Les facteurs envisagés au cours des différentes études reprises dans cette thèse sont entourés

1994, Glazenburg et collaborateurs se sont penchés sur l'identification des paramètres influençant la recombinaison chez le PrV. Lors de leurs recherches, ils ont montré que la séparation temporelle (2 h) des infections n'influait pas la fréquence de recombinaison. Précédemment, d'autres études s'étaient intéressées à l'influence de la parenté génétique chez les alphaherpèsvirus (Halliburton *et al.*, 1977 ; Preston *et al.*, 1978). Elles ont démontré que si la recombinaison est possible entre espèces proches, comme les HSV-1 et 2, elle n'est toutefois pas détectable entre des virus phylogéniquement plus éloignés, comme l'HSV-1 et le PrV (Halliburton *et al.*, 1977).

Au cours des trois études menées dans le cadre de ce travail, l'objectif a été de préciser l'influence de deux paramètres sur la recombinaison des alphaherpèsvirus : le délai de surinfection, c'est-à-dire l'influence de la désynchronisation des infections, et la parenté génétique des virus mis en présence.

## RÉSULTATS

La première étude a été consacrée à l'évaluation exhaustive de l'effet du délai entre infections sur la génération de virus recombinants chez le BoHV-1. Ce paramètre est particulièrement important dans la mesure où, en conditions naturelles, les infections successives sont statistiquement beaucoup plus fréquentes que les infections concomitantes, qui permettent de nombreux événements de recombinaison. Pour ce faire, Trois approches ont été retenues. Premièrement,

deux mutants du BoHV-1 délétés soit dans le gène codant pour la glycoprotéine gC (gC-/gE+) soit dans le gène codant pour gE (gC+/gE-) ont été utilisés en situation de coinfection et surinfections (2, 4, 6 et 8 h entre les infections) *in vitro*. Deuxièmement, l'expression de la  $\beta$ -galactosidase, dont le gène a été introduit dans le génome du virus surinfectant, a été mesurée avec plusieurs délais de surinfection (2, 4, 6 et 8 h). Troisièmement, la recombinaison a été investiguée au niveau des intermédiaires de réplication concatémériques (génomés liés les uns à la suite des autres de manière covalente) dans les mêmes situations de coinfection et surinfections. Les résultats obtenus démontrent que : i) la recombinaison est fréquente *in vitro* en situation de coinfection, environ 30 % de virus recombinants (gC+/gE+ et gC-/gE-) ayant été détectés à l'issue du cycle viral, ii) l'introduction d'un délai entre les infections empêche progressivement l'émergence de virus recombinants, iii) l'introduction d'un délai entre les infections empêche l'expression de la  $\beta$ -galactosidase du virus surinfectant, iv) les concatémères mixtes, signalant la recombinaison entre virus, ne sont plus détectables lorsque le délai entre infections dépasse 2 h et donc que (v) la recombinaison entre BoHV-1 n'est possible que dans un laps de temps restreint.

La deuxième étude a été conçue de manière à déterminer dans quelle mesure la recombinaison est encore possible lorsque les virus mis en présence appartiennent à deux espèces virales différentes (par exemple le BoHV-1 et l'herpèsvirus des cervidés 2, CvHV-2). Cette étude a profité de

l'existence unique du groupe des alphaherpèsvirus apparentés au BoHV-1 (BoHV-5, CvHV-1, CvHV-2 et l'herpèsvirus caprin 1, CpHV-1 entre autres). Ici, la recombinaison a été évaluée exclusivement à l'issue du cycle viral par analyse phénotypique, et génotypique pour certains, des virus générés à l'issue des différentes situations de coinfection. Des cultures cellulaires bovines ont été coinfectées avec un BoHV-1.2 mutant doublement marqué (contenant les gènes des protéines de fluorescence verte, GFP et rouge, RFP en lieu et place des gènes codant pour les glycoprotéines C et I respectivement) et différents alphaherpèsvirus de ruminants (BoHV-1.2, BoHV-1.1, BoHV-5, CvHV-2 et CpHV-1). À l'issue des coinfections, quatre types de virus (deux parentaux, GFP+/RFP+ et GFP-/RFP- et deux recombinants, GFP+/RFP- et GFP-/RFP+) ont été détectés et distingués selon leur phénotype. Les résultats montrent que : i) la recombinaison entre souches identiques ou non de BoHV-1 (BoHV-1.1 et 1.2) est fréquente (26 %), ii) la recombinaison interspécifique BoHV-1/BoHV-5 est possible et génère des virus possédant la base génétique d'un parent ou de l'autre, iii) des recombinants interspécifiques avec des espèces plus éloignées (CvHV-2 et CpHV-1) ne sont pas mis en évidence.

La troisième étude a été réalisée afin de préciser l'influence de la parenté génétique sur la recombinaison. La recombinaison à cette fois a été étudiée au stade des intermédiaires de réplication concatémériques selon la méthodologie utilisée dans la première étude. De la sorte, les paramètres perturbant la détection des recombinants interspécifiques potentiels tels que : (i) la viabilité des recombinants produits, (ii) la dominance entre virus générés ou (iii) la détectabilité difficile de certains recombinants, sont évités. Trente heures après avoir réalisé différentes coinfections et surinfections avec les virus sélectionnés, l'ADN concatémérique a été isolé et analysé. Les résultats obtenus montrent que : i) la recombinaison interspécifique est possible, comme cela avait été démontré précédemment entre les herpèsvirus bovins, mais également entre le BoHV-1 et le CvHV-2 et entre les CvHV-1 et 2 et ii) que l'inhibition de la surinfection est observable avec des délais similaires entre les virus sélectionnés. L'étude de la recombinaison au niveau concatémérique révèle pour la première fois des événements de recombinaison entre des alphaherpèsvirus aussi éloignés l'un de l'autre que le BoHV-1 et le CvHV-2 et entre les herpèsvirus des cervidés 1 et 2.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats de la première étude démontrent que des infections simultanées ou temporellement proches avec deux BoHV-1 distincts conduisent à l'émergence de pourcentages élevés (30%) de virus recombinants *in vitro*. L'augmentation du temps entre les infections empêche toutes surinfections potentielles et par conséquent l'émergence de virus recombinants. L'impact du délai de surinfection sur le processus de recombinaison a été analysé et confirmé à trois étapes différentes du cycle de

multiplication du virus surinfectant. Premièrement, avant la réplication, l'augmentation du délai entre infection prévient l'expression du gène de la bêta-galactosidase introduit dans le génome du virus surinfectant. Deuxièmement, la réplication du deuxième virus et ses conséquences, c'est-à-dire, la formation des structures concatémériques, n'est pas possible dans les cellules déjà infectées par le premier virus. Troisièmement, après la réplication virale, la production de virus possédant le phénotype du virus surinfectant ou de phénotype recombinant devient indétectable à mesure que l'intervalle entre les infections croît. Les virus recombinants sont à peine détectables lorsque le délai de surinfection est de 6 h et totalement indétectables lorsqu'il atteint les 8 h. Les résultats obtenus montrent l'établissement rapide d'une inhibition de la surinfection entre les infections, au moyen des mutants Lam gC- et Lam gE- et son impact déterminant sur la génération de virus recombinants.

Les événements de surinfection nécessaires à la recombinaison se produisent au cours d'une période très brève de 0 à 6 heures. Cette observation concorde avec une étude précédente sur le PrV dans laquelle les auteurs montraient une petite fenêtre permettant des doubles infections productives (intervalle maximum de 4 h entre infection) (Banfield *et al.*, 2003). Si l'intervalle entre infections dépasse les 6 h, les virus surinfectants ne peuvent fournir les génomes nécessaires à la recombinaison. La recombinaison est par conséquent intimement liée au caractère simultané des infections. Cette découverte est particulièrement importante dans le cadre de l'évaluation du risque de recombinaison entre les souches vaccinales et sauvages. En effet, lors d'épidémie de rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR), la vaccination intranasale au moyen de vaccin vivant gE- est fréquemment effectuée avec pour conséquence des coinfections probables avec la souche vaccinale et les risques de recombinaison qui en découlent. Ces recombinants pourraient mettre à mal les programmes de contrôle et d'éradication de la maladie. Récemment, l'isolement sur le terrain d'une souche gE- de BoHV-1, homologue du vaccin marqué Difivac, est venu renforcer la nécessité d'évaluer les risques de recombinaison (Dispas *et al.*, 2003). Les résultats obtenus dans cette étude associés aux faibles probabilités de coinfections sur le terrain nous autorisent à conclure que la recombinaison et ses conséquences potentielles sont des événements rares. Cependant, un unique recombinant associant la virulence d'une souche sauvage à la délétion gE suffirait à perturber durablement les plans de contrôle de l'IBR.

La deuxième étude rapporte la première observation *in vitro* de recombinants interspécifiques entre le BoHV-1 et le BoHV-5 après coinfections. Deux virus recombinants ont été isolés à l'issue des coinfections avec ces deux espèces virales. Par contre aucun recombinant n'a été détecté entre le BoHV-1 et des virus apparentés, tel le CvHV-2 et le CpHV-1. Ces résultats reflètent les homologues génétiques plus faibles entre le BoHV-1 et le CvHV-2 ou le CpHV-1 comparées aux

82,3 % d'homologie observé entre le BoHV-1 et le BoHV-5 (Ros et Belak, 1999 ; Delhon *et al.*, 2003). Étant donné que les génomes du CpHV-1 et du CvHV-2 n'ont pas été complètement séquencés, les arbres phylogéniques des alphaherpèsvirus de ruminants sont basés sur les séquences nucléotidiques de gB et gD analysées par les méthodes « *neighbour-joining* » et de parcimonie. Ils révèlent que le BoHV-5 est le virus le plus proche des BoHV-1.1 et 1.2 (homologie de 98,1 % pour gB) et que le CpHV-1 est le plus éloigné (89 % pour gB) (Ros et Belak, 1999). Le CvHV-2 est plus proche du BoHV-1 (92,3 % pour gB) et du BoHV-5 que le CpHV-1 (88,2 %) (Ros et Belak, 1999). Cependant, bien que peu probable dans nos conditions, la recombinaison entre ces virus et le BoHV-1 ne peut être complètement écartée. La proportion de 26 % de virus recombinants, observée entre souches identiques ou différentes de BoHV-1 concorde avec les proportions obtenues précédemment (Schynts *et al.*, 2003).

La méthode adoptée dans cette étude, basée sur l'utilisation de marqueurs fluorescents, a permis une première évaluation de la recombinaison entre plusieurs alphaherpèsvirus apparentés. Elle a permis d'analyser rapidement plus de 1000 virus à l'issue des coinfections. Cinq situations de coinfection, impliquant le BoHV-1.2 ont été testées en suivant le même protocole. C'est la première fois que la recombinaison est étudiée dans un groupe d'alphaherpèsvirus apparentés pouvant coinfecter une même espèce animale. Le groupe des alphaherpèsvirus de ruminants est unique parmi les alphaherpèsvirus. Précédemment, la recombinaison avait été étudiée *in vitro* et *in vivo* entre les HSV-1 et 2 (Timbury et Subak-Sharpe, 1973 ; Halliburton *et al.*, 1977), entre l'HSV-1 et le BoHV-2 et entre l'HSV-1 et le PrV (Halliburton *et al.*, 1977). La deuxième partie de nos recherches complète les études précédentes. La recombinaison est évaluée entre des virus présentant des homologies génétiques plus faibles et plus importantes que celles observées, respectivement, entre l'HSV-1 et l'HSV-2 et entre l'HSV-1 et le BoHV-2. Des recombinants interspécifiques ont été isolés entre les HSV-1 et -2 alors qu'aucun recombinant n'ont été rapportés entre l'HSV-1 et le BoHV-2 ou le PrV (Timbury et Subak-Sharpe, 1973 ; Halliburton *et al.*, 1977). Malgré un degré d'homologie génétique plus grand (BoHV-1/BoHV-5 : 82,3 %, HS-1/HSV-2 : 75 %), le BoHV-5 ne recombine pas plus avec le BoHV-1 que l'HSV-1 avec l'HSV-2. Les résultats montrent qu'avec un couple de virus moins proches (BoHV-1/CvHV-2 et BoHV-1/CpHV-1), aucun virus recombinant n'est détecté. Comme rapporté précédemment avec les virus à ARN, les homologies de séquences entre génome constituent un facteur déterminant de la recombinaison homologue entre virus. Cependant, même si ce facteur est déterminant, d'autres facteurs doivent être pris en considération, particulièrement ceux qui affectent la distribution des particules virales à une même cellule et de la sorte limitent ou accroissent les probabilités de coinfections cellulaires. Les coinfections peuvent être empêchées par des facteurs d'hôte, les facteurs cellulaires qui empêchent la pénétration de plus d'une particule virale dans

la cellule et les facteurs viraux. La première étude a montré que le délai de surinfection exerce une influence déterminante dans l'émergence de recombinants *in vitro*. En effet, un court intervalle de 2 à 4 h influence considérablement les pourcentages de virus parentaux et recombinants. Considérant que les cinétiques de pénétration et de multiplication des virus parentaux sont très différentes, en particulier pour le CvHV-2 qui entre très rapidement dans les cellules, une influence de ces paramètres sur la recombinaison est envisageable. Dans le cas du BoHV-1 et du CvHV-2, l'augmentation de l'intervalle entre infections n'a pas permis l'isolement de virus recombinants.

Considérant l'obtention relativement aisée de recombinants BoHV-1/BoHV-5 en laboratoire et la génération *in vitro* et *in vivo* de recombinants interspécifiques HSV-1/HSV-2, leur émergence en conditions naturelles est probable. Les alphaherpèsvirus de ruminants décrits ci-dessus sont capables de franchir la barrière d'espèces et d'établir des infections latentes chez ces espèces (Thiry, 2002). La génération de tels recombinants pourrait avoir des conséquences épidémiologiques importantes.

Les résultats de la troisième étude montrent que la recombinaison survient au niveau concatémérique entre le BoHV-1 et des virus plus éloignés, tel le CvHV-2, et que l'inhibition de la surinfection est conservée parmi les alphaherpèsvirus de ruminants. En effet des concatémères mixtes ont été observés avec les coinfections BoHV-1.1/BoHV-1.2, BoHV-5/BoHV-1.1, CvHV-1/CvHV-2 et BoHV-1.1/CvHV-2. Le CvHV-2 est plus éloigné du BoHV-1 (92,3 % d'homologie pour gB) que le BoHV-5 (98,1 % d'homologie pour gB) (Ros *et al.*, 1999). Le CvHV-1 est proche du CvHV-2 (94,8 % d'homologie pour gB) (Ros *et al.*, 1999). L'absence de détection de recombinants interspécifiques entre le BoHV-1 et le CvHV-2 lors de la précédente étude peut avoir différentes explications : (i) les concatémères mixtes peuvent libérer des génomes parentaux et recombinants ; (ii) si les virus recombinants ne sont pas viables ou sont désavantagés, leur détection devient difficile ; (iii) la population de recombinants interspécifiques détectables peut être très faible comme cela a été constaté à l'issue des coinfections BoHV-1/BoHV-5 ; (iv) des recombinants avec des *crossovers* de part et d'autres des marqueurs de sélection peuvent rester indétectables.

La recombinaison entre le CvHV-2 et le BoHV-1 présente un intérêt particulier, ces deux virus pouvant se rencontrer chez le bovin (Thiry, 2002). Des recherches ultérieures sur les recombinants interspécifiques *in vivo* devraient permettre de mieux cerner les risques générés par ces virus.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été rédigé dans le cadre de recherches subventionnées par le Service Public Fédéral, Santé Publique, Administration Recherche et Développement et le Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (convention 2.4508.02). François Meurens est aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

---

## RÉFÉRENCES

- BANFIELD B.W., KAUFMAN J.D., RANDALL J.A., PICKARD G.E. Development of Pseudorabies virus strains expressing red fluorescent proteins: new tools for multisynaptic labeling applications. *J. Virol.*, 2003, **77**, 10106-10112.
- DELHON G., MORAES M.P., LU Z., AFONSO C.L., FLORES E.F., WEIBLEN R., KUTISH G.F., ROCK D.L. Genome of bovine herpesvirus 5. *J. Virol.*, 2003, **77**, 10339-10347.
- DISPAS M., SCHYNTS F., LEMAIRE M., LETELLIER C., VANOPDENBOSCH E., THIRY E., KERKHOFS P. Isolation of a glycoprotein E deleted bovine herpesvirus-1 strain in the field. *Vet. Rec.*, 2003, **153**, 209-212.
- DOHNER D.E., ADAMS S.G., GELB L.D. Recombination in tissue culture between varicella-zoster virus strains. *J. Med. Virol.*, 1988, **24**, 329-341.
- FUJITA K., MAEDA K., YOKOYAMA N., MIYAZAWA T., KAI C., MIKAMI T. *In vitro* recombination of feline herpesvirus type 1. *Arch. Virol.*, 1998, **143**, 25-34.
- GLAZENBURG K.L., MOORMANN R.J., KIMMAN T.G., GIELKENS A.L., PEETERS B.P. *In vivo* recombination of pseudorabies virus strains in mice. *Virus Res.*, 1994, **34**, 115-126.
- HALLIBURTON I.W., RANDALL R.E., KILLINGTON R.A., WATSON D.H. Some properties of recombinants between type 1 and type 2 herpes simplex viruses. *J. Gen. Virol.*, 1977, **36**, 471-484.
- JAVIER R.T., SEDARATI F., STEVENS J.G. Two avirulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants *in vivo*. *Science*, 1986, **234**, 746-748.
- PRESTON V.G., DAVISON A.J., MARSDEN H.S., TIMBURY M.C., SUBAK-SHARPE J.H., WILKIE N.M. Recombinants between herpes simplex virus types 1 and 2: analyses of genome structures and expression of immediate early polypeptides. *J. Virol.*, 1978, **28**, 499-517.
- ROS C., BELAK S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 247-1253.
- 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, **77**, 12535-12542.
- THIRY E. Recent developments in infectious bovine rhinotracheitis. *Cattle Pract.*, 2002, **10**, 43-51.
- TIMBURY M.C., SUBAK-SHARPE J.H. Genetic interactions between temperature-sensitive mutants of types 1 and 2 herpes simplex viruses. *J. Gen. Virol.*, 1973, **18**, 347-357.

---

## PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- MEURENS F., KEIL G., MUYLKENS B., GOGEV S., SCHYNTS F., NEGRO S., WIGGERS L., THIRY E. Interspecific recombination between two ruminant alphaherpesviruses, bovine herpesviruses 1 and 5. *J. Virol.*, 2004, **78**, 9828-9836.
- MEURENS F., SCHYNTS F., KEIL G., MUYLKENS B., GALLEGOS P., THIRY E. Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 2004, **78**, 3872-3879.
- MEURENS F., MUYLKENS B., SCHYNTS F., BOURGOT I., THIRY E. L'interférence virale chez les *Alphaherpesvirinae*. *Virologie*, 2003, **7**, 319-328.
- MEURENS F., SCHYNTS F., THIRY E. La recombinaison chez les alphaherpèsvirus. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 108-119.