

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

- Orientation :** Médecine vétérinaire
- Titre de la thèse en français :** Etude de la recombinaison chez l'herpèsvirus bovin 1 : virulence des virus recombinants délétés dans le gène de la glycoprotéine E et localisation génomique des événements de recombinaison
- Titre de la thèse en anglais :** Study of the recombination of bovine herpesvirus 1: virulence of recombinant viruses deleted in the glycoprotein E gene and genomic tracing of recombination events
- Candidat :** Benoît Muylkens
- Promoteur :** Prof. Etienne Thiry
- Département et Service :** Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Service de Virologie et Pathologie des Maladies virales
- Date de la défense publique :** le 22 mai 2006
- Composition du Jury :**
- Membres extérieurs à la faculté :*
Denis Rasschaert, Jean-Jacques Letesson
- Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :*
Pierre Lekeux, Etienne Thiry, Alain Vanderplasschen, Bertrand Losson, Carole Charlier, Michel Georges, Fabrice Bureau, Frédéric Rollin, Nadine Antoine

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

L'herpèsvirus bovin 1 (BoHV-1), l'agent étiologique de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR), 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 co-infections respiratoires aptes à générer des virus recombinants (Schynts *et al.*, 2003). 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 (gE négatifs). Le BoHV-1 jouit donc d'une situation tout à fait originale du fait de l'utilisation de vaccins vivants atténués administrés au niveau des sites primaires de multiplication du virus sauvage. Selon les résultats obtenus, le BoHV-1 est capable de produire 30 % de virus recombinants de nouvelle génération *in vitro* et 30 à 50 % *in vivo*, 6 jours après la co-infection (Schynts *et al.*, 2003 ; Meurens *et al.*, 2004a, 2004b). Ce taux de génération de virus recombinants est très élevé. Ces observations plaident pour l'apparition de virus recombinants en conditions naturelles. Cela permet de poser l'hypothèse de la dissémination de souches recombinantes à partir

d'une souche parentale virulente et de la souche vaccinale gE négative.

Par l'échange de gènes qu'elle met en oeuvre, la recombinaison est capable de restaurer un phénotype virulent suite à la coinfection entre souches avirulentes de différents alphaherpèsvirus (Javier *et al.*, 1986 ; Schynts *et al.*, 2003). A ce jour cependant, aucune donnée ne permet d'appréhender le risque épidémiologique présenté par des virus recombinants gE négatifs issus de coinfection entre une souche vaccinale gE négative et une souche virulente du BoHV-1. Le caractère gE négatif acquis à partir de la souche vaccinale donne une image sérologique vaccinale de l'infection par ces virus ; il est censé garantir l'atténuation virale. Cependant, des facteurs de virulence transmis par la

souche sauvage pourrait conférer à ces souches virales recombinantes un pouvoir pathogène.

Les trois approches développées au cours de ce travail ont pour objectif de démontrer la génération des BoHV-1 recombinants gE négatifs et d'étudier leur virulence en essayant de préciser la localisation des événements de recombinaison qui ont abouti à leur apparition.

RÉSULTATS

La première étude a été consacrée à la génération et à la caractérisation biologique de souches recombinantes de l'herpèsvirus bovin 1 délétées dans le gène codant pour la glycoprotéine E. L'étape primordiale pour aborder le problème a consisté à produire, *in vitro*, de virus recombinants délétés dans le gène codant pour la glycoprotéine E suite à la co-infection entre différentes souches sauvages du BoHV-1 et une souche doublement délétée dans les gènes codant pour les glycoprotéines C et E. Une caractérisation phénotypique par double marquage en immunofluorescence a permis d'isoler 43 souches recombinantes du BoHV-1 délétées dans le gène codant pour la glycoprotéine E. Une caractérisation biologique de cette collection de BoHV-1 recombinants gE négatifs a été réalisée *in vitro* sur la base de 3 mesures. Ces tests ont permis de comparer les capacités de multiplication et de propagation des virus recombinants entre eux et de les confronter à celles des souches parentales sauvages et doublement délétée. Il a pu être démontré que plusieurs recombinants générés à partir des souches virulentes du BoHV-1 présentent *in vitro* des caractéristiques biologiques similaires à celles des souches parentales dont elles proviennent ; en dépit de la délétion du gène codant pour la glycoprotéine E dont

elles ont hérité. Les résultats obtenus *in vitro* ont servi à établir un score évaluant les propriétés biologiques des recombinants. Sur la base de ce score, quatre BoHV-1 recombinants gE négatifs ont été sélectionnés pour réaliser une inoculation expérimentale chez l'hôte naturel.

La deuxième étude a été mise en œuvre afin d'étudier *sensu stricto* la virulence des BoHV-1 recombinants gE négatifs. Dans cette optique, quatre groupes de veaux ont été inoculés avec les quatre virus recombinants sélectionnés au terme de la caractérisation biologique. Au cours de l'infection primaire et suite à la réactivation expérimentale des veaux, les tableaux de virulence et les profils virologiques et sérologiques induits par les BoHV-1 recombinants gE négatifs ont été comparés à ceux produits par une souche hypervirulente du BoHV-1, par la souche parentale doublement délétée gC-gE négative et par une souche vaccinale gE négative. L'inoculation expérimentale des veaux a démontré que les BoHV-1 recombinants gE négatifs sont plus virulents que la souche vaccinale gE négative. Ils ont induit des lésions et des signes cliniques dont l'intensité était intermédiaire par rapport à celle de leurs souches parentales. Le recombinant gE négatif isolé de la souche BoHV-1 Ciney a induit un score clinique significativement plus élevé que les autres recombinants. L'analyse des ganglions trijumeaux a montré que les recombinants testés ont établi une infection latente. Suite à la réactivation expérimentale, trois d'entre-eux ont été réexcrétés. Ces données ont démontré la possibilité d'obtenir des BoHV-1 recombinants gE négatifs virulents par la recombinaison entre une souche délétée du BoHV-1 et des souches virulentes du BoHV-1.

Au cours de la troisième étude, nous avons comparé l'utilisation de marqueurs de délétion introduits artificiellement et de marqueurs naturellement présents pour localiser la recombinaison au sein du génome du BoHV-1. Une première approche a consisté à mesurer les fréquences de virus recombinants parmi les virus de nouvelle génération produits suite à la co-infection entre des BoHV-1 marqués par des délétions en trois endroits du génome. Ces fréquences de virus recombinants ont permis de constater l'existence d'autres points de recombinaison dans le génome viral. Cependant, les résultats obtenus posaient la question de la localisation précise des événements de recombinaison. Dans une perspective de définition plus fine des points de crossing-over, une nouvelle approche a été développée. Elle reposait sur la détection de polymorphisme nucléotidique isolé (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) entre différentes souches du BoHV-1. Ces SNPs ont été utilisés comme marqueurs de recombinaison de manière à pouvoir établir une carte de recombinaison. Pour ce faire, les mutations ponctuelles ont été utilisées pour construire des sondes TaqMan qui permettent l'amplification-discrimination des SNPs en une étape grâce à une méthode de PCR. Ces outils ont permis la différenciation de deux souches sauvages du BoHV-1 au niveau de sept *loci* répartis de manière régulière dans le génome. Cette approche a permis de caractériser les virus obtenus suite à la coinfection des deux souches de BoHV-1 porteuses des SNPs. L'analyse des virus de nouvelle génération a montré que (i) la recombinaison est fréquente entre les souches sauvages du BoHV-1 ; (ii) plusieurs points de recombinaison existent dans le génome viral ; (iii)

les croisements entre trois marqueurs de recombinaison affichent une interférence génétique négative ; (iv) les segments long et court du génome du BoHV-1 présentent des fréquences de recombinaison très différentes ; (v) le segment court contient vraisemblablement des points chauds de recombinaison. L'outil développé ouvre la voie à de nombreuses perspectives relatives aux rôles et aux conséquences de la recombinaison chez les herpesvirus.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les études développées au cours de cette thèse génèrent plusieurs questions fondamentales par rapport à la stratégie de lutte mise en oeuvre pour lutter contre l'IBR, à l'évolution des souches de BoHV-1 et à l'impact de la recombinaison chez les alphaherpesvirus. Par ailleurs, ce travail suscite de nombreuses perspectives, tant au niveau de la recherche fondamentale qu'appliquée.

La première conclusion concerne l'utilisation des vaccins vivants marqués gE négatifs dans le cadre de la lutte contre l'IBR. Plusieurs pays européens, parmi lesquels la Belgique, ont mis en place des programmes de contrôle du BoHV-1 basés sur l'utilisation de souches de BoHV-1 avirulentes marquées par la délétion du gène de gE. L'utilisation d'un test sérologique basé sur la mise en évidence des anticorps dirigés contre gE a mis en place une véritable pression de sélection qui donne l'avantage aux bovins présentant une réaction négative envers gE. En effet, ces derniers, présumés sains, sont maintenus dans les troupeaux vaccinés où ils participent au renouvellement des générations de bovins. Nous avons posé dans ce travail la question

de la virulence présentée par de virus recombinants gE négatifs issus de la coinfection entre une souche vaccinale gE négative et une souche sauvage du BoHV-1. En d'autres termes, nous voulions savoir si la délétion en gE était garante du phénotype avirulent du BoHV-1.

Les deux premières études indiquent clairement que le caractère gE négatif peut être associé à une virulence conservée du BoHV-1. L'introduction de la délétion de gE par la recombinaison entre souches de BoHV-1 a des conséquences variables qui dépendent probablement de déterminants de souches échangés au cours de la recombinaison. Ces observations contribuent à une évaluation équilibrée prenant en considération, d'une part l'efficacité, et d'autre part la biosécurité des vaccins vivants marqués utilisés contre le BoHV-1. Une recommandation prioritaire, relative à la voie d'administration de ces vaccins vivants gE négatifs, pourrait être émise. Le recours à une administration intramusculaire pourrait réduire le risque d'apparition de recombinants gE négatifs. En terme de perspective, il reste à déterminer si ces recombinants gE négatifs du BoHV-1 peuvent (i) apparaître dans les conditions naturelles d'infection et de vaccination ; (ii) s'installer et se transmettre au sein de la population bovine. Une caractérisation à grande échelle est déjà envisagée pour les souches isolées dans les troupeaux infectés où la vaccination est couramment pratiquée par voie intranasale. Le recours à des marqueurs SNP mis au point dans la troisième étude permettra une approche ciblée du problème.

La deuxième conclusion a trait à l'utilisation de vaccins et/ou de vecteurs vivants atténués obtenus à partir d'herpesvirus comme moyen pro-

phylactique ou thérapeutique chez l'homme et chez les animaux. Ces souches atténuées sont élaborées, le plus souvent, par l'introduction de mutations ou de marqueurs qui assurent l'innocuité. Or, une fois que ces souches sont introduites dans une population humaine ou animale, il est légitime, selon les résultats observés au cours de cette thèse, de poser la question de l'émergence de virus recombinants présentant une virulence modifiée par rapport à celle qui a été observée lors de l'enregistrement de ces souches atténuées.

La troisième étude soulève la question du rôle de la recombinaison dans l'évolution des souches de BoHV-1, et plus généralement des alphaherpesvirus. En effet, l'apparition d'un grand nombre de combinaisons génétiques, à l'issue d'un seul cycle de multiplication de deux souches virales, montre une grande diversité génétique créée par la recombinaison. Que ces combinaisons virales différentes fussent le fruit de crossing-overs multiples ou de conversions géniques associées à un premier événement de recombinaison, le brassage de gènes n'en demeure pas moins considérable. La comparaison des fréquences de recombinaison observées à la fréquence des mutations spontanées apparaissant au cours de la réplication des *Herpesviridae* renforce l'idée selon laquelle la recombinaison pourrait être un moteur évolutif chez les herpesvirus (Thiry *et al.*, 2005). En effet, et bien au-delà de la transmission de la délétion du gène de gE, la recombinaison pourrait jouer le rôle disséminateur de caractères génotypiques favorables à la persistance du virus au sein d'une population animale. Il est même envisageable que des facteurs d'adaptation, plutôt que des facteurs de virulence, soient l'objet de telles recombinaisons.

La dernière étude ouvre la voie à différentes perspectives. Au niveau expérimental, une première approche pourrait consister à évaluer l'impact de la recombinaison de manière prolongée après la coinfection entre deux souches. La mise en présence des deux souches pourrait être suivie par des passages successifs en culture de cellules. De cette façon, la dynamique de recombinaison et ses conséquences seraient envisagées sur un plus long terme. Quel sera le devenir des combinaisons parentales ?;

Certains recombinants pourraient-ils s'imposer aux autres ? Ces questions pourraient être adressées de manière plus pertinente encore par une expérience sur un groupe de bovins, dans lequel ne seraient introduits que deux animaux infectés, l'un par une souche parentale et l'autre par la deuxième. Les virus excrétés par des bovins sentinelles placés au contact des bovins infectés seraient caractérisés et renseigneraient de l'impact de la recombinaison en situation naturelle de coinfection.

Des analyses phylogénétiques d'isolats peuvent aussi être envisagées dans différentes populations animales infectées par différentes souches et sous-types d'herpèsvirus. A la lumière des résultats récemment obtenus chez l'HSV-1 (Norberg *et al.*, 2004) et le BoHV-4 (Dewals *et al.*, 2006), ces analyses réalisées chez d'autres herpèsvirus permettraient de valider l'obstinante hypothèse du rôle fondamental de la recombinaison au cours de l'évolution de cette famille virale sophistiquée.

REFERENCES

- DEWALS B., THIRION M., MARKIN-GORIAYNOFF N., GILLET L., DE FAYS K., MINNER F., DAIX V., SHARP P.M., VANDERPLASSCHEN A. Evolution of bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between african buffalo and cattle. *J. Gen. Virol.*, 2006, **87**, 1509-1519.
- JAVIER R.T., SEDERATI F., STEVENS J.G. Two avirulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants in vivo. *Science*, 1986, **234**, 746-748.
- MEURENS F., SCHYNTS F., KEIL G.M., MUYLKENS B., VANDERPLASSCHEN A., GALLEGO P., THIRY E. Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 2004a, **78**, 3872-3879
- MEURENS F., KEIL G.M., 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.*, 2004b, **78**, 9828-9836.
- NORBERG P., BERGSTOM T., REKABDAR E., LINDH M., LILJEQVIST J.A. Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses. *J. Virol.* 2004, **78**, 10755-10764.
- SCHYNTS F., MEURENS F., 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., MEURENS F., MUYLKENS B., MCVOY M., GOGEV S., THIRY J., VANDERPLASSCHEN A., EPSTEIN A., KEIL G.M., SCHYNTS F. Recombination in alphaherpesviruses. *Rev. Med. Virol.* 2005, **15**, 89-103.
- MUYLKENS B., MEURENS F., SCHYNTS F., DE FAYS K., POURCHET A., THIRY J., VANDERPLASSCHEN A., ANTOINE N., THIRY E. Biological characterization of bovine herpesvirus 1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. *Vet. Microbiol.*, 2006, **113**, 283-91.
- MUYLKENS B., MEURENS F., SCHYNTS F., FARNIR F., POURCHET A., BARDIAU M., GOGEV S., THIRY J., CUISENAIRE A., VANDERPLASSCHEN A., THIRY E. Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J. Gen. Virol.*, 2006, **87**, 2149-2154.
- MUYLKENS B., GRISART B., MEURENS F., SCHYNTS F., VANDERPLASSCHEN A., THIRY E. Recombination mosaics and negative genetic interference in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1, in preparation.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- MUYLKENS B., MEURENS F., SCHYNTS F., THIRY E. Les facteurs de virulence des alphaherpèsvirus. *Virologie*, 2003, **7**, 1-15.

REMERCIEMENTS

Les recherches poursuivies dans le cadre de ce travail ont été subventionnées par le Service Public Fédéral, Santé Publique, Administration Recherche et Développement et le Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (convention 2.4508.02). Benoît Muylkens est aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.