



Faculté de Médecine Vétérinaire  
Service d'immunologie-vaccinologie

## Clonage du génome de l'herpèsvirus cyprin 3 en tant que chromosome artificiel bactérien

Cloning of the genome of Cyprinid herpesvirus 3 as an infectious bacterial artificial chromosome



**Dr. Guillaume Fournier**

**Mémoire de Formation Doctorale  
en Sciences Vétérinaires  
Année Académique 2007-2008**





**FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE**  
**SERVICE D'IMMUNOLOGIE-VACCINOLOGIE**

Promoteur : Prof. A. Vanderplasschen  
Co-promoteur : Dr. B. Costes

**Clonage du génome de l'herpèsvirus cyprin 3 en tant que  
chromosome artificiel bactérien**

**Cloning of the genome of Cyprinid herpesvirus 3 as an infectious  
bacterial artificial chromosome**

**Dr. Guillaume Fournier**

**Mémoire de Formation Doctorale  
en Sciences Vétérinaires**

**ANNEE ACADEMIQUE 2007-2008**

## **Remerciements**

*Au cours de mes études de médecine vétérinaire, j'ai rencontré un certain nombre d'encadrants et professeurs qui ont su aiguïser mes curiosité et désir. L'un d'eux m'a passionné pour l'immunologie. Je tiens donc à commencer par le Professeur Alain Vanderplasschen, qui m'a accueilli à bras ouverts dès mon stage de fin d'étude, me laissant goûter au plaisir de la recherche, et qui a renouvelé sa confiance en supervisant ma thèse. Je voudrais lui témoigner mon admiration pour son entrain et sa clairvoyance scientifique.*

*Je souhaite également remercier le Docteur Bérénice Costes qui m'a pris sous son aile et m'encadre énergiquement dans toutes mes manipulations depuis le début. Son expérience et sa rigueur n'ont d'égal que sa ténacité et viennent à bout de tout ce qu'elle entreprend.*

*Merci au Professeur Etienne Thiry pour m'avoir accueilli au sein du département des maladies infectieuses et parasitaires.*

*Je voudrais aussi témoigner ma reconnaissance à tous les habitants du laboratoire. Muriel Thirion et Hélène Schroeder qui ont gentiment accepté de partager leur bureau et que je n'ai eu de cesse d'assaillir de questions... pointilleuses. Benjamin Michel et Christel Boudry, compagnons de toutes les échappées, pour leur bonne humeur permanente. Sophie Vankerckhove et sa patience, Stalinraj Victor et son énergie toute indienne, Laurent Gillet, puits de connaissance à l'humour... unique, Dominique Ziant qui répond toujours calmement à mes incessantes questions, Lorène Dams toujours prête à passer des cellules pour la veille, Cédric et Charles, les malicieux complices qui s'occupent de tous les animaux du laboratoire...Christina et Jessica pour leur disponibilité et leur complicité. Mais aussi à Axel, Alexandra, Angélique, Elisabeth et Julien. Sans oublier les anciens membres du laboratoire partis vers d'autres horizons; Nicolas pour ses conseils avisés, Christophe pour sa bonne humeur et Anne-Claire qui je l'espère trouvera sa voie.*

*Merci à tous, que j'ai si souvent importuné par mes questions nombreuses... et qui contribuez à cette agréable atmosphère régnant dans le laboratoire...Notamment Céline et Bénédicte compagnons de voyage depuis déjà 7 ans et que j'ai toujours autant de plaisir à côtoyer.*

*Ce travail a été réalisé grâce au soutien du Fond pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour la bourse qui m'a été accordée. (bourse F.R.I.A. octroyée du 01/10/2007 au 31/12/2009).*

*Je voudrais ici remercier ma famille et amis proches. Mes parents pour la curiosité hétéroclite qu'ils m'ont inculqué, pour m'avoir soutenu et encouragé dans toutes mes entreprises et pour l'intérêt manifeste qu'ils portent à mes activités de recherche. Mon frère et ma sœur que je vois si peu et me témoignent pourtant tout leur amour dès que je les retrouve. Merci aussi à mes beaux-parents qui sont toujours attentifs à mes préoccupations et à mes amis que je côtoie tous les jours ou presque et qui me soutiennent Nathalie, Mathias, Philip, Daniel, Angelina,...*

*Enfin, Sophie Romain, merci à toi mon cher et tendre amour qui m'a poussé à me lancer dans cette superbe aventure, qui m'épaule dans les moments heureux mais aussi de doutes et fais de ma vie ce que jamais je n'aurais espéré il y a encore quelques années. Si la recherche est un tremplin, tu seras mes ailes.*

*Je te remercie encore Alain de cette invitation à la recherche pour les années à venir...*

---

## Liste des abréviations

---

Aa :	Acide aminé
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ATP :	Adénosine triphosphate
BAC :	Bacterial artificial chromosome
BoHV-4 :	Bovine herpesvirus-4
bp :	Base pair
CCB :	Cyprinus carpio brain
CeHV-17 :	Cercopithecine herpesvirus 17
CER :	Centre d'Economie Rurale (situé à Marloie en Belgique)
CNGV :	Carp nephritis and gill necrosis virus
CyHV-1 :	Cyprinid herpesvirus-1
CyHV-2 :	Cyprinid herpesvirus-2
CyHV-3 :	Cyprinid herpesvirus-3
DNA :	Deoxyribonucleic acid
dsDNA :	Double-stranded deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EGFP :	Enhanced green fluorescent protein
EHV-1 :	Equine herpesvirus-1
EHV-4 :	Equine herpesvirus-4
EiHV-1 :	Elephantid herpesvirus-1
FCS :	Fetal calf serum
FeHV-1 :	Felid herpesvirus-1
FL :	François Liefbrig
Fw :	Forward primer
<i>GalK</i> :	Galactokinase
GAM :	Goat anti-mouse
GAR :	Goat anti-rabbit
GPCR	G-protein-coupled receptor
HCMV :	Human cytomegalovirus
HHV-1 :	Human herpesvirus-1
HHV-2 :	Human herpesvirus-2
HHV-3 :	Human herpesvirus-3
HHV-4 :	Human herpesvirus-4
HHV-5 :	Human herpesvirus-5
HHV-6 :	Human herpesvirus-6
HHV-7 :	Human herpesvirus-7
HHV-8 :	Human herpesvirus-8
hpi :	Heures post-infection
IcHV-1 :	Ictalurid herpesvirus-1

---

ICTV :	International Committee on Taxonomy of Viruses
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
ILTV :	Infectious laryngotracheitis virus
IP :	Intrapéritonéal
IR :	Internal repeat
Kb :	kilopaires de bases nucléotidiques
KHV :	Koi herpesvirus
KHVD :	Koi herpesvirus disease
LAMP :	Loop-mediated isothermal amplification
LTR :	Left terminal repeat
MCMV :	Murine cytomegalovirus
MDV :	Marek's disease virus
MEM :	Milieu de culture
MOI :	Multiplicity of infection
MS :	Marker size
MuHV-4 :	Murid herpesvirus-4
NAD :	Nicotinamide adenine dinucleotide
Neo <sup>R</sup> :	Resistance à la néomycine
NLS :	Nuclear localization signal
OIE :	Office internationale des epizooties
ORF :	Open reading frame
OsHV-1 :	Ostreid herpesvirus-1
OTU :	Operational Taxonomic Unit
PBS :	Phosphate-buffered saline
PCR :	Polymerase chain reaction
PFU :	Plaque-forming units
pi :	Post-infection
R :	Repeat
RaHV-1 :	Ranid herpesvirus-1
Rev :	Reverse primer
RTR :	Right terminal repeat
SaHV-2 :	Saimiriine herpesvirus-2
SalHV-1 :	Salmonid herpesvirus-1
SalHV-2 :	Salmonid herpesvirus-2
SuHV-1 :	Suid herpesvirus-1
TK :	Thymidine kinase
TMPK :	Thymidylate kinase
TR :	Terminal repeat
UL :	Unit long
US :	Unit short
WT :	Wild type

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>3</b>
1. Les herpesvirus.....	4
1.1 Structure des virions.....	4
1.2 Caractéristiques du génome.....	4
1.3 Propriétés biologiques communes.....	4
1.4 Cycle biologique.....	6
1.4.1 L'infection productive ou lytique.....	6
1.4.2 L'infection latente.....	9
1.5 Classification des herpesvirus.....	9
2 L'herpesvirus cyprin 3.....	11
2.1 Généralités.....	11
2.2 L'herpesvirus cyprin 3 : l'agent responsable de l'herpès virose chez la carpe.....	11
2.3 Caractéristiques générales et moléculaires.....	15
3 Le BAC clonage.....	17
4 Objectifs.....	20
<b>Section expérimentale</b> .....	<b>23</b>
<i>Article:</i>	
"Cloning of the koi herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome demonstrates that disruption of the thymidine kinase locus induces partial attenuation in <i>Cyprinus carpio koi</i> "	
<i>J Virol, 2008, vol. 82 (10), 4955-4964</i>	
<b>Discussion et perspectives</b> .....	<b>34</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>39</b>

## Résumé

---

L'herpèsvirus de la carpe koi (KHV), ou herpèsvirus cyprin 3 (CyHV-3) est l'agent responsable d'une maladie mortelle chez les carpes koi et commune. Dans cette étude, nous avons décrit le clonage du génome du KHV sous forme d'un chromosome artificiel bactérien (BAC) stable et infectieux permettant la production de souches recombinantes du KHV. Cet objectif a été atteint par l'insertion d'une cassette BAC flanquée de sites *loxP* au sein du gène de la thymidine kinase (TK). Cette insertion a généré un plasmide BAC stable en bactéries et a permis de régénérer des virions par transfection en cellules permissives. Ainsi, des virions excisés pour la cassette BAC et possédant un gène TK tronqué ont été produits. De la même manière, des virions révertants pour TK ont également été produits. Les souches FL BAC excisée et révertante se répliquent de manière comparable à la souche parentale *in vitro*. La souche révertante a induit une maladie comparable à la souche sauvage, tandis que la souche excisée a présenté un phénotype partiellement atténué. Enfin, l'utilité du BAC KHV pour la production de recombinants a été démontrée par la production d'une souche délétée pour l'ORF16 grâce au principe de recombinaison en système procaryote. L'obtention du BAC KHV est une avancée importante qui permettra l'étude des gènes viraux impliqués dans la pathogénie du KHV ainsi que la production de vaccins recombinants atténués.

### Mots clés :

Herpèsvirus cyprin 3, Chromosome artificiel bactérien, Thymidine Kinase.

## Summary

---

### **Cloning of the genome of cyprinid herpesvirus 3 as an infectious bacterial artificial chromosome.**

Koi herpesvirus (KHV) or Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) is the causative agent of a lethal disease in koi and common carp. In the present study, we described the cloning of the KHV genome as a stable and infectious BAC clone that can be used to produce KHV recombinant strains. This goal was achieved by insertion of a *loxP*-flanked BAC cassette into the thymidine kinase (TK) locus. This insertion led to a BAC plasmid that was stably maintained in bacteria and was able to regenerate virions when transfected into permissive cells. Reconstituted virions free of the BAC cassette but with a disrupted TK locus were produced. Similarly, virions with a wild type revertant TK sequence were produced. The FL BAC excised strain and the FL BAC revertant strain replicated comparably to the parental FL strain. The FL BAC revertant strain induced KHV in koi carp that was indistinguishable from that of the parental strain, while FL BAC excised strain exhibited a partially attenuated phenotype. Finally, the usefulness of the KHV BAC for recombinant studies was demonstrated by production of an ORF16 deleted strain using prokaryotic recombination technology. The availability of KHV BAC is an important advance that will allow the study of viral genes involved in KHV pathogenesis, as well as the production of attenuated recombinant candidate vaccines.

#### **Key words :**

Cyprinid herpesvirus 3, Bacterial artificial chromosome, Thymidine Kinase.

---

## **Introduction**

---

# Introduction

---

## 1. Les herpesvirus

(Pour une revue de la littérature (Roizman et Pellet, 2001))

La famille des *Herpesviridae*, extrêmement répandue dans la nature, compte plus de 120 virus à ADN de grande taille. Ces virus sont capables d'infecter un grand nombre d'hôtes aussi divers que l'homme, des primates non humains, d'autres mammifères, des oiseaux, des reptiles, des amphibiens, des poissons et au moins un invertébré: l'huître (16).

### 1.1. Structure des virions

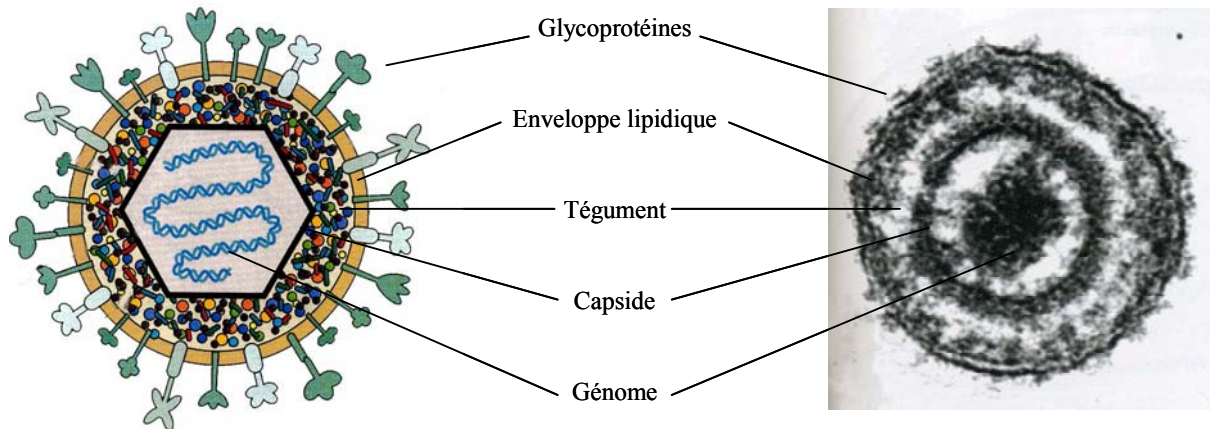
Les herpesvirus sont composés d'un *core* contenant une molécule d'ADN double brin linéaire ainsi que quelques molécules d'ARN (9). Ce *core* est entouré d'une nucléocapside de symétrie icosaédrique d'environ 100 nm de diamètre composée de 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères). La nucléocapside est elle-même recouverte d'un tégument : substance amorphe contenant des protéines ayant notamment des propriétés régulatrices lors de la transcription. Ce tégument est enfin entouré d'une enveloppe qui porte des projections à sa surface d'environ 8 nm de long : les glycoprotéines virales. La particule virale apparaît donc comme une sphère pouvant mesurer 120 à 300 nm de diamètre (Figure 1).

### 1.2. Caractéristiques du génome

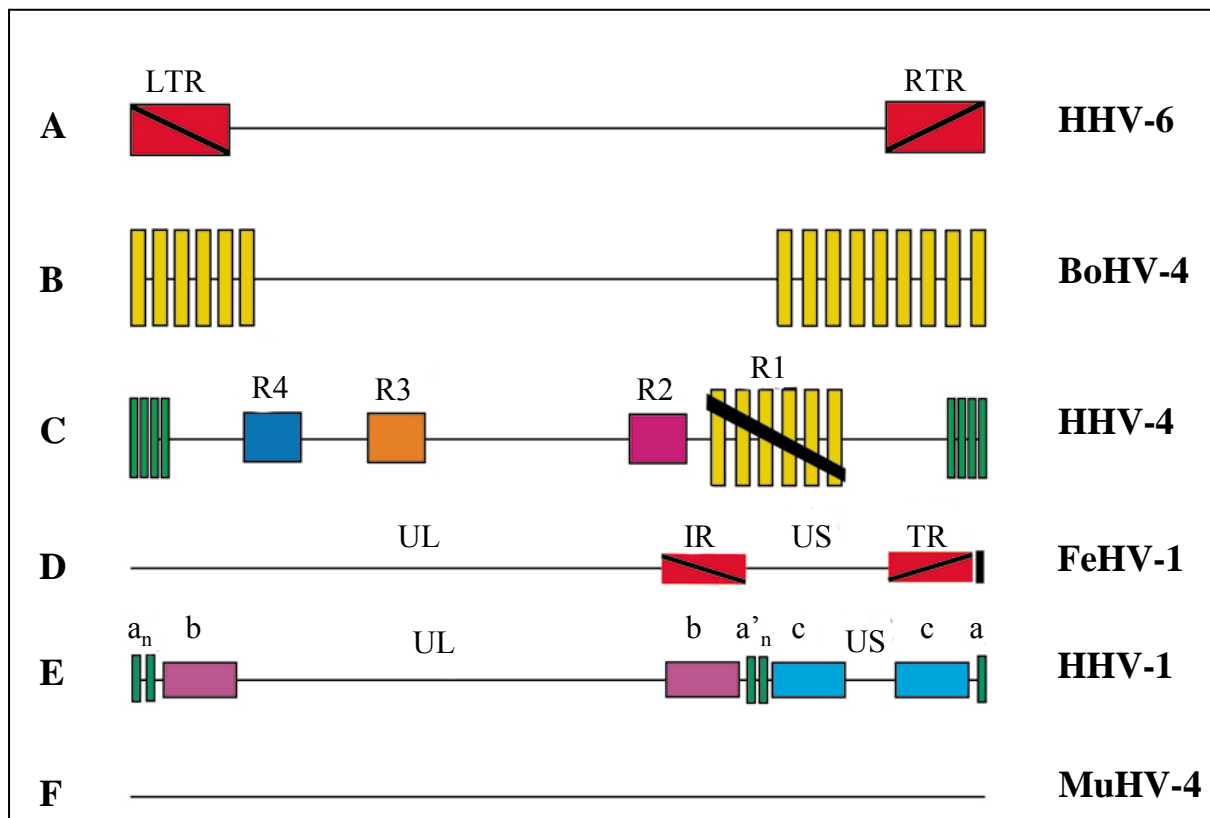
Le génome viral peut, en fonction de l'espèce virale considérée, comporter 124 à 295 kilo paires de bases nucléotidiques (kb). On observe également jusqu'à 10 kb d'écart entre différents isolats d'une même espèce selon le nombre de séquences répétées terminales et/ou internes. La composition en bases guanine et cytosine varie de 32 à 75 % selon l'espèce virale. Les génomes des herpesvirus ont été classés en six groupes dénommés: A, B, C, D, E et F sur base de l'arrangement de leur séquence ADN. Ces groupes sont décrits dans la Figure 2.

### 1.3. Propriétés biologiques communes

Les herpesvirus partagent quatre propriétés biologiques majeures. Premièrement, ils possèdent leur propre machinerie enzymatique qui intervient notamment dans le métabolisme des acides nucléiques. Deuxièmement, la synthèse de l'ADN viral et l'assemblage des capsides ont lieu dans le noyau de la cellule infectée. Troisièmement, la production des virions s'accompagne le plus souvent



**Figure 1 : Morphologie des herpesvirus.** Représentation schématique et photographie en microscopie électronique à contraste négatif d'une particule d'herpesvirus (Adapté de Flint *et al.*, 2004).



**Figure 2 : Représentation schématique des six groupes de génome des herpesvirus.** Les lignes horizontales représentent les régions uniques. Les rectangles représentent les régions répétées. Abréviations: LTR, Left terminal repeat; RTR, Right terminal repeat; R1-4, Repeat 1-4; UL, Unit long; US, Unit short; IR, Internal repeat; TR, Terminal repeat; HHV, Human herpesvirus; BoHV, Bovine herpesvirus; FeHV, Felid herpesvirus; MuHV, Murid herpesvirus (Adapté de Roizman & Pellet, 2001).

d'une lyse irréversible de la cellule infectée. Enfin, tous les herpèsvirus étudiés à ce jour sont capables de se maintenir à l'état latent chez leur hôte naturel.

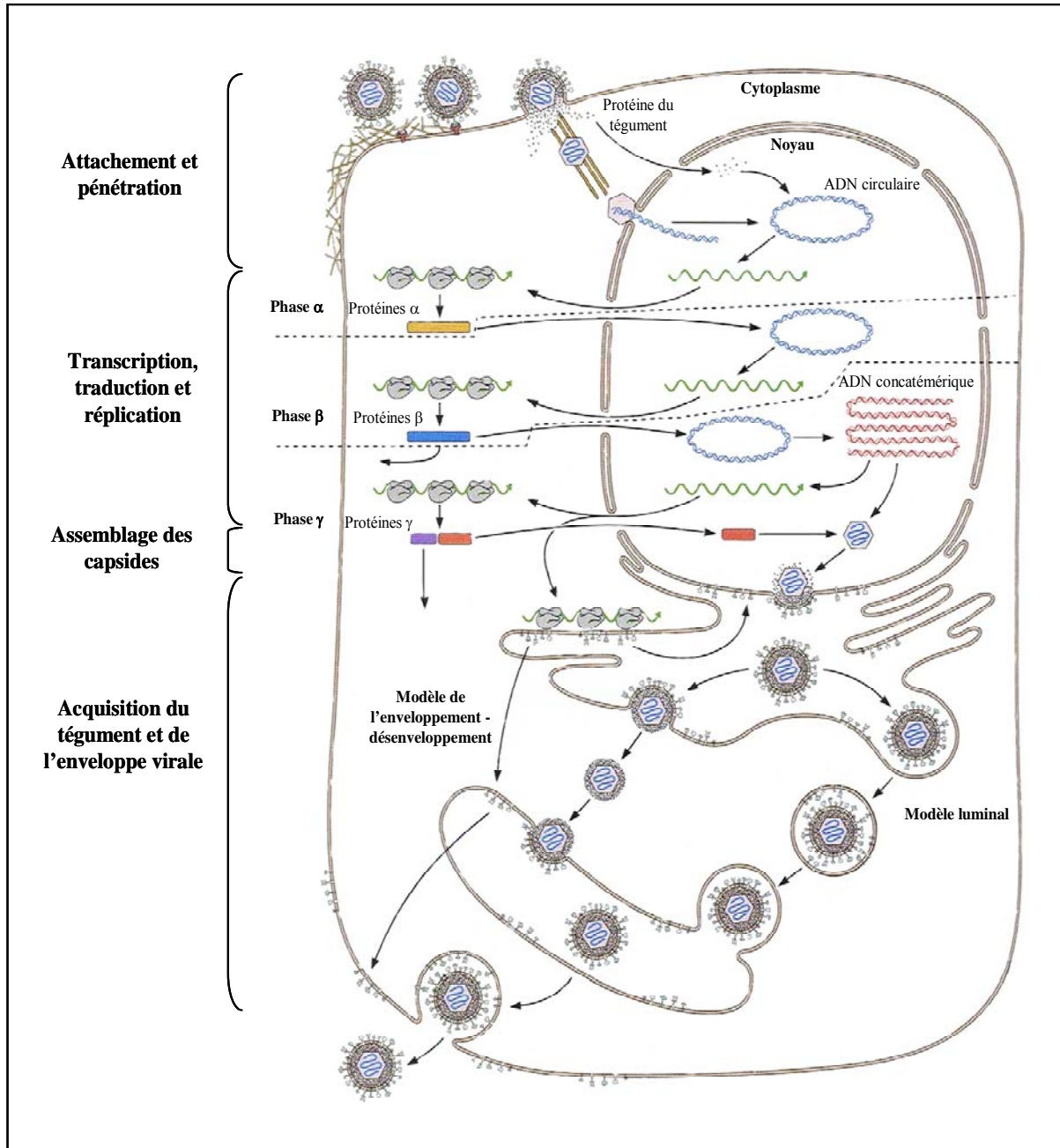
## 1.4. Cycle biologique

Les herpèsvirus peuvent établir deux types d'infection: l'infection dite productive ou lytique (Figure 3) et l'infection latente (Figure 5).

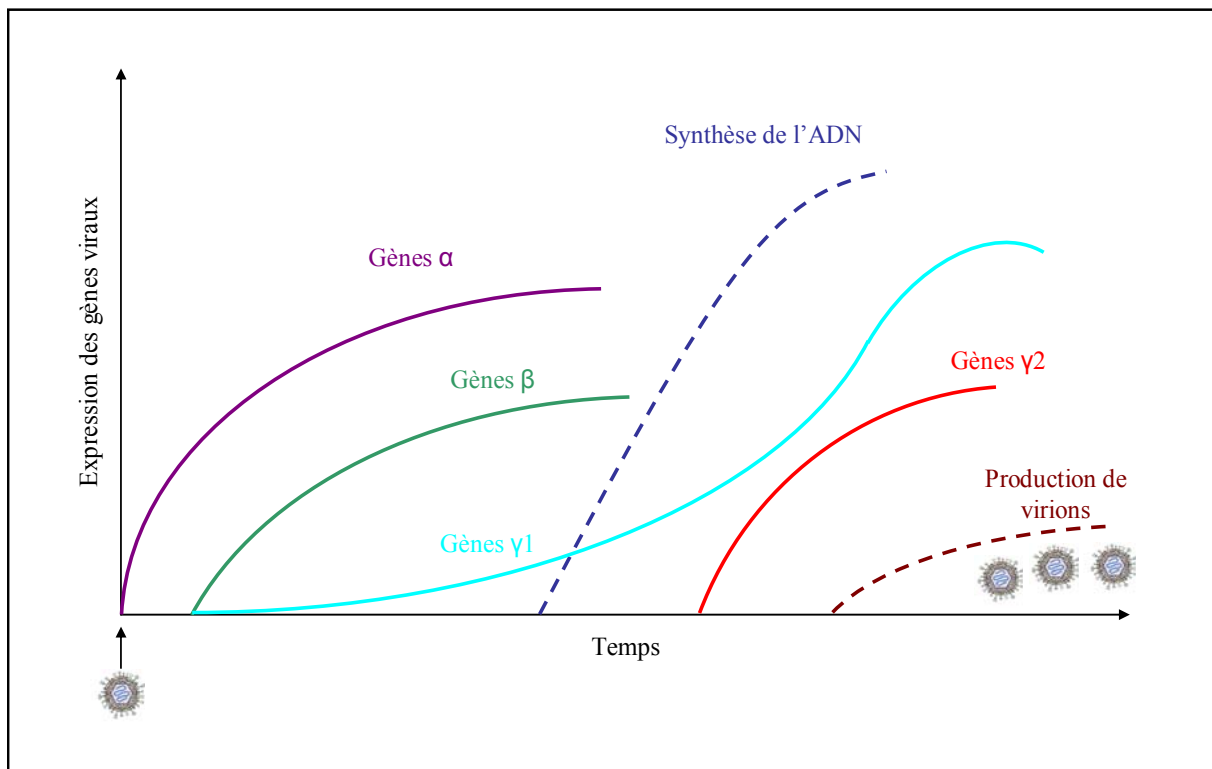
### 1.4.1. L'infection productive ou lytique

La première étape de l'infection lytique consiste en l'attachement du virion à la surface cellulaire (Figure 3). Il met en jeu des interactions entre une ou plusieurs glycoprotéines de l'enveloppe virale et un ou plusieurs récepteurs cellulaires (65). L'interaction avec les récepteurs cellulaires entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique et la pénétration du virus. Suite à la fusion, la nucléocapside et les protéines du tégument sont libérées dans le cytoplasme où la nucléocapside s'attache aux microtubules pour être transportée vers le noyau (63). Certaines protéines du tégument peuvent aussi être transportées vers le noyau où elles activent la transcription du génome viral et répriment la synthèse des protéines cellulaires. La nucléocapside délivre son ADN dans le noyau au niveau d'un pore nucléaire. Dès son entrée dans le noyau, l'ADN viral se circularise en l'absence de toute synthèse protéique virale préalable (22). Cette observation suggère un mécanisme de circularisation sous la dépendance de protéines cellulaires ou de protéines virales de structure (52). La transcription de l'ADN viral débute alors dans le noyau.

La transcription des gènes viraux se déroule en trois phases successives strictement contrôlées dans le temps: la phase  $\alpha$  ou précoce-immédiate, la phase  $\beta$  ou précoce et la phase  $\gamma$  ou tardive (Figures 3 et 4). La transcription des gènes  $\alpha$ , réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire, est activée par des protéines du tégument interagissant avec des facteurs transcriptionnels cellulaires. Les gènes  $\alpha$  codent essentiellement pour des protéines de régulation. Une fois traduites dans le cytoplasme, certaines protéines  $\alpha$  vont être importées dans le noyau où, en plus d'exercer un rétrocontrôle négatif sur leur propre expression, elles vont activer l'expression des gènes  $\beta$  et  $\gamma$ . Les gènes  $\beta$  atteignent leur pic d'expression dans les quatre à huit heures suivant l'infection. Ils codent essentiellement pour des protéines à activité enzymatique impliquées dans le métabolisme nucléotidique et la réplication de l'ADN viral. Les protéines  $\beta$  exercent un rétrocontrôle négatif sur leur propre expression et vont à leur tour activer l'expression des gènes  $\gamma$  dont le pic d'expression n'est atteint qu'une fois la réplication de l'ADN viral entamée. Les gènes  $\gamma_1$  ou tardifs partiels peuvent s'exprimer avant la réplication de l'ADN viral alors que l'expression des gènes  $\gamma_2$  ou tardifs réels est dépendante de la réplication de l'ADN viral. Les gènes tardifs codent pour les protéines de structure du virus composant la capsid, le



**Figure 3 : Cycle de multiplication des herpesvirus.** Infection productive ou lytique (Adapté de Flint *et al.*, 2004).



**Figure 4 : Cinétique d'expression des gènes des herpèsvirus.**

tégument ainsi que l'enveloppe et exercent un rétrocontrôle négatif sur l'expression des gènes  $\alpha$  et  $\beta$ . Les protéines de capsid, une fois synthétisées, sont transportées dans le noyau de la cellule pour s'y assembler et encapsider l'ADN génomique synthétisé.

La réplication de l'ADN viral circularisé débute au niveau des origines de réplication. Elle se déroule selon le mécanisme des «cercles roulants». Selon ce mécanisme, la réplication donne naissance à des structures intermédiaires de haut poids moléculaire appelées concatémères. Ces derniers sont de longues molécules d'ADN constituées de plusieurs unités génomiques liées bout à bout de façon covalente. Ils sont clivés, par une activité endonucléasique, en unités génomiques simples pendant l'encapsidation de l'ADN viral et sont intégrés dans des capsides néoformées selon un mécanisme d'encapsidation appelé «headful». Les nucléocapsides néoformées sont alors transportées vers la périphérie nucléaire. Leur trajet au travers de la barrière nucléocytoplasmique ainsi que l'acquisition du tégument et de l'enveloppe ne sont pas encore complètement élucidés.

#### **1.4.2. L'infection latente**

La latence est observée chez les herpèsvirus. Elle consiste au maintien de l'information génétique du virus, au sein du noyau cellulaire, sous forme d'un épisode circulaire en l'absence de multiplication virale (Figure 5). L'initiation de l'infection latente se déroule comme le début de l'infection lytique mis à part que la transcription des gènes viraux est sévèrement réduite. La manière dont la cascade de transcription normale est bloquée ou réduite reste un sujet de recherches et de débats. L'état de latence peut être interrompu à la suite de stimuli exogènes. Les changements dans la physiologie cellulaire permettent alors à l'infection lytique de redémarrer. Le génome viral est alors transcrit plus efficacement et est répliqué afin que de nouveaux virions soient produits.

#### **1.5. Classification des herpèsvirus**

La famille des *Herpesviridae* a été divisée en trois sous-familles dénommées *alpha-*, *beta-* et *gammaherpesvirinae* sur base de propriétés biologiques spécifiques (Figure 6).

La sous-famille des *alphaherpesvirinae* regroupe des virus généralement caractérisés par un spectre d'hôtes large, un cycle de multiplication court, une croissance rapide en culture cellulaire et la capacité de se maintenir à l'état latent, principalement mais pas exclusivement, dans les ganglions sensoriels.

Les membres de la sous-famille *betaherpesvirinae* sont caractérisés par un spectre d'hôtes généralement restreint. Leur cycle de multiplication est lent, tout comme la progression de l'infection en culture cellulaire. Ils provoquent souvent une hypertrophie des cellules infectées avec apparition de

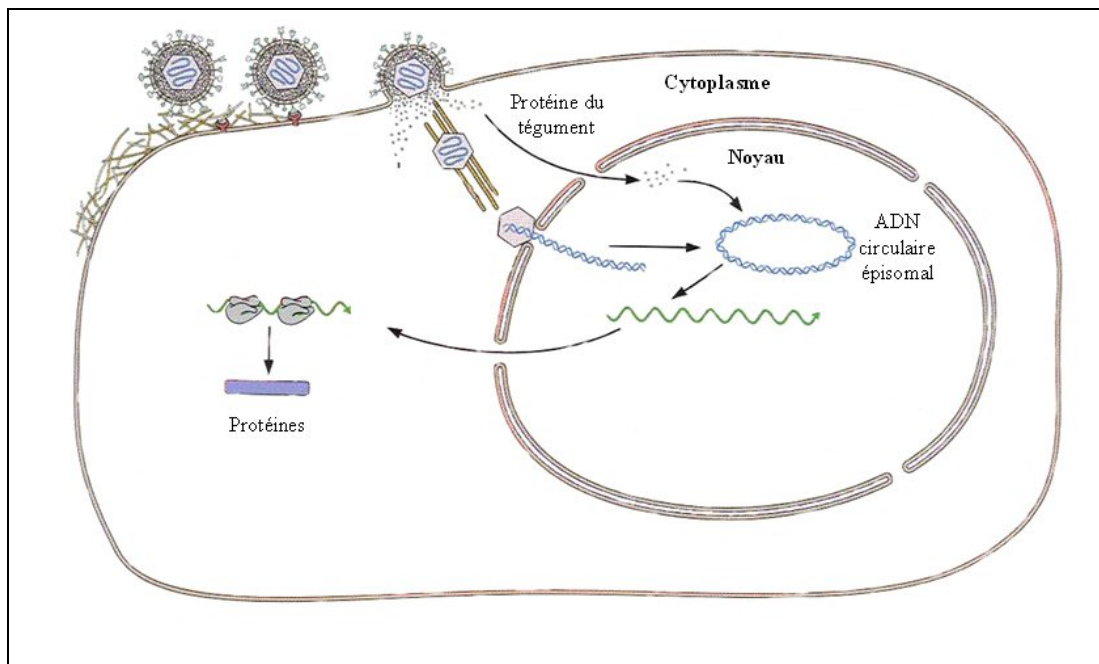


Figure 5 : Cycle de multiplication des herpesvirus. Infection latente (Adapté de Flint *et al.*, 2004).

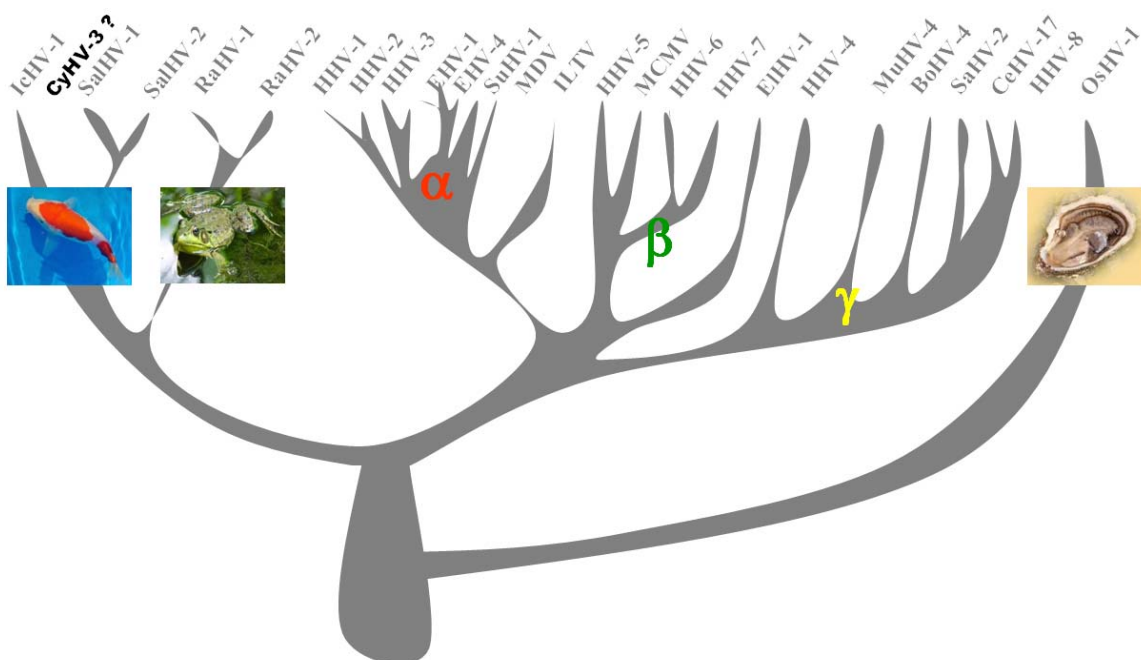


Figure 6 : Arbre phylogénétique des principaux herpesvirus. Représentation des trois branches évolutives menant aux herpesvirus d'invertébrés, de poissons et des mammifères dont les trois sous-familles  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont représentées (Adapté de Davison, 2002).

vacuoles cytoplasmiques et nucléaires. Ces virus sont latents notamment dans les glandes sécrétoires et dans les cellules lymphoréticulaires.

Les *gammaherpesvirinae* possèdent un spectre d'hôtes étroit, généralement restreint à la famille ou à l'ordre auquel l'hôte naturel appartient. De nombreux membres de cette sous-famille sont capables d'infecter des lymphocytes *in vitro*. *In vivo*, ces virus persistent à l'état latent dans les lymphocytes ou les tissus lymphoïdes. L'infection est fréquemment associée à des désordres lymphoprolifératifs et beaucoup de gammaherpèsvirus sont impliqués dans l'oncogenèse.

De nombreux herpèsvirus divergeants de ceux des mammifères depuis plus de 400 millions d'années (41) restent à ce jour non classés, ce qui laisse présager de l'existence de sous-familles supplémentaires. Citons par exemple les herpèsvirus d'amphibien et de poissons, tels que l'herpèsvirus du poisson chat (Ictalurid herpesvirus 1, IchV-1) et les herpèsvirus de carpes (herpèsvirus cyprin 1, -2, et -3, CyHV-1, -2 et -3) qui seraient assignés à la famille des *Alloherpesviridae* ainsi que l'herpèsvirus de mollusque de la famille des *Malacoherpesviridae* (57).

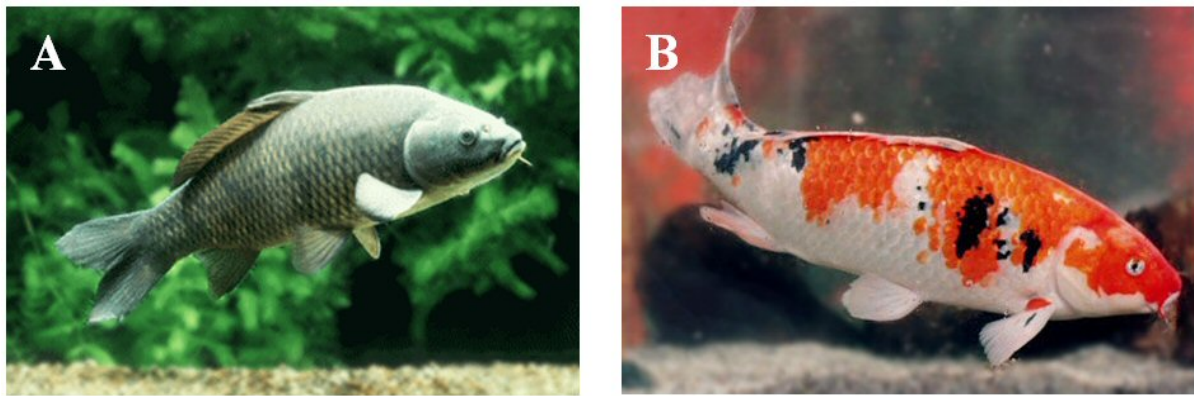
## 2. L'herpèsvirus cyprin 3

### 2.1. Généralités

La carpe commune (*Cyprinus carpio carpio*) est en terme de tonnage le premier poisson élevé pour la consommation humaine, principalement en Asie, en Europe et dans les pays de l'Est (5). Sa sous-espèce, la carpe koi (*Cyprinus carpio koi*), est par contre un poisson d'ornement très cher élevé seulement par les amateurs de ces poissons colorés (Figure 7). Les carpes sauvages ou d'élevage sont aujourd'hui exposées à de nombreux agents viraux. Avec la virémie printanière, l'herpèsvirose de la carpe est la maladie virale la plus préoccupante pour les pisciculteurs entraînant des pertes économiques considérables (29).

### 2.2. L'herpèsvirus cyprin 3 : l'agent responsable de l'herpèsvirose de la carpe

L'herpèsvirose de la carpe a été détectée pour la première fois en 1996 en Angleterre, cependant, le premier rapport scientifique n'a été publié qu'en 1998 (4, 32, 33). Ce rapport décrit l'apparition d'une maladie mortelle aux Etats-Unis et en Israël parmi les populations de carpes communes et de carpes koi. Les cultures intensives de carpes communes ainsi que le commerce international et les nombreuses exhibitions de carpes koi ont rapidement contribué à la dissémination de cette maladie à travers le monde. Elle s'est ainsi répandue très vite sous forme d'épidémie dans de nombreux pays tels que la Belgique (1999), la Chine (2001), l'Allemagne (2002), la France et le Japon (2003) (Tableau I) (53). Ces épidémies sont devenues un problème majeur entraînant de lourdes pertes économiques et financières aussi bien dans l'industrie de la carpe commune que dans celle de la carpe



**Figure 7 : Spécimens de carpes. (A)** Carpe commune (*Cyprinus carpio carpio*). **(B)** Carpe koi (*Cyprinus carpio koi*).

**Tableau I : Propagation du KHV à l'échelle planétaire au cours des dernières années (Adapté de Pokorova *et al.*, 2005).**

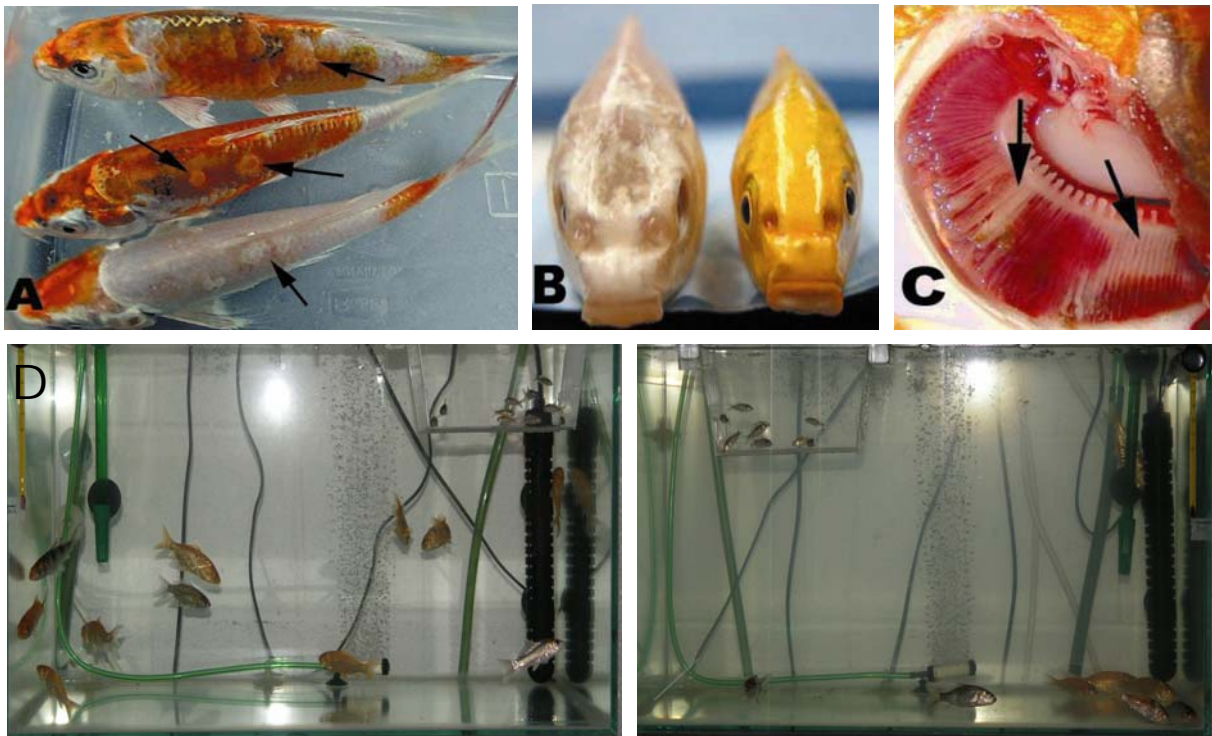
Pays	Situation concernant le KHV en 2005
<b>En Europe</b>	
Allemagne	Première épidémie en 1997.
Autriche	Première épidémie détectée en 2003 parmi des carpes koi d'un étang privé.
Belgique	Depuis 1999, on rapporte des épidémies avec plus de 90% de mortalité.
Danemark	Détecté en juillet 2002.
France	Deux suspicions en 2001, puis détection sur des carpes provenant d'Israël en 2003.
Italie	Détection en 2003.
Luxembourg	Détection en 2003
Pays-Bas	Première infection en 2001.
Pologne	Première détection en 2003 suivie de deux épidémies en 2004.
Royaumes Unis	Suspicion en 1996-98-99, isolement en 2000, 36 épidémies en 2002 et confirmation en 2003.
Suisse	Suspicion en 2001, épidémie en 2003.
<b>En Asie</b>	
Indonésie	Détection depuis 2002.
Israël	Premier diagnostic en 1998 sur des carpes provenant d'Europe suivi d'épidémies régulières.
Japon	Détection depuis mai 2003.
Taiwan	Première épidémie rapportée en 2002 suivie d'épidémies en 2003 et 2004.
Thaïlande	Détection lors d'une exportation pour l'Allemagne.
<b>En Afrique</b>	
Afrique du Sud	Deux épidémies rapportées en 2001 et 2003.
<b>En Amérique du Nord</b>	
USA	Première épidémie en 1998.

koi. L'herpès-virose de la carpe a été ajoutée en 2005 au manuel diagnostique des animaux aquatiques de l'Office International des Epizooties (OIE) et sa possible introduction dans la liste des maladies contagieuses à déclaration obligatoire est en discussion à l'heure actuelle.

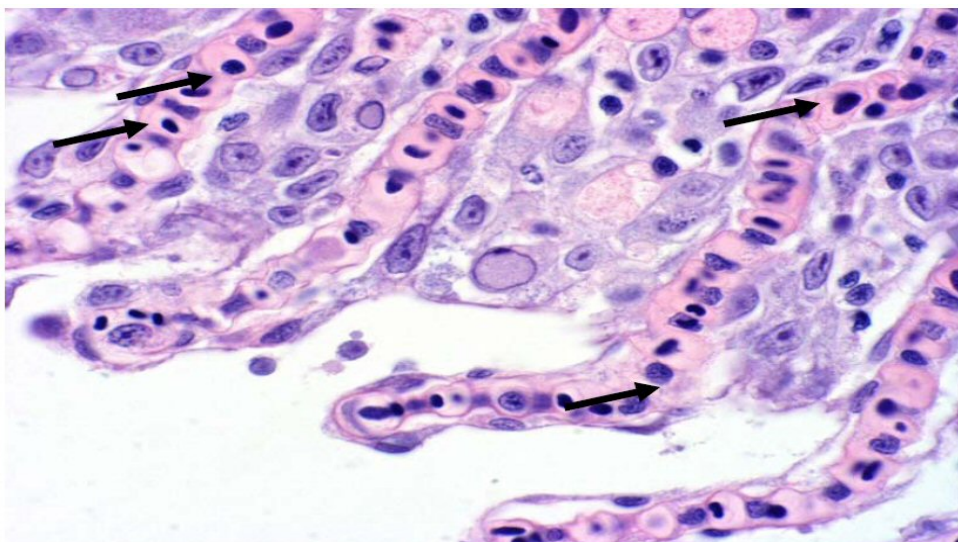
L'herpès-virose de la carpe est une maladie mortelle (70-100% de mortalité) et hautement contagieuse affectant les carpes de tout âge (36). Seule l'espèce carpe (*Cyprinus carpio*) semble présenter les symptômes typiques de la maladie. Cependant, de récentes études ont mis en évidence la présence du CyHV-3 chez d'autres espèces telles que le poisson rouge (*Carassius auratus*) et le carassin commun (*Carassius carassius*), posant l'hypothèse de l'existence d'espèces porteuses (20, 58). L'herpès-virose de la carpe est une maladie saisonnière apparaissant au printemps et en automne quand la température de l'eau oscille entre 18°C et 25°C (53). Les signes cliniques sont souvent non spécifiques. Les poissons infectés montrent tout d'abord une perte d'appétit et d'activité associés à une nage ralentie au fond ou en surface des bassins et l'aplatissement de la nageoire dorsale (Figure 8). Ensuite, ils présentent généralement des mouvements incohérents caractéristiques d'un état de suffocation. Les signes cliniques les plus consistants sont la décoloration tégumentaire associée à un gonflement, de l'énophtalmie, une augmentation de la fréquence respiratoire et des lésions branchiales pouvant aller de la congestion jusqu'à l'apparition de nécrose focale (Figure 8 et 9). On rapporte aussi une hypersécrétion de mucus et un œdème variable (36, 53).

Les voies de pénétration du virus dans l'organisme sont encore incertaines. Plusieurs études postulent une voie d'entrée au niveau des branchies ou des intestins (32, 50). Cependant une étude récente menée au sein du laboratoire d'accueil tend à démontrer un tropisme cutané (Costes B., communication personnelle). La période d'incubation est de 14 jours après mise en présence de poissons naïfs avec des poissons infectés (50). La multiplication du virus induit la fusion cellulaire et une vacuolisation cytoplasmique intense suivies d'une lyse des cellules (Figure 10) (51). Les lésions branchiales seraient vraisemblablement liées à des infections bactériennes secondaires. Le virus peut être isolé dans le sang dès 3 jours post-infection et dans de nombreux tissus (reins, nageoires, foie, rate, intestins, système nerveux central) dès 5 jours post-infection (32, 51). Le virus est retrouvé dans les fèces et peut donc se transmettre via l'eau (19). A l'heure actuelle, aucune étude ne permet de confirmer la persistance du virus sous une forme latente. Les résultats des recherches menées jusqu'à présent suggèrent que les carpes infectées dans certaines conditions peuvent développer une infection de type chronique mais non systématique (66). La réponse à cette question est non seulement importante pour la caractérisation du virus mais présente également des implications économiques puisqu'à l'heure actuelle on ne sait toujours pas comment et où le virus est conservé entre les épisodes aigus et comment on pourrait empêcher la dissémination du virus.

Le diagnostic de l'herpès-virose de la carpe se fait généralement par isolement viral à partir de biopsies du rein, des branchies et de la rate (53). Le virus est alors amplifié sur culture cellulaire et des



**Figure 8 : Signes cliniques caractéristiques du KHV.** (A) Zones de dépigmentation (flèches) réparties à la surface du corps. (B) Enophthalmie bilatérale d'un poisson infecté (gauche), comparé à son congénère sain (droite). (C) Décoloration et nécrose (flèches) des filaments branchiaux. (D) Comportement normal de carpes koi naïves non infectées (aquarium de gauche) comparé au comportement de carpes koi infectées par le KHV (aquarium de droite). On observe une apathie associée à une nage ralentie et à un regroupement des poissons au fond du bassin. (Hedrick *et al.* 2005 ; Costes B. communication personnelle).



**Figure 9 : Examen anatomopathologique de l'épithélium branchial d'un poisson infecté par le KHV.** Inclusions nucléaires éosinophiliques (flèches) dans l'épithélium branchial d'une carpe koi infectée par le KHV (Thiéry *et al.*, 2003).

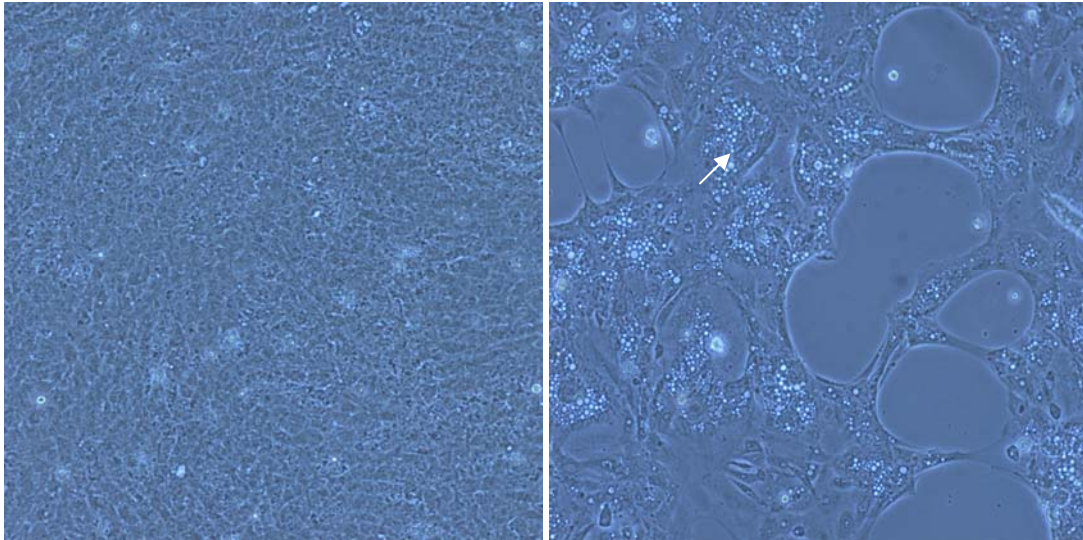
PCR peuvent être réalisées notamment sur l'ADN polymérase, la protéine majeure d'enveloppe et la thymidine kinase (6, 24, 38). A l'heure actuelle, 7 tests PCR différents sont couramment utilisés dans différents laboratoires. Récemment, une nouvelle méthode diagnostic appelée « *loop-mediated isothermal amplification* » (LAMP) a été développée (28, 64). Elle se réalise sur le gène de la thymidine kinase et s'est révélée très spécifique, très sensible et rapide. Par ailleurs, une PCR quantitative a également été développée (25). Elle a permis récemment de détecter des quantités infimes de virus dans l'eau de rivière au Japon (30). Enfin, des méthodes de détection du virus dans l'environnement par concentration du virus à partir de grands volumes d'eau ont également été développées (38).

A ce jour, les traitements et moyens de préventions contre l'herpès-virose de la carpe sont inexistantes. Une étude datant de 2003 a montré que les carpes pouvaient devenir naturellement résistantes à l'infection après culture dans des eaux surchauffées à 30°C (23, 56). Ainsi, certains producteurs gardent leurs carpes à des températures élevées pour limiter les infections. L'inconvénient de cette méthode est l'apparition dans ces eaux surchauffées d'infections bactériennes et mycosiques secondaires. Une autre étude a démontré qu'une souche de CyHV-3 atténuée par passages successifs en culture de cellules induit une immunité protectrice chez les carpes infectées (49, 56). Notons que les raisons de cette atténuation ne sont en rien comprises et que dès lors la possibilité de réversion du pouvoir pathogène ne peut être exclue. Plus récemment, un vaccin de type inactivé, délivré par administration orale dans des vésicules de liposome a été produit au Japon (75). Cependant, celui-ci n'induit qu'une protection partielle contre le KHV.

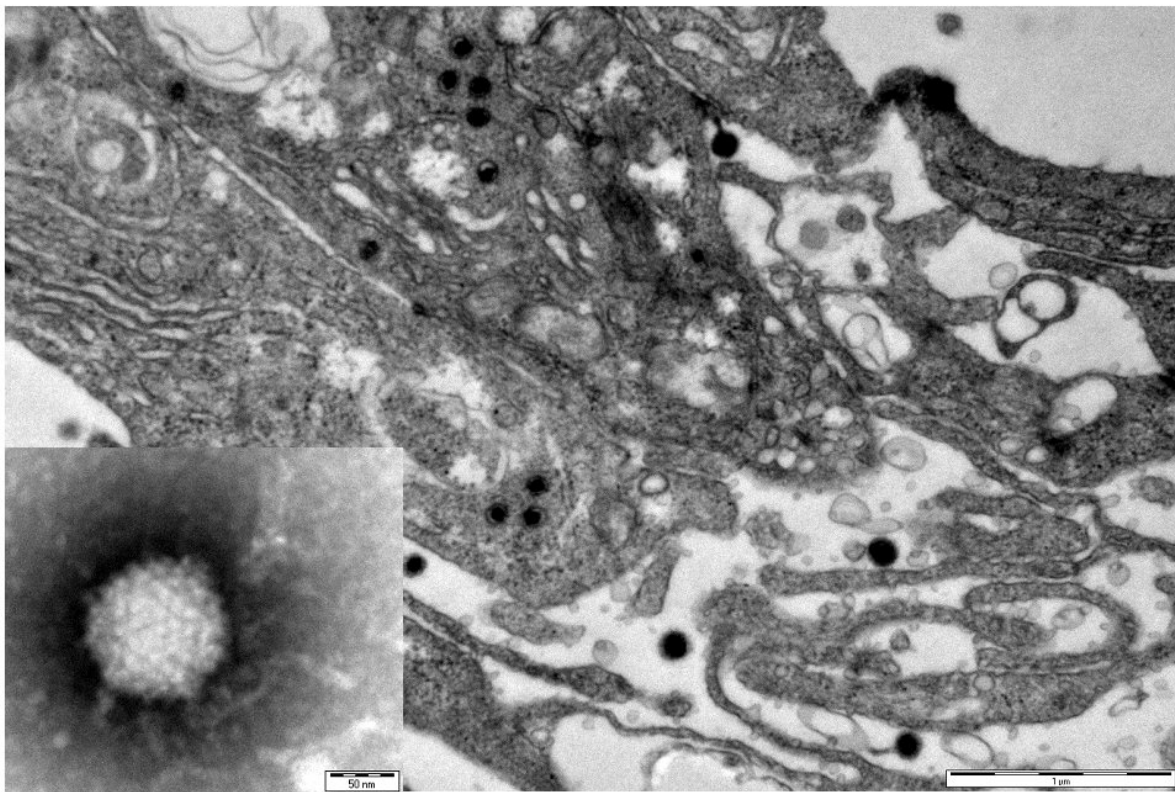
### 2.3. Caractéristiques générales et moléculaires

Depuis son premier isolement par Hedrick (32, 33), ce virus s'est vu attribué différents noms : premièrement, « *koi herpesvirus* » (KHV) du fait de son isolement initial à partir d'une carpe koi et à cause de ses caractéristiques morphologiques semblables aux autres herpèsvirus (32); deuxièmement, « *carp interstitial nephritis and gill necrosis virus* » (CNGV) à cause de sa pathogénie (51, 56) et enfin, CyHV-3 en raison de la similarité de certains de ses gènes avec ceux des CyHV-1 et -2 (73). Cette dernière nomenclature a été confirmée récemment par Aoki et collaborateurs qui ont classé le virus de l'herpès-virose de la carpe au sein de la famille *Herpesviridae* en tant que nouvelle espèce appelée CyHV-3 (3). Cependant, aucun nom officiel n'a encore été donné par le comité international de taxonomie des virus (ICTV). Pour plus de facilité, dans la suite de cet exposé, ce virus sera appelé KHV. Les différentes souches de KHV isolées de part le monde font partie d'un groupe viral très homogène (3).

Le KHV a été caractérisé pour la première fois par Gilad en 2003 puis plus récemment par d'autres auteurs (12, 35, 43, 44). Ces auteurs montrèrent que ce virus présente une ultrastructure



**Figure 10 : Effet cytopathique de l'infection par le KHV. (A)** Tapis de cellules CCB (Cyprinus carpio brain) non infecté. **(B)** Tapis cellulaire 6 jours après infection par le KHV. La flèche blanche montre la formation d'un syncytia. (Costes B. communication personnelle.)



**Figure 11 : Caractéristiques ultrastructurales du KHV mises en évidence par microscopie électronique.** Sections ultrafines de cellules CCB infectées par le KHV. L'agrandissement dans le coin inférieur gauche montre l'ultrastructure globale d'une particule virale (Costes B. communication personnelle).

ressemblant aux herpèsvirus avec une enveloppe entourant une capsid de type icosaédrique de 100 à 110 nm de diamètre, les deux séparé par une substance amorphe de type tégument. Les virions matures ont un diamètre de 170 à 230 nm (Figure 11). Au sein de la capsid se trouve le génome viral de type ADN linéaire double brin de 295 kb (3) ce qui fait du génome du KHV le plus grand génome recensé actuellement au sein de la famille des *Herpesviridae*. La structure exacte du génome n'a pas encore été complètement élucidée. Cependant, il a été montré récemment que le génome présente à ses extrémités deux régions consistant en des répétitions directes de 22 kb chacune (3). Cette structure s'apparente à celle des génomes de type B selon la classification de Roizman (Fig. 2) (55). Le contenu global du génome du CyHV-3 en nucléotides G+C est relativement élevé et oscille aux alentours de 60 % (3).

Récemment, l'entièreté du génome du KHV a été séquencée et 156 gènes ont été identifiés (3). Ce nombre de gènes est faible comparativement à la taille du génome et par rapport aux autres herpèsvirus. Parmi ces gènes, 8 sont dupliqués au sein des régions terminales droite et gauche et 9 représentent des « pseudogènes » dont les protéines ne sont pas exprimées. Quinze gènes seulement sont conservés avec l'IcHV-1, le prototype des herpèsvirus de poisson. Ce taux de conservation est faible comparé à celui qui existe entre les herpèsvirus de mammifères qui est de 43 gènes conservés (16). Le corollaire de cette constatation est que le génome du KHV contient un grand nombre de séquences n'ayant aucune homologie avec d'autres séquences virales connues. De plus, le génome du KHV renferme des séquences issues d'autres virus à grand génome ADN double brin tels que les poxvirus, les iridovirus ou encore les baculovirus (35, 73). Des études sont à l'heure actuelle en cours afin de comprendre l'origine phylogénétique du KHV.

Parmi les 156 gènes identifiés, 73 seulement ont été caractérisés quant à leur produit d'expression (Tableau II). De manière surprenante aucune étude n'a été publiée à ce jour sur le rôle d'un de ces gènes dans la pathogénie de l'infection du KHV. Cette lacune s'explique par la difficulté de produire des souches recombinantes de ce virus.

### 3. Le BAC Clonage

Les membres de la famille des *Herpesviridae* représentent les génomes ADN les plus grands parmi les virus de mammifères avec plus de 200 gènes potentiels (55). La caractérisation fonctionnelle de ces gènes par génération de virus recombinant et l'investigation des changements obtenus au niveau des phénotypes est importante pour comprendre les aspects moléculaires de la réplication, de la pathogénie et pour fournir la base rationnelle au développement de nouveaux vaccins ou traitement. Ainsi, depuis une vingtaine d'année, différentes méthodes de mutagenèse ont été développées afin de produire des souches recombinantes d'herpèsvirus (Figure 12) (72). La première d'entre elle, développée début des années 80, est la méthode classique de recombinaison homologue en cellules eucaryotes (45, 54, 61). Elle permet d'introduire une mutation et un marqueur de sélection au sein d'un

**Tableau II : Liste des gènes et protéines identifiées chez le KHV (Adapté de Aoki *et al.*, 2007).**

ORF	Protéines et fonctions suspectées
ORF 2	Code pour 2 protéines
ORF 4	Protéine de la famille des TNFR soluble
ORF 9	Protéine de la famille d'ORF 2
ORF12	Protéine de la famille des TNFR soluble
ORF 16	Protéine liée au récepteur couplé à la protéine G
ORF 19	Désoxynucléoside kinase (équivalent de l'ORF5 de l'IcHV-1)
ORF 22	Code pour 3 protéines
ORF 23	Petite sous unité de la ribonucléotide reductase
ORF 24	Protéine de la famille ORF22
ORF 25	Code pour une glycoprotéines de membrane
ORF 26	Glycoprotéine de membrane (famille ORF25)
ORF 27	Glycoprotéine de membrane (famille ORF 25)
ORF 28	Similaire aux épiméras/deshydratases NAD-dépendantes bactériennes
ORF 29	Protéine transmembranaire
ORF 30	Glycoprotéine de membrane
ORF 31	Protéine similaire aux DUF614 eucaryotiques
ORF 32	Protéine similaire à des protéines d'iridovirus
ORF 33	Sous-unité ATPase de la terminase (équivalent d'ORF62 del' IcHV-1)
ORF 39	Protéine transmembranaire
ORF 40	Glycoprotéine de membrane
ORF 41	Protéine de la famille des protéines Ring
ORF 46	Primase (équivalent à l'ORF63 de l'IcHV-1)
ORF 47	Equivalent à l'ORF64 de l'IcHV-1
ORF 48	Protéine kinase
ORF 54	Protéines de liaison au zinc
ORF 55	Thymidine kinase
ORF 61	Equivalent de l'ORF54 de l'IcHV-1
ORF 62	Protéine avec domaine OTU-like des protéases de type cystéine (cf. ORF65 de l'IcHV-1)
ORF 64	Protéine transport de nucléosides, glycoprotéine transmembranaire
ORF 65	Glycoprotéine membranaire (famille de l'ORF25)
ORF 68	Similaire à la myosine (possible équivalent ORF22 IcHV-1)
ORF 71	ADN hélicase (équivalent ORF25 IcHV-1)
ORF 72	Protéine triplex de capsid (équivalent ORF27 IcHV-1)
ORF 78	Protéase et maturation de capsid (équivalent ORF28 IcHV-1)
ORF 79	ADN polymérase (équivalent ORF57 IcHV-1)

ORF 80	Equivalent de l'ORF60 de l'IcHV-1
ORF 81	Protéine transmembranaire type III, homologue de l'ORF59 de l'IcHV-1 (Rozenkranz et al., 2008)
ORF 82	Protéine transmembranaire
ORF 83	Protéine transmembranaire
ORF 90	Equivalent de l'ORF37 de l'IcHV-1
ORF 92	Protéine majeure de capsid (équivalent ORF39 IcHV-1)
ORF 94	Sérine protéase de type trypsine-like
ORF 98	Uracil-DNA glycosylase
ORF 99	Glycoprotéine de membrane (équivalent ORF46 IcHV-1)
ORF 104	Protéine kinase de type sérine thréonine
ORF 107	Equivalent de l'ORF56 de l'IcHV-1
ORF 112	Protéines se liant aux acides nucléiques
ORF 114	Protéine transmembranaire (similaire à une protéine cellulaire de Dorio renio XP_684064)
ORF 115	Glycoprotéine de membrane
ORF 116	Glycoprotéine de membrane
ORF 123	Désoxynucléoside triphosphatase (équivalent ORF49 IcHV-1)
ORF 124	Glycoprotéine de membrane
ORF 126	Glycoprotéine de membrane
ORF 128	Protéine de la famille des protéines Ring, de type SPRY, de type Trim-like
ORF 131	Glycoprotéine de membrane
ORF 132	Protéine de membrane
ORF 134	Protéine homologue à l'IL-10
ORF 136	Glycoprotéine de membrane
ORF 137	Protéine de la famille ORF22
ORF 138	Glycoprotéine de membrane
ORF 139	Glycoprotéine de membrane (équivalent au gène B22R des poxvirus)
ORF 140	Thymidylate kinase
ORF 141	Grande sous unité de la ribonucléotide reductase
ORF 144	Protéine de la famille des protéines Ring
ORF 146	Glycoprotéine de membrane
ORF 148	Glycoprotéine de membrane de la famille ORF25
ORF 149	Glycoprotéine de membrane de la famille ORF25
ORF 150	Protéine de la famille des protéines Ring
ORF 153	Protéine transmembranaire

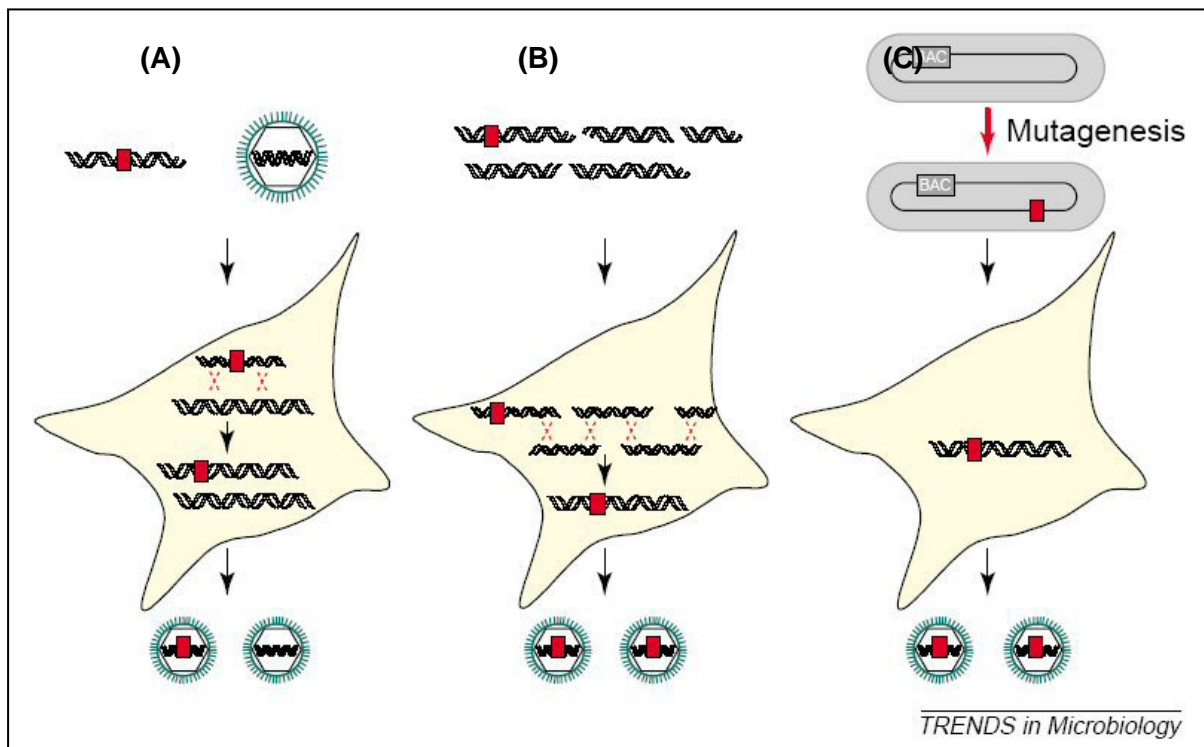
gène ciblé (Figure 12A). Les deux inconvénients majeurs de cette méthode sont la nécessité de cibler un gène non essentiel à la réplication viral et la nécessité d'isolement de la souche recombinante parmi la population virale parentale surabondante. A la fin des années 80, une autre méthode basée sur le clonage de l'entièreté du génome sous forme de cosmides fut développée (Figure 12B) (70). Cette méthode a l'avantage de ne nécessiter aucun marqueur de sélection. Cependant, le clonage du génome sous forme de cosmide est laborieux et des événements de recombinaison non spécifiques peuvent avoir lieu. C'est devant le besoin de développer une nouvelle méthode de mutagenèse rapide et efficace et de pouvoir cloner des grands segments d'ADN, que les chromosomes artificiels bactériens (BAC, « *bacterial artificial chromosome* ») firent leur apparition à la fin des années 90 (Figure 12C) (60).

Les BAC consistent en une séquence d'ADN clonée au sein du génome viral ayant pour but de conférer au génome viral la propriété de se propager comme un chromosome au sein d'une bactérie (72). Pour ce faire, le BAC contient une séquence dérivée du facteur F bactérien permettant non seulement la réplication du génome BAC au sein des bactéries mais aussi le maintien d'une seule copie du génome BAC par bactérie, minimisant ainsi les risques de recombinaison entre régions répétées ou homologues. Aussi, une souche bactérienne d'*E.coli* déficiente en recombinases est nécessaire pour minimiser tout risque de recombinaison et conférer ainsi au génome BAC sa grande stabilité (60, 68). Une fois le génome viral cloné en bactérie, celui-ci peut être muté via les techniques de recombinaison homologue en *E. coli* telles que la recombinaison par plasmide « *shuttle* » (72) ou via la sélection *galK* (74). La technologie BAC permet le clonage de génomes viraux entiers de près de 300 kb, ce qui est très intéressant pour le clonage des grands virus à ADN tels que les herpèsvirus. Les mutagenèses sur ces génomes BAC sont rapides, sûres, efficaces et représentent donc à l'heure actuelle la meilleure méthode pour l'exploration systématique du génome des herpèsvirus.

Le premier BAC d'herpèsvirus fut réalisé en 1997 pour le cytomégalovirus murin (42). Depuis, de nombreux herpèsvirus ont été clonés sous forme de BAC tels que l'herpèsvirus simplex 1 (67), le virus d'Epstein-Barr (17), le virus de la maladie d'Aujeszki (62), ou encore le cytomégalovirus humain (8). En outre, le laboratoire d'accueil a acquis au fil des années une grande expertise dans le BAC clonage. Ainsi, trois herpèsvirus ont été clonés sous forme de BAC, l'herpèsvirus bovin 4 (26), l'herpèsvirus alcélaphin 1 (18) et l'herpèsvirus félin 1 (14).

#### 4. Objectifs

L'objectif de ce mémoire de formation doctorale a été de contribuer, avec l'aide du Dr Bérénice Costes, au clonage du génome du KHV sous la forme d'un BAC stable et infectieux. L'obtention de ce BAC est une étape cruciale pour pouvoir entreprendre de manière systématique l'étude des rôles des gènes viraux dans la pathogénie de l'infection, et *in fine*, pour pouvoir construire des souches



**Figure 12 : Méthode de mutagenèse des herpèsvirus.** (A) Recombinaison homologue en cellule eucaryote. Un fragment d'ADN linéaire contenant la mutation et un gène rapporteur (carré rouge) flanqué de séquences homologues à la séquence cible du virus, est transfecté dans une cellule infectée par le virus. Le gène rapporteur est inséré dans le génome viral par recombinaison homologue. Les virus sauvage et recombinant doivent ensuite être séparés. (B) L'approche par cosmide. L'entièreté du génome est clonée sous forme de cosmides dont les séquences se chevauchent. Une mutation est introduite dans un fragment (carré rouge). Après transfection dans une cellule permissive, le génome viral est réassemblé au moyen de plusieurs événements de recombinaisons homologues générant des virus mutants. (C) Mutagenèse en système procaryote au moyen d'un chromosome artificiel bactérien (BAC). Le génome viral est maintenu sous forme de BAC en *E.coli*. Les virus BAC mutants peuvent être générés en utilisant diverses approches de mutagenèse en système procaryote (carré rouge). Le BAC est alors transfecté en cellules et le virus mutant est reconstitué (Wagner *et al.*, 2002).

recombinantes atténuées ayant un potentiel en vaccinologie. L'obtention de ce BAC a nécessité l'accomplissement de six étapes principales:

(i) Production d'une souche recombinante BAC KHV consistant en l'insertion d'une cassette BAC au sein du gène de la thymidine kinase (TK). Cette souche recombinante a été produite par recombinaison homologue en cellules eucaryotes.

(ii) Extraction du génome BAC KHV sous forme circulaire.

(iii) Electroporation du génome BAC KHV circularisé en bactérie *E.coli* de type DH10B, et vérification de la stabilité du plasmide ainsi cloné en bactérie.

(iv) Reconstitution de particules virales infectieuses BAC KHV par transfection du plasmide BAC KHV extrait des bactéries en cellules eucaryotes.

(v) Excision de la cassette BAC du génome KHV afin de reconstituer des particules virales n'exprimant plus TK.

(vi) Reconstitution de particules virales sauvages dites « révertantes » similaires à la souche parentale et exprimant TK.

L'ensemble des souches ainsi produites a été caractérisé *in vitro* au niveau de leur structure moléculaire, la production de plaque de lyse et leur cinétique de réplication *in vitro*. Ensuite, afin de démontrer l'utilité du clone BAC obtenu, une souche de KHV délétée pour l'ORF16, qui code pour un homologue du récepteur couplé à la protéine-G (GPCR), a été produite. Pour cela, une technique de mutagenèse procaryotique, basée sur une sélection positive du gène codant pour la galactokinase (*galK*), a été utilisée. Enfin, la virulence des souches recombinantes produites a été comparée *in vivo*. L'ensemble des clones générés au cours de ce mémoire de formation doctorale a fait l'objet d'une publication dans Journal of Virology présentée dans la section expérimentale de ce travail.

---

## **Section expérimentale**

---

# Cloning of the Koi Herpesvirus Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome Demonstrates That Disruption of the Thymidine Kinase Locus Induces Partial Attenuation in *Cyprinus carpio koi*<sup>∇</sup>

B. Costes,<sup>1</sup> G. Fournier,<sup>1</sup> B. Michel,<sup>1</sup> C. Delforge,<sup>1</sup> V. Stalin Raj,<sup>1</sup> B. Dewals,<sup>1</sup> L. Gillet,<sup>1</sup> P. Drion,<sup>2</sup> A. Body,<sup>3</sup> F. Schynts,<sup>3</sup> F. Loeffrig,<sup>3</sup> and A. Vanderplasschen<sup>1\*</sup>

Immunology-Vaccinology (B43b), Department of Infectious and Parasitic Diseases (B43b), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium<sup>1</sup>; Animal Facility (B23), University of Liège, B-4000 Liège, Belgium<sup>2</sup>; and CER Groupe, rue du Carmel 1, B-6900 Marloie, Belgium<sup>3</sup>

Received 30 January 2008/Accepted 29 February 2008

**Koi herpesvirus (KHV) is the causative agent of a lethal disease in koi and common carp. In the present study, we describe the cloning of the KHV genome as a stable and infectious bacterial artificial chromosome (BAC) clone that can be used to produce KHV recombinant strains. This goal was achieved by the insertion of a *loxP*-flanked BAC cassette into the thymidine kinase (TK) locus. This insertion led to a BAC plasmid that was stably maintained in bacteria and was able to regenerate virions when permissive cells were transfected with the plasmid. Reconstituted virions free of the BAC cassette but carrying a disrupted TK locus (the FL BAC-excised strain) were produced by the transfection of Cre recombinase-expressing cells with the BAC. Similarly, virions with a wild-type revertant TK sequence (the FL BAC revertant strain) were produced by the cotransfection of cells with the BAC and a DNA fragment encoding the wild-type TK sequence. Reconstituted recombinant viruses were compared to the wild-type parental virus in vitro and in vivo. The FL BAC revertant strain and the FL BAC-excised strain replicated comparably to the parental FL strain. The FL BAC revertant strain induced KHV infection in koi carp that was indistinguishable from that induced by the parental strain, while the FL BAC-excised strain exhibited a partially attenuated phenotype. Finally, the usefulness of the KHV BAC for recombination studies was demonstrated by the production of an ORF16-deleted strain by using prokaryotic recombination technology. The availability of the KHV BAC is an important advance that will allow the study of viral genes involved in KHV pathogenesis, as well as the production of attenuated recombinant candidate vaccines.**

Common carp (*Cyprinus carpio carpio*) is the most widely cultivated fish for human consumption mainly in Asia, Europe, and the Middle East (3). In contrast, the koi (*Cyprinus carpio koi*) subspecies is cultivated as an expensive, beautiful, and colorful pet fish for personal pleasure or competitive showing, especially in Japan but also worldwide (3). Recently, koi herpesvirus (KHV) was identified as the cause of mass mortality among koi and common carp in Israel, the United States, and Germany (7, 21, 22). The intensive culture of common carp, koi shows, and international trading have unfortunately contributed to the rapid global spread of highly contagious and extremely virulent KHV disease (19, 27, 35). Since its emergence, KHV has caused severe financial and economic losses in both koi and common carp culture industries worldwide (20, 34).

The genome of KHV comprises a linear double-stranded DNA sequence of ~295 kb (2, 24), similar to that of cyprinid herpesvirus 1 (41) but larger than those of other *Herpesviridae* members, which generally range from 125 to 240 kb. The sequence of the KHV genome revealed a significant number of

original DNA sequences with no homology to any other known viral sequences. Moreover, it contains highly divergent DNA sequences encoding polypeptides which resemble those of several other double-stranded DNA viruses, such as other herpesviruses, poxviruses, iridoviruses, and other large DNA viruses (24, 41).

Since the first isolation of KHV, an increasing number of studies have been devoted to the virus. They have reported data related to viral gene content (2, 4, 13, 14, 24–26, 41), pathogenesis (12, 13, 33, 38), epidemiology (24, 32), the diagnosis of KHV infection (1, 4, 14, 15, 17, 18, 37), and control (31, 34). However, no information on the roles of individual KHV genes in the biology of KHV infection or in pathogenesis has been published to date. Two reasons can explain this lacuna. Firstly, the KHV genome sequence has been published only very recently (2). Secondly, prolonged KHV cultivation in vitro leads to the spontaneous attenuation of the virus, making the production of KHV recombinants by classical homologous recombination in eukaryotic cells difficult (34).

Recently, the manipulation of large herpesvirus genomes has been facilitated by the use of bacterial artificial chromosome (BAC) vectors (6, 40). These vectors allow the stable maintenance and efficient mutagenesis of the viral genome in *Escherichia coli*, followed by the reconstitution of progeny virions by the transfection of permissive eukaryotic cells with the

\* Corresponding author. Mailing address: Immunology-Vaccinology (B43b), Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium. Phone: 32-4-366 42 64. Fax: 32-4-366 39 08. E-mail: A.vdplasschen@ulg.ac.be.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 12 March 2008.

BAC plasmid. Several herpesviruses have been successfully propagated as infectious BAC clones. The 235-kb genome of human cytomegalovirus is to date the largest herpesvirus genome which has been BAC cloned (6).

BAC cloning is an obvious approach to avoid the problems in the production of KHV recombinants described above. However, the large size of the KHV genome and its abundant repetitive sequence content (2) are two intrinsic features of KHV that may render its BAC cloning difficult.

In the present study, we describe for the first time the cloning of the KHV genome as a stable and infectious BAC clone. Several recombinant strains were derived from the BAC clone by using homologous recombination in eukaryotic cells and prokaryotic recombination technology. The comparison of these recombinant strains *in vivo* revealed that thymidine kinase (TK) gene disruption led to the partial attenuation of KHV and that the deletion of ORF16, encoding a putative G protein-coupled receptor (GPCR), did not affect KHV virulence. The availability of the KHV BAC is an important advance that will allow the study of viral genes involved in KHV pathogenesis, as well as the production of attenuated recombinant candidate vaccines.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cells and virus.** *Cyprinus carpio* brain (CCB) cells (30) were cultured in minimum essential medium (Invitrogen) containing 4.5 g of glucose (D-glucose monohydrate; Merck)/liter and 10% fetal calf serum (FCS). Cells were cultured at 25°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The KHV FL strain was isolated from a kidney of a fish that died from KHV infection (CER, Marloie, Belgium). FL stands for François Liefbrig, who isolated the strain.

**BAC cloning of KHV.** Firstly, a 1,137-bp DNA fragment corresponding to the TK open reading frame (ORF; ORF55) and ORF56 of the KHV genome was amplified by PCR using KHV FL DNA as a template. The following primers were used for the amplification: the forward primer TKfw (5'-ATGGCTATGCTGGAACGTGGT-3') and the reverse primer TKrev (5'-CTCAACAGGGAA GAGTGGCG-3'), corresponding to nucleotides 1 to 21 of the KHV TK ORF and nucleotides 279 to 297 of ORF56 (GenBank accession no. for the KHV genome, DQ177346), respectively. The amplification product was sequenced and TA cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega), resulting in pGEMT-TK (Fig. 1A). A BAC cassette was released by PmeI digestion of the pBeloBAC-Modified-EGFPNeo vector (11) and then ligated into the RsrII site of the pGEMT-TK vector, resulting in the pGEMT-TKBAC vector (Fig. 1A), in which the BAC cassette is flanked by KHV sequences. These KHV homologous sequences were exploited to produce the KHV FL BAC strain by homologous recombination in eukaryotic cells (Fig. 1B). Briefly, freshly seeded CCB cells were infected with KHV at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 PFU/cell. After an incubation period of 2 h, cells were transfected with circular pGEMT-TKBAC by using Lipofectamine Plus (Invitrogen). Four days postinfection (pi), cell supernatant was harvested and inoculated onto confluent CCB cell monolayers (10<sup>6</sup> cells per 9.5 cm<sup>2</sup>) in the presence of G418 (final concentration of 500 µg/ml). This step was repeated three times, leading to infected cultures containing predominantly the KHV FL BAC recombinant strain. This viral preparation was inoculated onto freshly seeded CCB cells at a MOI of 1 PFU/cell. The circularized form of the viral BAC recombinant genome was extracted 20 h pi as described previously (29), and 2 µg of DNA was introduced into *E. coli* DH10B cells (Invitrogen) by electroporation (at 2,250 V, 132 Ω, and 40 µF) as described elsewhere (36). Electroporated cells were plated immediately onto solid-Luria-Bertani medium plates supplemented with chloramphenicol (17 µg/ml). Note that it is crucial at this stage to avoid liquid preculture in order to avoid the preferential growing of bacteria containing incomplete KHV BAC plasmids.

**Reconstitution of infectious virus from the KHV FL BAC plasmid.** Permissive CCB cells were transfected with the FL BAC plasmid by using Lipofectamine Plus (Invitrogen) in order to produce the FL BAC recovered strain. To produce a wild-type revertant strain derived from the BAC, CCB cells were cotransfected with the FL BAC plasmid and the pGEMT-TK vector (molar ratio, 1:75). Seven days posttransfection, viral plaques negative for enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression were picked and enriched by three successive rounds

of plaque purification. Similarly, to reconstitute virions with the BAC cassette excised from the viral genome, CCB cells were cotransfected with the FL BAC plasmid and the pEFIN3-NLS-Cre vector, encoding Cre recombinase fused to a nuclear localization signal (16) (molar ratio, 1:70).

**Southern blotting.** Southern blot analysis was performed as described previously (28). Several probes were used. The TK probe was produced by PCR using the TKfw and TKrev primers described above and the KHV FL genome as a template. The terminal repeat (TR) probe corresponded to nucleotides 3817 to 4228 of the left TR and nucleotides 276494 to 276905 of the right TR of the KHV genome. The BAC probe was released from the pBeloBACModified-EGFPNeo vector by PmeI digestion. The ORF16 probe was produced by PCR using ORF16fw and ORF16rev primers corresponding to nucleotides 1 to 50 and 1027 to 1077 of KHV ORF16, respectively.

**Indirect immunofluorescence staining.** CCB cells were fixed and permeabilized with acetone-ethanol (50:50, vol/vol) for 10 min at -20°C. Immunofluorescence staining (incubation and washes) was performed in phosphate-buffered saline containing 10% FCS. Samples were incubated at 25°C for 45 min with mouse monoclonal antibody 8G12 raised against an unidentified KHV antigen expressed in the nuclei of infected cells. After three washes, samples were incubated at 25°C for 30 min with Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (heavy and light chains [GAM 568; 2 µg/µl; Molecular Probes]) as the secondary conjugate.

**Microscopy analysis.** Epifluorescence microscopy analysis was performed with a DMIRBE microscope (Leica) equipped with a DC 300F charge-coupled device camera (Leica) as described previously (39).

**Multistep growth curves.** Triplicate cultures of CCB cells were infected at a MOI of 0.5 PFU/cell. After an incubation period of 2 h, cells were washed with phosphate-buffered saline and then overlaid with Dulbecco's modified essential medium (Invitrogen) containing 4.5 g of glucose/liter and 10% FCS. The supernatants of infected cultures were harvested at successive intervals after infection, and the amount of infectious virus was determined by plaque assays with CCB cells as described previously (9).

**Production of the KHV FL BAC recombinant plasmid by *galK* positive selection of bacteria.** A KHV FL BAC recombinant plasmid with the deletion of ORF16 (encoding a putative GPCR) was produced using *galK* positive selection of bacteria as previously described (42). The recombination fragment consisted of a galactokinase gene (*galK*) flanked by 50-bp sequences corresponding to the beginning and the end of KHV ORF16. This fragment was produced by PCR using the *pgalK* vector (42) as a template, the forward primer 16galfw (5'-ATGAAACCTCTGGGTCTT TTTGTTTCTGTGCTCGGGCTGCTTGCCTGTCCCTGTTGACAATTAATC ATCGGCA-3'), and the reverse primer 16galrev (5'-TCATAGGACGCCATCGG TTGAGTTCGCTGCGGCTGCGACTCCAGTCTCTCAGCACTGTCCTGC TCCT-3'). Primer 16galfw consisted of nucleotides 1 to 50 of KHV ORF16 and nucleotides 1 to 24 of the *pgalK* vector (42). The reverse primer 16galrev consisted of nucleotides 1027 to 1077 of KHV ORF16 and nucleotides 1212 to 1231 of the *pgalK* vector (42).

**Induction of KHV disease in fish.** Specific-pathogen-free koi carp, with an average weight of 7 g, were kept in 60-liter tanks at 24°C. Several groups of fish, each comprising 10 carp (with the exception of mock-infected groups, which consisted of 13 carp), were kept in separate tanks. Koi carp were infected by intraperitoneal (IP) injection with 0.1 ml containing 3 × 10<sup>2</sup> PFU. The viral inoculums were titrated before inoculation and back titrated after inoculation to ensure that the doses were equivalent among groups. The control group (mock infected) was injected with culture medium under the same conditions. Fishes were examined daily for clinical signs of KHV disease, and dead fishes were removed. The animal study was accredited by the local ethics committee of the University of Liège (Belgium).

**Detection of KHV genome by PCR.** DNA was extracted from tissues of fish by using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen). PCR amplification was performed using 25 ng of total DNA as a template and the TKfw-TKrev and ORF16fw-ORF16rev primer pairs described above.

#### RESULTS

**Cloning of the KHV genome in *E. coli*.** The goal of the present study was to clone the genome of KHV as a stable and infectious BAC plasmid. When we started this project, very few sequences from KHV were available. The TK locus was one of the few KHV genes to have been sequenced. This locus was selected for the insertion of the BAC cassette, as TKs encoded

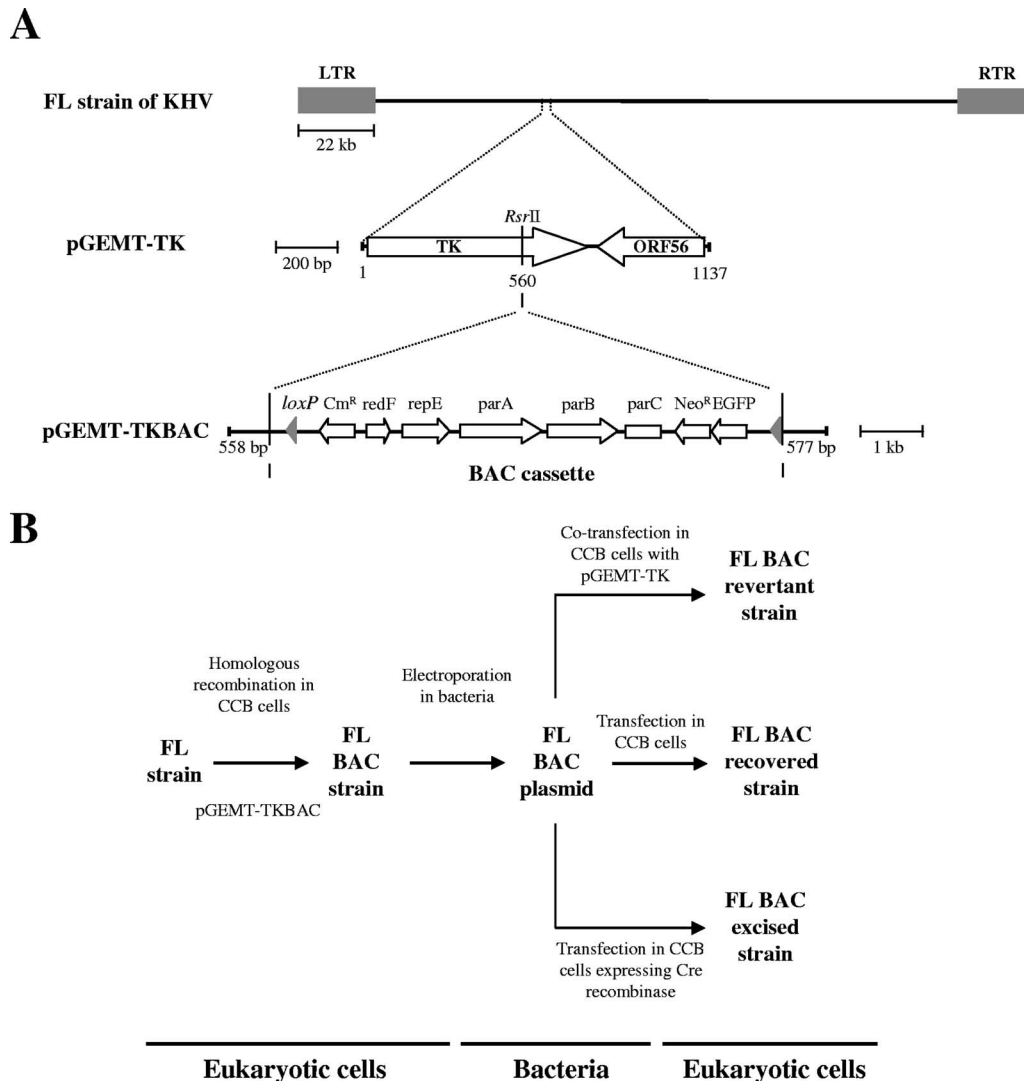


FIG. 1. Schematic representation of the strategy used to produce the infectious KHV FL BAC plasmid. (A) The genome of the KHV FL strain, flanked by two TRs (the left TR [LTR] and the right TR [RTR]), is shown at the top. A *loxP*-flanked BAC cassette was inserted into the *RsrII* sites of the TK ORF of the pGEMT-TK vector, resulting in pGEMT-TKBAC. (B) Flow chart of steps performed to produce the KHV FL BAC plasmid, to control its infectivity, and to demonstrate the possibility of removing the *loxP*-flanked BAC cassette from the genome of reconstituted virus or to produce a wild-type revertant strain derived from the FL BAC plasmid.

by herpesviruses and poxviruses have been shown previously to be dispensable for viral growth in vitro (8a, 30a).

The strategy depicted in Fig. 1 was used for the BAC cloning of KHV. This approach required as a first step the production of a recombinant strain called KHV FL BAC. The molecular structure of this strain was confirmed by a combined *SacI* restriction endonuclease and Southern blotting approach (Fig. 2). In the parental FL strain, the TK ORF was contained in a DNA fragment of approximately 5.2 kb. In the FL BAC strain, as a consequence of the BAC cassette insertion into the TK locus, the TK sequence was distributed into two fragments of approximately 5.3 and 9.1 kb (Fig. 2). Sequencing of the regions used to target homologous recombination confirmed that the FL BAC strain had the correct molecular structure (data not shown).

Next, we tried to clone circular intermediates of the FL BAC

genome into bacteria by classical approaches that we have used successfully in the past for the BAC cloning of other herpesviruses (9, 11, 16). Surprisingly, despite the screening of more than 500 independent clones, we were unable to select a single clone carrying the FL BAC genome. The BAC plasmids obtained generated heterogeneous restriction profiles with only a few bands corresponding to the expected restriction profile (data not shown). Due to the large size of the KHV genome, one may postulate that bacteria carrying incomplete KHV BAC plasmids may have a selective advantage over bacteria carrying a full-length KHV BAC clone and, consequently, that the liquid culture of transformed bacteria (performed before the plating of the bacteria onto solid medium) may lead to the selection of bacteria with BAC plasmids comprising only part of the KHV genome. To test this hypothesis, *E. coli* cells were plated immediately onto solid Luria-Bertani medium after

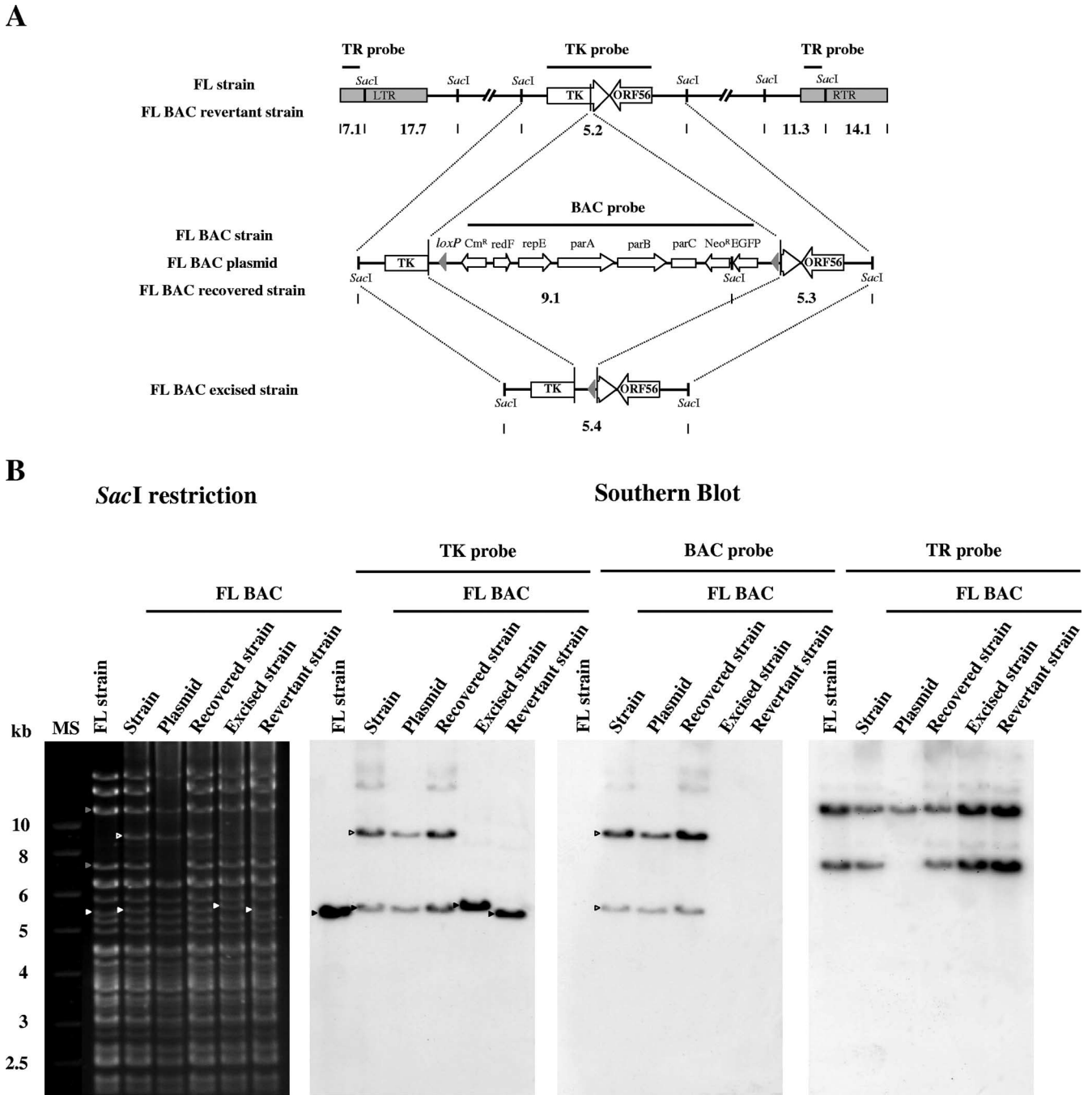


FIG. 2. Structural analysis of the KHV FL BAC plasmid and derived strains. (A) Schematic representation of some of the fragments generated by *SacI* enzymatic restriction. The genomes of the KHV FL and KHV FL BAC revertant strains are shown at the top. TK, BAC, and TR probes are indicated by bold horizontal lines. Fragment sizes in kilobases are indicated. Note that this cartoon is not drawn to scale. LTR, left TR; RTR, right TR. (B) The KHV FL BAC plasmid and the genomes of the KHV FL, FL BAC, FL BAC recovered, FL BAC-excised, and FL BAC revertant strains were analyzed by *SacI* restriction (agarose gel, first panel) and further tested by Southern blotting using probes corresponding to the TK ORF (second panel), the BAC cassette (third panel), or the TRs (fourth panel). Black and white arrowheads and open arrowheads indicate restriction fragments containing the TK ORF and the BAC cassette, respectively. Gray arrowheads indicate restriction fragments hybridizing with the TR probe. Marker sizes (MS) are indicated on the left.

electroporation. This approach led to BAC plasmids comprising most of the restriction fragments found in the FL BAC strain genome. However, only 1 to 2% of the clones exhibited a restriction profile comparable to that of the FL BAC strain

genome. One of these correct clones was characterized by a combined *SacI* restriction endonuclease and Southern blotting approach (Fig. 2). Due to the circularization of the genome in bacteria, the two bands encompassing the extremities of the

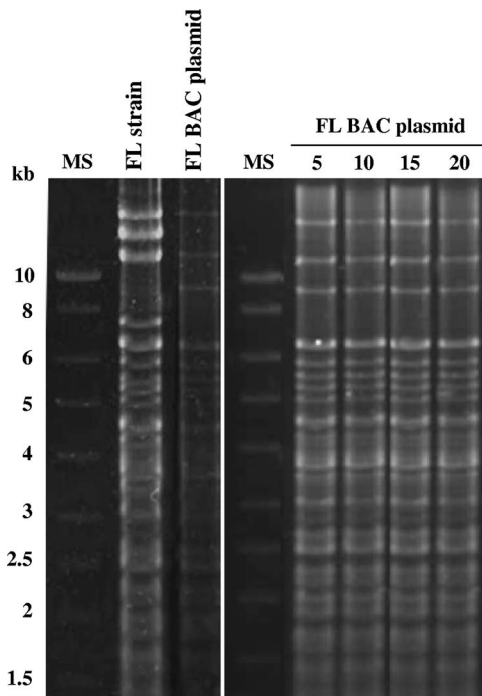


FIG. 3. Stability of the FL BAC plasmid in *E. coli* DH10B cells containing the FL BAC plasmid were passaged every day at a ratio of 1:100 (vol/vol) for 20 consecutive days. On the indicated days, BAC DNA from the culture was prepared. Finally, BAC DNA samples collected at various intervals were compared with parental FL strain and FL BAC strain DNA by *SacI* digestion and agarose gel electrophoresis. Marker sizes (MS) are indicated on the left.

left and the right terminal repeats (7.1 and 14.1 kb) present in the FL and FL BAC strains were missing in the FL BAC plasmid (Fig. 2). However, the restriction profile of the FL BAC plasmid did not reveal the expected fused fragment of 21.2 kb (Fig. 2). This observation suggested that the BAC contains a single copy of the terminal repeat. To test this hypothesis, *SacI* profiles were analyzed by Southern blotting using the TR probe. This analysis revealed the presence of two bands (7.1 and 11.3 kb) in the FL and FL BAC strain profiles and only a single band (11.3 kb) in the FL BAC plasmid profile (Fig. 2). These results demonstrate that the FL BAC plasmid contains only a single copy of the terminal repeat.

**Stability of the KHV genome in *E. coli*.** BAC plasmids are usually propagated in bacteria carrying a *recA* mutation that minimizes recombination. However, the large size and the complex structure of the KHV genome may lead to relative instability of the FL BAC plasmid (25). To assess the stability of the KHV genome as a BAC, bacteria containing the FL BAC plasmid were serially cultured for 20 consecutive days (about 130 generations). After various periods of culture, the BAC plasmids were isolated and characterized by *SacI* endonuclease digestion (Fig. 3). No difference among plasmids grown for various periods of time was observed, demonstrating a high level of stability of the KHV genome in *E. coli*.

**Reconstitution of infectious virus from the FL BAC plasmid.** The usefulness of a herpesvirus BAC clone requires the ability to reconstitute infectious particles from the BAC plasmid. Consequently, we tested whether infectious particles could be

produced by the transfection of CCB cells with the FL BAC plasmid (Fig. 1B). Six days posttransfection, viral syncytia expressing EGFP were detected. *SacI* restriction analysis of the DNA of reconstituted virus (the FL BAC recovered strain) revealed a restriction profile identical to the pattern observed for the FL BAC strain (Fig. 2). These data demonstrate that the BAC is able to regenerate the entire genome and infectious particles even if it includes only a single terminal repeat. To excise the BAC cassette from the genomes of reconstituted virions, CCB cells were cotransfected with the FL BAC plasmid and a Cre recombinase-expressing vector (Fig. 1B). The deletion of the BAC cassette was monitored by the disappearance of EGFP fluorescence and by a combined restriction endonuclease and Southern blotting approach (Fig. 2). The *cre-loxP*-mediated excision of the BAC cassette left a sequence of 172 bp in the TK ORF, leading to a *SacI* restriction fragment slightly larger than the corresponding wild-type fragment (Fig. 2). The 172-bp sequence consists of one *loxP* site (34 bp) and the sequences of the BAC cassette upstream (126 bp) and downstream (12 bp) of the *loxP* sites. Due to this insertion of a 172-bp foreign sequence into the TK ORF, the FL BAC-excised strain expressed a truncated form of TK corresponding to the first 185 amino acids (aa) of the wild-type protein (217 residues). Finally, to generate a revertant strain, CCB cells were cotransfected with the FL BAC plasmid and the pGEMT-TK vector (Fig. 1B). A revertant recombinant was selected on the basis of the nonexpression of EGFP. Restriction analysis revealed a profile identical to the pattern observed for the parental wild-type FL strain (Fig. 2).

Additional characterization of FL BAC-derived strains in cell cultures was performed. Firstly, microscopic examination of immunostained viral syncytia did not reveal differences among recombinants (Fig. 4A). Secondly, in order to investigate the putative effects of the recombination processes on viral growth in vitro, all recombinant strains were compared using a multistep growth assay (Fig. 4B). All viruses tested exhibited similar growth curves ( $P \leq 0.05$ ), leading to the conclusion that TK disruption does not affect KHV replication in vitro and that the KHV genome can support a large insertion (of at least 9.2 kb) despite its large size.

**Production of an FL BAC recombinant plasmid by mutagenesis in bacteria with *galk* positive selection.** The usefulness of a BAC clone for recombination studies relies on the possibility to use it for the production of recombinants by prokaryotic mutagenesis methods. To test the usefulness of the FL BAC clone, we produced a KHV recombinant strain with the deletion of ORF16 (encoding a putative GPCR) by using *galk* positive selection of bacteria. The molecular structure of the recombinant plasmid was confirmed by a combined *SacI* restriction endonuclease and Southern blotting approach (Fig. 5). In the parental FL strain and in the KHV FL BAC plasmid, ORF16 was contained in a DNA fragment of approximately 4.8 kb, whereas in the KHV FL BAC  $\Delta$ ORF16 plasmid, the corresponding fragment had a size of approximately 5 kb due to the deletion of most of ORF16 and the insertion of the *galk* cassette. This band encompassing the *galk* cassette is slightly visible on the Southern blot due to the short ORF16 nucleotide sequence left after deletion. Next, to reconstitute virions and to excise the BAC cassette from the genome of the recombinant plasmid, CCB cells were cotransfected with the KHV FL BAC

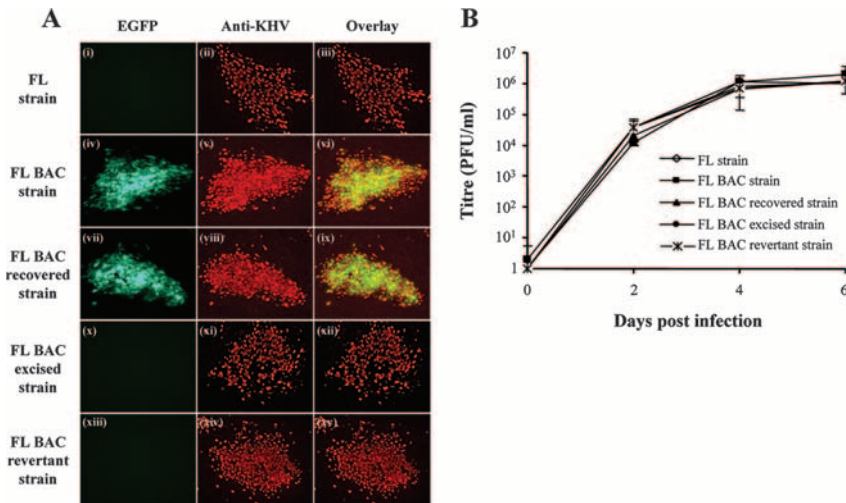


FIG. 4. Characterization of KHV strains derived from the FL BAC plasmid. (A) Epifluorescence analysis of KHV syncytia. CCB cells were infected (MOI of 0.1 PFU/cell) with FL, FL BAC, FL BAC recovered, FL BAC-excised, and FL BAC revertant strains and were overlaid with Dulbecco's modified essential medium containing 10% FCS and 0.6% (wt/vol) carboxymethyl cellulose (Sigma) to obtain isolated syncytia. Seven days pi, syncytia were revealed by indirect immunofluorescent staining using monoclonal antibody 8G12 and GAM 568 as the primary and secondary antibodies, respectively. The three horizontal panels in each set represent analyses of the same syncytium. Panels i, iv, vii, x, and xiii and panels ii, v, viii, xi, and xiv were analyzed for EGFP and GAM 568 fluorescent emissions, respectively. The merged EGFP and Alexa signals are shown in panels iii, vi, ix, xii, and xv. The side of each panel corresponds to 10  $\mu$ m of the specimen. (B) Replication kinetics of KHV recombinant strains were compared with those of the parental KHV FL strain as described in Materials and Methods. The data presented are the means  $\pm$  standard errors of triplicate measurements.

$\Delta$ ORF16 plasmid and a Cre recombinase-expressing plasmid. The deletion of the BAC cassette was monitored by the disappearance of EGFP fluorescence (data not shown) and by a combined restriction endonuclease and Southern blotting ap-

proach (Fig. 5). As described earlier, the *cre-loxP*-mediated deletion of the BAC cassette leaves a sequence of 172 bp disrupting the TK ORF. Consequently, the FL BAC  $\Delta$ ORF16-excised strain has a disrupted TK locus and a deletion of ORF16.

**Pathogenicities of FL BAC-derived strains in koi carp.** The strains derived from the FL BAC plasmid described above facilitated the testing of the effect of TK disruption (in FL BAC-excised and FL BAC revertant strains) and the effect of TK disruption and ORF16 deletion (in the FL BAC  $\Delta$ ORF16-excised strain) on the virulence of KHV. To address the effect of TK disruption on KHV virulence, the parental FL, FL BAC excision, and FL BAC revertant strains were compared by IP inoculation of naïve koi carp (Fig. 6A). The parental FL strain induced all the clinical signs associated with KHV disease, including apathy, the folding of the dorsal fin, increased mucus secretions, suffocation, erratic swimming, and the loss of equilibrium. The FL strain induced a mortality rate of 80%. At necropsy, the discoloration of gill filaments, herpetic skin lesions, and necrotic nephritis were observed for most fishes. In comparison to the FL parental strain, the FL BAC-excised strain exhibited a partially attenuated phenotype characterized by the production of similar clinical signs and lesions but with reduced intensities. Consistent with the attenuation observed, the mortality rate of fishes infected with the FL BAC-excised strain was reduced to 40%. Importantly, the virulence of the FL BAC revertant strain was similar to that of the parental FL strain.

The effect of TK disruption and ORF16 deletion was assessed in the same way, by IP inoculation of naïve koi carp. The parental FL strain and the FL BAC-excised strain were used as controls (Fig. 6B). Fishes infected with the parental FL strain developed KHV disease as described above (80% mortality).

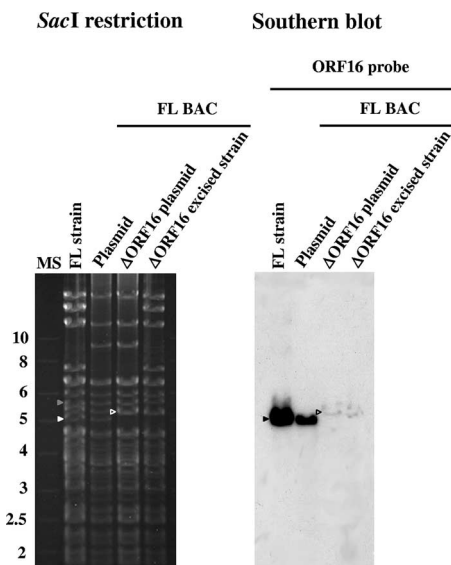


FIG. 5. Structural analysis of the KHV FL BAC *galk* recombinant plasmid. The KHV FL BAC plasmid, the derived FL BAC  $\Delta$ ORF16 plasmid, and the genome of the KHV FL BAC  $\Delta$ ORF16-excised strain were analyzed by *Sac*I restriction (agarose gel) and further tested by Southern blotting using a probe corresponding to ORF16. The KHV FL strain was used as a control. White and black arrowheads and open arrowheads indicate restriction fragments containing ORF16 and the *galk* cassette, respectively. The gray arrowhead indicates a restriction fragment containing the TK ORF. Marker sizes (MS) in kilobases are indicated on the left.

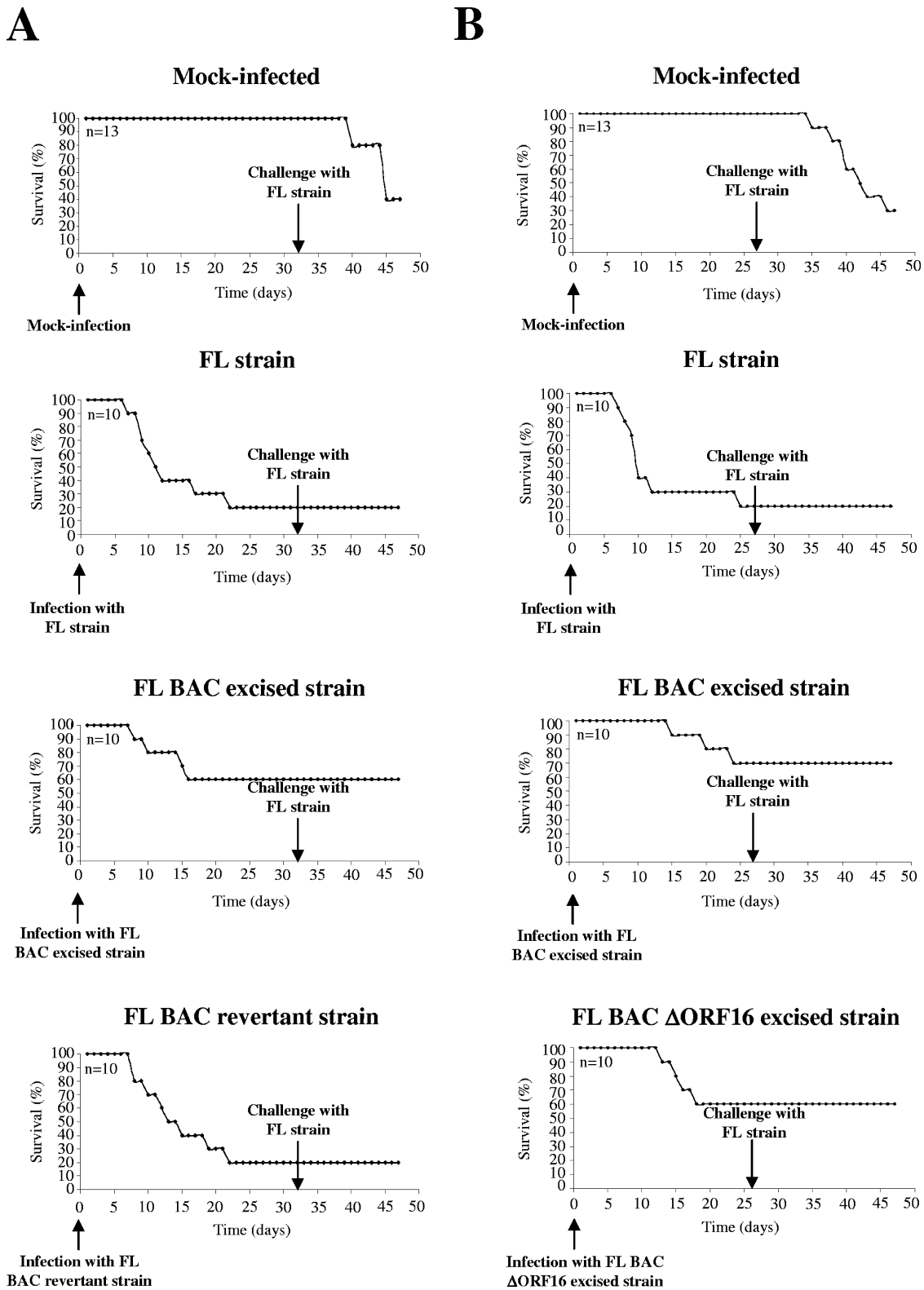


FIG. 6. Cumulative survival rates of carp infected with FL BAC plasmid-derived strains. (A) On day 0, four groups, each consisting of 10 koi carp (with the exception of mock-infected groups, consisting of 13 carp), were inoculated by IP injection with mock-infected culture medium and culture medium containing  $3 \times 10^2$  PFU of FL, FL BAC-excised, and FL BAC revertant strains. On day 32 pi, surviving fishes were challenged by IP injection with the parental FL strain. (B) On day 0, four groups, each consisting of 10 koi carp (with the exception of mock-infected groups, consisting of 13 carp), were inoculated by IP injection with mock-infected culture medium and culture medium containing  $3 \times 10^2$  PFU of FL, FL BAC-excised, and FL BAC  $\Delta$ ORF16-excised strains. On day 27 pi, surviving fishes were challenged by IP injection with the parental FL strain. Percentages of surviving carp are expressed according to days pi. The results presented are representative of three independent experiments.

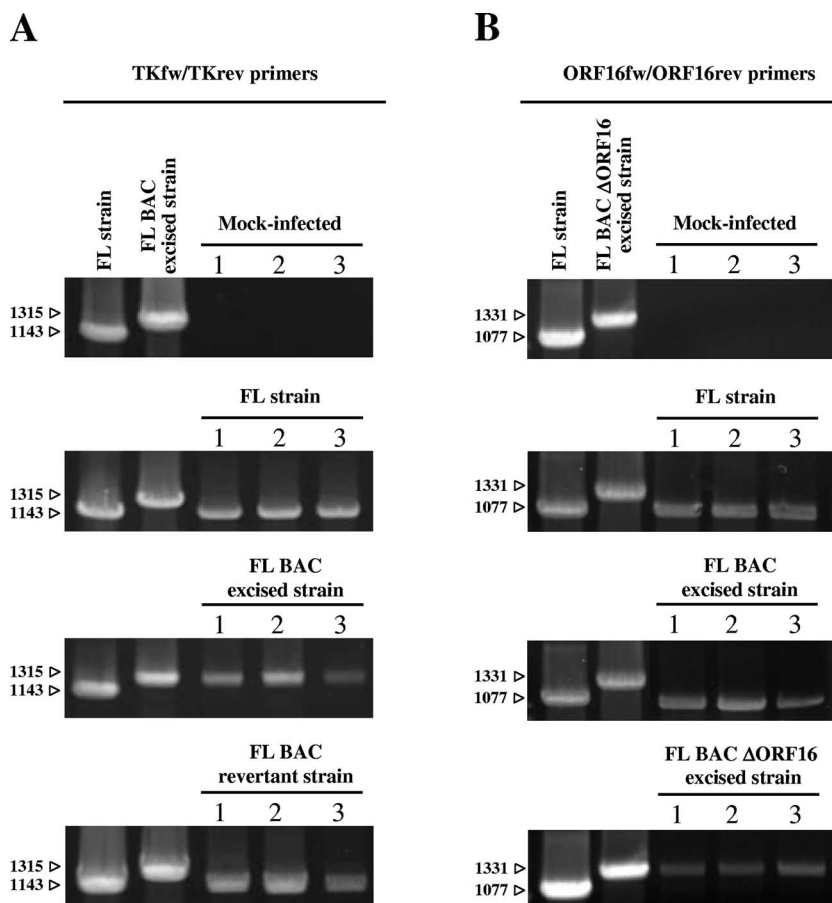


FIG. 7. PCR detection and characterization of KHV genomes recovered from infected dead carp. (A) DNA was extracted from the intestines of three mock-infected carp (selected randomly before the challenge) and from three dead carp from each of the groups infected with the FL, FL BAC excised, and FL BAC revertant strains. PCRs were performed with the TKfw/TKrev pair of primers. FL strain DNA and FL BAC excised strain DNA were used as controls. (B) DNA was extracted from the intestines of mock-infected carp and from dead carp infected with the FL, FL BAC excised, and FL BAC  $\Delta$ ORF16 excised strains. PCRs were performed with the ORF16fw/ORF16rev pair of primers. FL strain DNA and FL BAC  $\Delta$ ORF16 excised strain DNA were used as controls. The images are photographs of agarose gels. Numbers on the left of each gel are marker sizes.

In comparison to the parental strain, the FL BAC excision and FL BAC  $\Delta$ ORF16 excised strains exhibited partially attenuated phenotypes, inducing 30 and 40% mortality, respectively. This result suggests that ORF16, encoding a putative GPCR, does not contribute to KHV virulence significantly.

To control the infection of all groups of fish with the correct viral strain and to exclude any possibility of virus spread among tanks, PCR assays were performed on three randomly selected dead fishes from each infected group and three mock-infected fishes randomly selected before the challenge (Fig. 7). PCRs performed with the TKfw/TKrev (Fig. 7A) or ORF16fw/ORF16rev (Fig. 7B) primers confirmed that all samples from infected groups contained the KHV genome, while the sizes of the amplicons excluded the possibility of viral spread among the groups of fishes.

Finally, on day 32 (Fig. 6A) or day 27 (Fig. 6B) pi, the fishes that survived the primary inoculation were challenged by IP injection with the parental FL strain. Fishes were monitored until day 47. Independently of the strain used for the primary infection, none of the fishes died after the challenge or exhibited clinical signs of disease. In contrast, the challenge of the

mock-infected control group led to mortality rates of 60% (Fig. 6A) and 70% (Fig. 6B) by day 15 postchallenge.

## DISCUSSION

KHV is the etiological agent of an emerging disease which is highly contagious and extremely virulent and has a high mortality rate (25). Since the discovery of KHV in 1996, an increasing number of studies have been devoted to KHV. However, to date no information on the roles of individual KHV genes in the biology of KHV infection or in pathogenesis has been published. Similarly, there is a lack of safe and efficacious attenuated recombinant vaccines for the control of KHV disease. These lacunas are a consequence of the difficulty of generating KHV recombinant viruses by classical homologous recombination in eukaryotic cells. This problem can be circumvented by the use of BAC cloning technology (6, 40).

In the present study, we describe for the first time the cloning of the KHV genome as a stable and infectious BAC clone. The KHV BAC clone had several interesting features: (i) it was stable when propagated in bacteria, even over long periods

of culture corresponding to approximately 130 generations; (ii) it was infectious, as demonstrated by its ability to generate infectious virions after the transfection of permissive cells; (iii) the BAC cassette could be excised from the genome of reconstituted virus; (iv) the insertion of a large DNA sequence into the KHV genome did not affect the ability of KHV to replicate in vitro; (v) importantly, the replication of the FL BAC revertant strain was comparable to that of the FL strain, and the FL BAC revertant strain induced KHV disease in koi carp that was indistinguishable from that induced by the virulent parental strain; and (vi) finally, the usefulness of the KHV BAC clone for recombination studies was demonstrated by the production of an ORF16-deleted strain by prokaryotic recombination technology.

Even if the primary goal of the present study was not to investigate the role of KHV TK in pathogenesis, the recombinants derived from the FL BAC clone allowed us to do so. The FL BAC-excised strain encoding a truncated form of TK exhibited a partially attenuated phenotype in carp (Fig. 6). Four hypotheses may explain the partial attenuation observed. A first hypothesis may be the existence of a KHV enzyme that may partially compensate for TK gene deletion. Viral and cellular TKs have been classified into two types which differ in several respects (5). Type I TKs have higher molecular masses, typically around 40 kDa, and are active as homodimers. This subfamily contains herpesvirus TKs (with the exception of KHV TK) and also human mitochondrial TK. The herpes simplex virus type 1 TK is the viral prototype of this group. It is a multifunctional enzyme that possesses kinase activities normally performed by three separate cellular enzymes. It phosphorylates deoxythymidine and deoxyuridine, as does human TK, and deoxycytidine, as does human deoxycytidine kinase, and acts as a thymidylate kinase, as does human TMP kinase (TMPK) (8). TKs of type II include those from *Poxviridae* such as vaccinia virus and variola virus, as well as the human cytosolic TK. Type II TKs have smaller polypeptide chains than type I TKs, being ~25 kDa, but form homotetramers. Moreover, type II TKs have much narrower substrate specificities than type I TKs and phosphorylate only deoxyuridine and/or deoxythymidine. Based on the relatively small size and the nucleotide binding motif of KHV TK, it can be postulated that this TK belongs to type II (10). In poxviruses, the narrower substrate specificities of type II TKs are compensated for by a TMPK gene. Interestingly, the recent sequencing of the KHV genome has revealed the presence of a TMPK ORF (ORF140) (2). It is attractive to speculate that the encoded enzyme may at least partially compensate for the deletion of the KHV TK gene. In support of this hypothesis, it has been shown previously that the replacement of the herpes simplex virus type 1 TK ORF by a human TMPK gene renders the recombinant virus partially competent for replication in mouse sensory ganglia and reactivation from latency upon explant (8). Further studies are required to determine KHV TK and TMPK enzymatic activities and to determine how these enzymes contribute to the pathogenesis in the natural host.

Secondly, the partial attenuation observed with the FL BAC-excised strain may result from residual TK activity expressed by the truncated protein encoded by the FL BAC-excised strain. This hypothesis is very unlikely. Indeed, several studies of herpesviruses and poxviruses have demonstrated

previously that the C-terminal region of TK is essential for its activity (23). For example, it has been demonstrated previously that the last 10 residues of the 607-aa-long Epstein-Barr virus TK are essential for its activity (23). In comparison to Epstein-Barr virus TK, KHV TK is rather small, consisting of only 217 aa, among which only the first 185 residues are expressed by the FL BAC-excised strain. A third hypothesis to explain the partial attenuation observed with the FL BAC-excised strain may be that the removal of KHV TK function readily results in a partial-attenuation phenotype in the absence of functional complementation from another virus gene. Finally, a fourth hypothesis may be that host TK may partially replace the eliminated KHV TK.

The usefulness of the KHV BAC clone for recombination studies was demonstrated by the production of an ORF16-deleted strain by using prokaryotic recombination technology. In vivo, the strain induced a mortality rate comparable to that induced by the FL BAC-excised strain, suggesting that ORF16 does not contribute significantly to KHV virulence under the conditions used (Fig. 6B).

In conclusion, this study is the first to report the BAC cloning of a herpesvirus genome as large as that of KHV. The availability of a KHV BAC is an important advance that will allow the study of viral genes involved in KHV pathogenesis, as well as the production of safe and efficacious multiattenuated recombinant candidate vaccines to control KHV infection.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The CCB cell line developed by M. Neukirch was obtained through the courtesy of D. Steinhagen. L. Gillet and B. Dewals are postdoctoral researchers of the Fond National de la Recherche Scientifique. V. Stalin Raj is a postdoctoral fellow of the University of Liège.

This work was supported by a grant from the University of Liège (Crédit d'Impulsion).

#### REFERENCES

- Adkison, M. A., O. Gilad, and R. P. Hedrick. 2005. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.* **40**:53–62.
- Aoki, T., I. Hirono, K. Kurokawa, H. Fukuda, R. Nahary, A. Eldar, A. J. Davison, T. B. Waltzek, H. Bercovier, and R. P. Hedrick. 2007. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.* **81**:5058–5065.
- Balon, E. K. 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture* **129**: 3–48.
- Bercovier, H., Y. Fishman, R. Nahary, S. Sinai, A. Zlotkin, M. Eyngor, O. Gilad, A. Eldar, and R. P. Hedrick. 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.* **5**:13.
- Black, M. E., and D. E. Hruby. 1990. Quaternary structure of vaccinia virus thymidine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**:1080–1086.
- Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski, and M. Messerle. 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* **73**:8320–8329.
- Bretzinger, A., T. Fischer-Scherl, R. Oumouma, R. Hoffmann, and U. Truyen. 1999. Mass mortalities in koi, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **19**:182–185.
- Chen, S. H., W. J. Cook, K. L. Grove, and D. M. Coen. 1998. Human thymidine kinase can functionally replace herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for viral replication in mouse sensory ganglia and reactivation from latency upon explant. *J. Virol.* **72**:6710–6715.
- Coen, D. M., M. Kosz-Vnenchak, J. G. Jacobson, D. A. Leib, C. L. Bogard, P. A. Schaffer, K. L. Tyler, and D. M. Knipe. 1989. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4736–4740.
- Costes, B., M. Thirion, B. Dewals, J. Mast, M. Ackermann, N. Markine-Goriaynoff, L. Gillet, and A. Vanderplasschen. 2006. Felid herpesvirus 1

- glycoprotein G is a structural protein that mediates the binding of chemokines on the viral envelope. *Microbes Infect.* **8**:2657–2667.
10. **Coupar, B. E., S. G. Goldie, A. D. Hyatt, and J. A. Pallister.** 2005. Identification of a Bohle iridovirus thymidine kinase gene and demonstration of activity using vaccinia virus. *Arch. Virol.* **150**:1797–1812.
  11. **Dewals, B., C. Boudry, L. Gillet, N. Markine-Goriaynoff, L. de Leval, D. M. Haig, and A. Vanderplasschen.** 2006. Cloning of the genome of Alcelaphine herpesvirus 1 as an infectious and pathogenic bacterial artificial chromosome. *J. Gen. Virol.* **87**:509–517.
  12. **Dishon, A., A. Perelberg, J. Bishara-Shieban, M. Houze, M. Davidovich, S. Werker, and M. Kotler.** 2005. Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7285–7291.
  13. **Gilad, O., S. Yun, M. A. Adkison, K. Way, N. H. Willits, H. Bercovier, and R. P. Hedrick.** 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.* **84**:2661–2667.
  14. **Gilad, O., S. Yun, K. B. Andree, M. A. Adkison, A. Zlotkin, H. Bercovier, A. Eldar, and R. P. Hedrick.** 2002. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. *Dis. Aquat. Org.* **48**:101–108.
  15. **Gilad, O., S. Yun, F. J. Zagmutt-Vergara, C. M. Leutenegger, H. Bercovier, and R. P. Hedrick.** 2004. Concentrations of a koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.* **60**:179–187.
  16. **Gillet, L., V. Daix, G. Donofrio, M. Wagner, U. H. Koszinowski, B. China, M. Ackermann, N. Markine-Goriaynoff, and A. Vanderplasschen.** 2005. Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J. Gen. Virol.* **86**:907–917.
  17. **Gray, W. L., L. Mullis, S. E. LaPatra, J. M. Groff, and A. Goodwin.** 2002. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J. Fish Dis.* **25**:171–178.
  18. **Gunimaladevi, I., T. Kono, M. N. Venugopal, and M. Sakai.** 2004. Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.* **27**:583–589.
  19. **Haenen, O. L. M., K. Way, S. M. Bergmann, and E. Ariel.** 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **24**:293–307.
  20. **Hedrick, R. P.** 1996. Movement of pathogens with the international trade of live fish: problems and solutions. *Rev. Sci. Tech.* **15**:523–531.
  21. **Hedrick, R. P., O. Gilad, S. Yun, J. Spangenberg, R. Marty, M. Nordhausen, M. Kebus, H. Bercovier, and A. Eldar.** 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health.* **12**:44–55.
  22. **Hedrick, R. P., R. Marty, M. Nordhausen, M. Kebus, H. Bercovier, and A. Eldar.** 1999. An herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi *Cyprinus carpio*. *Fish Health Newsl.* **27**(no. 3):7.
  23. **Hsu, T. Y., M. W. Liu, Y. R. Chang, C. Y. Pai, M. Y. Liu, C. S. Yang, and J. Y. Chen.** 1996. Functional analysis of C-terminal deletion mutants of Epstein-Barr virus thymidine kinase. *J. Gen. Virol.* **77**:1893–1899.
  24. **Hutoran, M., A. Ronen, A. Perelberg, M. Houze, A. Dishon, I. Bejerano, N. Chen, and M. Kotler.** 2005. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species. *J. Virol.* **79**:1983–1991.
  25. **Houze, M., A. Dishon, and M. Kotler.** 2006. Characterization of a novel virus causing a lethal disease in carp and koi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:147–156.
  26. **Ishioka, T., M. Yoshizumi, S. Izumi, K. Suzuki, H. Suzuki, K. Kozawa, M. Arai, K. Nobusawa, Y. Morita, M. Kato, T. Hoshino, T. Iida, K. Kosuge, and H. Kimura.** 2005. Detection and sequence analysis of DNA polymerase and major envelope protein genes in koi herpesviruses derived from *Cyprinus carpio* in Gunma prefecture, Japan. *Vet. Microbiol.* **110**:27–33.
  27. **Liu, H., X. Shi, L. Gao, and Y. Jiang.** 2002. Study on the aetiology of koi epizootic disease using the method of nested-polymerase chain reaction assay (nested-PCR). *J. Huazhong Agric. Univ.* **21**:414–418.
  28. **Markine-Goriaynoff, N., L. Gillet, O. A. Karlsen, L. Haarr, F. Minner, P. P. Pastoret, M. Fukuda, and A. Vanderplasschen.** 2004. The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-M encoded by bovine herpesvirus 4 is not essential for virus replication despite contributing to post-translational modifications of structural proteins. *J. Gen. Virol.* **85**:355–367.
  29. **Morgan, R. W., J. L. Cantello, and C. H. McDermott.** 1990. Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. *Avian Dis.* **34**:345–351.
  30. **Neukirch, M., K. Böttcher, and S. Bunnajrakul.** 1999. Isolation of a virus from koi with altered gills. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **19**:221–224.
  - 30a. **Panicali, D., and E. Paoletti.** 1982. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:4927–4931.
  31. **Perelberg, A., A. Ronen, M. Hutoran, Y. Smith, and M. Kotler.** 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. *Vaccine* **23**:3396–3403.
  32. **Perelberg, A., M. Smirnov, M. Hutoran, A. Diamant, Y. Bejerano, and M. Kotler.** 2003. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Isr. J. Aquaculture* **55**:5–12.
  33. **Pikarsky, E., A. Ronen, J. Abramowitz, B. Levavi-Sivan, M. Hutoran, Y. Shapira, M. Steinitz, A. Perelberg, D. Soffer, and M. Kotler.** 2004. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J. Virol.* **78**:9544–9551.
  34. **Ronen, A., A. Perelberg, J. Abramowitz, M. Hutoran, S. Tinman, I. Bejerano, M. Steinitz, and M. Kotler.** 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* **21**:4677–4684.
  35. **Sano, M., T. Ito, J. Kurita, T. Yanai, N. Watanabe, M. Satoshi, and T. Iida.** 2004. First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.* **39**:165–168.
  36. **Smith, G. A., and L. W. Enquist.** 2000. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:4873–4878.
  37. **Soliman, H., and M. El-Matbouli.** 2005. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virol. J.* **2**:83.
  38. **St.-Hilaire, S., N. Beevers, K. Way, R. M. Le Deuff, P. Martin, and C. Joiner.** 2005. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.* **67**:15–23.
  39. **Vanderplasschen, A., and G. L. Smith.** 1997. A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. *J. Virol.* **71**:4032–4041.
  40. **Wagner, M., Z. Ruzsics, and U. H. Koszinowski.** 2002. Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.* **10**:318–324.
  41. **Waltzek, T. B., G. O. Kelley, D. M. Stone, K. Way, L. Hanson, H. Fukuda, I. Hirono, T. Aoki, A. J. Davison, and R. P. Hedrick.** 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *J. Gen. Virol.* **86**:1659–1667.
  42. **Warming, S., N. Costantino, D. L. Court, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland.** 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res.* **33**:e36.

---

## **Discussion et perspectives**

---

---

## Discussion et perspectives

---

Le KHV est l'agent responsable d'une maladie émergente hautement contagieuse, très virulente et entraînant de fortes mortalités (36). Depuis sa découverte en 1996, le nombre d'études sur le sujet ne cesse d'augmenter. Toutefois, aujourd'hui encore, très peu d'informations ont été publiées concernant le rôle des différents gènes dans la biologie de l'infection ou la pathogénie. De plus, il n'y a toujours aucun vaccin atténué sûr et efficace pour contrôler cette pathologie. Ces deux constatations peuvent être expliquées par la difficulté à générer des virus recombinants par recombinaison homologue classique en cellules eucaryotes.

Récemment, les manipulations de génome d'herpèsvirus ont été facilitées par l'utilisation de chromosomes artificiels bactériens (BAC) (72). Ces vecteurs permettent le maintien stable des génomes viraux au sein de souches d'*E.coli*, tout en permettant leur mutagenèse en système procaryote. Une fois manipulés, ces génomes BAC modifiés permettent la production de virions infectieux par simple transfection en cellules eucaryotes permissives. Ainsi, la technologie BAC et les techniques de mutagenèse en système procaryote ont révolutionné la production de souches recombinantes chez les herpèsvirus (72, 74). Les mécanismes de recombinaison en *E.coli* sont à l'heure actuelle bien compris et sont plus rapide et facile que les techniques classiques de recombinaison homologue en cellules eucaryotes. Ils offrent plusieurs avantages. Premièrement, le génome viral recombinant peut être caractérisé avant la production de particules virales infectieuses en cellules eucaryotes. Cette caractéristique contraste avec la méthode classique de recombinaison homologue en cellules eucaryotes où l'analyse structurale du recombinant ne peut commencer qu'après son isolement de la population virale parentale. Deuxièmement, les techniques de mutagenèse en système procaryote permettent l'introduction de n'importe quelles modifications génomiques même celles touchant des gènes essentiels aboutissant à l'inhibition de la réplication virale. Troisièmement, la production de recombinants en système procaryote limite les multiples passages sur culture cellulaire évitant ainsi l'atténuation spontanée rencontrée chez certains virus, et notamment chez le KHV (56). Enfin, le génome BAC peut servir de vecteur d'expression pour une multitude de transgènes insérés n'importe où dans le génome sans nécessiter de gène rapporteur.

Ce mémoire de formation doctorale a eu pour but le clonage du génome du KHV sous la forme d'un BAC stable en bactéries et infectieux en cellules eucaryotes. Ce clone BAC du KHV possède plusieurs caractéristiques intéressantes. Premièrement, il est stable en bactéries pendant de longues périodes de culture. Deuxièmement, il est capable de régénérer des virions infectieux après transfection sur cellules eucaryotes permissives. Troisièmement, la cassette BAC peut être facilement excisée du génome de ces virions reconstitués. Enfin, l'insertion de séquences ADN de grande taille ne semble pas affecter la réplication du virus *in vitro*.

La production de ce BAC a nécessité plusieurs étapes. Premièrement, nous avons produit une souche recombinante du KHV contenant la cassette BAC par recombinaison homologe en cellules eucaryotes. Cette production a été facilitée par la présence au sein de la cassette BAC d'un gène codant pour une protéine de fusion EGFP-Neo<sup>R</sup> sous contrôle du promoteur précoce-immédiat du cytomégalo virus humain (18). L'expression de cette protéine chimérique permet d'une part de visualiser l'événement de recombinaison en cellules eucaryotes (EGFP); et d'autre part de sélectionner de manière positive cet événement (Neo<sup>R</sup>) en lui conférant une résistance à une drogue. Le choix du site d'insertion de la cassette BAC a été restreint par le manque d'information disponible au moment du commencement de cette étude. En effet, la séquence du génome n'étant alors que partiel, le seul site d'insertion possible était l'ORF du gène TK connue pour être non essentielle chez les autres herpèsvirus. Deuxièmement, le génome de cette souche recombinante a été extrait des cellules eucaryotes sous forme circulaire. Cette étape déterminante pour l'électroporation du génome viral en bactérie a été rendue particulièrement complexe par la taille, la complexité et la fragilité du génome du KHV. En effet, la taille imposante du génome a entraîné une fragilité et une susceptibilité accrue au clivage spontané lors des processus d'extraction de la forme circulaire du génome. La grande majorité des génomes obtenus était donc sous forme de fragments d'ADN représentant seulement une partie du génome. Troisièmement, le génome circularisé a été électroporé en bactéries *E.coli* de type DH10B. Au vu du nombre restreint de molécule génomique entière obtenue, l'efficacité de l'électroporation a été très faible. En effet, le nombre de clones BAC obtenus a été de moins de 0.2%. Cependant, malgré la fragilité, la taille et la complexité du génome, le clone BAC obtenu a été évalué comme étant très stable en bactéries. Cette stabilité génomique est un pré requis essentiel pour l'utilisation des méthodes de mutagenèse en systèmes procaryotes. Quatrièmement, des particules virales infectieuses ont été reconstituées en cellules eucaryotes. De la même manière que pour la forme circulaire du génome, l'extraction du clone BAC des bactéries a été rendue difficile à cause de la fragilité du génome du KHV. Par contre, contrairement à d'autres herpèsvirus, cette étape n'a pas nécessité l'utilisation de molécules déclenchant la cascade d'expression des gènes viraux. Enfin, dernièrement, afin de pouvoir utiliser le BAC KHV comme background génétique pour la production de souches recombinantes, nous avons vérifié la possibilité de reconstituer des particules virales infectieuses de deux types. D'une part, nous avons reconstitué des particules infectieuses débarrassées de la cassette BAC et n'exprimant plus TK. Cette souche appelée « excisée » diffère de la souche parentale sauvage par une cicatrice de 172 pb. Cette étape a été rendue difficile au vu de l'incapacité de produire une lignée exprimant de façon stable la recombinase Cre. Ainsi, la cassette BAC a été excisée par la recombinase Cre exprimée de façon transitoire en lignée cellulaire. D'autre part, nous avons reconstitué des particules infectieuses dites « révertantes », semblables à la souche parentale sauvage, par recombinaison homologe en cellules eucaryotes entre le clone BAC du KHV et la cassette TK sauvage. L'ensemble des souches recombinantes produites au cours de ce mémoire ont été caractérisées *in vitro* quant à leur structure moléculaire, la production de plaque de lyse et leur cinétique

de réplication. Cette caractérisation n'a révélée aucune différence entre les souches ainsi testées. Ensuite, l'utilité du clone BAC KHV a été démontrée par la production d'une souche recombinante, délétée pour l'ORF16 codant pour un homologue de GPCR. Cette souche recombinante a été produite par le technique de mutagénèse bactérienne basée sur la sélection positive du gène *galK* (74). Enfin, finalement, les souches recombinantes produites au cours de cette étude ont été comparées *in vivo* quant à leur virulence après inoculation au sein de carpes koi naïves. Les souches parentale et révertante ont induit une maladie semblable en tout point au sein des carpes koi démontrant une virulence comparable de ces deux souches. Par contre, la souche excisée n'exprimant plus TK et la souche excisée délétée ORF16 n'exprimant ni TK ni la GPCR ont montré une atténuation partielle par comparaison avec la souche parentale sauvage.

Devant le manque d'information disponible sur le rôle des différents gènes viraux dans la pathogénie de l'infection et l'absence de moyen de prévention ou de traitement pour contrôler l'infection des carpes, il est devenu essentiel de produire rapidement des souches recombinantes de KHV. Ainsi, le clonage du KHV sous forme d'un BAC stable et infectieux représente une avancée inestimable et ouvre de nombreuses perspectives fondamentales et appliquées.

D'un point de vue fondamental, le BAC KHV permettra d'étudier l'implication des différents gènes dans la pathogénie de l'infection. Grâce à la publication récente de la séquence entière du génome KHV (3), de nombreux gènes pourront être ciblés de façon spécifique. A l'heure actuelle, des recombinants KHV ciblant plusieurs gènes non essentiels mais néanmoins supposés jouer un rôle important dans la pathogénie de l'infection sont en cours de production au sein du laboratoire d'accueil (Costes B, communication personnelle). Ces recombinants aideront à comprendre le rôle des différents gènes dans la biologie de l'infection des carpes par le KHV et dans la biologie de l'infection des herpesvirus en général.

D'un point de vue appliqué, la souche recombinante n'exprimant plus TK présente plusieurs intérêts. Premièrement, elle n'exprime plus TK. Si on se réfère aux données de la littérature concernant la TK des autres herpesvirus, cette perte d'expression de TK devrait entraîner une atténuation complète du phénotype observé et non une atténuation partielle comme obtenue au cours de cette étude (76). Des études complémentaires sont en cours actuellement au sein du laboratoire d'accueil afin de pouvoir expliquer ce résultat surprenant. Quoiqu'il en soit, cette souche KHV atténuée pourrait représenter une souche vaccinale potentielle. Cette contribution n'est en rien négligeable vu qu'à l'heure actuelle aucune souche recombinante vaccinale sûre et efficace n'est disponible. Une souche KHV atténuée par passages successifs en culture de cellule a été produite en Israël (49, 56). Cependant, cette souche atténuée présente deux désavantages majeurs. Premièrement, cette souche atténuée par passage en culture de cellule pourrait subir de nouvelles mutations régénérant le phénotype sauvage. Deuxièmement, cette souche dite « atténuée » entraîne un taux de mortalité de 20 % chez les carpes infectées, ce qui n'est pas négligeable d'un point de vue de son utilisation potentielle pour une vaccination de masse au sein des piscicultures de carpes (Costes B.

communication personnelle). Aussi, un vaccin de type inactivé délivré par administration orale dans des vésicules de liposome a été produit au Japon (75). Cependant, celui-ci n'induit qu'une protection partielle contre le KHV rendant son utilisation inefficace. Un deuxième intérêt conféré par cette souche virale n'exprimant plus TK est que celle-ci pourrait être rendue « encore plus atténuée » en ciblant d'autres gènes importants impliqués dans la virulence du virus. Le séquençage récent du génome entier du KHV facilitera grandement la recherche d'ORF potentielles (3). Enfin, la souche KHV recombinante pourrait être utilisée en tant que vecteur d'expression de transgènes. A ce titre, l'expression de la protéine G, immunogène majeur du virus de la virémie printanière pourrait conférer aux carpes infectées par cette souche KHV recombinante une double immunité protectrice, non seulement contre le KHV mais aussi contre la virémie printanière, qui à elles deux représentent les principales pathologies virales rencontrées dans les piscicultures de carpes (2).

En conclusion, ce mémoire de formation doctorale aura permis le clonage du génome du KHV sous la forme d'un BAC stable et infectieux utilisé au laboratoire d'accueil comme outil moléculaire de base dans la production de plusieurs souches recombinantes. Celles-ci permettront une avancée considérable dans les recherches tant fondamentales qu'appliquées sur le KHV.

---

## **Bibliographie**

---

1. **Adkison, M. A., Gilad, O., and Hedrick, R. P.** 2005. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.* **40**:53-62.
2. **Ahne, W., H. V. Bjorklund, S. Essbauer, N. Fijan, G. Kurath, and J. R. Winton.** 2002. Spring viremia of carp (SVC). *Dis Aquat Organ* **52**:261-72.
3. **Aoki, T., I. Hirono, K. Kurokawa, H. Fukuda, R. Nahary, A. Eldar, A. J. Davison, T. B. Waltzek, H. Bercovier, and R. P. Hedrick.** 2007. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J Virol* **81**:5058-65.
4. **Ariav, R., S. Tinman, I. Paperna, and I. Bejerano.** 1998. Presented at the EAAP 9th International Conference, Rhodes, Greece.
5. **Balon, E. K.** 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture* **129**:3-48.
6. **Bercovier, H., Y. Fishman, R. Nahary, S. Sinai, A. Zlotkin, M. Eynogor, O. Gilad, A. Eldar, and R. P. Hedrick.** 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol* **5**:13.
7. **Black, M. E., and D. E. Hruby.** 1990. Quaternary structure of vaccinia virus thymidine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **169**:1080-6.
8. **Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* **73**:8320-9.
9. **Bresnahan, W. A., and T. Shenk.** 2000. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* **288**:2373-6.
10. **Bretzinger, A., Fischer-Scherl, T., Oumouma, R., Hoffmann, R., Truyen, U.** 1999. Mass mortalities in koi, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **19**:182-185.
11. **Chen, S. H., W. J. Cook, K. L. Grove, and D. M. Coen.** 1998. Human thymidine kinase can functionally replace herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for viral replication in mouse sensory ganglia and reactivation from latency upon explant. *J Virol* **72**:6710-6715.
12. **Choi, D. L., S. G. Sohn, J. D. Bang, J. W. Do, and M. S. Park.** 2004. Ultrastructural identification of a herpes-like virus infection in common carp *Cyprinus carpio* in Korea. *Dis Aquat Organ* **61**:165-8.
13. **Coen, D. M., M. Kosz-Vnenchak, J. G. Jacobson, D. A. Leib, C. L. Bogard, P. A. Schaffer, K. L. Tyler, and D. M. Knipe.** 1989. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:4736-40.
14. **Costes, B., M. Thirion, B. Dewals, J. Mast, M. Ackermann, N. Markine-Goriaynoff, L. Gillet, and A. Vanderplasschen.** 2006. Felid herpesvirus 1 glycoprotein G is a structural protein that mediates the binding of chemokines on the viral envelope. *Microbes Infect* **8**:2657-67.
15. **Coupar, B. E. H., S. G. Goldie, A. D. Hyatt, and J. A. Pallister.** 2005. Identification of a Bohle iridovirus thymidine kinase gene and demonstration of activity using vaccinia virus. *Archives of Virology* **150**:1797-1812.
16. **Davison, A. J.** 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* **86**:69-88.
17. **Delecluse, H. J., T. Hilsendegen, D. Pich, R. Zeidler, and W. Hammerschmidt.** 1998. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8245-50.

18. **Dewals, B., C. Boudry, L. Gillet, N. Markine-Goriaynoff, L. de Leval, D. M. Haig, and A. Vanderplasschen.** 2006. Cloning of the genome of Alcelaphine herpesvirus 1 as an infectious and pathogenic bacterial artificial chromosome. *J Gen Virol* **87**:509-17.
19. **Dishon, A., A. Perelberg, J. Bishara-Shieban, M. Houze, M. Davidovich, S. Werker, and M. Kotler.** 2005. Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl Environ Microbiol* **71**:7285-91.
20. **El-Matbouli, M., M. Saleh, and H. Soliman.** 2007. Detection of cyprinid herpesvirus type 3 in goldfish cohabiting with CyHV-3-infected koi carp (*Cyprinus carpio koi*). *Vet Rec* **161**:792-3.
21. **Flint, S. J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R., Skalka, A.M.** 2004. Structure, Genome Organization, and Infectious Cycles. Herpesviruses, p. 810-813, Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses, second edition ed, Washington.
22. **Garber, D. A., S. M. Beverley, and D. M. Coen.** 1993. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* **197**:459-62.
23. **Gilad, O., S. Yun, M. A. Adkison, K. Way, N. H. Willits, H. Bercovier, and R. P. Hedrick.** 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J Gen Virol* **84**:2661-7.
24. **Gilad, O., S. Yun, K. B. Andree, M. A. Adkison, A. Zlotkin, H. Bercovier, A. Eldar, and R. P. Hedrick.** 2002. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. *Dis Aquat Organ* **48**:101-8.
25. **Gilad, O., S. Yun, F. J. Zagnutt-Vergara, C. M. Leutenegger, H. Bercovier, and R. P. Hedrick.** 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis Aquat Organ* **60**:179-87.
26. **Gillet, L., V. Daix, G. Donofrio, M. Wagner, U. H. Koszinowski, B. China, M. Ackermann, N. Markine-Goriaynoff, and A. Vanderplasschen.** 2005. Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J Gen Virol* **86**:907-17.
27. **Gray, W. L., L. Mullis, S. E. LaPatra, J. M. Groff, and A. Goodwin.** 2002. Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J Fish Dis* **25**:171-178.
28. **Gunimaladevi, I., T. Kono, M. N. Venugopal, and M. Sakai.** 2004. Detection of koi herpesvirus in common carp, *Cyprinus carpio* L., by loop-mediated isothermal amplification. *J Fish Dis* **27**:583-9.
29. **Haenen, O. L. M., K. Way, S. M. Bergmann, and E. Ariel.** 2004. The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **24**:293-307.
30. **Haramoto, E., M. Kitajima, H. Katayama, and S. Ohgaki.** 2007. Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *J Fish Dis* **30**:59-61.
31. **Hedrick, R. P.** 1996. Movement of pathogens with the international trade of live fish: problems and solutions. *Rev Sci Tech* **15**:523-31.
32. **Hedrick, R. P., O. Gilad, S. Yun, J. Spangenberg, R. Marty, M. Nordhausen, M. Kebus, H. Bercovier, and A. Eldar.** 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *J. Aquat. Anim. Health* **12**:44-55.

33. **Hedrick, R. P., R. Marty, M. Nordhausen, M. Kebus, H. Bercovier, and A. Eldar.** 1999. An herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi *Cyprinus carpio*. Fish Health Newsletter, FHS, Am. Fish. Soc. **27**:7.
34. **Hsu, T. Y., M. W. Liu, Y. R. Chang, C. Y. Pai, M. Y. Liu, C. S. Yang, and J. Y. Chen.** 1996. Functional analysis of C-terminal deletion mutants of Epstein-Barr virus thymidine kinase. J Gen Virol **77**:1893-1899.
35. **Hutoran, M., A. Ronen, A. Perelberg, M. Ilouze, A. Dishon, I. Bejerano, N. Chen, and M. Kotler.** 2005. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species. J Virol **79**:1983-91.
36. **Ilouze, M., A. Dishon, and M. Kotler.** 2006. Characterization of a novel virus causing a lethal disease in carp and koi. Microbiol Mol Biol Rev **70**:147-56.
37. **Ishioka, T., M. Yoshizumi, S. Izumi, K. Suzuki, H. Suzuki, K. Kozawa, M. Arai, K. Nobusawa, Y. Morita, M. Kato, T. Hoshino, T. Iida, K. Kosuge, and H. Kimura.** 2005. Detection and sequence analysis of DNA polymerase and major envelope protein genes in koi herpesviruses derived from *Cyprinus carpio* in Gunma prefecture, Japan. Vet Microbiol **110**:27-33.
38. **Kazuaki, M., M. Honjo, K. Yukihiro, K. Uchii, R. Yonekura, and Z. Kawabata.** 2008. Detection and significance of koi herpesvirus (KHV) in freshwater environments, p. 1262-1272, vol. 53.
39. **Liu, H., X. Shi, L. Gao, and Y. Jiang.** 2002. Study on the aetiology of koi epizootic disease using the method of nested-polymerase chain reaction assay (nested-PCR). J. Huazhong Agric. Univ **21**:414-418.
40. **Markine-Goriaynoff, N., L. Gillet, O. A. Karlsen, L. Haarr, F. Minner, P. P. Pastoret, M. Fukuda, and A. Vanderplasschen.** 2004. The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-M encoded by bovine herpesvirus 4 is not essential for virus replication despite contributing to post-translational modifications of structural proteins. J Gen Virol **85**:355-67.
41. **McGeoch, D. J., F. J. Rixon, and A. J. Davison.** 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. Virus Research **117**:90-104.
42. **Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski.** 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A **94**:14759-63.
43. **Miwa, S., T. Ito, and M. Sano.** 2007. Morphogenesis of koi herpesvirus observed by electron microscopy. J Fish Dis **30**:715-22.
44. **Miyazaki, T., Y. Kuzuya, S. Yasumoto, M. Yasuda, and T. Kobayashi.** 2008. Histopathological and ultrastructural features of Koi herpesvirus (KHV)-infected carp *Cyprinus carpio*, and the morphology and morphogenesis of KHV, p. 1-11, vol. 80.
45. **Mocarski, E. S., L. E. Post, and B. Roizman.** 1980. Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions. Cell **22**:243-55.
46. **Morgan, R. W., J. L. Cantello, and C. H. McDermott.** 1990. Transfection of chicken embryo fibroblasts with Marek's disease virus DNA. Avian Dis **34**:345-51.
47. **Neukirch, M., K. Böttcher, and S. Bunnajrakul.** 1999. Isolation of a virus from koi with altered gills. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. **19**:221-224.
48. **Panicali, D., and E. Paoletti.** 1992. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. 1982. Biotechnology **24**:503-7.
49. **Perelberg, A., A. Ronen, M. Hutoran, Y. Smith, and M. Kotler.** 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. Vaccine **23**:3396-403.

50. **Perelberg, A., M. Smirnov, M. Hutoran, A. Diamant, Y. Bejerano, and M. Kotler.** 2003. Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus Carpio* in Israel. *Isr. J. Aquacult.* **55**:5-12.
51. **Pikarsky, E., A. Ronen, J. Abramowitz, B. Levavi-Sivan, M. Hutoran, Y. Shapira, M. Steinitz, A. Perelberg, D. Soffer, and M. Kotler.** 2004. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J Virol* **78**:9544-51.
52. **Poffenberger, K. L., and B. Roizman.** 1985. A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J Virol* **53**:587-95.
53. **Pokorova, D., T. Vesely, V. Piackova, S. Reschova, and J. Hulova.** 2005. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. *Vet. Med.-Czech* **5**:139-147.
54. **Post, L. E., and B. Roizman.** 1981. A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* **25**:227-32.
55. **Roizman, B., and P. E. Pellet.** 2001. The family *Herpesviridae* : a brief introduction, p. 2381-2397. *In* H. P. M. Knipe D.M. (ed.), *Fields virology*, 4th Edition ed. Lippincott, Williams & Wilkins publishers, Philadelphia.
56. **Ronen, A., A. Perelberg, J. Abramowitz, M. Hutoran, S. Tinman, I. Bejerano, M. Steinitz, and M. Kotler.** 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* **21**:4677-84.
57. **Rosenkranz, D., B. G. Klupp, J. P. Teifke, H. Granzow, D. Fichtner, T. C. Mettenleiter, and W. Fuchs.** 2008. Identification of envelope protein pORF81 of koi herpesvirus. *J Gen Virol* **89**:896-900.
58. **Sadler, J., E. Marecaux, and A. E. Goodwin.** 2008. Detection of koi herpes virus (CyHV-3) in goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to infected koi, p. 71-72, vol. 31.
59. **Sano, M., T. Ito, J. Kurita, T. Yanai, N. Watanabe, M. Satoshi, and T. Iida.** 2004. First detection of koi herpes virus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.* **39**:165-168.
60. **Shizuya, H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon.** 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8794-7.
61. **Smiley, J. R.** 1980. Construction in vitro and rescue of a thymidine kinase-deficient deletion mutation of herpes simplex virus. *Nature* **285**:333-5.
62. **Smith, G. A., and L. W. Enquist.** 2000. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4873-8.
63. **Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**:1007-21.
64. **Soliman, H., and M. El-Matbouli.** 2005. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virol J* **2**:83.
65. **Spear, P. G.** 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* **6**:401-10.
66. **St-Hilaire, S., N. Beevers, K. Way, R. M. Le Deuff, P. Martin, and C. Joiner.** 2005. Reactivation of koi herpesvirus infections in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Organ* **67**:15-23.

67. **Tanaka, M., H. Kagawa, Y. Yamanashi, T. Sata, and Y. Kawaguchi.** 2003. Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *J Virol* **77**:1382-91.
68. **Tao, Q., and H. B. Zhang.** 1998. Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors. *Nucleic Acids Res* **26**:4901-9.
69. **Thiery, R., F. Pozet, and P. Kinkelin.** 2003. Deux maladies virales émergentes chez les poissons: la nodaviriose des espèces marines et l'herpesviriose de la carpe koi, *Cyprinus carpio*. *Epidemiologie et santé animale* **44**:83-94.
70. **van Zijl, M., W. Quint, J. Briaire, T. de Rover, A. Gielkens, and A. Berns.** 1988. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J Virol* **62**:2191-5.
71. **Vanderplassen, A., and G. L. Smith.** 1997. A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. *J Virol* **71**:4032-41.
72. **Wagner, M., Z. Ruzsics, and U. H. Koszinowski.** 2002. Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol* **10**:318-24.
73. **Waltzek, T. B., G. O. Kelley, D. M. Stone, K. Way, L. Hanson, H. Fukuda, I. Hirono, T. Aoki, A. J. Davison, and R. P. Hedrick.** 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. *J Gen Virol* **86**:1659-67.
74. **Warming, S., N. Costantino, D. L. Court, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland.** 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* **33**:e36.
75. **Yasumoto, S., Y. Kuzuya, M. Yasuda, T. Yoshimura, and T. Miyazaki.** 2006. Oral Immunization of Common Carp with a Liposome Vaccine Fusing Koi Herpesvirus Antigen. *Fish Pathology* **41**:141-145.
76. **Yokoyama, N., K. Maeda, Y. Tohya, Y. Kawaguchi, Y. S. Shin, M. Ono, S. Ishiguro, Y. Fujikawa, and T. Mikami.** 1996. Pathogenicity and vaccine efficacy of a thymidine kinase-deficient mutant of feline herpesvirus type 1 in cats. *Arch Virol* **141**:481-94.

