

La recombinaison chez les alphaherpèsvirus

F. MEURENS, F. SCHYNTS, E. THIRY

Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires

Service de Virologie

Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège,

boulevard de Colonster, 20, bât. B43b, 4000 Liège

François Meurens est lauréat du Prix des Annales de Médecine Vétérinaire 2000

Correspondance :

Etienne THIRY,

tél : 32(0)4/366.42.50 ; fax : 32(0)4/366.42.61 ; e-mail : etienne.thiry@ulg.ac.be

RESUME : La famille des *Herpesviridae* regroupe des virus enveloppés à ADN bicaténaire dont l'ancêtre commun serait apparu il y a environ 400 millions d'années. La classification de ces virus repose, soit sur leurs propriétés biologiques (trois sous-familles : *Alpha*-, *Beta*- et *Gammaherpesvirinae*), soit sur leur structure génomique (groupes A à F). Leur structure génomique, leur réplication, l'encapsidation et le clivage de leur génome, la recombinaison et ses conséquences biologiques sont tour à tour abordés. Etant donné leur importance respective en médecine humaine et vétérinaire, une attention particulière est accordée à deux virus, l'herpèsvirus simplex de type 1 et l'herpèsvirus bovin de type 1, membres de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. Les conséquences biologiques de la recombinaison appellent à une meilleure compréhension de ce phénomène. Le lien de la recombinaison avec la réplication virale, son rôle précis et sa contribution au processus évolutif sont autant de sujets qui demandent à être explorés.

INTRODUCTION

Les *Herpesviridae* ont une importance considérable autant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Chez l'homme, l'augmentation actuelle de la prévalence de l'herpèsvirus simplex de type 2 (*herpes simplex virus 2* ; HSV-2) responsable de l'herpès génital, l'augmentation des infections néonatales à herpèsvirus et l'implication du virus d'Epstein-Barr (*human herpesvirus 4* ; HHV-4) et de l'herpèsvirus humain de type 8 (*human herpesvirus 8* ; HHV-8) dans des cancers humains renforcent le besoin d'une compréhension affinée de la biologie de ces virus (Roizman et Thayer, sans date).

Sur le plan vétérinaire, la rhinotrachéite infectieuse bovine (*infectious bovine rhinotracheitis* ; IBR), la maladie d'Aujeszky, la rhinopneumonie équine, l'herpèsvirose canine et la

rhinotrachéite féline ont une importance considérable. Pour cette raison, l'étude de ces pathologies animales présente un intérêt majeur.

La famille des *Herpesviridae* regroupe des virus enveloppés à ADN bicaténaire et génome complexe dont l'ancêtre commun serait apparu il y a environ 400 millions d'années (Weir, 1998 ; McGeoch *et al.*, 2000). Ces virus se multiplient dans le noyau des cellules de nombreux vertébrés et invertébrés parmi lesquels figurent des mammifères (notamment l'homme, le cheval, les bovins, le chat, le chien et le porc), des reptiles, des oiseaux, des poissons, des amphibiens et des mollusques (Roizman *et al.*, 1992 ; 1996). Les herpèsvirus sont classés selon deux systèmes. Le premier repose sur des propriétés biologiques telles le spectre d'hôte et la durée du cycle de multiplication et distingue trois sous-familles : *Alpha*-,

Beta- et *Gammaherpesvirinae*. Le second, basé sur la structure génomique, scinde la famille en six groupes désignés par les lettres A à F. Les *Alphaherpesvirinae* (figure 1) sont des virus qui se caractérisent par un cycle de multiplication court, une propagation rapide de l'infection en culture de cellules, une lyse efficace des cellules infectées et un large spectre d'hôtes. Ils ont la capacité d'établir des infections latentes principalement dans les neurones des ganglions sensoriels. La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* se divise à son tour en deux genres : d'une part le genre *Simplexvirus* dont font partie, par exemple, l'herpèsvirus simplex de type 1 (*herpes simplex virus 1* ; HSV-1) responsable de l'herpès bucco-labial et l'HSV-2 ; d'autre part le genre *Varicellovirus* dont font partie le virus de la maladie d'Aujeszky (*pseudorabies virus* ; PrV), l'herpèsvirus équin de type 1 (*equine herpes-*

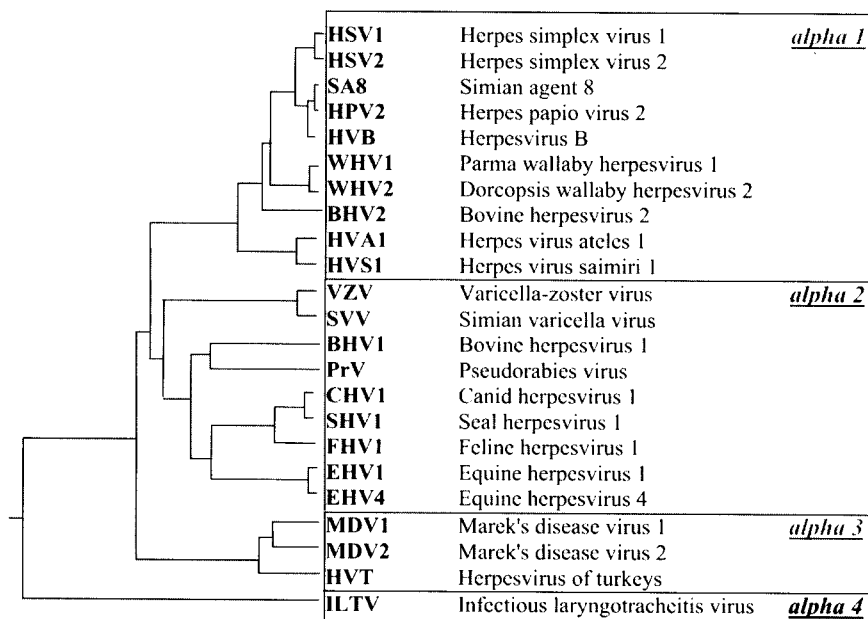


Figure 1 : Sur base des études de phylogénie, la sous-famille Alphaherpesvirinae se scinde en quatre lignées : alpha 1, alpha 2, alpha 3 et alpha 4 (adapté de McGeoch et al., 2000).

virus 1 ; EHV-1) et l'herpèsvirus bovin de type 1 (*bovine herpesvirus 1* ; BHV-1) (Roizman et al., 1992).

Les Herpesviridae constituent un modèle intéressant pour l'étude de la réplication de l'ADN en système eucaryote étant donné qu'ils codent pour la plupart des protéines nécessaires à ce processus (Bataille et Epstein, 1995). Son caractère hautement recombinogène fait de cette famille de virus un modèle particulièrement utile pour l'étude de la recombinaison homologue, phénomène qui est intimement lié à la réplication de l'ADN viral. L'importance de l'acquisition d'informations supplémentaires sur le phénomène de recombinaison est encore renforcée par les conséquences que peut avoir un tel processus (Bataille et Epstein, 1995). En effet, la recombinaison peut être à l'origine de l'apparition de nouveaux virus. Ces virus pourraient constituer une menace sanitaire ou à tout le moins remettre en question l'efficacité des programmes d'éradication. La cause principale de cette menace réside dans leur capacité à allier, suite à la recombinaison, des caractéristiques issues de la souche vaccinale (par exemple chez le BHV-1 ne plus exprimer la glycoprotéine E) à la virulence d'un virus sauvage. Enfin, le mécanisme de recombinaison au sein de la cellule est d'autant plus

intéressant à étudier que le taux de mutation très faible rencontré chez ces virus ne peut expliquer leur évolution génétique.

Le présent article abordera successivement quatre thèmes : l'organisation génomique des *Herpesviridae*, la réplication de leur ADN, l'encapsidation et le clivage de leur génome et la recombinaison avec ses conséquences biologiques. Les trois premiers thèmes seront essentiellement consacrés à la biologie moléculaire des herpèsvirus dont la connaissance constitue une étape indispensable à une compréhension affinée de l'im-

portance de la recombinaison sur les virus et surtout sur leur organisation génomique. Ces thèmes seront développés en mettant plus particulièrement l'accent sur deux alphaherpèsvirus, l'HSV-1 et le BHV-1. Le premier car c'est sans conteste le virus le mieux connu de la famille et le second car il constitue un des herpèsvirus les plus importants en médecine vétérinaire.

ORGANISATION GENOMIQUE Herpesviridae

Le génome viral, localisé dans la capside, est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire linéaire, dont la taille varie de 124 à 235 kpb (kilopaire de bases ; kpb) suivant l'espèce virale considérée. Cette molécule d'ADN présente la particularité de varier légèrement en longueur au sein d'une même espèce, étant donné la présence d'un nombre variable de séquences répétées terminales ou internes (Roizman et al., 1992). La composition en base Guanine+Cytosine (G+C) varie de 32 à 75 % selon l'espèce virale envisagée (Roizman et al., 1992).

Herpèsvirus simplex de type 1

Le génome de l'HSV-1, membre du groupe d'organisation génomique E (figure 2), consiste en une molécule d'ADN bicaténaire d'une taille de 152 kpb. Il est constitué de 2 unités liées de manière covalente, L et S, qui

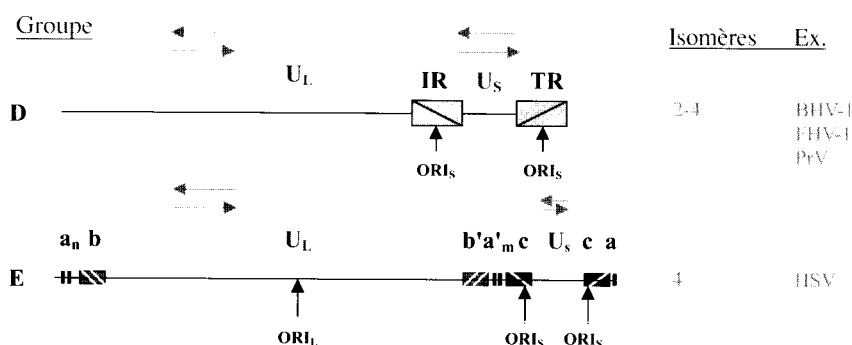


Figure 2 : Représentation schématique de l'arrangement des classes D et E de génomes d'herpèsvirus. Les lignes horizontales représentent les régions uniques. Les rectangles représentent les répétitions internes et terminales (IR et TR pour le groupe D et abc pour le groupe E). Les extrémités terminales présentes dans le groupe E sont constituées de deux éléments. Une extrémité contient n copies de la séquence a situées à côté d'une séquence plus large appelée b. L'autre extrémité possède la séquence a directement répétée située à côté d'une séquence appelée c. Les séquences terminales ab et ca sont insérées dans des orientations inverses et sont séparées par les séquences uniques longue (UL) et courte (US) du génome. Dans les groupes D et E, les composants des génomes peuvent s'inverser les uns par rapport aux autres générant ainsi différents isomères génomiques (adapté de Roizman et al., 1992) (herpes simplex virus 1 ; HSV-1, Feline herpesvirus 1 ; FHV-1, pseudorabies virus ; PrV, bovine herpesvirus 1 ; BHV-1, origin of replication ; ORI)

représentent respectivement 82 et 18 % du génome. L'unité L se compose d'une séquence unique (UL) de 108 kpb flanquée par une paire de séquences inversées répétées de 9 kpb chacune (appelée TR_L pour *terminal repeat L* et IR_L pour *internal repeat L* ou encore a_nb et b'a'_m). L'unité S est constituée d'une séquence unique de 13 kpb (U_S) bordée d'une paire de séquences répétées inversées de 6,5 kpb (TR_S et IR_S ou a'_mc' et ca). Le nombre de séquences a répétées à la jonction L/S et à l'extrémité L terminale est variable. C'est ainsi que sont décrits a_n et a_m où le nombre de séquences a varie de une à dix copies.

Ce génome, complètement séquencé, code pour 84 gènes au moins parmi lesquels onze codent pour des glycoprotéines, désignées gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL et gM (Roizman et Ward, 1994 ; Roizman et Sears, 1996). Il contient, de plus, deux types de séquences agissant en *cis* qui sont essentielles pour la multiplication du virus : les origines de réplication de l'ADN (*ori*) (figure 2) et les signaux d'encapsidation et de clivage (*pac 1* et *pac 2*) (figure 3).

Dans le cas de l'HSV-1, l'analyse par enzymes de restriction de l'ADN extrait de virions révèle que l'U_L et l'U_S peuvent s'inverser l'une par rapport à l'autre conduisant à l'apparition de quantités équimolaires de quatre isomères. Ceux-ci sont nommés P (prototype), I_L (*inverted L* ; inversion de l'U_L), I_S (*inverted S*, inversion de l'U_S) et IL_S (*inverted L and S* ; inversion de l'U_L et de l'U_S) (Bataille et Epstein, 1994).

Herpèsvirus bovin de type 1

Le génome du BHV-1, appartenant au groupe D (figure 2), consiste en une molécule d'ADN bicaténaire d'une taille de 136 kpb. Il est composé d'une unité longue (U_L) mesurant 104 kpb et d'une unité courte (U_S) mesurant 10 kpb. Cette dernière est flanquée de deux séquences répétées (11 kpb chacune), inversées l'une par rapport à l'autre (Schwyzer et Ackermann, 1996). Le génome du

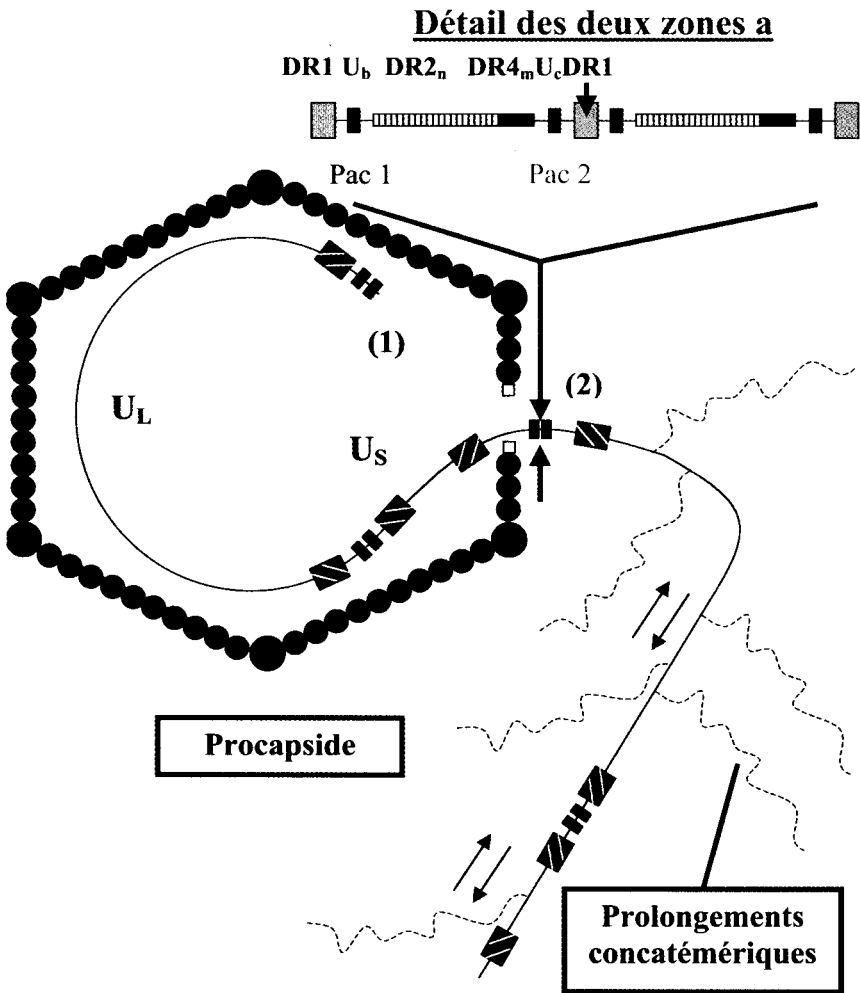


Figure 3 : Encapsidation et clivage des unités génomiques de l'HSV-1 (herpes simplex virus 1). La séquence *pac 2* présente au sein de la première séquence *a* (1) servirait de signal d'encapsidation directionnelle. Une fois le génome unitaire encapsidé, les séquences *pac 1* et *pac 2* de la seconde extrémité génomique (2) s'associeraient à une protéine pour initier l'assemblage d'un complexe de clivage de l'ADN. Ensuite, celui-ci cliverait l'ADN *cis* à niveau de la répétition directe 1 (DR1) partagée par les 2 séquences *a* adjacentes. U_b et U_c représentent les deux régions uniques de la séquence *a*.

BHV-1 contient également les deux types de séquences *cis-acting*, c'est-à-dire les origines de réplication de l'ADN et les signaux d'encapsidation/clivage (*pac 1* au sein de chacune des séquences répétées, un *pac 2* à une extrémité de l'U_L et un *pac 2* écourté à l'autre extrémité de l'U_L) (Hammerschmidt et al., 1986 ; 1988 ; Walser et al., 2000).

La région U_S peut se présenter sous deux orientations différentes par rapport à l'U_L, ce qui a pour conséquence l'existence de deux formes isomériques du BHV-1. Ces isomères génomiques se retrouvent en quantité équimolaire dans l'environnement (Mayfield et al., 1983). L'inversion de l'U_L par rapport à l'U_S survient mais à faible fréquence (Walser et al., 2000). Le détail moléculaire et la

fonction de ce mécanisme ne sont pas encore élucidés.

Deux sous-types de BHV-1 (sous-types 1 et 2) sont distingués selon le génotype. L'ADN des souches de sous-type 1 (BHV-1.1) possède, après digestion par des enzymes de restriction, un profil électrophorétique semblable à la souche virale de référence Cooper. Ce sous-type comprend en majeure partie des souches isolées du tractus respiratoire supérieur lors d'épisodes cliniques d'IBR. L'ADN des souches de sous-type 2 (BHV-1.2) présente un profil électrophorétique semblable à la souche virale de référence K22. Ce second sous-type comprend de nombreuses souches génitales isolées lors d'épisodes cliniques d'IPV (Baranowski, 1996 ; Lemaire et al., 1994).

La totalité du génome de la souche Cooper du BHV-1 a été séquencée suite à une collaboration internationale (Schwyzer et Ackermann, 1996 ; Meyer *et al.*, 1997). Ainsi 67 gènes uniques sont répartis dans l'*U_L* et l'*U_S* et un gène est dupliqué car présent dans l'*IR* (*internal repeat*) et la *TR* (*terminal repeat*) (Schwyzer et Ackermann, 1996). Les produits d'expression de la plupart de ces gènes montrent des homologies de séquence avec les protéines des autres *Alphaherpesvirinae*, comme par exemple l'HSV-1 (Schwyzer et Ackermann, 1996). Les gènes du BHV-1 sont désignés sur base de la nomenclature adoptée pour l'HSV-1 (Schwyzer et Ackermann, 1996).

CYCLE DE MULTIPLICATION VIRALE

Consécutivement à leurs interactions avec les glycosaminoglycans cellulaires (GAGs) des protéoglycans et avec trois types de récepteurs d'entrée, les herpesvirus opèrent la fusion de leur enveloppe avec la membrane plasmique de la cellule cible par un mécanisme indépendant du pH (Campadelli-Fiume *et al.*, 2000). Fuller et Lee (1992) ont proposé un modèle en cinq étapes décrivant l'entrée de l'HSV-1 dans la cellule cible. Il regroupe l'attachement initial (importance des glycoprotéines gB et gC), l'attachement stable (gD), l'amorçage de la fusion (interaction entre gD et deux autres composants, l'un d'origine cellulaire, l'autre d'origine virale), l'expansion de la fusion (gD, gH, rôle hypothétique de gB et gL) et la libération de la capside dans le cytoplasme.

Toutefois un modèle alternatif peut être proposé. Il comprend une fusion unique de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique suivie d'une invagination et d'une perforation de la membrane plasmique. Une fois la membrane plasmique perforée, la particule virale enveloppée peut effectuer son entrée et se déplacer dans le cytoplasme cellulaire vers le noyau. Ce modèle bien sûr n'exclut en rien le rôle des différentes glycoprotéines virales impliquées dans la pénétration des herpesvirus (Wild *et al.*, 1998 ; Wagner, sans date).

Dans un deuxième temps, après l'entrée du virus dans la cellule, les protéines du tégument viral interrompent la synthèse protéique de la cellule. Ensuite, grâce à l'action de certaines protéines, la capside est transportée vers le noyau où l'ADN viral va entrer pour ensuite se circulariser (Garber *et al.*, 1993). La transcription des gènes viraux commence. Celle-ci, finement régulée dans le temps, distingue trois classes de gènes : les gènes précoces-immédiats (ou *alpha*), les gènes précoces (ou *beta*) et les gènes tardifs (ou *gamma*) (Honess et Roizman, 1975).

Les gènes immédiats, dont la transcription est très fortement activée par certaines protéines du tégument, codent pour des protéines régulatrices qui vont d'une part ralentir la transcription des gènes immédiats et d'autre part activer la transcription des gènes précoces.

Les gènes précoces sont transcrits avant que n'ait lieu la réplication de l'ADN viral. Ils codent pour une série d'enzymes nécessaires à la réplication virale ou impliquées dans le métabolisme de l'ADN.

Les gènes tardifs sont exprimés soit avant et après l'initiation de la réplication de l'ADN viral (*gamma*-1 ou précoces-tardifs), soit uniquement après (*gamma*-2) le début de la réplication de l'ADN viral (Roizman et Sears, 1996). Ils codent pour la majorité des protéines structurales.

Il existe chez les *Herpesviridae* plusieurs origines de réplication (trois chez HSV-1) (Stow et McMonagle, 1983). Certaines initient une réplication bidirectionnelle, d'autres une réplication unidirectionnelle selon le modèle des " cercles roulants ". Bien que la multiplication du virus se déroule dans le noyau de la cellule, c'est une ADN polymérase codée par le virus qui assure la réplication (Coen *et al.*, 1984). Sept gènes, parmi lesquels celui codant pour la polymérase, sont nécessaires à la réplication de l'HSV-1 (Wu *et al.*, 1988 ; Roizman, 1996).

La réplication aboutit à la formation de concatémères, longues molécules d'ADN composées d'une suite de génomes simples liés de façon cova-

lente (Hammerschmidt et Sudgen, 1990). Ces intermédiaires de réplication de masse moléculaire élevée, interagissant avec des procapsides vides, produisent des capsides matures contenant un génome viral (McVoy et Adler, 1994). Ces capsides s'associent à des protéines de tégument et acquièrent une première enveloppe phospholipidique en quittant le noyau cellulaire (Johnson et Spear, 1982). Ensuite, elles sont acheminées vers le réticulum endoplasmique où la glycosylation des protéines virales d'enveloppe débute. En le quittant pour gagner le cytoplasme, elles perdent cette première enveloppe. Lors de leur entrée dans l'appareil de Golgi, elles en acquièrent une définitive à laquelle sont associées les protéines dont la glycosylation est terminée sur place (Stackpole, 1969 ; Jones et Grose, 1988 ; Whealy *et al.*, 1991 ; Browne *et al.*, 1996). Une autre hypothèse est cependant formulée pour expliquer la formation de l'enveloppe définitive. Celle-ci soutient que l'enveloppe proviendrait de la membrane nucléaire interne du noyau cellulaire (Johnson et Spear, 1982). Ces opérations terminées, les particules virales matures sont libérées dans le milieu extracellulaire par exocytose.

REPLICATION DU GENOME

Classiquement le modèle des cercles roulants (Gilbert et Dressler, 1968) est retenu pour expliquer la réplication des *Herpesviridae*. Ce modèle comprend une cassure d'un des brins de l'ADN circularisé qui génère une extrémité 3' portant un groupement hydroxyle et une extrémité 5' portant un groupement phosphate. L'extrémité 5' est ensuite déplacée et dégage le brin d'ADN complémentaire qui peut dès lors servir de matrice pour la synthèse de l'autre brin à partir de l'extrémité 3' (figure 4). La fourche de réplication avance le long du génome circulaire et produit un concatémère qui, de part les liaisons qu'il établit avec d'autres concatémères, va participer à la formation d'un réseau complexe d'acide nucléique (Severini *et al.*, 1996). Par la suite les concatémères du réseau interagissent avec les procapsides, les

séquences *pac 1* et *pac 2* et des protéines pour encapsider et cliver les unités génomiques (McVoy et Adler, 1994 ; McVoy *et al.*, 2000).

Toutefois la structure branchée des concatémères des herpèsvirus est difficilement explicable par un modèle de réplication se basant uniquement sur la réplication en cercles roulants (Severini *et al.*, 1996 ; Bataille et Epstein, 1997). Il était donc nécessaire de compléter le modèle par l'introduction d'éléments supplémentaires. C'est ainsi que la réplication de l'ADN viral circularisé (Garber *et al.*, 1993) se ferait plutôt par un mécanisme complexe incluant non seulement la réplication en cercles roulants mais également la réplication bidirectionnelle et la recombinaison homologue. Les événements de recombinaison homologues seraient particulièrement stimulés par les nombreuses coupures de l'ADN bicaténaire qui surviennent au cours du cycle viral (Sarisky et Weber, 1994).

ENCAPSIDATION ET CLIVAGE

La nature branchée des concatémères viraux a été démontrée dans une étude

sur les intermédiaires de réplication de l'HSV-1 (Severini *et al.*, 1996). A la suite de cette étude, l'hypothèse de l'implication de deux enzymes dans la résolution de ces structures en unités génomiques encapsidables a été avancée. La première enzyme, vraisemblablement la nucléase alcaline virale, agit comme enzyme débranchante, réduisant de ce fait considérablement la complexité de l'ensemble (Martinez *et al.*, 1996). La seconde enzyme, une terminase, libère des génomes unitaires (figure 3).

Cependant les processus d'encapsidation et clivage ne se résument pas à la simple action de deux enzymes isolées. En effet, ces mécanismes résulteraient plutôt de l'association étroite de protéines, dérivant entre autre, dans le cas de l'HSV-1, des gènes viraux UL 6, 15, 17, 25 , 28 et 32 (Van Zeijl *et al.*, 2000), de procapsides (ou capsides B), de segments d'ADN de longueurs déterminées et de séquences agissant en *cis* nommées *pac 1* et *pac 2* (Logvinoff et Epstein, 2000). La séquence *pac 1* consiste en série de 3 à 7 paires de bases riches en adénine (A) ou thymine (T) flanquée de chaque côté par 5

à 7 cytosines (Deiss *et al.*, 1986). La séquence *pac 2* comprend une région de 5 à 10 paires de bases qui est souvent associée à un motif **CGCGGCG** (Deiss *et al.*, 1986). *Pac 1* et *pac 2* sont localisées le plus souvent à 30-35 paires de bases de l'extrémité génomique, généralement aux terminaisons opposées du génome (Deiss *et al.*, 1986).

Les séquences *pac 1* et *pac 2* sont conservées et se retrouvent en nombres et localisations variables chez tous les herpèsvirus (Hammerschmidt *et al.*, 1988 ; McVoy *et al.*, 2000) (figure 3). Leurs positions respectives au sein des concatémères garantiraient l'encapsidation de génome entier de longueur appropriée. La présence d'une séquence *pac 2* à l'extrémité libre des concatémères semblerait nécessaire pour qu'ils puissent interagir avec les procapsides. Dès lors *pac 2* jouerait un rôle de signal d'encapsidation directionnelle (figure 3). Ensuite les séquences *pac 1* et *pac 2* s'associeraient à une protéine pour initier l'assemblage d'un complexe pouvant cliver l'ADN en un site déterminé. Elles constitueraient de la sorte les véritables pivots des processus d'encapsidation et de clivage où elles interviennent donc à de multiples niveaux. Leurs actions, influencées par de nombreux paramètres tels leurs localisations ou leurs nombres, seraient contrôlées par des séquences agissant en *cis* dont la nature reste à préciser (McVoy *et al.*, 1998 ; 2000). Une compréhension accrue des phénomènes d'encapsidation et de clivage passe ainsi par une étude approfondie des relations entre les divers acteurs concernés et par la mise en évidence de la contribution exacte de chacun d'entre-eux au mécanisme.

La recombinaison par ses capacités de réarrangement génomique fait partie des éléments influençant les processus d'encapsidation et de clivage. En effet, elle peut être à l'origine d'un déplacement des séquences *pac 1* et *pac 2* au sein des concatémères.

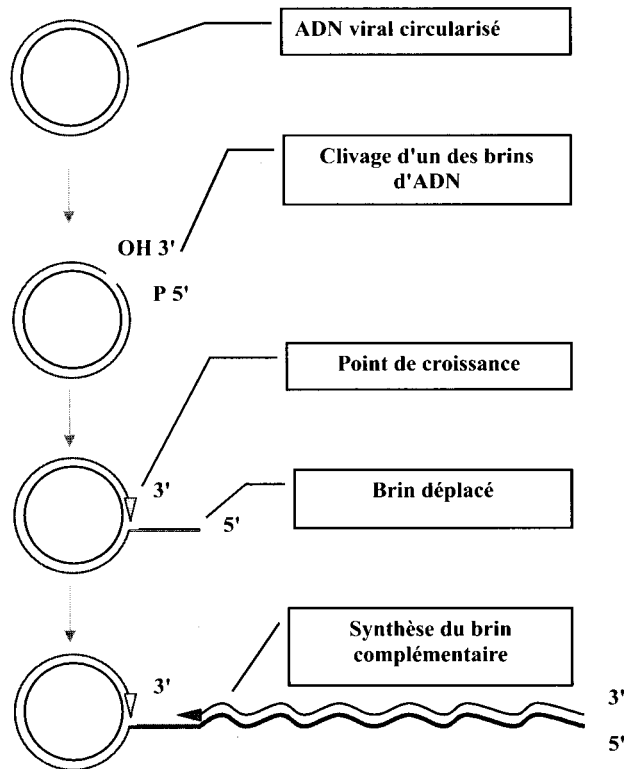


Figure 4 : Mécanisme de réplication de l'ADN par cercles roulants. Ce mécanisme est vraisemblablement impliqué dans la genèse des intermédiaires de réplication concatémériques des Herpesviridae.

**MECANISME
DE LA RECOMBINAISON**

La recombinaison, au sens génétique du terme consiste en la génération de nouvelles combinaisons de matériel génétique (Dressler et Potter, 1982 ; Bujarski, 1999 ; Umene, 1999). Quatre types de recombinaison sont classiquement décrits : la recombinaison homologue, la recombinaison spécifique, la transposition et la recombinaison illégitime (Umene, 1999). Au sein de la famille des *Herpesviridae*, deux de ces quatre types de recombinaison sont décrits : l'homologue et l'illégitime. La recombinaison est étroitement liée à la réplication de l'acide nucléique viral et semble constituer, au même titre que la latence, une caractéristique essentielle de la biologie des *Herpesviridae* sans que le rôle exact d'un tel processus n'ait à ce jour été élucidé.

La recombinaison homologue chez les herpèsvirus repose sur le modèle de cassure/réparation de la double hélice d'ADN d'*E. coli*. Ce modèle comporte quatre étapes distinctes (Bujarski, 1999 ; Umene, 1999) : l'initiation, l'appariement homologue, l'extension de l'hétéroduplex et la terminaison (figure 5).

L'initiation génère une région d'ADN monocaténaire réceptive à l'action d'une protéine recombinase (Rec). Des hélicases, déroulant l'ADN bicaaténaire, et des nucléases, le coupant, sont impliquées dans le processus. La deuxième étape consiste en l'appariement homologue et l'échange de brins d'ADN. Cette étape est promue par une protéine Rec, également appelée protéine SSB (*Single Strand Binding Protein*), se liant à l'ADN monocaténaire ou à une région monocaténaire de l'ADN. Une autre protéine de liaison à l'ADN monocaténaire modifie la structure secondaire de l'ADN, facilitant de ce fait la liaison de la protéine Rec à l'ADN. Ensuite Rec parcourt l'ADN, cherchant une homologie de séquence. Une fois celle-ci détectée, un intermédiaire triple brin est formé et l'échange de segments, contrôlé par Rec, peut dès lors avoir lieu, formant ainsi une molécule jointive impliquant quatre brins (*jonction*

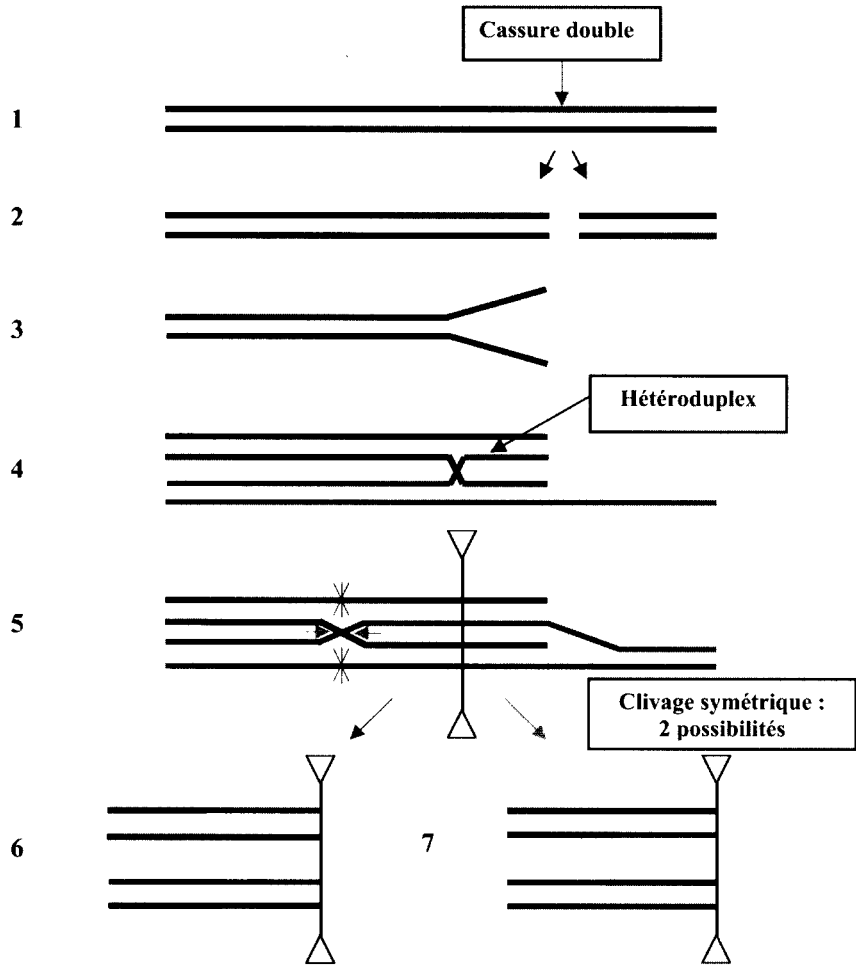


Figure 5 : Mécanisme de la recombinaison homologue basé sur le modèle de cassure/réparation de la double hélice d'ADN. (1) La double hélice d'ADN est clivée. (2) Les deux fragments s'éloignent l'un de l'autre. (3) L'ADN produit des extrémités monocaténaires libres. (4) Une de celles-ci est alignée avec une séquence homologue et l'échange de segment a lieu. La jonction Holliday impliquant quatre segments est formée. Le mouvement de cette jonction vers la gauche conduit à l'extension de l'hétéroduplex d'ADN. (5) La jonction est scindée par clivage symétrique (2 possibilités) et les hétéroduplex d'ADN sont libérés. La structure des hétéroduplex d'ADN se trouvant à gauche de la ligne verticale est présentée (adapté d'Umene, 1999).

Holliday). La troisième étape, nécessitant un mouvement vers la gauche où vers la droite de la jonction Holliday, conduit à l'extension de l'hétéroduplex d'ADN. Cette étape serait également contrôlée par Rec en association étroite avec d'autres protéines. La terminaison implique le clivage symétrique par une endonucléase de la jonction Holliday, produisant les molécules recombinantes.

Dans le cas de l'HSV-1, non moins de 7 gènes (UL 9, 29, 5, 8, 52, 30 et 42) sont décrits comme étant de près ou de loin impliqués dans le processus de réplication auquel la recombinaison serait intimement liée (Weber *et al.*, 1988 ; Bataille et Epstein 1995). La recombinaison homologue pourrait cependant être indépendante de ces mêmes gènes car supportée par des protéines cellulaires (Yao et Elias,

2001). Cette découverte cependant n'est pas de nature à réfuter totalement l'hypothèse d'une liaison importante des mécanismes de recombinaison et réplication.

Divers auteurs ont également montré que des cassures double brin générées par des enzymes de restriction stimulent significativement la recombinaison au sein de l'ADN (Sarisky et Weber, 1994). Ces cassures se produisent à maintes reprises au cours du cycle viral des *Herpesviridae*.

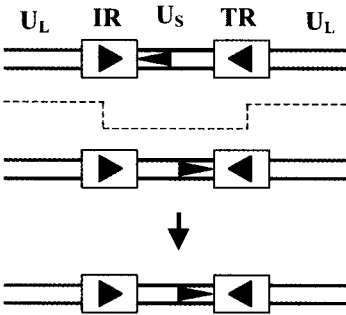
La recombinaison homologue peut aussi bien survenir au sein d'un intermédiaire de réplication du virus suite à la présence des nombreuses répétitions directes ou inverses jalonnant le génome, qu'entre les intermédiaires de réplication d'un virus ou de virus différents voire entre l'ADN viral et l'ADN cellulaire.

La recombinaison illégitime est aussi nommée recombinaison non homologue car elle survient entre séquences d'ADN présentant peu, voire aucune homologie de séquence. Elle ne nécessite ni la spécificité de site, ni l'action d'éléments génétiques définis, tels les transposons. Elle survient cependant à une fréquence moindre que la recombinaison homologue (Umene, 1999).

CONSEQUENCES BIOLOGIQUES DE LA RECOMBINAISON CHEZ LES ALPHAHERPESVIRUS

Les conséquences biologiques de la recombinaison dérivent de la génération de nouvelles combinaisons de matériel génétique. La recombinaison peut aboutir aussi bien à des réarrangements intramoléculaires, telles des inversions, des duplications et des délétions de séquences uniques (isomères génomiques résultant de la recombinaison intramoléculaire), qu'à la génération de nouveaux virus, par exemple, suite à la recombinaison entre deux souches parentales différentes (Umene, 1999 ; Umene et Sakaoka, 1999). La présence des inversions de séquences uniques dans les génomes du BHV-1 et de l'HSV-1 serait ainsi le résultat d'épisodes de recombinaison homologue entre répétitions inversées d'un même concatémère ou de deux concatémères différents (Bataille et Epstein, 1997 ; Martin et Weber, 1996 ; McVoy *et al.*, 1994 ; 2000) (figure 6). D'un point de vue évolutif la présence des répétitions inversées résulterait elle-même d'épisodes de recombinaison illégitime entre deux molécules de même séquence mais d'orientation opposée (Umene, 1999 ; Umene et Sakaoka, 1999) (figure 7). D'autre part, un épisode de recombinaison illégitime entre deux molécules de même séquence alignées incorrectement mais dans la même orientation mène à l'apparition de répétitions directes au sein du génome (Umene, 1999) (figure 7). Tout événement supplémentaire de recombinaison illégitime entre deux séquences uniques arrangées en orientation opposée mènera à l'expansion des répétitions inversées et à la réduction

Répétitions inversées



Répétitions directes

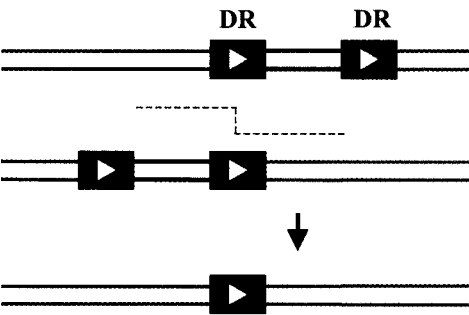


Figure 6 : Événements de recombinaison entre séquences répétées. Les séquences répétées sont représentées par des rectangles associés à des triangles indiquant leurs orientations. La recombinaison entre répétitions inversées (répétition interne : IR et répétition terminale : TR) mène à une inversion de la séquence unique courte (US). La recombinaison entre répétitions directes (DR) mène à la délétion de la séquence flanquée par celle-ci. La recombinaison est indiquée par des lignes pointillées (adapté d'Umene, 1999).

des séquences uniques comme cela a été observé chez l'HSV-1 et le cytomégalo virus humain (Umene, 1999). De nombreuses études portant sur la génération de nouveaux virus par recombinaison ont été réalisées. C'est ainsi qu'en 1955, Wildy a démontré l'existence du phénomène de recombinaison chez l'HSV-1 en isolant un virus sauvage suite à la co-infection de deux mutants thermosensibles. En 1986, Javier et collaborateurs ont inoculé deux souches non virulentes de l'HSV-1 à des souris. La plupart des animaux co-infectés sont morts, alors que les animaux ayant reçu une dose similaire ou cent fois plus élevée de chaque virus séparément ont survécu. Ils ont ainsi démontré que deux souches avirulentes de l'HSV-1 pouvaient interagir *in vivo* pour produire des recombinants virulents létaux. Nishyama et collaborateurs (1991) ont pour leur part utilisé des enzymes

de restriction pour montrer qu'une souche délétée dans le gène codant pour la thymidine kinase de l'HSV-2 et la souche neuroinvasive *syn* de l'HSV-1 peuvent recombiner après co-inoculation. Des recombinaisons surviennent aussi entre souches atténuées de PrV *in vitro* et *in vivo* chez le mouton (Henderson *et al.*, 1990). Une expérience similaire chez le porc, hôte naturel du PrV, a permis la recombinaison génétique entre différentes souches de PrV lorsqu'elles étaient inoculées en des endroits différents (inoculation intranasale pour une des souches et intramusculaire pour l'autre) (Henderson *et al.*, 1991). Dangler et collaborateurs (1993) ont montré, par amplification génique, l'apparition de souches recombinantes après co-infection chez le porc de deux souches vaccinales modifiées de PrV, l'une délétée dans le gène

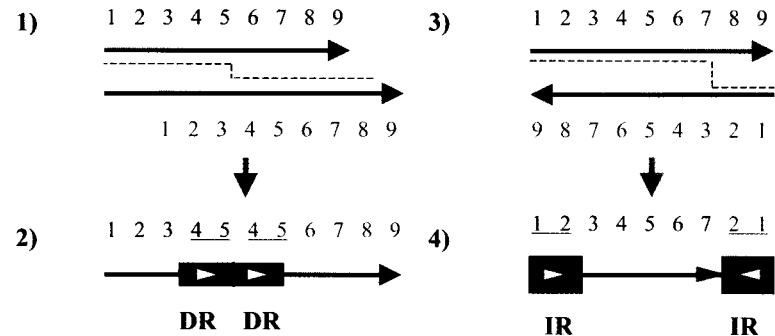


Figure 7 : Génération de séquences répétées par recombinaison illégitime (ligne pointillée). Les séquences uniques sont représentées par une ligne continue terminée par une flèche indiquant leurs orientations. Les répétitions se présentent sous forme de rectangles associés à des triangles indiquant leurs orientations. La recombinaison illégitime entre deux molécules alignées incorrectement dans la même orientation produit la molécule (2). Le résultat d'un événement de recombinaison illégitime entre deux molécules en orientation opposées produit la molécule (4) (adapté d'Umene, 1999).

codant pour la thymidine kinase et la glycoprotéine gE (TK-/gE-), l'autre étant une souche virulente de PrV (TK+/gE+). Après co-inoculation de porcs avec les deux souches, ils ont constaté que 1,3 % des virus excrétés possédaient un phénotype recombinant TK-/gE+. La recombinaison chez les *Herpesviridae* n'est donc pas un événement rare en conditions expérimentales comme le confirme une étude sur l'herpèsvirus félin de type 1 (*feline herpesvirus 1* ; FHV-1). En effet, lors d'expériences de co-infection *in vitro* avec différentes souches de l'FHV-1, il a été montré que 10,1 à 21,5 % des virus produits étaient des virus recombinants (Fujita *et al.*, 1998).

Un travail considérable concernant les recombinaisons génétiques a été réalisé par Glazenburg et collaborateurs en 1994. Premièrement, ces auteurs ont confirmé que la co-inoculation intracérébrale chez la souris de deux souches de PrV non létales génère des recombinants létaux. Toutefois, pour générer des recombinants, il est nécessaire d'utiliser des doses de 10⁶ unités formant plaque des deux souches parentales. De plus, contrairement aux données émises par Henderson et collaborateurs (1990), les deux souches doivent être inoculées au même site chez la souris. Cette contradiction peut s'expliquer par le fait que les virus et les hôtes utilisés étaient différents, ce qui peut influencer la multiplication ainsi que la dissémination des virus au sein de l'hôte. Ils ont également abordé le sujet de l'interférence, c'est à dire lorsqu'une cellule infectée par un ou des virus devient résistante à toute autre infection, rendant ainsi tout événement de co-infection impossible (Glazenburg *et al.*, 1994). Un intervalle de deux heures entre l'inoculation de la première et de la seconde souche a permis la recombinaison et/ou la complémentation. La distance entre les sites génomiques supportant la recombinaison n'a pas joué un rôle prédominant dans la fréquence de celle-ci.

L'ensemble de ces données démontre le risque d'une recombinaison génétique entre deux souches virales différentes (figure 8), par exemple, de

BHV-1, dans la muqueuse nasale de bovins simultanément vaccinés avec un vaccin vivant délété dans le gène codant pour la glycoprotéine E (Bayovac®, Bayer ou Rhinobovin®, Hoechst) et infectés par le virus sauvage. D'autres cas de figure sont envisageables comme, notamment, la présence d'une de ces deux souches à l'état latent. Un épisode de réactivation et réexcrétion de la souche latente pourrait provoquer sa présence au niveau de la muqueuse nasale au même moment qu'une autre souche et dès lors être à l'origine de phénomènes de recombinaison. La présence de deux souches de BHV-1 différentes à l'état latent a été également démontrée, offrant de ce fait encore un scénario supplémentaire de recombinaison (Whetstone et Miller, 1989). Cependant de telles recombinaisons n'ont pas été observées sur le terrain en ce qui concerne le PrV.

La recombinaison est un des principaux mécanismes de l'évolution des *Herpesviridae* (Weir, 1998 ; McGeoch, 1999 ; Umene, 1999). De fait, elle constitue, de par sa capacité à réarranger le génome viral, un des mécanismes pivots du processus évolutif. Ce rôle central, elle le partage avec deux autres grands processus générateurs de diversité, d'une part les acquisitions d'ADN étranger (où elle pourrait avoir également joué un

rôle), d'autre part la substitution nucléotidique (de moindre importance cependant chez les *Herpesviridae*) (Weir, 1998 ; McGeoch, 1999 ; Umene, 1999). Dans le domaine des réarrangements génomiques, la recombinaison serait aussi responsable de l'apparition des nombreuses inversions, duplications et autres délétions qui caractérisent la famille des *Herpesviridae* (figures 6 et 7). Enfin, en ce qui concerne l'acquisition de nouvelles séquences d'ADN, la recombinaison pourrait également jouer un rôle, dans la mesure où elle peut se produire entre séquences d'ADN d'origines distinctes, virales ou cellulaires. Cette dernière possibilité pourrait être à l'origine de la présence de nombreux gènes, tout particulièrement les gènes de réplication qui sont très proches de leurs homologues cellulaires.

CONCLUSIONS

La recombinaison et la latence constituent les caractéristiques biologiques essentielles des *Herpesviridae*. L'étude des polymorphismes de restriction a montré que la recombinaison survient à des fréquences élevées. Elle risque, par conséquent, de constituer une menace sanitaire par sa capacité à générer de nouveaux virus alliant, suite à la recombinaison, des caractéristiques issues d'une souche vaccinale à la virulence d'un virus sauvage. Ce danger, non négligeable, doit être évalué précisément par la mise en place d'études complémentaires. Celles-ci pourraient, par exemple, porter sur la quantification *in vivo* du processus au cours du temps ou encore sur l'influence de l'interférence virale sur ce même processus. D'autre part, les conséquences nombreuses et multiples de la recombinaison semblent avoir un impact considérable au niveau évolutif. Des recherches sont également nécessaires afin d'évaluer plus précisément cet impact et sa contribution exacte à l'évolution des *Herpesviridae*. Ensuite la nature des mécanismes sous-jacents à la recombinaison demande à être explorée, particulièrement en ce qui concerne leurs liens avec les mécanismes de la réplication. Enfin il serait utile d'étudier la

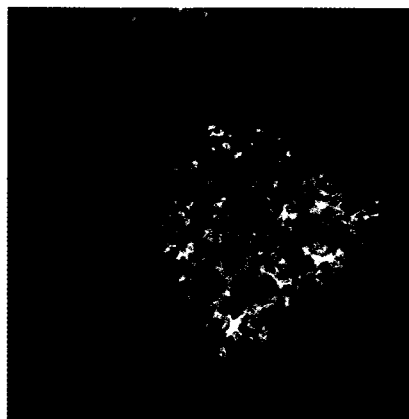


Figure 8 : Visualisation par immunofluorescence d'une plaque de lyse induite par un virus recombinant obtenu après co-infection *in vitro* de deux souches de BHV-1 (bovine herpesvirus 1) délétées respectivement pour les glycoprotéines gC ou gE. Deux anticorps ont été utilisés, un dirigé contre la gC et l'autre contre la gE. Ces deux anticorps primaires ont été révélés par deux anticorps secondaires, l'un spécifique de l'anticorps primaire anti-gC, couplé à la fluoroscène (coloration verte) et l'autre, spécifique de l'anticorps primaire anti-gE, couplé à la R-phycoérythrine (coloration rouge) (Schyns *et al.*, 2001).

structure des intermédiaires de répliation des herpèsvirus appartenant à la classe d'organisation génomique D. En effet, l'organisation génomique plus simple de ces derniers par rapport à ceux de la classe E devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes réplicatifs et de recombinaison des herpèsvirus.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été rédigé dans le cadre de recherches subventionnées par le Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture, Administration Recherche et Développement. François Meurens est aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

RECOMBINATION IN ALPHA-HERPESVIRUSES

The *Herpesviridae* family is a double-stranded DNA virus family, the ancestor of which should have appeared four hundred million years ago. The classification of these viruses is based on either their biological properties (three sub-families : *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaherpesvirinae*) or their genomic structures (groups A to F). Their genomic structures, their replication, packaging and cleavage of the genome, the recombination and their biological properties are discussed in this article. Given their

respective importance in human and veterinary medecines, a special attention is drawn on two viruses, namely herpes simplex virus 1 and bovine herpesvirus 1, members of the sub-family *Alphaherpesvirinae*. The biological consequences of recombination increase the necessity for a better understanding of this process. Several topics, such as the close association of recombination with viral replication, its role and its contribution to the evolutionary need to be further explored.

BIBLIOGRAPHIE

- BARANOWSKI E. Identification et caractérisation des glycoprotéines gH, gE, gG et gp 42 du *bovine herpesvirus 1*. (PhD Thesis). Université de Liège : Liège, 1996, 169 p.
- BATAILLE D., EPSTEIN A. Herpes simplex virus replicative concatemers contain components in inverted orientation. *Virology*, 1994, **203**, 384-388.
- BATAILLE D., EPSTEIN A.L. Herpes simplex virus type 1 replication and recombination. *Biochimie*, 1995, **77**, 787-795.
- BATAILLE D., EPSTEIN A.L. Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. *J. Virol.*, 1997, **71**, 7736-7743.
- BROWNE H., BELL S., MINSON T., WILSON D.W. An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions : evidence for reenvelopment during egress. *J. Virol.*, 1996, **70**, 4311-4316.
- BUJARSKI J.J. Recombination of viruses. In : Granoff A., Webster R.G. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*. 2nd edition. Academic Press : San Diego, 1999, 1446-1454.
- CAMPADELLI-FIUME G., COCCHI F., MENOTTI L., LOPEZ M. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev. Med. Virol.*, 2000, **10**, 305-319.
- COEN D.M., SASCHMAN D.P., GELEP P.T., RETONDO M.J., WELLER S.K., SCHAFFER P.A. Fine mapping and molecular cloning of mutations in the herpes simplex virus DNA polymerase locus. *J. Virol.*, 1984, **49**, 236-247.
- DANGLER C.A., HENDERSON L.M., BOWMAN L.A., DEEVER R.E. Direct isolation and identification of recombinant pseudorabies virus strains from tissues of experimentally co-infected swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 540-545.
- DEISS L.P., CHOU J., FRENKEL N. Functionnal domains within the a sequence involved in the cleavage-packaging of herpes simplex virus DNA. *J. Virol.*, 1986, **59**, 605-618.
- DRESSLER D., POTTER H. Molecular mechanisms in genetic recombination. *Ann. Rev. Biochem.*, 1982, **51**, 727-761.
- FUJITA K., MAEDA K., YOKOYAMA N., MIYAZAWA T., KAI C., MIKAMI T. In vitro recombination of feline herpesvirus type 1. *Arch. Virol.*, 1998, **143**, 25-34.
- FULLER A.O., LEE W.C. Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J. Virol.*, 1992, **66**, 5002-5012.
- GARBER D.A., BEVERLEY S.M., COEN D.M. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology*, 1993, **197**, 459-462.
- GILBERT W., DRESSLER D. DNA replication : the rolling circle model. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1968, **33**, 473-484.
- GLAZENBURG K.L., MOORMANN R.J., KIMMAN T.G., GIELKENS A.L., PEETERS B.P. In vivo recombination of pseudorabies virus strains in mice. *Virus Res.*, 1994, **34**, 115-126.
- HAMMERSCHMIDT W., LUDWIG H., BUHK H.J. Short repeats cause heterogeneity at genomic terminus of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 1986, **58**, 43-49.
- HAMMERSCHMIDT W., LUDWIG H., BUHK H.J. Specificity of cleavage in replicative-form DNA of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 1988, **62**, 1355-1363.
- HAMMERSCHMIDT W., SUDGEN B. DNA replication of herpesviruses during the lytic phase of their life-cycles. *Mol. Biol. Med.*, 1990, **7**, 45-57.

- HENDERSON L.M., KATZ J.B., ERICKSON G.A., MAYFIELD J.E. *In vivo* and *in vitro* genetic recombination between conventional and gene-deleted vaccine strains of pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1990, **51**, 1656-1662.
- HENDERSON L.M., LEVINGS R.L., DAVIS A.J., STURTZ D.R. Recombination of pseudorabies virus vaccine strains in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 820-825.
- HONESS R.W., ROIZMAN B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis : sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, **72**, 1276-1280.
- JAVIER R.T., SEDARATI F., STEVENS J.G. Two avirulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants *in vivo*. *Science*, 1986, **234**, 746-748.
- JOHNSON D.C., SPEAR P.G. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J. Virol.*, 1982, **43**, 1102-1112.
- JONES F., GROSE C. Role of cytoplasmic vacuoles in varicella-zoster virus glycoprotein trafficking and virion envelopment. *J. Virol.*, 1988, **62**, 2701-2711.
- LEMAIRE M., PASTORET P.P., THIRY E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 167-180.
- LOGVINOFF C., EPSTEIN A.L. Intracellular cre-mediated deletion of the unique packaging signal carried by a herpes simplex virus type 1 recombinant and its relationship to the cleavage-packaging process. *J. Virol.*, 2000, **74**, 8402-8412.
- MARTIN D.W., WEBER P.C. The α sequence is dispensable for isomerization of the herpes simplex virus type 1 genome. *J. Virol.*, 1996, **70**, 8801-8812.
- MARTINEZ R., SARISKY R.T., WEBER P.C., WELLER S.K. Herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is required for efficient processing of viral DNA replication intermediates. *J. Virol.*, 1996, **70**, 2075-2085.
- MAYFIELD J.E., GOOD P.J., VANOORT H.J., CAMPBELL A.R., REED D.E. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J. Virol.*, 1983, **47**, 259-264.
- McGEOCH D.J., DAVISON A.J. The molecular evolutionary history of the herpesviruses. In : Domingo E., Webster R., and Holland J. (Eds.), *Origin and evolution of viruses*. Academic Press : London, 1999, 441-446.
- McGEOCH D.J., DOLAN A., RALPH A.C. Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J. Virol.*, 2000, **74**, 10401-10406.
- McVOY M.A., ADLER S.P. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.*, 1994, **68**, 1040-1051.
- McVOY M.A., NIXON D.E., ADLER S.P. Circularization and cleavage of guinea pig cytomegalovirus genomes. *J. Virol.*, 1997, **71**, 4209-4217.
- McVOY M.A., NIXON D.E., ADLER S.P., MOCARSKI E.S. Sequences within the herpesvirus-conserved *pac1* and *pac2* motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J. Virol.*, 1998, **72**, 48-56.
- McVOY M.A., NIXON D.E., HUR J.K., ADLER S.P. The ends on herpesvirus DNA replicative concatemers contain *pac2* cis cleavage/packaging elements and their formation is controlled by terminal cis sequences. *J. Virol.*, 2000, **74**, 1587-1592.
- McVOY M.A., RAMNARAIN D. Machinery to support genome segment inversion exists in a herpesvirus which does not naturally contain invertible elements. *J. Virol.*, 2000, **74**, 4882-4887.
- MEYER G., VLCEK C., PACES V., O'HARA M.K., PASTORET P.-P., THIRY E., SCHWYZER M. Sequence analysis of the bovine herpesvirus type 1 genes homologous to the DNA polymerase (UL30), the major DNA-binding protein (UL29) and the ICP 18.5 assembly protein (UL28) genes of herpes simplex virus. *Arch. Virol.*, 1997, **142**, 89-102.
- NISHYAMA Y., KIMURA H., DAIKOKU T. Complementary lethal invasion of the central nervous system by non-neuroinvasive herpes simplex type 1 and 2. *J. Virol.*, 1991, **65**, 4520-4524.
- ROIZMAN B., SEARS A.E. Herpes simplex viruses and their replication. In : Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*. 3rd edition. Lippincott-Raven Publishers : Philadelphia, 1996, 2231-2295.
- ROIZMAN B., DESROSIER R.C., FLECKENSTEIN B., LOPEZ C., MINSON A.C., STUDDERT M.J. The family Herpesviridae : An update. *Arch. Virol.*, 1992, **123**, 425-449.
- ROIZMAN B., WARD P.L. Herpes simplex genes : the blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet.*, 1994, **10**, 267-274.
- ROIZMAN B. Herpesviridae. In : Fields B.N., Knip D.M., Howley P.M. (Eds.), *Fields Virology*. 3rd edition. Lippincott-Raven publishers : Philadelphia, 1996, 2220-2230.
- ROIZMAN B., THAYER N. Herpesvirus Family : *Herpesviridae*. (sans date) (en ligne) Adresse URL : <http://www.stdgen.lanl.gov/stdgen/bacteria/hhv1/herpes.html> Consulté le 2 novembre 2000.
- SARISKY R.T., WEBER P.C. Requirement for double-strand breaks but not for specific DNA sequences in herpes simplex virus type 1 genome isomerization events. *J. Virol.*, 1994, **68**, 34-47.
- SCHYNTS F., VANDERPLASSCHEN A., HANON E., RIJSEWIJK F.A.M., VAN OIRSCHOT J.T., THIRY E. Use of PCR and immunofluorescence to detect bovine herpesvirus 1 recombinants. *J. Virol. Methods*, 2001, **92**, 99-104.
- SCHWYZER M., ACKERMANN M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. In : Thiry E., Edwards S., Ackermann M., Keil G., Pastoret P.P., van Oirschot J.T. (Eds.), *Infectious Bovine Rhinotracheitis and other Ruminant Herpesvirus Infections*. Elsevier : Amsterdam, 1996, 17-29.
- SEVERINI A., SCRABA D. G., LORNE D., TYRRELL J. Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.*, 1996, **70**, 3169-3175.