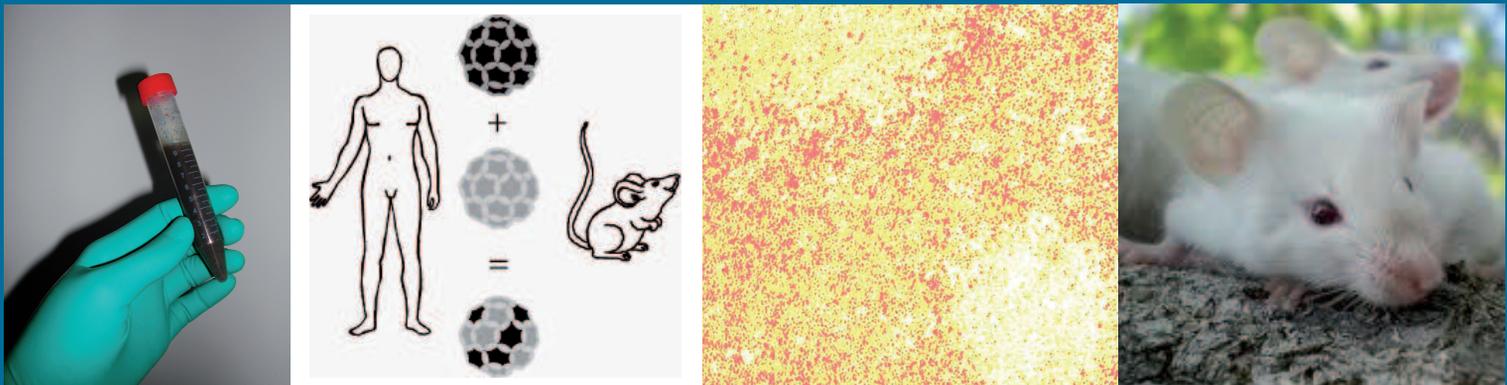


Study of recombinant human and murine noroviruses in natural and experimental conditions

Etude des virus recombinants chez les norovirus humains et murins en conditions naturelles et expérimentales



Elisabeth Mathijs

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Vétérinaires
Année académique 2010-2011

Université
de Liège



Académie universitaire Wallonie-Europe

Université de Liège

Faculté de médecine vétérinaire

Département des maladies infectieuses et parasitaires

Service de virologie vétérinaire et maladies virales animales

Département des sciences des denrées alimentaires

Service de microbiologie des denrées alimentaires

**Study of recombinant human and murine noroviruses
in natural and experimental conditions**

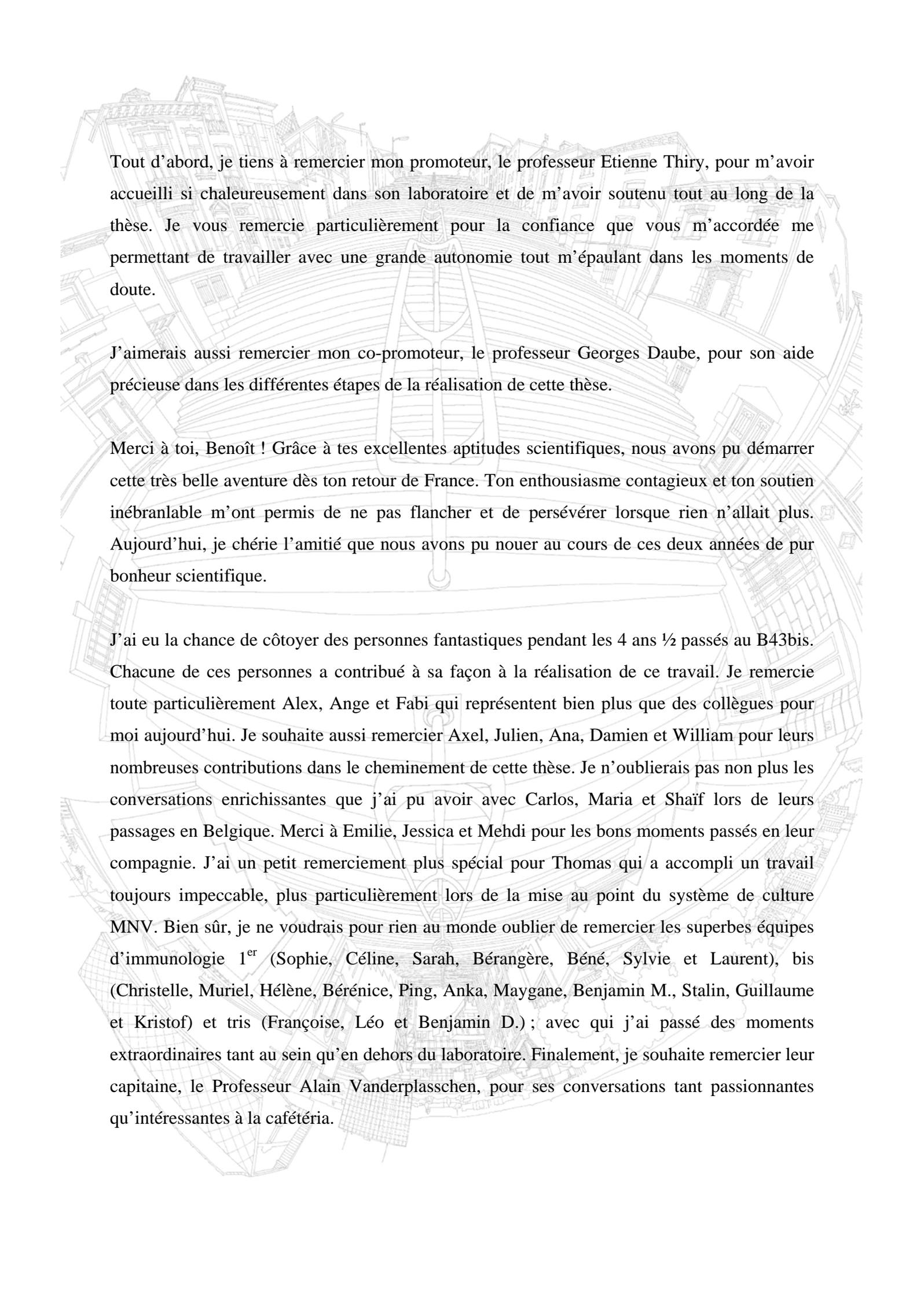
**Étude des virus recombinants chez les norovirus humains et murins
en conditions naturelles et expérimentales**

Elisabeth Mathijs

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Sciences Vétérinaires

Année académique 2010-2011



Tout d'abord, je tiens à remercier mon promoteur, le professeur Etienne Thiry, pour m'avoir accueilli si chaleureusement dans son laboratoire et de m'avoir soutenu tout au long de la thèse. Je vous remercie particulièrement pour la confiance que vous m'accordée me permettant de travailler avec une grande autonomie tout m'épaulant dans les moments de doute.

J'aimerais aussi remercier mon co-promoteur, le professeur Georges Daube, pour son aide précieuse dans les différentes étapes de la réalisation de cette thèse.

Merci à toi, Benoît ! Grâce à tes excellentes aptitudes scientifiques, nous avons pu démarrer cette très belle aventure dès ton retour de France. Ton enthousiasme contagieux et ton soutien inébranlable m'ont permis de ne pas flancher et de persévérer lorsque rien n'allait plus. Aujourd'hui, je chérie l'amitié que nous avons pu nouer au cours de ces deux années de pur bonheur scientifique.

J'ai eu la chance de côtoyer des personnes fantastiques pendant les 4 ans ½ passés au B43bis. Chacune de ces personnes a contribué à sa façon à la réalisation de ce travail. Je remercie toute particulièrement Alex, Ange et Fabi qui représentent bien plus que des collègues pour moi aujourd'hui. Je souhaite aussi remercier Axel, Julien, Ana, Damien et William pour leurs nombreuses contributions dans le cheminement de cette thèse. Je n'oublierais pas non plus les conversations enrichissantes que j'ai pu avoir avec Carlos, Maria et Shaïf lors de leurs passages en Belgique. Merci à Emilie, Jessica et Mehdi pour les bons moments passés en leur compagnie. J'ai un petit remerciement plus spécial pour Thomas qui a accompli un travail toujours impeccable, plus particulièrement lors de la mise au point du système de culture MNV. Bien sûr, je ne voudrais pour rien au monde oublier de remercier les superbes équipes d'immunologie 1^{er} (Sophie, Céline, Sarah, Bérangère, Béné, Sylvie et Laurent), bis (Christelle, Muriel, Hélène, Bérénice, Ping, Anka, Maygane, Benjamin M., Stalin, Guillaume et Kristof) et tris (Françoise, Léo et Benjamin D.); avec qui j'ai passé des moments extraordinaires tant au sein qu'en dehors du laboratoire. Finalement, je souhaite remercier leur capitaine, le Professeur Alain Vanderplasschen, pour ses conversations tant passionnantes qu'intéressantes à la cafétéria.



Autant dire que tout ce travail n'aurait pas pu être possible sans l'intervention d'une équipe technique de choc : Domi, toujours prêt à raconter une petite blague ; Lorène, toujours les mots qu'il faut ; Choupette, mon petit rayon de soleil ; Cédric et Charles, le duo bricoleur ; Antoine, notre SMSeur en série ; et bien sûr François, le comique du service. Je vous remercie tous de tout cœur pour votre aide précieuse.

Merci à vous, Xtina et Jessica, pour votre disponibilité et votre bonne humeur à toute épreuve.

Un grand merci au professeur Claude Saegerman et à toute son équipe (Bénédicte, Marie-France, Sarah, Claire, Ludovic, Jean-Baptiste et Sébastien) pour les collaborations tant scientifiques que lucratives.

De plus, j'aimerais remercier toutes les personnes ayant contribué à la réalisation du travail présenté dans cette thèse : Nadine Antoine, Christina Franssen, Marie-Athénaïs de Schaetzen, Carine Nezer, Caroline De Backer, Pascale Huynen, Benoît Kabamba. Ook zou ik graag alle partners van het NORISK project willen bedanken: Sarah Denayer, Nadine Botteldoorn, Katelijne Dierick, Professor Mieke Uyttendaele, Leen Baert, Lieve Herman, Els Vancoillie en Ambroos Stals.

Je ne voudrais surtout pas manquer de remercier ma famille, ma belle-famille et mes amis pour le soutien et les nombreuses attentions qu'ils m'ont apportés lors de cette dernière ligne droite. Je suis consciente que je suis très chanceuse d'être aussi bien entourée. J'ai une pensée très particulière pour ma petite Bompì qui nous a quitté l'année dernière et qui me manque énormément.

Merci à mon petit mari tout frais pour son soutien, son aide et sa patience. Grâce à toi, j'ai eu la chance de pouvoir me consacrer entièrement à mon travail même si cela pouvait empiéter pas mal sur notre vie de couple. Je te promets de nous consacrer plus de temps dès à présent.

Je remercie Merial pour leur contribution à l'impression du manuscrit.

Table of contents

Table of contents	i
Abbreviation list	ii
Chapter 1: Introduction	2
1.1 Noroviruses.....	4
1.1.1 Background	5
1.1.2 Viral structure and genomic organisation	6
1.1.3 Taxonomy and classification.....	7
1.1.4 Replication cycle	8
1.1.5 Norovirus infections in humans and animals	9
In Humans	9
In animals	10
1.1.6 Epidemiology, transmission and zoonotic potential	12
1.1.7 Diagnosis of norovirus infections	15
2.1 Norovirus recombination.....	17
2.1.1 Definitions and general aspects of RNA recombination	17
History	17
Types of RNA recombination	18
Recombination detection tools	19
Evolutionary advantages of RNA recombination	19
Constraints on RNA recombination	20
2.1.2 Recombination in noroviruses.....	21

Chapter 2: Objectives	22
Chapter 3: Experimental section	25
3.1 Study on human norovirus recombination in natural conditions.....	26
3.1.1 Novel norovirus recombinants and GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium.....	27
3.2 Study of murine norovirus recombination in experimental conditions	44
3.2.1 Experimental evidence of recombination in murine noroviruses.....	46
3.2.2 <i>In vivo</i> characterisation of an <i>in vitro</i> generated recombinant murine norovirus...	59
Chapter 4: Discussion and perspectives	74
Chapter 5: Summary – Résumé.....	82
Summary.....	83
Résumé	87
Chapter 6: References	91

Abbreviation list

AIDS: acquired immune deficiency syndrome	HIV: human immunodeficiency virus
BHQ: black hole quencher	hpi: hours post-infection
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool	HuN(o)V: human norovirus
BoN(o)V: bovine norovirus	ICA: infectious centre assay
CaN(o)V: canine norovirus	ICTV: international committee for taxonomy of viruses
Ct: threshold cycle	IPH: Institute of Public Health (Belgium)
Cy3: cyanine dye 3	LOD: limit of detection
DC: dendritic cell	m.o.i.: multiplicity of infection
Dmax: maximum absolute difference	Mj: macrophage
DMEMc: complemented Dulbecco's modified Eagle's medium	MLN: mesenteric lymph nodes
DNA: desoxyribonucleic acid	MNV: murine norovirus
dpior DPI: days post-infection	MuN(o)V: murine norovirus
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid	MUSCLE: Multiple Sequence Alignment
eIF: translation initiation factors	NoV: norovirus
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay	NRL FBO: national reference laboratory for foodborne outbreaks
EM: electron microscopy	nt: nucleotide
FAM: 6-carboxyfluorescein	NTC: non-template control
FBO: foodborne outbreak	N-term: N-terminal protein
FBVE: Foodborne Viruses in Europe	NTPase: nucleoside 5'-triphosphatase
FCS: foetal calf serum	ORF: open reading frame
FeN(o)V: feline norovirus	p.f.u. or pfu: plaque forming unit
GE: gastroenteritis	P: protruding domain
GI-V: genogroup I-V	pb: pair base
gRNA: genomic RNA	PBS: phosphate buffered saline
GTR: generalised time reversible	PhyML: phylogenetic estimation using Maximum Likelihood
hpi: hours post infection	Pro: proteinase
HBGA: histo-blood group antigen	PS: penicillin-streptomycin
	r.p.m.: revolutions per minute

RdRp: RNA-dependant RNA-polymerase
Rec MNV: recombinant murine norovirus
RIVM: Rijksinstituut voor
Volksgezondheid en Milieuhygiëne -
National Institute of Public Health and the
Environment
RNA: ribonucleic acid
RT-qPCR: reverse transcription- real time
polymerase chain reaction
S: shell domain
SARS: severe acute respiratory syndrome
sgRNA: subgenomic RNA

SimPlot analysis: similarity plot analysis
SNP: single nucleotide polymorphism
ssDNA: single stranded DNA
ssRNA: single stranded RNA
SwN(o)V: swine norovirus
T_m: melting temperature
UF: units of fluorescence
VP: viral protein
VPg: genome-linked virus protein