



HAL
open science

Étude phylogénique de souches d'alphaherpèsvirus isolées chez les équidés français et développement d'un outil innovant pour la mesure des anticorps neutralisants après infection ou vaccination

Gabrielle Sutton

► To cite this version:

Gabrielle Sutton. Étude phylogénique de souches d'alphaherpèsvirus isolées chez les équidés français et développement d'un outil innovant pour la mesure des anticorps neutralisants après infection ou vaccination. Biologie moléculaire. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC406 . tel-03435884

HAL Id: tel-03435884

<https://theses.hal.science/tel-03435884v1>

Submitted on 19 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Etude phylogénique de souches d'alphaherpèsvirus isolées chez les équidés français et développement d'un outil innovant pour la mesure des anticorps neutralisants après infection ou vaccination

**Présentée et soutenue par
Gabrielle SUTTON**

**Thèse soutenue le 18/05/2021
devant le jury composé de**

Mme SYLVIE LECOLLINET	Directeur de recherche, CIRAD	Rapporteur du jury
Mme MURIEL COULPIER	Directeur de recherche, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Membre du jury
M. PIERRE TRITZ	Docteur Vétérinaire, Clinique Vétérinaire de Faulquemont	Membre du jury
M. STÉPHANE PRONOST	Directeur de recherche, Laboratoire LABÉO	Directeur de thèse
M. ROMAIN PAILLOT	Maître de conférences HDR, Ecole Equine et Vétérinaire	Co-directeur de thèse
M. FRANÇOIS MEURENS	Professeur, École Nationale Vétérinaire de Nantes	Président du jury

Thèse dirigée par STÉPHANE PRONOST et ROMAIN PAILLOT, Biologie, Génétique et Thérapies Ostéo-Articulaires et Respiratoires



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



AVANT-PROPOS

L'herpèsvirus équin 1, considéré comme l'un des principaux pathogènes infectant les chevaux, est bien souvent à l'origine d'importantes conséquences sanitaires et économiques pour la filière équine, comme l'atteste la récente épizootie ayant eu lieu en Février 2021 et dont le foyer était à Valence (Espagne). Cette épizootie a touché la filière équine du sport et conduit la Fédération Équestre Internationale à arrêter les activités pendant un mois. Ce virus de la famille des *Herpesviridae* a la particularité de présenter alternativement deux modes d'infection, lytique ou latent, selon la régulation épigénétique exercée sur la réplication du génome viral. Cette caractéristique de latence complexifie la prévention, et les épisodes infectieux sur le terrain peuvent prendre une tournure dramatique selon les signes cliniques observés. Ce manuscrit rendra compte dans un premier temps, au travers d'une introduction bibliographique, des connaissances acquises sur ce virus depuis sa découverte. Puis, les objectifs de ce projet seront décrits. La ligne directrice de ces objectifs est de faire l'état des lieux moléculaire des souches d'herpèsvirus équin 1 circulant en France depuis les dix dernières années, et d'étudier le statut immunitaire de populations équines ciblées au travers d'une approche technologique innovante. Les résultats obtenus au cours des différentes études constituant ce projet seront ensuite présentés essentiellement sous forme d'article. Enfin, ces résultats seront discutés, avant de conclure et d'énoncer d'éventuelles perspectives.

FINANCEMENTS

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet CENTAURE co-financé par la Région Normandie et l'Union Européenne dans le cadre du programme opérationnel FEDER/FSE 2014-2020.

Ils ont été financés à 50% par la Région Normandie et à 50% par le Fonds Eperon. Leur réalisation a également été rendue possible grâce au soutien financier de LABÉO et de l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE).

L'ensemble des travaux ont été menés sur la plateforme de recherche équine Normandie Equine Vallée (Saint-Contest) au sein de l'équipe MECIIR (Mécanisme et Contrôle des Infections et Inflammation Respiratoire) intégrée au laboratoire BioTARGen (Biologie, génétique et thérapies ostéoarticulaires et respiratoires) et du pôle Recherche Développement et Innovation de LABÉO. Ils ont également été menés en collaboration avec le Réseau d'Épidémiologie-surveillance en Pathologie Equine (RESPE), l'Irish Equine Centre (IEC, Naas, Irlande) et la « Medway School of Pharmacy » au sein de l'équipe « Viral Pseudotype Unit » (VPU, Université du Kent, Chatham, Royaume-Uni).



REMERCIEMENTS

“Just one step at a time“

Il m’arrive souvent de dire que j’ai une bonne étoile, mais en vérité je suis surtout très bien entourée. A l’issue de ces trois années de thèse, il m’importe de remercier chacune des personnes qui ont contribué à ce travail par leur aide et leur soutien.

Je remercie tout d’abord grandement le Docteur Sylvie Lecollinet, le Docteur Muriel Couplier, le Docteur Pierre Tritz et le Professeur François Meurens, pour l’honneur qu’ils me font en acceptant d’évaluer mon travail en tant que rapporteurs ou examinateurs de soutenance.

J’aimerais ensuite remercier chaleureusement mes deux encadrants de thèse, Stéphane Pronost et Romain Paillot. Je suis convaincue de vous avoir donné du fil à retordre plus d’une fois, mais pour ma part, malgré mon air parfois ronchon, j’ai surtout énormément appris à vos côtés sur bien des plans. Je sors enrichie de ces trois années durant lesquelles vous m’avez accompagnée avec énormément de bienveillance. Merci beaucoup.

Un grand merci également à Loïc Legrand. Je n’aurais jamais tenté cette drôle d’aventure si tu ne m’en avais pas ouvert la porte. Merci beaucoup pour ton soutien et ta confiance. Je suis heureuse d’être entrée dans le monde du travail au sein d’une équipe encadrée avec autant de dynamisme et d’humanité. Merci.

Je voudrais également remercier Magali Demoor et Philippe Galéra pour m’avoir accueillie au sein de leur équipe et leurs mots d’encouragement. Merci à Guillaume Fortier de m’avoir fait confiance et m’avoir écoutée et conseillée lorsque j’en ai eu besoin et à Pierre-Hugues Pitel pour sa confiance et ses paroles encourageantes. Merci.

Ce projet n’aurait pas vu le jour sans le soutien de l’Etat Français et de la Région Normandie, du Fonds Eperon et de l’École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement que je remercie.

Merci également aux membres de mon comité de suivi individuel, Andreas Thomas Knigge, Françoise Rédini, Christina Zeitz et Vincent Zuba pour m'avoir accompagnée et encouragée avec bienveillance chaque année de cette thèse.

Comme le dit si justement Stéphane, nous faisons un travail d'équipe ! Merci donc à toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler durant ces trois années. Merci à toi Christine, pour m'avoir formée, conseillée et appris un peu de ta rigueur mais aussi pour avoir pris le temps d'échanger avec moi sur mon sujet de thèse. Erika, je t'ai appelée au secours de nombreuses fois, alors merci d'avoir toujours répondu présente et pour ton aide et tes conseils. Merci Albertine pour ton humour et merci Sophie pour ta patience à la réception de mes tableaux de commandes...presque toujours incomplets ! Merci à toi Marie-Pierre, je crois que personne n'aime beaucoup la maintenance, mais nous avons tous la chance que tu sois là pour nous guider et la rendre moins contraignante. Un grand merci pour tes innombrables gâteaux, tous aussi délicieux les uns que les autres. Merci à tous les doctorants avec qui j'ai partagé ces trois années de thèse. Merci les garçons de m'avoir accueillie dans votre bureau et merci Romain C de m'avoir laissé ta place. Merci à toi Côme pour ton aide précieuse pendant ces trois années et, bon, allez, tes quelques cookies. Merci à toi Bastien pour tes challenges sportifs et tes blagues. Merci à toi aussi Clément, je ne suis pas sûre d'être devenue une fine botaniste, mais je me retrouve avec un avocatier dans mon appartement (Alphonse II, Alphonse I n'a jamais poussé, le confinement lui a sapé le moral). Si je dois garder un souvenir de ce bureau, ce sera celui de nos expériences scientifiques sur la carboglace. Une grande réussite. Clovis, tu n'as pas partagé notre bureau mais assurément toutes nos pauses. Merci pour tes encouragements et tes nombreux conseils qui m'ont souvent bien aidée à avancer. Il est maintenant temps de remercier la Dream Team, merci Flora, Marine et Aurélie pour votre pêche, votre humour et votre grand soutien ces derniers mois. Merci Flora d'avoir subi avec moi et avec beaucoup d'humour, comme toujours, la déprime post-COVID19 de nos cellules. Merci à toi Marine pour ta bonne humeur qui ne passe jamais inaperçue dans le labo. Et merci Aurélie pour ton humour et ton authenticité, rendez-vous en 2023 pour la victoire des All Blacks ! Je ne vous oublie pas Camille, Manon et Matthieu ! Camille, merci pour ton aide pendant tes stages et durant ces derniers mois, tu as beaucoup mis la main à la pâte pour ce projet, je t'en remercie. Manon, Matthieu, Camille, Flora, Marine, Aurélie, je vous envoie plein de courage pour terminer vos thèses, dans des conditions qui sont difficiles mais qui ne vous empêcheront pas de briller, soyez-en certain(e)s.

Merci également à toute l'équipe du RESPE, Christel Marcillaud-Pitel, Stéphanie, Virginie, Marion, Claire, Pierre-Thomas.

Et puis, bien sûr, je remercie Stéphanie et Marie qui m'ont aussi accueillie et soutenue avec beaucoup de bienveillance. Merci à Juliette, Manon, Flavie, Pierre, Samuel, Sofyia, Sarah et Louise, merci à tous pour nos échanges, nos pauses ensemble et blagues échangées au détour d'un couloir !

Merci également à Camille Vercken pour ton dynamisme et l'intérêt que tu portes à nos projets respectifs.

Merci à Frédéric pour nos chouettes échanges et tes nombreux conseils toujours enrichissants, merci à Florence.

Merci à Karen et Raphaëlle, pour vos conseils quand j'en ai eu besoin et votre bienveillance.

J'aimerais également remercier mes anciens collègues du service de VBM. Merci à Aurélie Godard, Aurélie Laurent, Virginie, Cécile, Yann et Elena pour les quatre années que nous avons passées ensemble avant cette thèse et durant lesquelles j'ai beaucoup appris mais aussi beaucoup ri. Avez-vous retrouvé mes feuilles, par hasard ? Pardonnez-moi d'avoir autant liquidé nos réserves de bonbons.... ! Merci également à Charline, Emilie, Ying et Louise pour vos sourires et votre aide quand j'en ai eu besoin ces dernières années. Merci aussi à Elise, Suzanne et Maud, pour leur coup de pouce toujours donné avec le sourire. Merci à Fabienne, Fany et Caroline pour leur bonne humeur. Merci à l'équipe de cytologie et d'immunologie pour m'avoir laissée leur chiper des échantillons de temps en temps. Merci à tous les autres que j'ai toujours autant de plaisir à croiser lors de mes virées « en bas »!

Merci également au personnel de l'accueil pour les nombreux colis que je leur ai confiés ou qu'ils ont réceptionnés pour moi. Merci à Fabrice, Michaël et Karen pour toute la logistique dont nous dépendons tous et leur distribution de sourires.

I was very lucky to visit and spend some time in two laboratories in Ireland and in the UK. I would like to thank warmly Ann Cullinane and Marie Garvey, Simon Scott and Cecilia Di Genova for kindly receiving me in their lab and transmitting some of their knowledge. Thank you also for making me feel comfortable and showing me some nice places in your beautiful respective countries. Thank you very much.

Parce qu'avoir la tête dans le guidon n'est pas de bon augure, merci à mes amis, pour leur soutien. Merci à toi ma Ju, toujours à l'écoute et pétillante de bonne humeur (sauf quand il faut rentrer à pieds en 20, 25....admettons 30 minutes), merci pour ton énorme soutien qui m'a beaucoup aidée. Merci également à toi Augustin (oh, 35 minutes maximum hein!). Merci à vous, Emilie et Gilles, pour votre soutien qui m'a touché malgré la distance. Merci à toi, Aurélie Godard, pour ta positivité et ta bienveillance à toute épreuve. A tes côtés, les pensées négatives n'ont qu'à bien se tenir! Je pense aussi à vous Violène, Clémence, Mimi et Michou, ou encore Julien et Aurélie et aussi à vous, Lucie, Marjo, Hélène, Célia, Nathan et Cléa pour votre présence et tous nos si bons moments passés ensemble pendant et bien avant ces trois années. Merci à Marie, Babeth et Naïssa pour tous vos petits mots et vos pensées, et à toi, François pour ton aide sur ce manuscrit. Et enfin, merci à toi Afia, pour tes mots d'encouragement. Mettre la main à la pâte pour ton doctorat m'aura marquée, j'y ai souvent pensé durant ces trois années, j'ai d'ailleurs toujours autant de mal à manger du chou-fleur...Merci à tous !

A ma famille. A mes chers parents, Jocelyne et Wayne, pour votre amour et votre soutien si bienveillant, solide et inconditionnel, pour votre aide précieuse tout au long de ces années. Il n'y a pas un seul petit chapitre de cette thèse, auquel vous n'avez pas grandement contribué. Thank you. A mes deux grandes sœurs, Alexiane et Jessica. Les petits derniers s'inspirent beaucoup de leurs aînés, il y a assurément un petit bout de vous dans ces travaux. Merci pour tout votre soutien, votre bienveillance, vos mots quotidiens et vos blagues! A Gilles et Xavier, pour votre soutien également, pour les bons moments passés ensemble, merci ! A toi, petit Léon, qui est venu nous apporter tant de douceur à la fin d'une année si déstabilisante. A mon cher grand-père, avec qui j'aime philosopher et refaire le monde. A toute ma grande famille pour son soutien. Merci à tous !

To Chris and Jackie, Robin, Lorraine and Natasha, Grant and Sue, Richard and Helen, Sharen and Mike, Imelda and Dan, Diane and Dave, Tania and again Jessica. Thank you all for listening and helping me in making the decision to start this thesis while I was in New Zealand. It is with all your caring advice in mind that I boarded the plane back home. I think I had made my decision then. Thank you.

TABLE DES MATIERES

Avant-Propos.....	1
Financements.....	3
Remerciements	5
Table des matières	9
Table des illustrations.....	13
Abréviations	17
Chapitre 1. Contexte Scientifique.....	23
A. Généralités sur les Herpèsvirus	24
a. Classification générale	24
b. Herpesviridae	27
c. Alphaherpèsvirus des équidés.....	30
d. Evolution des herpèsvirus	34
B. Structure et Cycle de réplication de l’EHV-1	39
a. Structure des virions	39
b. Organisation du génome	40
c. Protéines Virales	44
d. Cycle viral	52
C. Pathogénicité de l’EHV-1	66
a. Virémie et tropisme cellulaire.....	66
b. Signes cliniques	71
c. Latence	74
d. Ecologie du virus	75

D.	Réponse Immunitaire après infection par l'EHV-1	77
a.	Immunité innée induite	77
b.	Immunité adaptative induite	79
E.	Prophylaxie et Traitement des infections dues à l'EHV-1	85
a.	Vaccination	85
b.	Méthodes de diagnostic.....	90
c.	Traitements antiviraux	100
F.	Filière équine et gestion de crise	107
a.	Mesures sanitaires	107
b.	Epidémiologie / séroprévalence dans le monde.....	109
c.	EHV-1 en France	111
G.	Phylogénie et caractère neuropathogène des variants d'EHV-1.....	113
a.	Etude du génome de l'EHV-1	114
b.	Souches neuropathogènes et non-neuropathogènes.....	116
Chapitre 2. Objectifs du projet de thèse.....		123
Chapitre 3. Projet scientifique et méthode.....		127
A.	Etude phylogénique de l'EHV-1 en France et découverte fortuite de deux souches d'alphaherpèsvirus des équides	128
a.	<u>Article 1</u> : Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion	128
b.	<u>Article 2</u> : Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C ₂₂₅₄ /H ₇₅₂ Strain in French Horses Showing No Major Impact on the Strain Behaviour	168
c.	<u>Article 3</u> : Equid alphaherpesviruses 8 and 9: strain isolation in France, molecular characteristics and antiviral assay	229
B.	Amélioration de l'outil de séroneutralisation pour l'analyse de la production d'anticorps neutralisants après infection par l'EHV-1 ou vaccination contre l'EHV-1 et l'EHV-4 (<u>Article 4</u>).....	274

Chapitre 4. Discussion générale, Perspectives et Conclusion	319
A. Discussion générale et perspectives.....	320
B. Conclusion	337
Références	339
Annexes.....	373

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Schéma représentatif de l'ordre des Herpesvirales.....	26
Figure 2 : Suggestion d'évolution dans le temps des trois sous familles des Herpesviridae	35
Figure 3 : Illustration du passage de la barrière de l'espèce sur la base des génomes complets d'espèces animales et du gène de la glycoprotéine B de différents herpesvirus, tirée des travaux de Azab <i>et al.</i> (2018).....	38
Figure 4 : Structure schématique d'un virion d'EHV-1 et observation au microscope électronique à transmission d'une particule virale d'EHV-1(Animal health Trust). Figure inspirée de Paillot <i>et al.</i> , 2008.....	40
Figure 5 : Représentations graphiques des six structures de génome décrites chez les <i>Herpesviridae</i>	41
Figure 6 : Carte du génome de l'EHV-1	43
Figure 7 : Représentation graphique en trois dimensions de l'ADN polymérase de l'HSV-1 issue des travaux de Zarrouk <i>et al.</i> (2017)	52
Figure 8 : Schématisation de l'entrée de l'EHV-1 dans une cellule cible	54
Figure 9 : Schématisation du transport des particules virales ou des capsides tégmentées vers le noyau cellulaire par la dynéine, le long des microtubules cellulaires	57
Figure 10 : Libération de l'ADN viral à l'intérieur du noyau cellulaire, au niveau d'un NPC	58
Figure 11 : Schématisation de la transcription et de la réplication virale de l'EHV-1 au sein du noyau cellulaire	61
Figure 12 : Schématisation de l'assemblage des nouveaux virions et de leur libération/transmission hors de la cellule	63
Figure 13 : Schéma récapitulatif du cycle viral de l'EHV-1	65
Figure 14 : Schématisation du premier cycle d'infection de l'EHV-1 au niveau de l'épithélium respiratoire et de l'installation la virémie cellulaire	70
Figure 15 : Schéma récapitulatif des signes cliniques pouvant être observés chez les chevaux lors d'une infection par l'EHV-1	73
Figure 16 : Schématisation de la mise en place de la réponse immunitaire innée lors d'une infection par l'EHV-1.....	79

Figure 17 : Schématisation de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative lors d'une infection par l'EHV-1	84
Figure 18 : Outils de PCR pour la détection et le typage de souches d'EHV-1	92
Figure 19 : Exemple d'ECPs observés sur trois lignées cellulaires différentes.....	94
Figure 20 : Coupes histologiques présentées par Holz <i>et al.</i> (2019) de tissus infectés par l'EHV-1	95
Figure 21 : Observation de différents degrés d'hémolyse à la suite d'un test RFC dirigée contre l'EHV-1 lors d'une étude menée par Bannai <i>et al.</i> (2013).....	97
Figure 22 : Mise en application du diagnostic d'un cas de myéloencéphalopathie proposée par Pusterla <i>et al.</i> (2009)	99
Figure 23 : Répartitions géographiques des déclarations au RESPE selon les trois réseaux (respiratoire aigu, syndrome nerveux, et avortement) en France pour l'année 2010.....	112
Figure 24 : Alignement des codons concaténés correspondants aux 37 acides aminés aux loci ciblés par l'analyse par MLSTaa proposée par Garvey <i>et al.</i> (2019) par rapport à la souche de référence Ab4	157
Figure 25 : Analyse phylogénétique des séquences MLSTnt EHV-1 de 63 souches à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood) et du modèle Kimura-2 (choisi grâce à l'analyse « Model selection » des 63 séquences).....	159
Figure 26 : Réseau phylogénétique réticulé obtenu grâce à l'algorithme NeighborNet proposé par Splitstree4.....	160
Figure 27 : Réseau phylogénétique construit selon l'algorithme Median Joining Network proposé par le logiciel PopART	161
Figure 28 : Schéma récapitulatif des trois méthodes de séroneutralisation explorées pour la détermination du titre d'anticorps neutralisants d'un sérum sur cellules E.Derm infectées par l'EHV-1	300
Figure 29 : (A) Cinétique des cellules E.Derm infectées par trois concentrations d'EHV-1 : $3,65 \times 10^4$, $3,65 \times 10^5$ et $3,65 \times 10^6$ DECP ₅₀ /mL. (B) Régression linéaire montrant la corrélation du CIT ₅₀ de chacune des doses de virus avec le Log ₁₀ de leur concentration.....	301
Figure 30 : Cinétiques de cellules infectées par l'EHV-1 en présence de sept dilutions du sérum A (1:4 à 1:256).....	302
Figure 31 : Régression linéaire illustrant la relation entre le CIT ₅₀ SR/CIT ₅₀ V de sérums collectés sur les chevaux 1 à 4 du set #2 de sérums des jours J+8 à J+18 post-infection expérimentale, et le titre prédit selon la cinétique des courbes de CI sur la cascade de dilution 1:4 à 1:256 de ces sérums.....	303

Figure 32 : Régression linéaire illustrant la relation entre le CIT_{50SR}/CIT_{50V} de sérums collectés sur les chevaux 1 à 4 du set #2 de sérums des jours J+8 à J+18 post-infection expérimentale, et le titre prédit à partir de la cascade de dilution (1:4 à 1:256) de ces sérums et selon le seuil AUC.....304

Figure 33 : Réciproque des titres d'anticorps neutralisants obtenus avec la méthode #2 sur cellules E.Derm (RTNA NT#2) et avec la méthode conventionnelle sur cellules RK13 (NT-RK13) pour les sérums des chevaux 1 à 8 du set#2 de sérums (respectivement A à H)307

Figure 34 : Description figurative du principe de la détermination du titre d'un sérum selon la méthode #3309

Figure 35 : Titre d'anticorps neutralisant l'EHV-1 obtenus avec la méthode #3 sur cellules E.Derm (RTNA NT#3) en comparaison avec la réciproque des titres d'anticorps neutralisants obtenus avec la méthode conventionnelle sur cellules RK13 (NT-RK13) pour les sérums des chevaux 1 et 2 du set#2 de sérums (respectivement A à B)310

Tableaux

Tableau 1 : Classification de l'ordre des Herpesvirales selon le dernier rapport de l'International Committee Of Taxonomy of Viruses (ICTV)29

Tableau 2 : Présentation des Alphaherpèsvirus des équidés, de leur(s) hôtes(s) naturel(s) et des signes cliniques qu'ils peuvent engendrer30

Tableau 3 : Fonctions connues des 12 glycoprotéines présentes à la surface de l'EHV-1, inspiré d'Osterrieder & Van de Walle (2010)50

Tableau 4 : Récapitulatif des vaccins commercialisés connus dans le monde. Tableau inspiré de Selvaraj, 201990

Tableau 5 : Récapitulatif des molécules antivirales testées contre l'EHV-1 *in vitro* et/ou *in vivo* et leur mode d'action 105

Tableau 6 : Récapitulatif des valeurs de CIT_{50SR}/CIT_{50V} et des réciproques des titres d'anticorps neutralisant l'EHV-1 prédits sur E.Derm (selon les courbes de CI ou selon le seuil AUC) pour les sérums des chevaux 1 à 4 du set #2 de sérums prélevés aux jours J+8 et J+18 post-infection expérimentale305

Tableau 7 : Récapitulatif des réciproques de titres d'anticorps neutralisant l'EHV-1 obtenus avec la méthode #2 sur E.Derm (RTNA NT#2) et la méthode conventionnelle sur RK13 (NT-RK13) pour les sérums des chevaux 1 à 8 du set #2 de sérums prélevés aux jours J+8 et J+18 post-infection expérimentale308

Tableau 8 : Récapitulatif des réciproques de titres d'anticorps neutralisant l'EHV-1 obtenus avec la méthode #3 sur E.Derm (RTNA NT#3) et la méthode conventionnelle sur RK13 (NT-RK13) pour les sérums des chevaux 1 et 2 du set #2 de sérums prélevés aux jours J+8 et J+18 post-infection expérimentale312

ABREVIATIONS

A

A ₂₂₅₄	Adénine en position 2 254 du gène de l'ADN polymérase
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AHV-1	Alcelaphine gammaherpesvirus 1
ARNm	Acide ribonucléique messenger

B

BHK	Baby hamster kidney
BoHV-1, 2	Bovine alphaherpesvirus 1 et 2

C

CCL	Chemokine ligand (motif C-C)
CeHV-1	Macacine alphaherpesvirus 1
CI	Cell index
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50
CIT ₅₀	Temps requis pour induire une chute de cell index de 50%
CHO	Chinese hamster ovary
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CpHV-1	Caprine alphaherpesvirus 1
CXCL	Chemokine ligand (motif C-X-C)

D

D ₇₅₂	Acide aspartique en position 752 de l'ADN polymérase
DECP ₅₀	Dose entraînant un effet cytopathique pour 50 % des cellules
DIVA	Differentiating infected from vaccinated animals

E

E	Early (genes)
EBMEC	Equine brain microvascular endothelial cells

EBV	Epstein Barr Virus
ECE	Exanthème coïtal équin
eCG	equine chorionic gonadotropin
ECP	Effet cytopathique
E.Derm	Equine dermal
EEK	Equine embryonic kidney
EHM	Equine herpesvirus myeloencephalopathy
EHV	Equid herpesvirus
EICP0	EHV-1 infected cell polypeptide 0
EIV	Equine influenza virus
ELA-A	Equine leucocyte antigen A
ELISA	Enzyme-linked immuno assay
EREC	Equine respiratory epithelial cells
ETIF	EHV-1 alpha trans-inducing factor

F

Fc	Fragment cristallisable
----	-------------------------

G

G ₂₂₅₄	Guanine en position 2 254 du gène de l'ADN polymérase
GAG	Glycosaminoglycanes
GaHV-2	Gallid alphaherpesvirus 2
gB, gC	Glycoprotéine B, glycoprotéine C
G+C	Guanine + Cytosine
GFP	Green fluorescent protein
gp	Glycoprotéine

H

HHV	Human herpesvirus
hIgG	Human immunoglobuline G
Hpi	Heure post-infection
HSV	Human simplex virus
HVEM (Hve)	Herpesvirus entry mediator

I

ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IE	Immediate early (gene)
IEC	Irish Equine Centre
IEP	Immediate early protein
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IR _L , IR _S	Internal repeat long, short

K

kDa	kilo Dalton
KSHV	Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus

L

L	Late (genes)
LA-PCR	Long and accurate polymerase chain reaction
LAT	Latent associated transcripts
L-particles	Light particles
LTc	Lymphocytes T Cytotoxiques

M

MDa	Méga Dalton
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
MDV	Marek's disease virus
MLV	Modified live vaccines
MLST	Multi locus sequence typing
MLSTaa	Multi locus sequence typing sur la base des acides aminés
MLSTnt	Multi locus sequence typing sur la base des acides nucléiques

N

N ₇₅₂	Asparagine en position 752 de l'ADN polymerase
NGS	Next generation sequencing
NK	Natural killer
NPC	Nuclear pore complex

NT ₅₀	Titre d'anticorps induisant 50% de neutralisation d'une souche virale
Nup	Nucléoporine

O

Oct1	Octamer-binding protein 1
OHV-2	Ovine gammaherpesvirus 2
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
ORF	Open reading frame

P

PAMP	Pathogen associated molecule pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
Pi	Post-infection
PK	Pig Kidney
PRR	Patern recognition receptor
PrV	Pseudorabies virus

R

RFC	Réaction de fixation du complément
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RK	Rabbit kidney
ROC	Receiver operating characteristic
ROCK1	Rho associated coiled-coil kinase 1
RTCA	Real time cell analysis
RTNA	Real time neutralisation assay

S

SNC	Système Nerveux Central
SH	Sulfate d'héparane
SN	Séroneutralisation
SRH	Single radial hemolysis
SuHV-1	Suid herpesvirus 1

T

TAP	Transporter associated with antigen processing
-----	--

ABBREVIATIONS

Th	T helper (lymphocyte auxiliaire)
TK	Thymidine Kinase
TLR	Toll-Like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TR _L ,TR _S	Terminal Repeat Long, Short

U

U _L	Unique Long
U _S	Unique Short

V

vCKBP	viral Chemokine Binding Protein
VRC	Viral Replication Compartments
VP	Virion protein
VZV	Varicella-Zoster Virus

Chapitre 1.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

A. Généralités sur les Herpèsvirus

Le terme « herpès », du Grec ancien ἕρπης (hérypô, ramper) fut probablement employé pour la première fois il y a plus de vingt-cinq siècles par Hippocrate comme en témoignent ses écrits décrivant des lésions cutanées humaines chroniques rampant sur la peau et présentant un aspect vésiculeux ou ulcéreux (Beswick 1962). La nature des lésions désignées sous ce terme d'herpès a grandement évolué au cours des siècles et ce n'est qu'au XX^e siècle que l'origine virale de l'herpès a été établie (pour revue, Roizman 1985).

Le terme « virus », du latin *virus* (poison, toxique), désigne des entités microscopiques non cellulaires dont le développement et la persistance dépendent d'une cellule hôte et peuvent parfois être à l'origine de maladies. Si le débat concernant leur appartenance au monde du vivant bat son plein depuis plus de cent ans, il semblerait que leur existence, quant à elle, remonte aux origines de la vie. Plusieurs hypothèses ont été émises à ce sujet. Une première suggérant que les ancêtres des virus aient existé avant même l'apparition des premières cellules, une seconde qu'ils soient le résultat de la désolidarisation d'éléments cellulaires et enfin une dernière suggérant, cette fois, que les virus résultent de la régression de parasites intracellulaires (pour revue, Kaján *et al.* 2020). Quoi qu'il en soit, cette indispensable interaction des virus avec les cellules qu'ils infectent pourrait être à l'origine d'une co-évolution entre les virus et les hôtes qu'ils infectent (pour revue, Kaján *et al.* 2020).

Cette première partie traitera de la classification générale des herpèsvirus. La classification des herpèsvirus des équidés sera ensuite détaillée, en mettant l'accent sur les alphaherpèsvirus. Enfin, les théories d'évolution des herpèsvirus seront brièvement abordées.

a. Classification générale

La première classification des herpèsvirus a été publiée en 1971 par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV) sous le genre des *Herpèsvirus*. Dans ce premier rapport, les virus étaient classés selon leur hôte naturel et leurs caractéristiques pathogéniques et épidémiologiques (pour revue, Davison 2010). L'évolution des techniques d'étude comme la microscopie, l'usage d'anticorps spécifiques et enfin le séquençage des acides nucléiques a permis d'ajuster les critères de classification et d'ainsi prendre en compte la structure des virus, leur mode de réplication et leur structure et proximité génomique. Ainsi, comme présenté en Figure 1, les herpèsvirus appartiennent à ce jour à l'ordre des *Herpesvirales*, lui-même divisé en trois

familles qui sont celles des *Alloherpesviridae* infectant les poissons et les grenouilles, des *Malacoherpesviridae* infectant les mollusques et des *Herpesviridae* classifiant tous les autres herpèsvirus. Cet ordre des *Herpesvirales* est lui-même classé au sein du Realm *Duplodnaviria*, Règne *Heuggongvirae*, Embranchement *Peploviricota*, Classe *Herviviricetes* selon l'EC51 meeting, 2019, Berlin, Allemagne Ratification, mars 2020. Environ 122 virus sont classifiés dans cet ordre. Il semble que tous les vertébrés soient infectés par au moins une espèce d'herpèsvirus et qu'il existe au moins deux herpèsvirus infectant les mollusques.

Les virus de l'ordre des *Herpesvirales* sont des virus à ADN linéaire double brin enveloppés. La grande particularité de l'ensemble des virus de cet ordre est leur capacité à établir une latence chez leur hôte. Cette latence peut faire l'objet de réactivations tout au long de la vie de l'hôte, permettant ainsi au virus de persister en se disséminant à nouveau. Les différentes espèces de cet ordre se différencient par leur(s) hôte(s) naturel(s), les propriétés de leur ADN, le contenu et arrangement de leurs gènes, leur cycle de réplication, les tissus et cellules qu'ils infectent, leur cross-réactivité antigénique et leur site et mécanisme d'établissement de la latence (pour revue, Burrell, Howard and Murphy 2017).

La famille des *Herpesviridae* regroupe l'ensemble des herpèsvirus de mammifères, d'oiseaux et de reptiles, et est divisée en trois sous-familles: la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, représentée par les genres *Iltovirus*, *Mardivirus*, *Scutavirus*, *Simplexvirus* et *Varicellovirus*; la sous-famille des *Betaherpesvirinae* représentée par les genres *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Proboscivirus* et *Roseolovirus*; et enfin la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* représentée par les genres *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Percavirus* et *Rhadinovirus*.

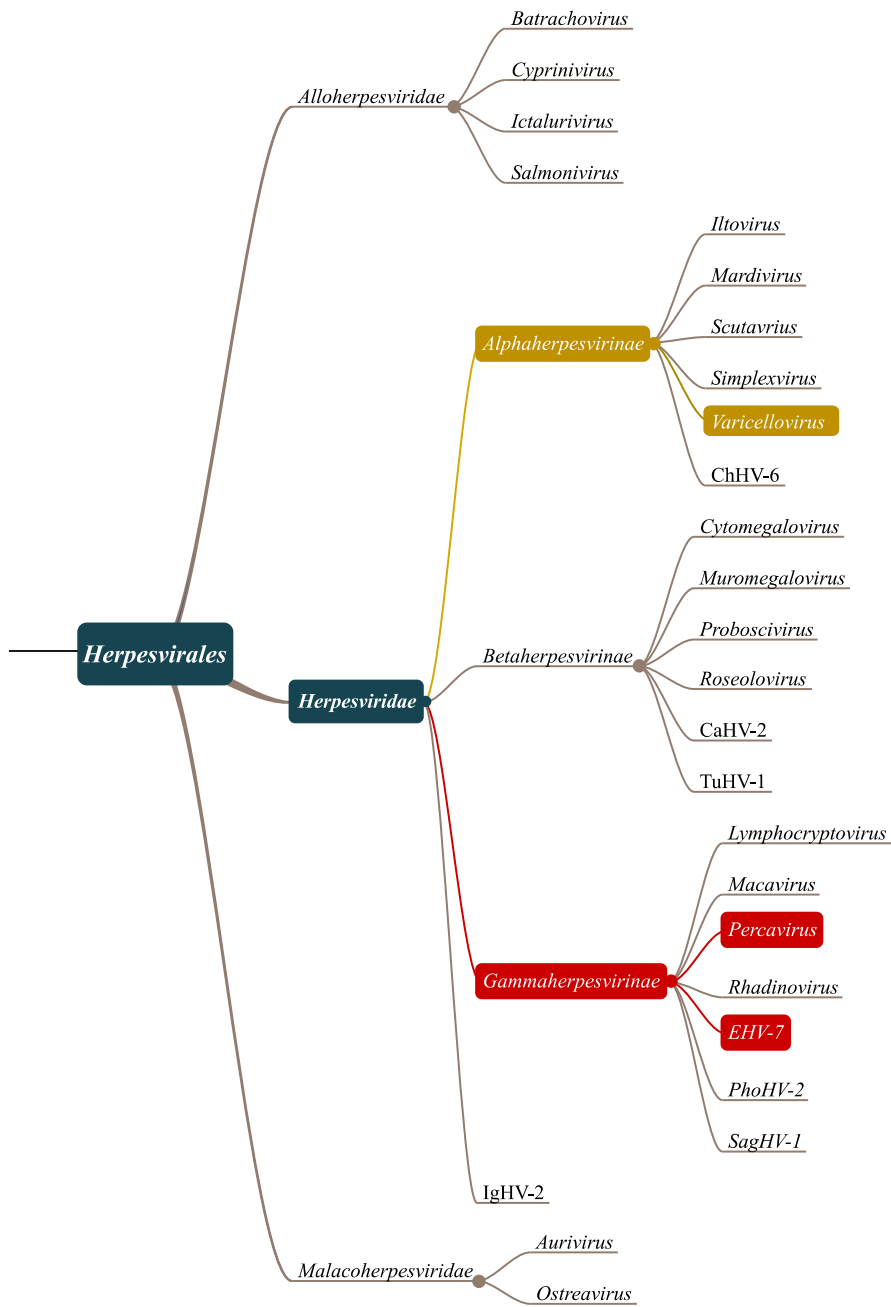


Figure 1 Schéma représentatif de l'ordre des Herpesvirales. La couleur jaune permet de positionner les alphaherpèsvirus des équidés au sein de cette classification. La couleur rouge permet, pour sa part, de positionner les gammaherpèsvirus des équidés.

b. *Herpesviridae*

Comme décrit précédemment, les herpèsvirus des équidés appartiennent à la famille des *Herpesviridae*. La plupart ont pour hôte naturel le cheval (*Equus caballus*), même si certains semblent également infecter les ânes (*Equus asinus*), les zèbres (*Equus quagga, zebra ou grevyi*), voire passer la barrière d'espèce et infecter des mammifères, équidés ou non (voir partie A.c). Ces herpèsvirus sont répartis au sein de deux sous-familles, les *Alphaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*, partageant ainsi les caractéristiques d'herpèsvirus d'autres espèces. Aucun herpèsvirus des équidés n'a été décrit dans la famille des *Betaherpesvirinae* à l'heure actuelle. Les herpèsvirus humains étant les plus largement étudiés parmi les *Herpesviridae*, leurs caractéristiques sont par conséquent mieux définies et servent de prototypes pour l'étude des herpèsvirus de leur sous-famille et genre.

La sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, est divisée en cinq genres : le genre des *Simplexvirus*, représenté par les Herpes Simplex Virus 1 et 2 (HSV ou Human Herpes Virus (HHV) 1 et 2 selon la classification ICTV), le genre des *Varicellovirus*, représenté le Varicella-Zoster Virus (VZV ou HHV-3) et comportant également les Equid alphaherpesvirus (EHV) 1, 3, 4, 8, et 9, les genres des *Mardivirus*, des *Scutavirus* et enfin celui des *Iltovirus*. Les détails des virus classés dans cette sous-famille des *Alphaherpesvirinae* sont indiqués dans le Tableau 1. Les virus de cette sous-famille ont un cycle de réplication court (quelques heures), peuvent infecter un large spectre de cellules, vont lyser les cellules qu'ils infectent et établissent leur latence dans les ganglions nerveux sensoriels (pour revue, Whitley 1996; pour revue, Cohrs and Gildeen 2011; pour revue, Burrell, Howard and Murphy 2017).

La sous famille des *Betaherpesvirinae*, non représentée par les herpèsvirus des équidés est divisée en quatre genres : les *Cytomegalovirus* représentés par le Cytomegalovirus (CMV ou HHV-5), les *Muromegalovirus* représentés par le Murid betaherpesvirus 1 (MuHV-1), les *Proboscivirus* représentés par l'Elephantid betaherpesvirus 1 (EIHV-1) et enfin les *Roseolovirus* représentés par le Human betaherpesvirus 6A (HHV-6A). Les Caviid betaherpesvirus 2 (CaHV-2) et Tupaiid betaherpesvirus 1 (TuHV-1) font également partie de cette sous-famille. Cette sous-famille est représentée par des virus au cycle de réplication long et progressif (plusieurs jours). Ils infectent un plus petit spectre de cellules que les alphaherpèsvirus et ces dernières prennent une apparence de cellules gonflées parfois multinuclées (cytomégalie). Les bêtaherpèsvirus établissent leur latence au niveau de tissus

lymphoréticulés, dans les glandes sécrétrices et au niveau des reins (pour revue, Whitley 1996; pour revue, Burrell, Howard and Murphy 2017).

La sous-famille des *Gammaherpesvirinae* quant-à-elle est divisée en quatre genres : les *Lymphocryptovirus* représentés par l'Epstein-Barr Virus (EBV ou HHV-4) et les *Macavirus*, les *Percavirus* au sein desquels sont répertoriés les EHV-2 et 5 et les *Rhadinovirus* représentés par le Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus (KSHV ou HHV-8). L'EHV-7 aussi connu sous le nom d'Asinine gammaherpesvirus 2 (AsHV-2) est un virus à part de cette sous-famille. Les détails des virus classés parmi les *Gammaherpesvirinae* sont également présentés dans le Tableau 1. Cette sous-famille possède le spectre de cellules cibles le plus restreint se limitant par exemple aux cellules lymphoïdes B et cellules endothéliales pour l'EBV et le KSHV. La latence de virus appartenant à cette sous-famille a été observée dans les tissus lymphoïdes (pour revue, Whitley 1996; pour revue, Burrell, Howard and Murphy 2017).

Les herpesvirus des équidés sont donc classifiés parmi les *Alphaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*. Nous nous intéresserons à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* dans laquelle se classent les *Varicellovirus* comprenant l'EHV-1. Dans un souci de clarté, les herpesvirus des équidés seront désignés sous l'abréviation anglaise EHV. La même nomenclature sera utilisée pour les autres espèces d'herpesvirus lorsqu'elles seront citées.

Tableau 1 Classification de l'ordre des Herpesvirales selon le dernier rapport de l'International Comittee Of Taxonomy of Viruses (ICTV).

<i>Herpesvirales</i>	<i>Allo-herpesviridae</i>	<i>Batrachovirus</i>		RaHV-1, 2, 3	
		<i>Cyprinivirus</i>		AngHV-1, CyHV-1, 2, 3	
		<i>Ictalurivirus</i>		AciHV-2, IcHV-1, 2	
		<i>Salmonivirus</i>		SalHV-1, 2, 3	
	<i>Herpesviridae</i>	<i>Alpha-herpesvirinae</i>	<i>Iltovirus</i>		GaHV-1, PsHV-1
			<i>Mardivirus</i>		AnHV-1, CoHV-1, GaHV-2,3, MeHV-1, SpHV-1
			<i>Scutavirus</i>		ChHV5, THV3
			<i>Simplexvirus</i>		HSV-1, 2, AtHV-1, BoHV-2, CHV-2, LHV-4, McHV-1, MaHV-1,2, PoHV-3, PaHV-2, PtHV-1, SaHV1
			<i>Varicellovirus</i>		VZV (HHV-3), BoHV-1, BoHV-5, BuHV-1, CaHV, CpHV-1, CeHV-9, CvHV-1,2, EHV-1, 3, 4, 8, 9, FeHV-1, MoHV-1, PhHV-1, SuHV-1 (PrV)
			ChHV-6		
		<i>Béta-herpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>		CMV (HHV-5), AoHV-1, CbHV-1, CeHV-5, McHV-3, McHV-8, MaHV-1, PnHV-2, PaHV-2,3, SaHV-4
			<i>Muromegalovirus</i>		MuHV-1, 2, 8
			<i>Proboscivirus</i>		EiHV-1, 4, 5
			<i>Roseolovirus</i>		HHV-6A, 6B, HHV-7, McHV-9, MuHV-3, SuHV-2
			CaHV-2		
			TuHV-1		
		<i>Gamma-herpesvirinae</i>	<i>Lympho-cryptovirus</i>		HHV-4, CalHV-3, CeHV-14, GoHV-1, McHV-4, 10, PnHV-1, PaHV-1, PoHV-2
			<i>Macavirus</i>		AIHV-1, 2, BoHV-6, CpHV-2, HipHV-1, OvHV-2, SuHV-3, 4, 5
			<i>Percavirus</i>		EHV-2, 5, FeHV-1, MusHV-1, PhHV-3, VeHV-1
			<i>Rhadinovirus</i>		HHV-8, AtHV-2, 3, BoHV-4, CrHV-2, MaHV-5, 8, 11, 12, MuHV-4, 7, SaHV-2
			EHV-7		
			PhoHV-2		
			SagHV-1		
IgHV-2					
<i>Malaco-herpesviridae</i>	<i>Aurivirus</i>		AbHV-1		
	<i>Ostreavirus</i>		OsHV-1		

c. *Alphaherpèsvirus des équidés*

Les cinq herpèsvirus des équidés de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* appartiennent au genre des *Varicellovirus*. Les signes cliniques qu'ils peuvent engendrer et leur capacité à être réactivés après une phase de latence suscitent un grand intérêt au sein de la filière équine. L'ensemble de leurs caractéristiques est résumé dans le Tableau 2.

Tableau 2 Présentation des *Alphaherpèsvirus des équidés*, de leur(s) hôte(s) naturel(s) et des signes cliniques qu'ils peuvent engendrer.

Alphaherpèsvirus des équidés	Hôte naturel	Forme de maladie	Référence
Alphaherpèsvirus équin 1 (EHV-1)	Cheval	Forme respiratoire – Oculaire – Avortement – Forme nerveuse	(Allen <i>et al.</i> 2004)
Alphaherpèsvirus équin 3 (EHV-3)	Cheval	Exanthème coïtal	(Sijmons <i>et al.</i> 2014)
Alphaherpèsvirus équin 4 (EHV-4)	Cheval	Forme respiratoire – Avortements rares	(Allen <i>et al.</i> 2004)
Alphaherpèsvirus équin 6 (Alphaherpèsvirus asin 1) (EHV-6)	Âne	Exanthème coïtal	(Jacob <i>et al.</i> 1988)
Alphaherpèsvirus équin 8 (Alphaherpèsvirus asin 3) (EHV-8)	Âne et Cheval	Forme respiratoire – Forme nerveuse	(Garvey <i>et al.</i> 2018)
Alphaherpèsvirus équin 9 (Alphaherpèsvirus de Gazelle 1) (EHV-9)	Gazelle, Zèbre, Onagre	Forme nerveuse	(Schrenzel <i>et al.</i> 2008)

EHV-1

Ce virus, qui est au centre de notre étude, a été décrit pour la première fois en 1933 suite à un avortement chez une jument (Dimock and Edwards 1933). Il a d'abord été désigné sous deux appellations : l'« EHV-1 de sous-type 1 », aussi appelé « virus abortif » et l'« EHV-1 sous-type 2 », aussi appelé « virus de la rhinopneumonie équine » (pour revue, Crabb and Studdert 1995). Le second sous-type, dont l'hétérogénéité du génome a été mise en évidence à l'aide d'enzymes de restrictions en 1981 et confirmée par la suite, n'est en fait autre que l'EHV-4 (Sabine, Robertson and Whalley 1981; Studdert, Simpson and Roizman 1981; Telford *et al.* 1998; pour revue, van Maanen 2002). L'EHV-1 n'a été désigné comme

tel qu'en 1992 par l'ICTV, alors que l'EHV-4 apparaîtra en 1987 dans la nomenclature. Trois principales formes cliniques peuvent être observées lors d'infections par l'EHV-1 : une forme respiratoire, une forme abortive et une forme nerveuse, ces trois formes seront décrites plus en détails par la suite. L'hôte naturel de l'EHV-1 est le cheval mais un franchissement de barrière d'espèce a été mis en évidence avec la description d'infections chez d'autres espèces d'équidés tels que les ânes par exemple (Negussie *et al.* 2017). Par ailleurs, l'isolement de variants génétiquement très proches de l'EHV-1 et parfois désignés sous le nom de « zebra-borne equine alphaherpesvirus 1 » a également été décrit à plusieurs reprises chez des espèces de mammifères équidés ou non, comme ce fut le cas chez des zèbres (Blunden *et al.* 1998; Guo *et al.* 2014; Abdelgawad *et al.* 2015), des onagres (*Equus hemionus*) (Ghanem *et al.* 2008), des gazelles de Thomsons (*Eudorcas thomson*) (Kennedy *et al.* 1996; Wohlsein *et al.* 2011; Sakaguchi *et al.* 2017), des bovins (Crandell, Ichimura and Kit 1988), des biches (*Dama dama*, Kinyili 1979), des lamas (*Lama glama*) et alpacas (*Vicugna pacos*) (Rebhun *et al.* 1988), chez des ours (*Ursus americanus*) et des cochons d'Inde (*Cavia porcellus*) (Wohlsein *et al.* 2011), ou encore des rhinocéros Indiens (*Rhinoceros unicornis*) (Abdelgawad *et al.* 2014). Lors d'infection chez d'autres hôtes, les formes observées sont très souvent nerveuses. De plus, une étude menée par Ibrahim *et al.* en 2007, semble montrer que des souches isolées chez un onagre, un zèbre ou une gazelle sont plus virulentes chez le hamster que celles isolées chez des chevaux (Ibrahim *et al.* 2007). Enfin, l'EHV-1 établit sa latence au niveau des ganglions trigémînés et dans les nœuds lymphatiques submandibulaires (Allen *et al.* 2004; Pusterla, Mapes and Wilson 2010).

La structure de l'EHV-1 telle qu'elle est connue à ce jour sera décrite par la suite, ainsi que celle de son génome, des protéines virales les mieux étudiées et enfin le comportement du virus au sein d'une cellule à travers la description de son cycle viral.

EHV-3

L'EHV-3 a été isolé pour la première fois en 1968 simultanément aux Etats-Unis, au Canada et en Australie (Bryans 1968; Girard, Greig and Mitchell 1968; Pascoe, Spradbrow and Bagust 1968; Feilen, Walker and Studdert 1979). Il est à l'origine de l'exanthème coïtal équin (ECE) qui se caractérise par des lésions cutanées externes au niveau du vagin et de la muqueuse vestibulaire pour les juments, du pénis et du prépuce des étalons. Ces lésions se présentent sous la forme de vésicules évoluant en pustules et/ou ulcères et sont accompagnées d'une inflammation locale caractérisée par des rougeurs et un gonflement. Il s'agit d'un virus

sexuellement transmissible par contact de la peau (pour revue, Hussey and Landolt 2015). Le phénomène d'avortement ne semble pas observé sur le terrain, bien qu'il semble que l'inoculation *in utero* de ce virus ait pu engendrer des avortements (Gleeson, Sullivan and Studdert 1976). Par ailleurs, des études ont reporté la mise en évidence d'EHV-3 au niveau des nasaux de poulains de mères infectées (Barrandeguy 2010). Pour finir, le site d'établissement de la latence de l'EHV-3 n'est pas clairement défini dans la littérature.

EHV-4

L'EHV-4, identifié comme un virus distinct de l'EHV-1 à partir de 1981, a pour hôte naturel le cheval et n'a pas été trouvé chez d'autres hôtes (Sabine, Robertson and Whalley 1981; Studdert, Simpson and Roizman 1981; Cullinane, Rixon and Davison 1988; Telford *et al.* 1998; pour revue, van Maanen 2002). Une étude menée par Telford *et al.* en 1998 montre une proximité entre les ORFs homologues d'EHV-1 et EHV-4 allant de 55 % à 84 % (54.9 % à 96.4 % en terme de séquence protéique) (Telford *et al.* 1998). Ce virus affecte principalement le tractus respiratoire supérieur des chevaux même si des cas sporadiques d'avortements ont été rapportés (Izume *et al.* 2017). Lorsque les signes cliniques se manifestent, ils peuvent durer 2 à 3 semaines. Ces signes cliniques se caractérisent par une fièvre, un état apathique, une perte d'appétit, de la toux, un écoulement nasal et/ou oculaire dans un premier temps séreux puis muco-purulent. Il peut arriver que les jeunes poulains développent des infections bactériennes au niveau du tractus respiratoire inférieur (pour revue, Hussey 2019). L'EHV-4 à l'état latent a pu être mis en évidence au niveau des tissus lymphoïdes, des ganglions trigéminés et dans des cellules épithéliales pulmonaires (Edington, Welch and Griffiths 1994; Borchers *et al.* 1997; Borchers, Wolfinger and Ludwig 1999; pour revue, Harless and Pusterla 2006).

EHV-6

L'EHV-6 n'est à ce jour pas reconnu dans la classification de l'ICTV. Il a cependant été associé à plusieurs reprises à l'Asinine alphaherpesvirus 1 (AsHV-1 selon la nomenclature anglaise) et initialement isolé chez l'âne comme le montre le rapport de Jacob *et al.* (1988) (Browning, Ficorilli and Studdert 1988; Jacob *et al.* 1988). Les signes cliniques associés à l'herpèsvirus isolé dans cette étude sont similaires à ceux de l'exanthème coïtal équin observé lors d'infections par l'EHV-3 décrit précédemment. L'analyse par polymorphisme de longueur des fragments de restriction du génome de la souche alors isolée a permis de montrer malgré une proximité, une distinction génétique avec l'EHV-3. Un autre

alphaherpèsvirus isolé lors d'un épisode infectieux affectant 34 ânes a entraîné des lésions nodulaires puis ulcéreuses au niveau de la muqueuse buccale, de la langue et de la peau autour des lèvres chez les jeunes individus de moins de 4 mois, et des lésions similaires au niveau des parties génitales et des mammelles des femelles adultes. La séquence complète de cette alphaherpèsvirus a montré une homologie génétique de 87,02% avec l'EHV-3 mais n'a pas pu être comparée avec la séquence de la souche isolée en 1988 par Jacob *et al.*, le prélèvement n'étant plus disponible (Martella *et al.* 2020).

EHV-8

L'EHV-8 était anciennement identifié sous le nom anglais d'Asinine alphaherpesvirus 3 (AsHV-3 selon la nomenclature anglaise) et fut isolé pour la première fois chez un âne en 1988 par une équipe australienne (Browning, Ficorilli and Studdert 1988). Son hôte principal est donc l'âne (*Equus asinus*) mais il a été isolé également plus récemment chez des chevaux (Liu *et al.* 2012; Garvey *et al.* 2018). L'EHV-1 et l'EHV-8 étant génétiquement très proches, il semble y avoir une cross-réactivité des anticorps. Il n'existe pas à ce jour et à notre connaissance d'outil permettant la discrimination d'anticorps neutralisant spécifiquement l'EHV-8 (Garvey *et al.* 2018). Cela rend difficile l'estimation de la séroprévalence de ce virus au sein de la population équine. L'EHV-8 cause principalement des signes respiratoires similaires à ceux décrits pour l'EHV-1 et l'EHV-4, mais des formes nerveuses ont également été décrites chez des ânes infectés (Liu *et al.* 2012; Maanen *et al.* 2017; Garvey *et al.* 2018). Deux études, l'une portant sur les profils protéiques de souches EHV-1 et EHV-8 et l'autre sur la réactivité croisée d'anticorps monoclonaux contre des glycoprotéines de surface suggèrent que l'EHV-8 serait encore plus proche de l'EHV-1 que ne l'est l'EHV-4 (Crabb and Studdert 1990; Crabb, Allen and Studdert 1991). Enfin, le séquençage complet de quatre souches irlandaises en 2018 révèle que l'EHV-8 aurait en fait une plus grande homologie avec l'EHV-9 (92 % d'homologie sur l'ensemble du génome) qu'avec l'EHV-1 (89 % d'homologie sur l'ensemble du génome) dont il reste très proche (Garvey *et al.* 2018).

EHV-9

L'EHV-9, d'abord identifié sous le nom de Gazelle alphaherpesvirus 1 (GHV-1 selon la nomenclature anglaise) semble avoir été isolé pour la première fois en 1993 chez une Gazelle de Thomson dans un jardin zoologique au Japon (Fukushi *et al.* 1997). Renommé ensuite EHV-9 de par sa grande proximité génétique et cross-réactivité d'anticorps avec l'EHV-1 (d'environ 86 % à 95 % d'homologie selon les ORFs) (Fukushi *et al.* 1997; Yanai *et*

al. 1998; Taniguchi *et al.* 2000; Fukushi, Yamaguchi and Yamada 2012), il a été identifié chez de nombreuses espèces équine et non équine telles que les zèbres, qualifiés désormais d'hôtes naturels (zèbres de Grévy's *Equus grevyi*, zèbres de Grant *Equus quagga boehmi*), les onagres, également hôtes naturels (*Equus hemionus onager*), les girafes (*Giraffa camelopardalis reticulata*) et même l'ours polaire (*Ursus maritimus*) (Kasem *et al.* 2008; Schrenzel *et al.* 2008; Donovan *et al.* 2009; Fukushi, Yamaguchi and Yamada 2012; Abdelgawad *et al.* 2016; Moeller *et al.* 2018) démontrant ainsi une facilité à franchir la barrière de l'espèce. Les signes cliniques observés sont généralement des signes neurologiques pouvant conduire à la mort. De par la virulence des souches décrites et leur isolement chez un grand nombre d'espèces animales différentes, ce virus représente une menace pour l'espèce équine.

d. Evolution des herpèsvirus

Des modèles d'études phylogéniques à partir des différents génomes d'herpèsvirus connus ont permis de remonter la trace des herpèsvirus et d'imaginer leur évolution depuis leur ancêtre commun (McGeoch and Cook 1994; McGeoch *et al.* 1995; pour revue, Davison 2002). L'étude menée par McGeoch *et al.* (1995) impliquant l'alignement de séquences d'acides aminés issues de huit gènes (UL2, UL5, UL15, UL19, UL27, UL28, UL29 et UL30) et basée sur un modèle d'horloge moléculaire constante, a estimé que les trois sous-familles des *Herpesviridae* auraient fait leur apparition il y a 180 à 220 millions d'années (période qui correspond également à l'apparition des mammifères). Les premières différenciations en genre auraient eu lieu il y a plus de 80 millions d'années, les autres familles se seraient ensuite distinguées au cours des 80 millions d'années qui ont suivi (Figure 2, (McGeoch *et al.* 1995)). Selon cette publication, la variété actuelle des herpèsvirus serait le résultat d'une « co-spéciation » et l'apparition des herpèsvirus d'oiseaux serait par conséquent survenue à la suite d'un passage de barrière d'espèces entre mammifères et oiseaux.

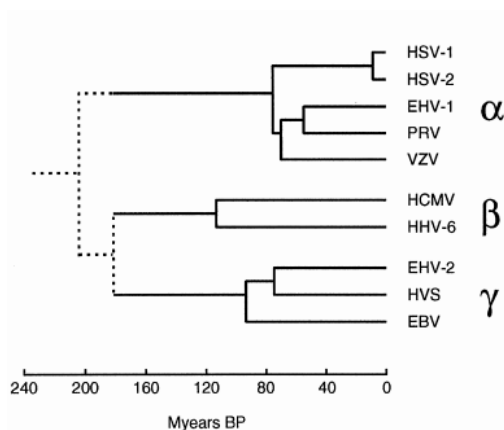


Figure 2 Suggestion d'évolution dans le temps des trois sous familles des *Herpesviridae* selon l'analyse de séquences d'acides aminés issues de huit gènes conservés parmi les *herpèsvirus* par McGeoch et al. 1995.

Plus tard, l'évolution des *herpèsvirus* a également été explorée en détail par Davison A.J. (pour revue, Davison 2002). L'auteur rappelle dans cette revue que la spécificité d'hôte des *herpèsvirus* est le résultat d'une longue co-évolution virus-hôte et est illustrée par une relativement modeste pathogénicité. Il est donc possible que des espèces d'*herpèsvirus* se soient éteintes avec leur hôte, les espèces actuellement connues ne représenteraient alors que la partie émergée de l'iceberg.

A l'heure actuelle, les données disponibles sur l'ensemble des *herpèsvirus* connus ne permettent pas de remonter plus loin que les trois grandes familles des *herpèsvirus* en terme d'évolution. S'il est acté que les *Herpesviridae*, les *Malacoherpesviridae* et les *Alloherpesviridae* partagent des points communs et sont bien tous des *herpèsvirus*, leur divergence est telle qu'il est difficile de retracer leur ancêtre commun (pour revue, Davison 2002).

L'analyse de l'évolution des *herpèsvirus* par Davison A.J. (2002) montre que celle-ci est mieux connue au sein des *Herpesviridae*, pour lesquels un plus grand nombre de séquences et d'informations sont disponibles. Il semblerait que les α -, β - et γ -*herpesvirinae* aient évolué à partir d'un ancêtre commun à partir duquel ils auraient hérité de 43 gènes principalement localisés au centre des génomes des différentes lignées. Il semble que ces gènes sont plutôt impliqués dans les fonctions essentielles du cycle de la réplication virale (entrée dans la cellule, réplication de l'ADN, encapsidation du génome, assemblage des virions etc.). Les lignées auraient ensuite acquis de nouveaux gènes plus spécifiques en périphérie de leur génome (impliqués dans l'interaction hôte, latence, etc.). Cette acquisition

de nouveaux gènes pourrait avoir eu lieu par émergence, duplication, divergence extensive de gènes ancestraux ou encore par capture de gènes de l'hôte. La dynamique évolutive au sein des lignées, pourrait ensuite avoir été rythmée par la spéciation des hôtes (des virus génétiquement proches infectant des hôtes différents), la sélection positive entraînant l'apparition de mutations silencieuses ou non, le franchissement de la barrière de l'espèce ou encore la recombinaison qui semble être plus fréquente intra-espèce que inter-espèces chez les herpesvirus (pour revue, Davison 2002).

Comme mentionné précédemment, les herpesvirus sont caractérisés, de manière générale, par une grande spécificité d'hôte. Cependant des franchissements de la barrière d'espèce ont pu être observés chez des herpesvirus membres des différentes sous-familles d'*Herpesviridae* comme illustré dans la Figure 3 tirée de la revue publiée par Azab *et al.* (pour revue, Azab *et al.* 2018). Si certaines homologies de séquences entre herpesvirus infectant des hôtes différents pourraient n'être que le fruit d'une co-évolution et co-divergence des virus avec leurs hôtes, dans certains cas, la théorie du saut de barrière d'espèce est plus probable et souvent accompagnée de signes cliniques plus menaçants pour le nouvel hôte infecté. En s'intéressant au danger que peut représenter un tel phénomène pour des espèces sauvages parfois en voie de disparition, Azab *et al.* (2018) ont ainsi passé en revue plusieurs herpesvirus susceptibles d'avoir franchi cette barrière de l'espèce. Les *Betaherpesvirinae* semblent être les herpesvirus de mammifères les plus spécifiques de leurs hôtes. Azab *et al.* (2018) rappellent toutefois la forte pathogénicité de certains herpesvirus d'éléphants chez leurs jeunes hôtes. En effet, bien qu'aucun phénomène de franchissement de la barrière de l'espèce n'ait été mis en évidence chez ce type d'herpesvirus, l'intensité des signes cliniques qu'ils peuvent induire les distingue d'autres herpesvirus ayant co-évolué avec leur hôte spécifique qu'ils infectent de manière plus silencieuse. De la même manière, une grande divergence chez les bêtaherpesvirus infectant les chauves-souris laisse à penser que des franchissements de la barrière de l'espèce ont pu se produire (pour revue, Azab *et al.* 2018). Chez les *Gammapherpesvirinae*, les auteurs mentionnent l'Alcelaphine gammaherpesvirus 1 (AHV-1) et l'Ovine gammaherpesvirus 2 (OHV-2) qui sont souvent asymptomatiques chez leurs hôtes naturels respectifs que sont le gnou et le mouton mais peuvent causer une maladie mortelle, la fièvre catarrhale maligne, lorsqu'ils infectent d'autres ruminants tels que la chèvre, les bovins ou encore le cerf de Virginie (Brown and Bloss 1992; Stahel *et al.* 2013; pour revue, Azab *et al.* 2018). Du côté des *Alphaherpesvirinae* les franchissements de la barrière de l'espèce semblent plus fréquents, avec notamment celui du

Macacine alphaherpesvirus 1 (CeHV-1) aussi connu sous le nom d'herpèsvirus B. Ce virus infecte principalement les macaques mais des cas chez l'humain (<100) ont été reportés avec une mortalité supérieure à 70% (Hummeler *et al.* 1959; Holmes *et al.* 1990; Engel *et al.* 2002). Bien qu'à priori peu fréquent, ce saut de barrière d'espèce représente l'une des plus grandes menaces de zoonose liée à un herpèsvirus (pour revue, Jaiakittivong and Langlais 1998; pour revue, Woźniakowski and Samorek-Salamonowicz 2015). L'HSV-2 et le VZV sont eux aussi suspectés d'avoir été transmis de primates non-humains à des primates humains. Concernant les alphaherpèsvirus des ruminants, ils semblent pouvoir infecter plusieurs espèces de ruminants mais leur spectre d'hôtes n'est encore pas bien connu. Toutefois, s'ils peuvent pour certains mettre en danger certaines espèces sauvages en voie de disparition, ils n'ont à priori encore jamais été isolés chez l'homme (pour revue, Azab *et al.* 2018). Le Suid alphaherpesvirus 1 (SuHV-1) ou virus de la pseudo-rage (« pseudorabies » PrV) est à l'origine de la maladie d'Aujeszky chez le porc sauvage ou domestique, caractérisée par des signes cliniques nerveux et des avortements (pour revue, Pomeranz, Reynolds and Hengartner 2005). Ce virus est capable d'infecter plusieurs hôtes non-naturels provoquant des signes nerveux et souvent la mort de l'animal infecté (Marcaccini *et al.* 2008; Masot *et al.* 2017; Lian *et al.* 2020). La susceptibilité des primates humains au SuHV-1 est controversée, mais seules des infections anecdotiques chez les primates humains et les primates non-humains ont été rapportées (pour revue, Tischer and Osterrieder 2010; pour revue, Wong *et al.* 2019). Un autre alphaherpesvirus considéré comme représentant une potentielle menace pour l'espèce humaine est le Gallid alphaherpesvirus 2 (GaHV-2) infectant les poulets, les dindes ou les cailles et responsable de la maladie de Marek (« Marek's disease virus » MDV) caractérisée par des tumeurs et une immunosuppression chez l'hôte infecté. Alors que ce virus a été soupçonné d'être associé à la sclérose multiple chez l'homme dans les années 1990, une autre étude parue en 2001 a montré par PCR la présence de GaHV-2 dans du sérum humain (McStreet, Elkunk and Latiwonk 1992; Laurent *et al.* 2001). Ces derniers résultats n'ont pas pu être confirmés et il n'existe pas d'autre évidence de passage de la barrière de l'espèce. Ce virus reste néanmoins sous les projecteurs (pour revue, Tischer and Osterrieder 2010).

Concernant l'EHV-1, la caractéristique d'évolution lente des herpèsvirus est bien retrouvée pour ce virus, comme le montrent les récents travaux de Bryant *et al.* (Bryant *et al.* 2018). Par ailleurs, ces travaux ont mis en lumière des sites de recombinaison entre des souches d'EHV-1 et d'EHV-4, ou encore des souches d'EHV-1 et d'EHV-8. Une autre étude

portant cette fois sur une souche d'EHV-1 ayant franchi la barrière de l'espèce et infecté un ours polaire (*Ursus maritimus*), a mis en évidence une zone de recombinaison entre l'EHV-1 et l'EHV-9 (Greenwood *et al.* 2012). Cette dernière suspicion de recombinaison a cependant été contestée par la suite par Guo *et al.* (Guo *et al.* 2014). Le franchissement de la barrière de l'espèce chez les herpesvirus des équidés peut aussi être illustré par l'EHV-8 infectant principalement les ânes mais ayant également été isolé chez des chevaux (Garvey *et al.* 2018).

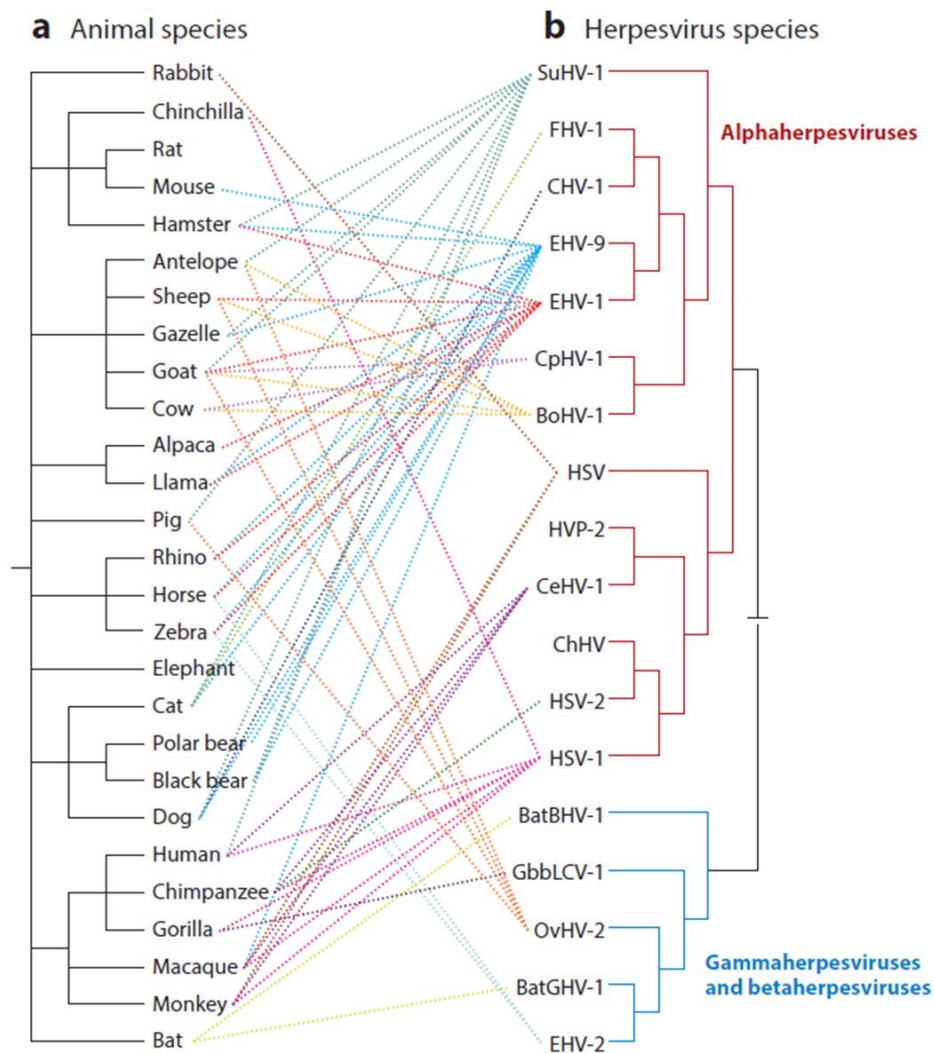


Figure 3 Arbre phylogénétique obtenu par la méthode de maximum de vraisemblance obtenu dans PyMOL. Analyse de la robustesse par 100 répétitions de bootstraps. (a) génomes complets d'espèces animales, (b) gène de la glycoprotéine B de différents herpesvirus. Les lignes en pointillés relient les herpesvirus aux hôtes chez lesquels ils ont pu être isolés. Figure et légende tirées de la revue publiée par Azab *et al.* (2018).

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'EHV-1 seront abordées dans la partie B de ce chapitre.

B. Structure et Cycle de réplication de l'EHV-1

Les caractéristiques de l'EHV-1 ont pu être établies grâce aux nombreuses études menées depuis plusieurs années sur ce virus et grâce aux extrapolations des caractéristiques de l'HSV-1 représentant les *Alphaherpesvirinae* et du VZV représentant les *Varicellovirus*.

a. Structure des virions

Malgré leur variabilité génétique et de propriétés biologiques, les *Herpesviridae* ont une structure de virion commune composée d'un ADN viral linéaire et double brin encapsidé dans la nucléocapside, elle-même incrustée dans un tégument protéique, lui-même recouvert par une enveloppe portant des glycoprotéines à sa surface (Figure 4).

Certaines études décrivent l'enroulement de l'ADN autour d'un complexe protéique de forme toroïde (pour revue, Roizman and Baines 1991). L'ensemble serait incrusté dans une matrice liquide cristalline et rattaché à la structure de la capsidie par le biais de protéines en fuseau, formant ainsi la nucléocapside (pour revue, Burrell, Howard and Murphy 2017). La capsidie est composée de 162 capsomères dont 150 hexons (localisés sur les facettes de la structure) et 12 pentons (localisés aux sommets de la structure) formant une structure icosaédrique de symétrie T=16 (Newcomb *et al.* 1989; Baker *et al.* 1990). L'un des sommets de cette capsidie est occupé par un complexe protéique constituant un pore et permettant l'encapsidation ou l'exclusion de l'ADN viral concatémérisé (Chang *et al.* 2007; pour revue, Mettenleiter, Klupp and Granzow 2009). La nucléocapsidie dont la taille est d'environ 100-110 nm (pour revue, Riaz, Murtaz-ul-Hasan and Akhtar 2017) est elle-même prise dans le tégument, une matrice plus ou moins épaisse et comportant de nombreuses protéines qui jouent un rôle majeur dans le cycle de réplication du virus. Concernant l'HSV-1, 23 protéines virales du tégument ont été identifiées par spectrométrie de masse, de taille et d'abondance variables. Des protéines cellulaires ont également été identifiées dans le tégument de virions d'HSV-1 dont certaines sont impliquées dans le transport et l'exocytose (Loret, Guay and Lippé 2008; pour revue, Owen, Crump and Graham 2015). Les protéines du tégument interagissent entre-elles, donnant une certaine structure au tégument, même lorsque les virions sont désenveloppés (lors de l'assemblage par exemple) (pour revue, Owen, Crump and Graham 2015). La tomographie cryo-électronique du tégument de l'HSV-1 a mis en évidence une polarisation de ce dernier, la capsidie étant beaucoup plus proche de l'enveloppe d'un côté que de l'autre (Grünwald *et al.* 2003). Ce tégument est, pour finir, lui-même enveloppé

d'une bicouche lipidique désignée sous le nom d'enveloppe et portant à sa surface 12 glycoprotéines jouant un rôle majeur dans le cycle de vie du virus.

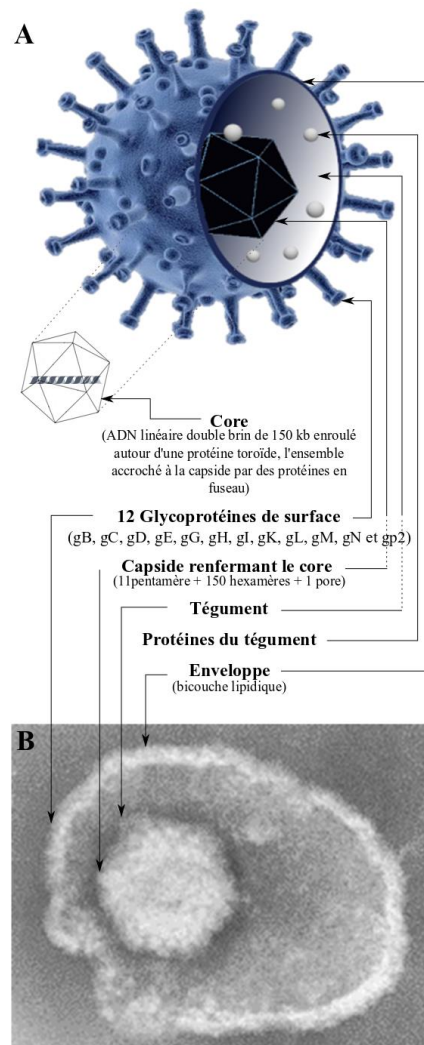


Figure 4 (A) structure schématique d'un virion d'EHV-1 et (B) observation au microscope électronique à transmission d'une particule virale d'EHV-1 (Animal Health Trust), d'après la revue de Paillot et al. (2008).

Ainsi, les virions d'herpèsvirus sont structurés par un assemblage de protéines qui, au fil des étapes du cycle viral, permettent l'acheminement du génome viral vers le noyau cellulaire où a lieu sa réplication puis l'assemblage de nouveaux virions, plusieurs éléments que nous allons décrire en commençant par l'organisation du génome.

b. Organisation du génome

La séquence complète du génome de l'EHV-1, et plus précisément de la souche Ab4 (isolée lors d'un épisode impliquant chevaux ayant présenté la forme nerveuse de la maladie), a été décrite pour la première fois par Telford *et al.* en 1992 (Telford *et al.* 1992). Le génome

complet d'une seconde souche V592, cette fois isolée lors d'un avortement, a ensuite été présenté par Nugent *et al.* (2006) (Nugent *et al.* 2006). Les séquençages de génome complet se sont ensuite multipliés et en 2018, une étude de grande ampleur sur 78 variants d'EHV-1 a été menée par Neil Bryant à l'Animal Health Trust (Royaume-Uni) en collaboration avec le Sanger Institute de Cambridge (Bryant *et al.* 2018).

Le génome des herpesvirus se présente sous la forme d'un ADN double brin linéaire. On distingue six structures de génome parmi les *Herpesviridae* (A à F) comme présenté Figure 5. L'ADN de l'EHV-1 est une molécule d'environ 93 méga Daltons (MDa) organisée selon une structure de type D, soit deux régions uniques, chacune entourée de deux régions répétées inversées. La taille du génome de la souche de référence Ab4 est de 150,223 kilo-paires de bases (kb) avec un contenu général en guanine + cytosine (G+C) d'environ 56,7 % (Henry *et al.* 1981; Telford *et al.* 1992). Il se divise en deux régions uniques, une région longue ou « Unique Long » (U_L) de 112 870 paires de bases (pb) entourée de deux régions répétées inversées ou « Terminal/Internal Repeat » (TR_L/IR_L) de 32 pb, et une région courte ou « Unique Short » (U_S) de 11 861 pb, également entourée de deux régions répétées inversées ou « Internal/Terminal Repeat » (IR_S/TR_S) de 12 714 pb (Figure 5). Le contenu en (G+C) serait plus élevé au niveau de ces dernières régions IR_S/TR_S (67 %) (Henry *et al.* 1981; Telford *et al.* 1992; Bryant *et al.* 2018; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019).

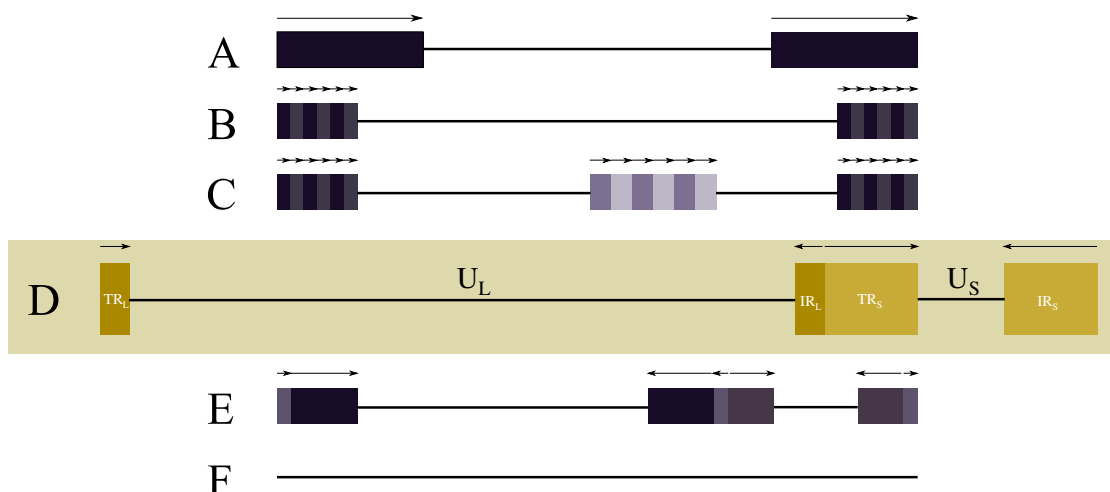


Figure 5 Représentations graphiques des six structures de génome décrites chez les *Herpesviridae*. La structure D (jaune) est représentative du génome de l'EHV-1.

Les alphaherpèsvirus ont un génome essentiellement colinéaire et celui de l'EHV-1 n'échappe pas à la règle. Il est divisé en 80 cadres de lecture ouverts ou « Open Reading Frames » (ORF) (Figure 6). Parmi ces gènes, 63 (ORF1 à 63) se trouvent au niveau de la région U_L, 8 (ORF68 à 76) au niveau de la région U_S et 4 (ORF64 à 67) sont dupliqués au niveau des régions IR et TR (Bryant *et al.* 2018). Toujours comme pour les autres herpèsvirus, les 80 ORFs du génome de l'EHV-1 peuvent se diviser selon trois catégories définies par leur ordre d'expression et d'activation. En effet, lors de l'entrée du virus au niveau du noyau de la cellule hôte, la machinerie transcriptionnelle va se mettre en route selon un ordre bien précis. Le premier gène exprimé sera donc qualifié de « Immediate Early » (IE) ou α , son expression régulera celle des gènes qualifiés de « Early » (E) ou β qui eux-mêmes activeront les gènes dits « Late » (L) ou γ (γ_1 et γ_2) (Caughman, Staczek and O'Callaghan 1985; Gray *et al.* 1987a, 1987b). Il semblerait que les gènes E (β) soient essentiels à la réplication tandis que les gènes L sont plutôt nécessaires à la structure et l'assemblage des virions (pour revue, Paillot *et al.* 2008).

Pour finir, trois éléments *cis*-régulateurs ont été identifiés comme potentielles origines de réplication sur le génome de l'EHV-1. Les deux premières, toutes deux désignées sous le nom de OriS et localisées au niveau des régions IR_S et TR_S, sont la copie d'une même séquence palindromique composée de deux séquences inversées de 9 pb (5'-CGTTCGCAC-3') séparées par une région riche en adénine+thymine (A+T). La troisième origine de réplication est une région montrant une forte homologie avec la région OriL identifiée chez l'HSV-1 et désignée sous le même nom (Baumann, Yalamanchili and O'Callaghan 1989; Telford *et al.* 1992; Martin and Deb 1994).

Le génome de l'EHV-1 code un panel de protéines virales plus ou moins bien définies. Nous continuerons donc avec la description des protéines virales les mieux décrites chez l'EHV-1 à ce jour.

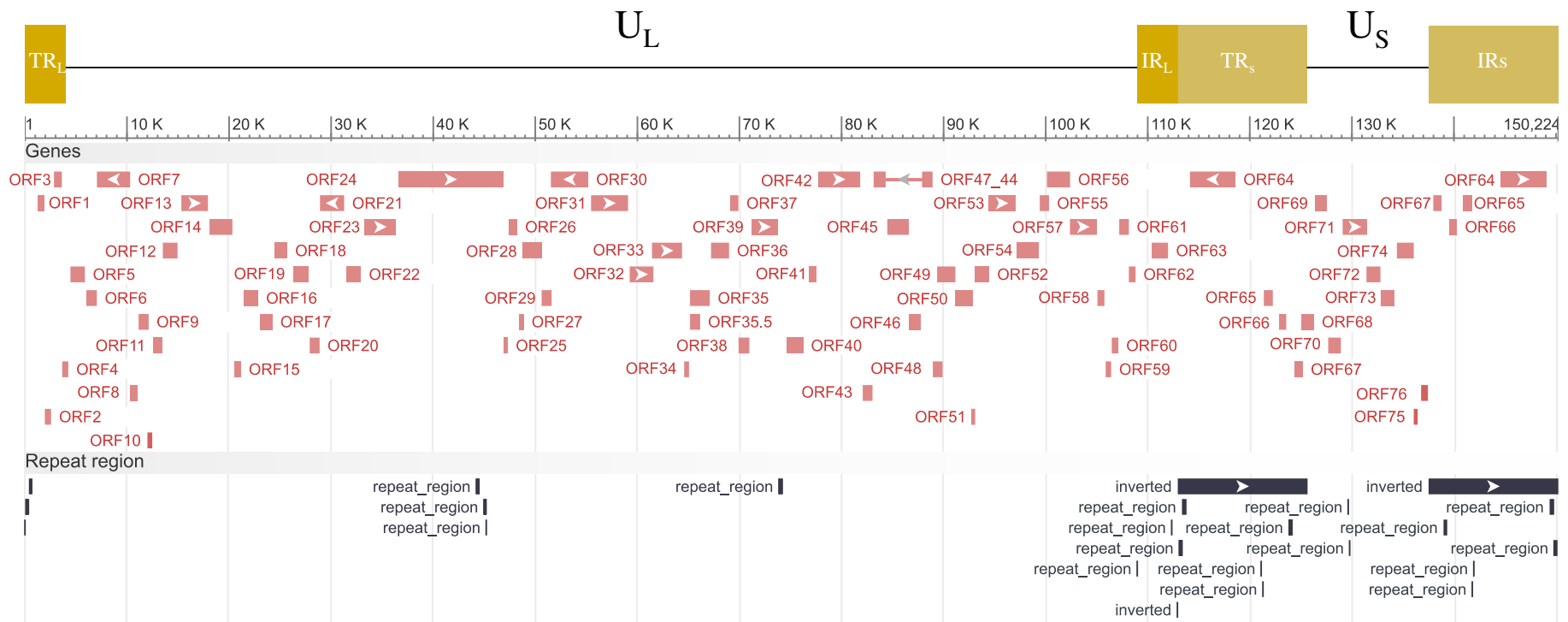


Figure 6 Carte du génome de l'EHV-1. La structure générale (de type D) est rappelée en jaune. Les gènes (Open Reading Frames (ORF)) sont indiqués en rouge. Les régions répétées sont indiquées en bleu (Bryant et al. 2018).

c. Protéines Virales

Protéines du tégment

Le tégment, cette matrice entourant la capsid, comporte plusieurs protéines qui jouent un rôle dans la structure du virus, mais également lors de différentes étapes du cycle d'infection viral. Douze protéines ont pu être définies comme protéines du tégment, toutes homologues de protéines de l'HSV-1 et codées par les ORFs 11, 12, 13, 14, 15, 23, 24, 40, 46, 49, 51 et 76 (Telford *et al.* 1992; Allen *et al.* 2004). Il semblerait que certaines protéines soient libérées dans le cytoplasme dès l'entrée du virion dans la cellule alors que d'autres sont transportées jusqu'au noyau avec la capsid (Frampton *et al.* 2010). La protéine VP16-E ou « EHV-1 alpha trans-inducing factor » (ETIF) (ORF12), la protéine EVP22 (ORF11) et la protéine EUL47 (ORF13) sont parmi les mieux décrites chez l'EHV-1.

La protéine VP16-E (ou ETIF) est une protéine majeure du tégment de 60 kilo-Dalton (kDa). Elle joue un rôle de structure et est également impliquée dans la régulation du gène IE en formant un complexe avec d'autres protéines cellulaires (Lewis, Thompson and Caughman 1993; von Einem *et al.* 2006). Il semblerait par ailleurs que VP16-E joue un rôle essentiel dans la maturation des virions et leur libération (von Einem *et al.* 2006). La protéine EVP22 est une protéine de 304 acides aminés chez l'EHV-1 et conservée parmi les alphaherpèsvirus bien qu'elle n'assure pas systématiquement les mêmes fonctions pour chacun des membres de cette famille (Okada *et al.* 2015). Concernant l'EHV-1, il semblerait que cette protéine liant les ARN messagers (ARNm) soit un régulateur de l'expression protéique à un niveau post-transcriptionnel, et particulièrement lors des premières étapes de la transcription virale (Okada *et al.* 2018). Le rôle de la protéine EUL47 n'est, quant à lui, pas clairement défini, mais il semble toutefois qu'elle joue un rôle à plusieurs niveaux qui sont la réplication virale, l'enveloppement des virions et le pouvoir infectieux du virus (Yu *et al.* 2012).

Une autre protéine peu décrite chez l'EHV-1 est le produit de l'ORF24. Son homologue VP1-3 (UL36) décrit chez l'HSV-1 est une protéine importante liant le penton VP5 de la capsid et incrustant ainsi la forme icosaédrique de la capsid à la partie interne du tégment. Il semblerait par ailleurs que cette protéine, qui est fermement attachée à la capsid, le reste jusqu'à l'arrivée aux pores nucléaires du virion (Machtiger *et al.* 1980; Newcomb *et al.* 1996; Zhou *et al.* 1999; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019).

Glycoprotéines

L'enveloppe virale porte 12 glycoprotéines à sa surface qui sont les glycoprotéines B (gB ou gp14), C (gC), D (gD), E (gE), G (gG), H (gH), I (gI), K (gK), L (gL), M (gM), N (gN), et la glycoprotéine gp2 (Tableau 3). Les onze premières sont codées par des gènes conservés parmi les alphaherpèsvirus alors que la dernière (gp2) n'est à ce jour décrite que chez EHV-1, EHV-4, l'EHV-8 et l'EHV-9 (Crabb and Studdert 1990; Fukushi, Yamaguchi and Yamada 2012). Ces glycoprotéines interviennent à différents stades du cycle viral et jouent un rôle dans l'établissement de la réponse immunitaire de l'hôte de par leur exposition à la surface des particules virales. Ces glycoprotéines ne sont pas toutes caractérisées pour l'EHV-1 et la compréhension de leur fonction se limite parfois aux connaissances acquises pour leurs homologues (HSV-1 notamment). Quatre d'entre elles (gB, gD, et l'hétérodimère gH-gL) sont essentielles à la culture ou réplique *in vitro*, les autres glycoprotéines jouant un rôle qualifié de non-essentiel à la croissance du virus *in vitro* (Neubauer *et al.* 1997; Csellner *et al.* 2000; Azab, Zajic and Osterrieder 2012).

La glycoprotéine B (gB ou gp14) est un trimère transmembranaire de type 1 appartenant aux protéines virales de fusion de classe III arborant probablement plusieurs conformations (pré-fusion/post fusion), bien que les mécanismes de remaniement de structure ne soient pas bien connus (Connolly and Longnecker 2012). Elle est codée par l'ORF33 et fait, par ailleurs, partie des glycoprotéines les plus conservées parmi les herpèsvirus (Telford *et al.* 1992; Bryant *et al.* 2018). Bien qu'encore peu caractérisée, il semble que la gB de l'EHV-1 soit impliquée dans le processus de pénétration par fusion dans la cellule, sous la médiation du complexe gH/gL, mais également de manière essentielle dans la fusion de cellule à cellule (Neubauer *et al.* 1997; Spiesschaert *et al.* 2015). Les récepteurs de la gB de l'EHV-1 ne sont pas connus mais des études menées sur la gB de l'HSV-1 montrent que cette dernière est capable de se fixer aux sulfates d'héparane (SH) présents au niveau de membranes cellulaires, permettant un attachement du virus à la cellule hôte. Cette fonction n'est pas essentielle à l'entrée du virus et il est probable qu'elle soit plutôt remplie par la glycoprotéine C (gC ou gp13) capable également de fixer les SH (Laquerre *et al.* 1998). D'autres récepteurs ont été identifiés comme liant la gB de l'HSV-1, dont des récepteurs de la famille des immunoglobulines (paired immunoglobuline-like type 2 receptor, PILR α), des chaînes lourdes de myosine de type II ou encore des glycoprotéines associées à la myéline (Sato *et al.* 2008; Arii *et al.* 2010; Suenaga *et al.* 2010). Pour finir, il a été mis en évidence

que cette glycoprotéine est une cible majeure de la réponse humorale de l'hôte (Allen *et al.* 1991; Packiarajah *et al.* 1998).

La glycoprotéine C (gC ou gp13) est une protéine membranaire intégrale de type 1 codée par l'ORF16 du génome de l'EHV-1 (Telford *et al.* 1992). Comme précisé précédemment, cette glycoprotéine non indispensable au cycle viral est capable de se lier à des SH cellulaires favorisant ainsi l'interaction de la gD avec un récepteur cellulaire, une étape clé du cycle viral (Osterrieder 1999). De toute évidence, cette glycoprotéine semble être en étroite relation avec la gB. Une étude récente menée sur la gC de l'HSV-1 suggère en effet que cette dernière pourrait être à l'origine d'un pH faible favorisant un changement de conformation de la gB et faciliter ainsi l'entrée du virus dans la cellule hôte (Komala Sari *et al.* 2020). Un autre rôle de la gB montré chez l'HSV-1 serait de permettre la sortie des virions du noyau par fusion de la pré-enveloppe virale avec la membrane nucléaire (Farnsworth *et al.* 2007). De plus, cette glycoprotéine qui comme la gB, est une cible majeure de la réponse humorale (Allen *et al.* 1991; Packiarajah *et al.* 1998), aurait un rôle de protection de la gB (ainsi que la gD et la gH) vis-à-vis des anticorps neutralisants chez l'HSV-1 (Komala Sari, Gianopulos and Nicola 2019). Bien que de tels mécanismes n'aient pas été démontrés chez l'EHV-1, il est possible que ce dernier arbore un fonctionnement similaire. Il semble également que la gC de l'HSV-1 soit capable de lier le troisième composant du complément et ainsi apporter une protection contre la neutralisation amorcée par le complément au virus (McNearney *et al.* 1987). Ce même phénomène a pu être mis en évidence pour l'EHV-4 mais n'est pas connu pour l'EHV-1 (Azab *et al.* 2010b).

La glycoprotéine D (gD ou gp18) est une protéine membranaire de type 1 de 58 kDa codée par l'ORF72 du génome de l'EHV-1 (Telford *et al.* 1992; Flowers *et al.* 1995). Cette glycoprotéine a été démontrée comme essentielle à l'entrée du virus dans la cellule et à la fusion virale de cellule en cellule (Csellner *et al.* 2000). Il semblerait qu'en se fixant à un ou des récepteurs cellulaires qui lui sont spécifiques, elle rende possible son interaction avec un complexe de glycoprotéines H et L. La gD joue ainsi un rôle important dans le tropisme cellulaire de l'EHV-1 (Azab and Osterrieder 2012). Il s'agit également d'une glycoprotéine impliquée dans l'activation de la réponse immunitaire humorale (Tewari *et al.* 1994; Packiarajah *et al.* 1998).

Les glycoprotéines gE et gI ont été décrites chez l'HSV-1 comme formant un hétérodimère transmembranaire jouant un rôle dans la transmission des virions d'une cellule à

l'autre (Dingwell *et al.* 1994). Cet hétérodimère a en effet été observé au niveau de surfaces de cellules infectées en contact avec d'autres cellules non infectées (Dingwell and Johnson 1998). Il a également été montré chez l'HSV-1 que ce complexe de glycoprotéines jouait un rôle de récepteur capable de fixer la région Fc (fragment cristallisable) des immunoglobulines G humaines (hIgG) et ainsi contribuait à une évasion de l'immunité par internalisation et dégradation du complexe lié aux immunoglobulines (Ndjamen *et al.* 2014). Enfin, il est possible que ce complexe soit impliqué avec d'autres glycoprotéines dans l'assemblage des virions chez l'HSV-1 (Farnsworth, Goldsmith and Johnson 2003). Les connaissances concernant ce complexe sont moins avancées pour l'EHV-1. Il ne semble pour autant pas que ce complexe soit indispensable à l'entrée du virus dans la cellule hôte, il a d'ailleurs été montré chez l'HSV-1 et l'HSV-2, que ces deux glycoprotéines ne sont pas indispensables à la culture *in vitro*. En revanche, il semble jouer un rôle important dans la virulence (Longnecker *et al.* 1987; Matsumura *et al.* 1998). Une étude portée sur la gE par Andoh *et al.* (2013) a permis de mettre en évidence une région au fort potentiel immunogénique, et spécifique de l'EHV-1 (Andoh *et al.* 2013).

La glycoprotéine G (gG) est également retrouvée chez plusieurs alphaherpèsvirus et codée chez l'EHV-1 par l'ORF70 (McGeoch 1990; Colle, Clay Flowers and O'Callaghan 1992; Telford *et al.* 1992). Il s'agit une protéine transmembranaire intégrale de type 1 se présentant sous plusieurs formes, toutes homodimériques: une forme ancrée au niveau de l'enveloppe virale (66kDa) et deux formes résultant du clivage de la première, l'une également ancrée dans l'enveloppe virale (10-12kDa) et l'autre sous une forme sécrétée (55kDa) (Drummer, Crabb and Studdert 1998; Bryant 2003). La fonction de la gG est encore mal connue, mais il a été montré qu'elle n'était pas essentielle à la réplication virale de l'HSV-1 et de l'HSV-2 *in vitro* (Longnecker *et al.* 1987). Sous ses différentes formes, cette glycoprotéine a une activité de liaison des chimiokines (viral chemokine binding protein, vCKBP), des molécules clés de la régulation de l'inflammation et de la signalisation immunitaire, participant ainsi probablement à l'évasion immunitaire virale. Cette activité a été observée chez plusieurs alphaherpèsvirus dont l'EHV-1 (Bryant 2003; Van de Walle *et al.* 2007; von Einem *et al.* 2007). Par ailleurs, la gG est aussi une cible de la réponse immunitaire chez l'hôte infecté et probablement de manière spécifique du type d'herpèsvirus (Crabb and Studdert 1993).

Comme la gB, les glycoprotéines H (gH) et L g(L) sont conservées parmi les herpèsvirus. Chez l'EHV-1, elles sont codées respectivement par les ORF39 et 62 du génome de l'EHV-1 (Telford *et al.* 1992). Ces deux protéines forment un complexe indispensable à la réplication du virus. Le rôle démontré de la gD dans l'entrée du virus dans la cellule et de la transmission de cellule en cellule s'étend probablement au complexe des deux glycoprotéines. (Forrester *et al.* 1992; Roop, Hutchinson and Johnson 1993; Stokes *et al.* 1996; Azab, Zajic and Osterrieder 2012). Selon le modèle de l'HSV-1, la gH posséderait un domaine transmembranaire contrairement à la gL. Il est probable que la gL joue un rôle d'échafaud pour la gH à laquelle elle se lie et soit indispensable à la maturation de cette dernière. Ce complexe protéique aurait alors pour rôle d'interagir avec la gB et d'en activer la fonction fusogène suite à la fixation de la gD à un récepteur cellulaire, et de permettre l'entrée du virus dans la cellule (Atanasiu *et al.* 2007; Chowdary *et al.* 2010). Toujours selon le modèle de l'HSV-1, la gH et la gB pourraient toutes deux être impliquées dans la sortie des virions pré-assemblés du noyau par fusion avec la membrane nucléaire, le rôle de la gL dans ce processus n'étant pas clairement défini (Farnsworth *et al.* 2007). En complément, une étude menée par Azab *et al.* en 2013, montre l'implication de la gH dans la détermination du mode d'entrée du virus dans la cellule, par fusion ou endocytose (Azab, Lehmann and Osterrieder 2013). D'un point de vue antigénique, les glycoprotéines gH et gL sont, ensemble, des cibles de la réponse immunitaire de l'hôte infecté (Tewari *et al.* 1994; Stokes *et al.* 1996; Kukreja *et al.* 1998).

La glycoprotéine K (gK) est une protéine membranaire hydrophobe codée par l'ORF6 (Telford *et al.* 1992). Cette glycoprotéine joue un rôle important dans la culture de l'EHV-1 *in vitro* notamment dans le processus de libération des virions mais également dans la transmission de cellule à cellule. Bien que composante des virions, cette glycoprotéine est retrouvée en grande quantité au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi des cellules infectées (Neubauer and Osterrieder 2004).

La glycoprotéine M (gM ou gp21/22a) est une protéine membranaire hydrophobe dimérique de classe III codée par l'ORF52 du génome de l'EHV-1 (Pilling *et al.* 1994; Osterrieder *et al.* 1997). Bien que non essentielle à la culture *in vitro* de l'EHV-1, elle contribue à l'entrée du virus dans la cellule hôte mais pourrait également jouer un rôle dans la sortie des virions de la cellule infectée, sachant que ni son rôle ni son interaction avec d'autres glycoprotéines (gE/gI, gN) ne sont clairement définis (Osterrieder *et al.* 1996, 1997; Rudolph and Osterrieder 2002). Plusieurs études ont mis en évidence le caractère immunogène de la

souche d'EHV-1 RacH délétée du gène codant la gM sur modèle murin et équin (Osterrieder, Seyboldt and Elbers 2001; Kydd *et al.* 2020). A l'issue de leur étude, il a été suggéré que la gM pourrait agir comme un modulateur de la réponse immunitaire mais le rôle exact de cette glycoprotéine reste à élucider. (Osterrieder, Seyboldt and Elbers 2001). Bien que le mécanisme soit encore mal connu, il est possible que la gM soit sous la régulation d'une autre glycoprotéine (gN) lors de stades avancés du cycle viral (Rudolph *et al.* 2002; Mahmoud *et al.* 2013; El Kasmi and Lippé 2015).

La glycoprotéine N (gN) codée par l'ORF10 du génome de l'EHV-1 est l'homologue de l'UL49.5 chez l'HSV-1 (Telford *et al.* 1992; Rudolph *et al.* 2002). Conservée parmi les herpesvirus, cette glycoprotéine dont le rôle est mal connu pourrait, chez l'EHV-1, être co-exprimée avec la gM, interagir avec cette dernière par l'intermédiaire d'un pont disulfure et être requise pour sa maturation. Le complexe gN/gM ainsi formé semble par ailleurs contribuer à l'antigénicité du virus (Rudolph *et al.* 2002; Mahmoud *et al.* 2013). Une telle interaction a pu être observée chez d'autres herpesvirus comme par exemple l'HSV-1, le CMV, l'HHV-8, le PrV ou encore le BoHV-1 (Liang *et al.* 1996; Jöns, Dijkstra and Mettenleiter 1998; Mach *et al.* 2000; Koyano *et al.* 2003; El Kasmi and Lippé 2015).

La glycoprotéine gp2 est une protéine lourde O-glycosylée non essentielle pour la croissance *in vitro*. Elle est encodée par l'ORF71 du génome de l'EHV-1 et n'a été identifiée à ce jour que chez l'EHV-1, l'EHV-4 et l'EHV-8 (Crabb, Allen and Studdert 1991; Sun and Brown 1994; Sun *et al.* 1994; Wellington *et al.* 1996). Cette glycoprotéine semble intervenir à la fois dans les processus d'entrée dans la cellule, d'enveloppement secondaire, de sortie des virions et de transmission d'une cellule à l'autre. Elle semble également jouer un rôle dans la virulence des souches (Sun *et al.* 1996; Smith *et al.* 2005). De récents travaux menés par Poelaert *et al.* (2019) suggèrent que cette glycoprotéine a, comme la gG, une activité de liaison des chimiokines (Poelaert *et al.* 2019a). L'interaction de cette glycoprotéine avec la gM est également suspectée, leurs délétions impactant sévèrement la culture virale (Rudolph and Osterrieder 2002).

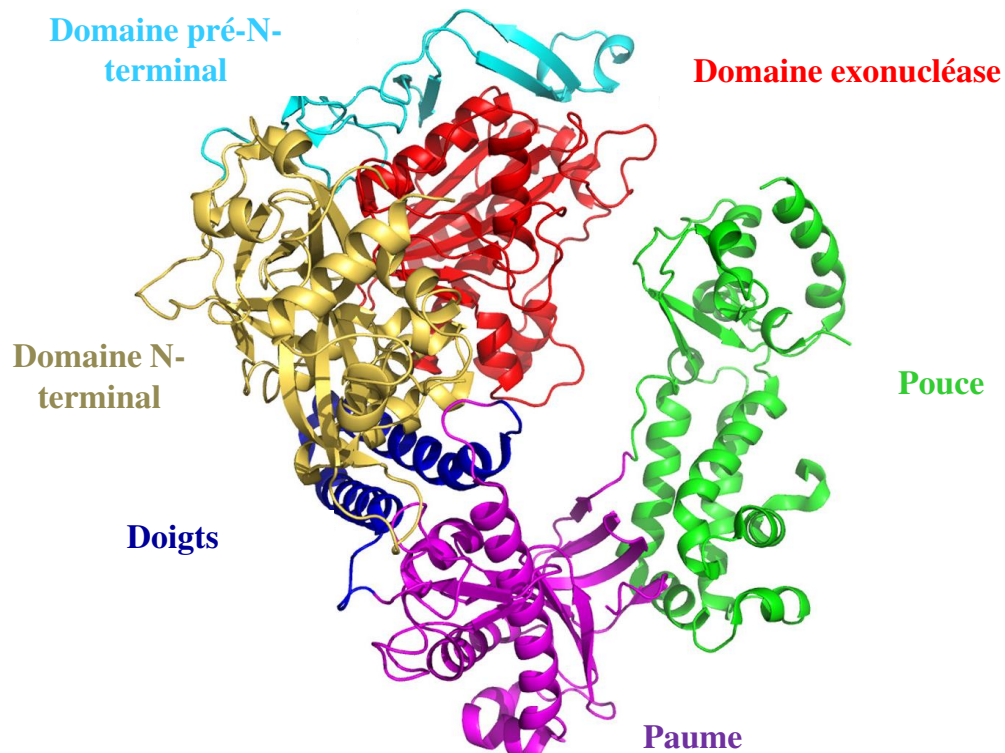
Tableau 3 Fonctions connues des 12 glycoprotéines présentes à la surface de l'EHV-1, inspiré d'Osterrieder & Van de Walle (2010). Les informations concernant le caractère immunogène de ces glycoprotéines sont issues des travaux de Mahmoud et al. (2013) (pour revue, Osterrieder and Van de Walle 2010; Mahmoud et al. 2013).

Glycoprotéine	Essentielle ou non au cycle viral	Rôle chez l'EHV-1	Cible de la réponse humorale
Glycoprotéine B	Oui	Entrée dans la cellule par fusion – Sortie des endosomes par fusion	Majeure
Glycoprotéine C	Non	Entrée dans la cellule	Majeure
Glycoprotéine D	Oui	Entrée dans la cellule – Sortie des endosomes	Oui
Glycoprotéine E	Non	Transmission des virions d'une cellule à l'autre Facteur probable de virulence	Oui
Glycoprotéine G	Non	Activité de liaison des chimiokines – rôle probable dans l'évasion immunitaire	Oui
Glycoprotéine H	Probable	Entrée dans la cellule – Sortie du noyau	Non connue
Glycoprotéine I	Non	Complexe avec la gE - Transmission des virions d'une cellule à l'autre – Facteur probable de virulence	Oui
Glycoprotéine K	Probable	Libération des virions – Transmission des virions d'une cellule à l'autre	Non connue
Glycoprotéine L	Probable	Complexe avec la gH	Non connue
Glycoprotéine M	Non	Rôle probable dans l'entrée et la sortie des virions dans la cellule	Oui – en complexe avec gN
Glycoprotéine N	Non	Complexe avec la gM	Oui – en complexe avec gM
Glycoprotéine gp2	Non	Rôle probable dans l'enveloppement secondaire, dans la sortie des virions et dans la transmission d'une cellule à l'autre – Possible facteur de virulence	Oui

ADN polymérase

L'ADN polymérase des herpèsvirus codée par l'ORF30 est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité de processivité, jouant un rôle clé dans le cycle lytique viral et plus particulièrement dans la réplication virale. Elle appartient à la famille B regroupant les polymérases eucaryotes α , β , ζ et ϵ , mais également des polymérases de fungi, plantes, bacteriophages ou autres virus. Les polymérases de cette famille sont

multifonctionnelles et peuvent lier d'autres protéines formant des complexes de plusieurs sous-unités, comme c'est le cas pour l'ADN polymérase de l'HSV-1 qui, en se liant à la protéine UL42 (facteur de processivité), va voir son activité de polymérisation de l'ADN augmentée (pour revue, Zarrouk, Piret and Boivin 2017). La structure de la sous-unité catalytique des ADN polymérases de cette famille a été assimilée à l'image d'une main, avec pour domaines une paume (domaine catalytique), des doigts (liaison des nucléotides à incorporer) et un pouce (liaison de l'ADN) (Figure 7) (Ollis *et al.* 1985; pour revue, Zarrouk, Piret and Boivin 2017). Un domaine N-terminal, un domaine exonucléase 3'-5' et un autre C-terminal ont également été identifiés. Sept régions ont également été identifiées comme étant conservées parmi les polymérases de cette famille (I à VII, allant de la plus conservée à la moins conservée) (Larder, Kemp and Darby 1987; pour revue, Zarrouk, Piret and Boivin 2017). Chez l'EHV-1, la sous-unité catalytique est une protéine de 1 220 acides aminés codée par l'ORF30 (3 663 pb). Elle a fait l'objet de nombreuses études, qui seront abordées par la suite, concernant l'association d'une mutation non silencieuse en position 2 254 de l'ORF30 (752 de la protéine) aux signes cliniques observés chez les animaux infectés (Nugent *et al.* 2006). La structure globale de l'ADN polymérase de l'EHV-1 étant peu étudiée, sa forte homologie avec l'HSV-1 a permis de situer cette mutation au niveau de la paume de la protéine, sans pour autant pouvoir évaluer l'impact de la mutation sur sa fonction (Goodman *et al.* 2007). Cette mutation a par ailleurs été montrée comme étant non essentielle à la culture *in vitro* (Ma, Lu and Osterrieder 2010). Des études, qui seront reprises plus en détail dans la partie expérimentale de ce manuscrit, ont néanmoins été menées sur l'impact de la mutation sur le comportement des souches *in vitro* (Gryspeardt *et al.* 2010; Ma, Lu and Osterrieder 2010; Vandekerckhove *et al.* 2010; Laval *et al.* 2017). Enfin, de par son rôle essentiel dans la réplication virale, cette protéine représente une cible potentielle pour des antiviraux.



ADN polymérase – UL30 de l'HSV-1

Figure 7 Représentation graphique en trois dimensions de l'ADN polymérase de l'HSV-1 issue des travaux de Zarrouk et al. (2017). Les domaines pré-N-terminal (bleu clair), N-terminal (beige), des doigts (bleu foncé), de la paume (violet) du pouce (vert) et le domaine exonucléase (rouge) sont représentés Figure tirée de la revue de Zarrouk, Piret and Boivin (2017).

d. Cycle viral

Le cycle viral de l'EHV-1 se divise en de nombreuses étapes qui sont l'attachement des virions à la surface des cellules, la fusion membranaire ou l'inclusion des virions dans le cytoplasme des cellules, la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme et son transport jusqu'au noyau pour y libérer l'ADN viral, la transcription et réplication du génome viral et enfin l'assemblage puis la libération des virions.

Attachement et entrée des virions (glycoprotéines B, C, G, H et L)

Comme pour de nombreux alphaherpèsvirus (dont l'HSV-1 et le virus de la maladie d'Aujeszky (PrV)), l'entrée des virions dans la cellule hôte serait gouvernée par cinq glycoprotéines d'enveloppe virale, qui sont la gC, la gB, la gD, et les gH et gL sous la forme d'un dimère. Le premier contact résulte de l'interaction entre la gC et les glycoprotéines

cellulaires. En effet, la membrane cellulaire porte à sa surface des protéines membranaires, des protéoglycanes auxquelles se lient des macromolécules appelées glycosaminoglycanes (GAGs). Ces GAGs sont de plusieurs natures, dont les sulfates d'héparane (SH) présents dans les tissus animaux. La glycoprotéine C des virions d'EHV-1 est capable de se lier à ces SH qui jouent alors un rôle de récepteurs de liaison et permettent ainsi un premier attachement des virions à la surface cellulaire (Osterrieder 1999). Il est intéressant de noter que pour l'EHV-1 comme pour l'HSV-1, ce premier attachement n'est cependant pas essentiel à l'entrée du virus dans la cellule puisqu'une inactivation de la gC n'entraîne pas une inactivation du virus mais résulte seulement en une diminution de son pouvoir infectieux (Osterrieder 1999; pour revue, Spear 2004). Quoiqu'il en soit, cette interaction gC-SH va faciliter l'interaction de la gD de manière cette fois déterminante avec un récepteur d'entrée. Plusieurs types de récepteurs liés par la gD (« herpesvirus entry mediator » (HVEM)) ont été décrits chez les alphaherpèsvirus tels que les récepteurs de type Hve A, membres de la famille de récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TNF) (chez l'HSV-1 et l'HSV-2); les HveB, membres de la famille des immunoglobulines (variant Rid1 d'HSV-1, HSV-2 et PrV); les HveC également membres de la famille des immunoglobulines (HSV-1, HSV-2, PrV, BoHV-1) et une forme modifiée de sulfate d'héparane appelé sulfate d'héparane 3-O-sulfaté (HSV-1) (Geraghty *et al.* 1998; Frampton *et al.* 2005; Azab and Osterrieder 2012). Il a été montré que l'EHV-1 est capable d'infecter les cellules portant ces récepteurs. Cependant, il semblerait que la gD de l'EHV-1 soit également capable de se fixer à un récepteur qui lui est propre mais non identifié (Frampton *et al.* 2005), ainsi qu'avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) équin de classe I, présent notamment au niveau des cellules endothéliales du système nerveux central (Kurtz *et al.* 2010; Sasaki *et al.* 2011). La liaison de la gD à son récepteur entraîne un changement de conformation de ce dernier permettant l'interaction du complexe avec les glycoprotéines H et L formant un dimère, provoquant la dissociation de la gL (Figure 8). Cette dissociation est probablement à l'origine de l'activation du pouvoir fusogène de la gB (pour revue, Azab and Osterrieder 2017). Concernant cette dernière, les connaissances sur les récepteurs auxquels cette glycoprotéine se lie sont plus maigres et requièrent encore quelques investigations (Sato *et al.* 2008; Arii *et al.* 2010; Atanasiu *et al.* 2010; Suenaga *et al.* 2010). L'ensemble des interactions {glycoprotéines-récepteurs} vont ensuite permettre l'entrée du virion dans la cellule mais également l'activation de cascades de signalisation modulant le cytosquelette cellulaire et préparant la membrane cellulaire à la fusion ou l'enveloppement du virus.

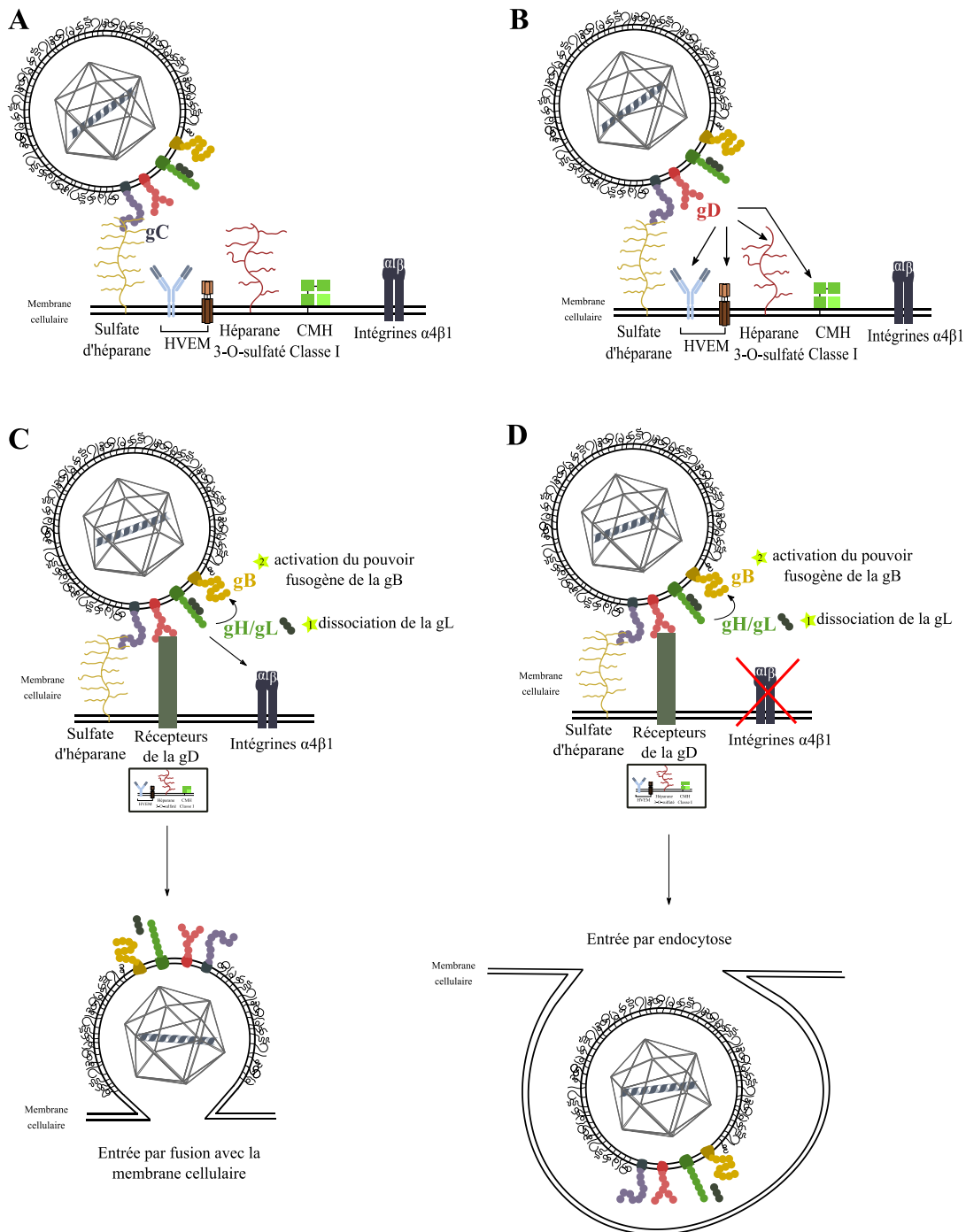


Figure 8 Schématisation de l'entrée de l'EHV-1 dans une cellule cible. Liaison non-essentielle de la gC aux sulfates d'héparane présents sur la membrane cellulaire (A) facilitant la liaison de la gD à des récepteurs spécifiques (B). Interaction du complexe « gD/récepteur » avec le complexe dimérique gH/gL entraînant la libération de la gL et l'activation du pouvoir fusogène de la gB (C et D). L'internalisation par fusion ou par endocytose pourrait être déterminée par l'interaction de la gH avec les intégrines $\alpha 4\beta 1$ si elles sont présentes à la surface cellulaire. Figure inspirée de la revue publiée par Azab & Osterrieder (2017).

Fusion membranaire

Deux modes d'entrée ont été décrits pour les alphaherpèsvirus, le premier par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et le second par endocytose (internalisation). Bien que mieux décrits pour l'HSV-1, ces deux différents modes d'entrée ont pu être observés pour l'EHV-1 (Frampton *et al.* 2007) et sont schématisés Figure 8.

Concernant la fusion, suite à l'intervention de la gD, de la gB et du complexe gH/gL, la fusion du virion avec la membrane cellulaire va entraîner une libération du tégument et des protéines qu'il comporte mais aussi de la nucléocapside dans le cytoplasme (Van de Walle *et al.* 2008). Concernant les HSV il semblerait que le complexe gH/gL, activé par son interaction avec la gD et son récepteur, soit nécessaire pour activer ou réguler le pouvoir fusogène de la gB (Agelidis and Shukla 2015). La gB est par ailleurs indispensable à la fusion du virion avec la membrane cellulaire. Chez d'autres alphaherpèsvirus (HSV-1, VZV), il a été montré que cette glycoprotéine était capable de lier d'autres récepteurs facilitant la fusion du virion avec la membrane cellulaire sans que le mécanisme ne soit clairement élucidé (Agelidis and Shukla 2015). Ces récepteurs n'ont pas été décrits pour l'EHV-1, en revanche l'entrée par fusion a pu être observée pour les fibroblastes de peau équine (E.Derm) et les cellules de rein de lapin (RK13) (Frampton *et al.* 2007).

Le phénomène d'endocytose a notamment pu être observé *in vitro* pour l'EHV-1 sur plusieurs lignées cellulaires telles que les cellules fibroblastiques LM de souris, les cellules Chinese Hamster Ovary (CHO), les cellules endothéliales micro-vasculaires de cerveau équines (EBMEC), ou encore les cellules mononuclées sanguines périphériques (PBMCs) (Abodeely, Lawson and Randall 1970; Frampton *et al.* 2007; Van de Walle *et al.* 2008; Hasebe *et al.* 2009). Il ne semble pas que ce mode d'entrée soit dépendant de l'interaction de la gD avec un récepteur comme il l'a été montré pour l'HSV-1, ni qu'il implique les mécanismes d'endocytose classiques (endocytose clathrine-dépendante, cavéole, etc.). En revanche, selon une étude menée par Van de Walle *et al.* (2008), l'internalisation par endocytose de l'EHV-1 pourrait résulter d'une interaction entre des intégrines αV , qui sont des hétérodimères membranaires cellulaires, et le motif Arg-Ser-Asp (RSD) présent au niveau de la gD (Van de Walle *et al.* 2008). Des études similaires portant sur l'HSV-1 ont mis en évidence une possible interaction entre le motif Arg-Gly-Asp (RGD) de la gH mais seulement pour un type cellulaire (Agelidis and Shukla 2015, 2015). Il semblerait également que la gD soit nécessaire à l'internalisation de l'HSV-1 sans que le motif n'ait pu être identifié.

L'interaction de la gD avec un récepteur et de la gB avec le complexe gH/gL sont en revanche nécessaires pour libérer la nucléocapside de l'endosome devenu acide dans le cytoplasme, comme lors de la fusion, sans quoi l'endosome subit une dégradation lysosomale (Nicola and Straus 2004). Comme nous le verrons par la suite, il est possible que cette libération se fasse à proximité du noyau cellulaire (Frampton *et al.* 2010).

Les paramètres déterminants une entrée par endocytose ou par fusion ne sont pas encore clairement définis. Une étude menée par Azab *et al.* en 2013, suggère sur le modèle de cellules épithéliales, que l'interaction de la gH avec les intégrines $\alpha 4\beta 1$ présentes à la surface cellulaire ainsi qu'un autre facteur viral non connu, est déterminante sur le mode d'entrée par fusion (si l'interaction a lieu) ou par endocytose (si l'interaction n'a pas lieu) (Azab, Lehmann and Osterrieder 2013). L'internalisation par endocytose serait rapide tout comme la fusion mais il est possible qu'elle dépende du type cellulaire (selon les récepteurs présents à la surface des cellules cibles), ou encore d'un pH basique. En effet, il a été montré pour différents virus tels que l'HSV-1, l'EBV, l'HHV-8 et même l'EHV-1 qu'ils étaient capables d'infecter certains types cellulaires par fusion, d'autres par endocytose et cela parfois dépendamment ou indépendamment du pH (Miller and Hutt-Fletcher 1992; Akula *et al.* 2003; Nicola and Straus 2004; Nicola *et al.* 2005; Hasebe *et al.* 2006; pour revue, Hutt-Fletcher 2007; Van de Walle *et al.* 2008).

D'autres glycoprotéines pourraient avoir un rôle dans l'entrée du virus dans la cellule sans que leur fonction exacte ne soit connue. En effet, des virus EHV-1 portant une délétion de la gM montrent une cinétique de pénétration dans des cellules complémentées en gM plus lente que des virus non mutés (Osterrieder *et al.* 1996). De même, il semble que la délétion du gène de la gp2 résulte entre autre en l'altération de l'adsorption des virus et possiblement leur pénétration (Sun *et al.* 1996).

Transport des virions jusqu'au noyau cellulaire

Une fois internalisés, les virus « désenveloppés » vont avoir recours à des microtubules cellulaires polarisés et constitués de dimères d' α et β tubuline pour traverser le cytosquelette et atteindre le noyau cellulaire. Les virus vont être transportés le long de ces microtubules grâce à la dynéine chargée négativement et qualifiée de moteur des microtubules (Figure 9) (Frampton *et al.* 2010). Dans leur étude Frampton *et al.* (2010) proposent deux scénarios. Le premier, direct, implique le transport de la nucléocapside accolée de protéines du tégument par la dynéine le long des microtubules. Le second, indirect, implique le

transport d'endosomes renfermant le virus le long des microtubules par la dynéine et leur libération à proximité du noyau cellulaire. Il semblerait également que ce transport soit rendu possible grâce à des voies de signalisation elles-mêmes activées par le virus, telles que l'acétylation de la tubuline permettant une stabilisation des microtubules, ou encore l'induction de la kinase cellulaire « Rho associated coiled-coil kinase 1 » (ROCK1). Il a en effet été montré que son inhibition affecte le transport des EHV-1 vers le noyau cellulaire (Frampton *et al.* 2007, 2010). L'ensemble des mécanismes activés et permettant le transport de l'EHV-1 vers le noyau reste encore mal connu.

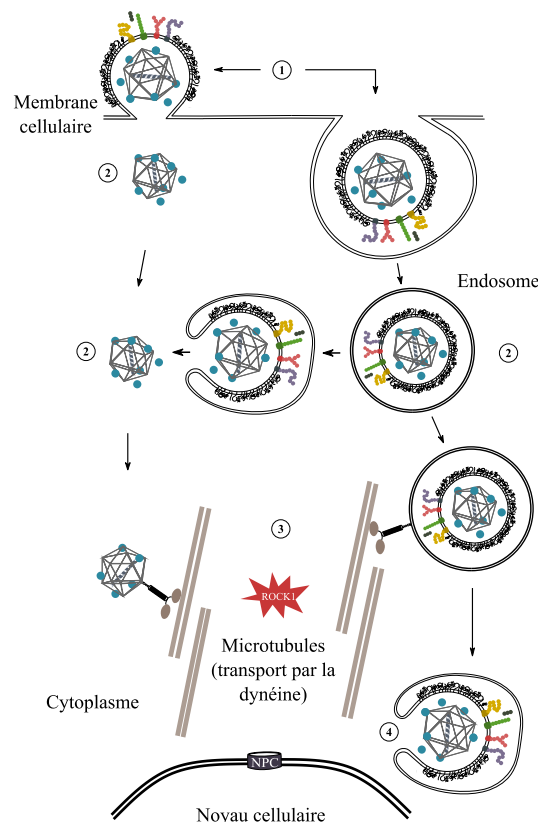


Figure 9 Schématisation du transport des particules virales ou des capsides tégmentées vers le noyau cellulaire par la dynéine, le long des microtubules cellulaires. (1) Entrée du virus par fusion ou endocytose. (2) Libération ou non de la nucléocapside et de protéines du tégment. (3) Transport de la nucléocapside accompagnée de protéines du tégment, ou d'endosomes contenant le virus, le long des microtubules cellulaires vers le noyau cellulaire, à l'aide de la dynéine. Ce transport est facilité, entre autre, par la « Rho associated coiled-coil kinase 1 » (ROCK1) dont l'activation est induite par l'entrée du virus dans la cellule. (4) Dans le cas de transport d'endosomes, la libération de la nucléocapside et de protéines du tégment, se fait à l'arrivée vers le noyau cellulaire. Figure inspirée de la revue de Paillot *et al.* (2008).

Libération, transcription et réplication du génome viral

La libération du génome viral dans le noyau cellulaire est très peu décrite en ce qui concerne les herpesvirus. Une récente étude suggère cependant que l'ADN, empaqueté et sous pression dans la capsid fixée au niveau complexes de pores nucléaires (Nuclear pore complex NPC), serait éjecté dans le nucléoplasme par relâchement de cette surpression (Figure 10) (Brandariz-Nuñez *et al.* 2019). L'attachement de la capsid au NPC n'a pas été décrite chez l'EHV-1 mais pour ce qui est de l'HSV-1, il semble que ce processus implique la protéine de tégument UL36 ainsi que les nucléoporines Nup358 et Nup214 liant la capsid de manière directe ou indirecte, et ce, sous l'influence de l'importine β (Ojala *et al.* 2000; Copeland, Newcomb and Brown 2009; pour revue, Kukhanova, Korovina and Kochetkov 2014; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019). Une fois le matériel génétique libéré dans le noyau cellulaire, la capsid reste dans le cytoplasme tandis que la machinerie transcriptionnelle se met en route (Tognon *et al.* 1981).

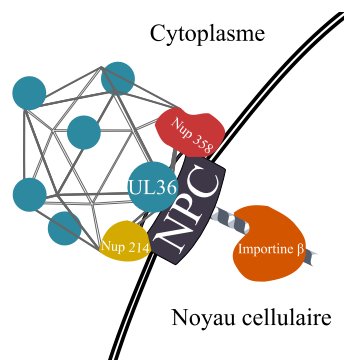


Figure 10 Libération de l'ADN viral à l'intérieur du noyau cellulaire, au niveau d'un NPC. Lors de cette étape, des protéines du tégument qui seront nécessaires à la réplication virale vont également être libérées dans le noyau. Figure inspirée de la revue de Paillot *et al.* (2008).

Comme une réaction en chaîne, la transcription du génome va se faire en plusieurs étapes successives (Figure 11). En ce qui concerne l'HSV-1, l'architecture de ce dernier va être modifiée à l'entrée du génome dans le noyau cellulaire. Des compartiments de réplication virale vont se former (Viral Replication Compartments : VRC), la chromatine cellulaire va être écartée, le réseau fibreux composant la *lamina* va être modifié ainsi que la morphologie du noyau (Simpson-Holley *et al.* 2005; Callé *et al.* 2008). Comme décrit précédemment, le génome viral est divisé en trois types de gènes IE (α), E (β) et L (γ) transcrits successivement, les premiers étant essentiels à la transcription des seconds eux-mêmes essentiels à la transcription des derniers (Honess and Roizman 1974).

Il n'existe qu'un seul gène IE (α) qui est activé par un régulateur transcriptionnel. Chez l'HSV-1 cet activateur est la protéine du tégument VP16 également désignée comme α trans-inducing factor (α -TIF) (Campbell, Palfreyman and Preston 1984; Lewis, Thompson and Caughman 1993; pour revue, Roizman and Zhou 2015). Des homologues de ce régulateur ont été identifiés chez plusieurs herpesvirus (VZV, BoHV-1, PrV) montrant des différences de structure, de propriétés et de domaines d'activation de la transcription (Carpenter and Misra 1992; Moriuchi *et al.* 1993; Fuchs *et al.* 2002a). En ce qui concerne l'EHV-1, ce régulateur correspond à la protéine du tégument VP16-E ou ETIF décrite précédemment. Cette protéine, entrée au niveau du noyau cellulaire va former un complexe avec deux protéines cellulaires, Oct1 et « Host cell factor ». Il est possible que le mécanisme de l'EHV-1 diffère de celui de l'HSV-1, il semblerait que ce complexe à l'aide d'autres facteurs soit à l'origine de la dé-répression et de l'initiation de la transcription du gène IE (α) (pour revue, Roizman and Zhou 2015). Le gène IE (α), transcrit par l'ARN polymérase II de la cellule hôte (comme tous les autres gènes viraux), correspond à l'ORF64 (4 461 pb) présent dans les deux régions inversées répétées du génome de l'EHV-1 (Grundy, Baumann and O'Callaghani 1989; Garko-Buczynski *et al.* 1998). Il permet la synthèse de deux protéines qui figurent parmi les sept protéines régulatrices connues. La première et principale est désignée sous le nom de Immediate Early Protein (IEP). Il s'agit d'une phosphoprotéine de 1 487 acides aminés ayant un rôle activateur de la transcription des gènes E (β) et L (γ), mais également répresseur de son propre promoteur et du gène L de la gK (Smith, Caughman and O'Callaghan 1992; Kim, Bowles and O'callaghan 1999; Bowles, Kim and O'Callaghan 2000). La transcription des gènes E (β) initiée par l'IEP va permettre la synthèse de protéines essentielles à la réplication du génome viral (Gray *et al.* 1987a; Smith, Caughman and O'Callaghan 1992; Bowles, Kim and O'Callaghan 2000). Une seconde protéine tronquée de l'IEP et codée par une séquence incluse dans l'ORF64 est l'IR2 (Harty and O'Callaghan 1991). Cette protéine, également régulatrice de la transcription, ne possède pas les domaines de trans-activation lui permettant d'activer les gènes E (β) et L (γ) mais peut en revanche réprimer l'expression de l'ORF64 et donc la synthèse de l'IEP (Smith, Zhao and O'Callaghan 1994; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019).

Parmi les protéines codées par les gènes E (β), quatre semblent essentielles à la régulation de la transcription de l'EHV-1. L'une d'entre elles, l'« EHV-1 Infected Cell Protein 0 » (EICP0) codée par l'ORF63, semble pouvoir trans-activer l'ensemble des promoteurs des gènes IE (α), E (β) et plus particulièrement L (γ) notamment grâce à son

domaine riche en cystéine aussi appelé « RING finger ». Cette protéine et l'IEP sont antagonistes sans que le mécanisme de cette interférence ne soit connu (Bowles, Kim and O'Callaghan 2000; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019). Deux autres protéines EICP22 et EICP27 codées par les gènes E (β) (ORF5 pour EICP27) vont permettre en synergie avec l'IEP la trans-activation des gènes E (β) et L (γ) (Bowles, Kim and O'Callaghan 2000; pour revue, Slater 2014; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019). Concernant les autres gènes E (β), ils sont pour leur part impliqués dans la réplication du génome viral. Chez l'HSV-1, six protéines (issues des gènes UL5, UL8, UL9, UL29, UL30, UL42, et UL52) vont alors intervenir pour séparer les brins de la structure hélicoïdale de l'ADN au niveau des origines de réplication Ori S et Ori L, fixer l'ADN simple brin et dénouer l'ADN puis permettre à l'ADN polymérase de se fixer. Pour ce virus, il a été décrit que d'autres protéines cellulaires sont également recrutées telles que l'ADN ligase, la topoisomérase II et d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ou la recombinaison (Hammarsten, Yao and Elias 1996; Muylaert and Elias 2007; pour revue, Weller and Coen 2012). La réplication se déroule sur des brins d'ADN viraux circularisés. Il a été suggéré que les extrémités du génome de l'EHV-1 étaient complémentaires permettant au génome de se circulariser. Les ADN circulaires produits seraient probablement clivés par la suite, conditionnant l'assemblage des virions (Chowdhury *et al.* 1990).

Chez les herpèsvirus, les protéines codées par les gènes L (γ) sont principalement des protéines de structure des virions. La régulation de leur expression est moins bien connue que celle des gènes IE (α) et E (β) mais il semble qu'elle soit dépendante de la réplication virale comme cela a été montré pour l'HSV-1 par exemple (Dennis and Smiley 1984; pour revue, Gruffat, Marchione and Manet 2016). Les gènes L (γ) sont divisés en deux catégories, γ_1 et les γ_2 , la première étant transcrite de manière décalée par rapport aux gènes E (β) mais avant la réplication virale alors que la seconde ne semble être transcrite qu'une fois la réplication du génome aboutie (pour revue, Gruffat, Marchione and Manet 2016).

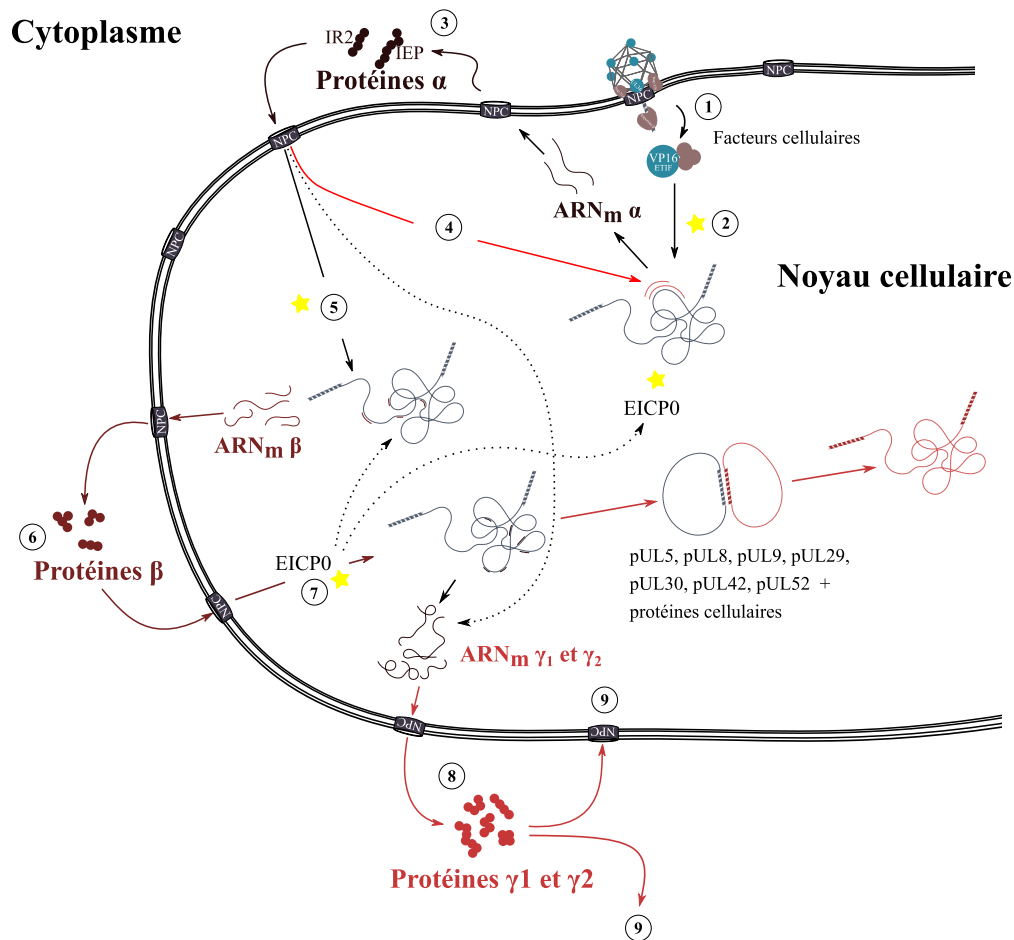


Figure 11 Schématisation de la transcription et de la réplication virale de l'EHV-1 au sein du noyau cellulaire. (1) Entrée de la nucléocapside accompagnée de protéines du tégment (dont VP16-E) dans le noyau cellulaire. (2) Dérégulation du gène IE (α) par la protéine VP16-E couplée à des facteurs cellulaires, et activation de sa transcription. (3) Traduction de la protéine IE (α) en deux peptides de tailles différentes. (4) Répression du gène IE (α). (5) Activation de la transcription des gènes E (β). (6) Traduction des protéines E (β). (7) Activation de la transcription des gènes L (γ) et de la réplication du génome. (8) Traduction des protéines L (γ). (9) Assemblage et sortie des virions. Figure inspirée de la revue de Paillot et al. (2008)

Assemblage et libération des virions

Chez les herpèsvirus, l'assemblage des virions débute par celui des capsides au sein même du noyau cellulaire (Figure 12). La construction de procapsides vides d'ADN viral se fait à l'aide d'un échafaudage protéique, comme c'est le cas chez l'HSV-1 pour lequel la protéine échafaud pUL26.5 et la protéase pUL26 permettent l'assemblage de protéines pUL19 (VP5; protéine majeure constituant les pentons et les hexons formant la structure de la capside), pUL18 et pUL38 (protéines reliant les capsomères entre eux, pour revue, Mettenleiter, Klupp and Granzow 2009). L'ensemble de ces protéines en nombre forment

ainsi la procapside. La protéine pUL6 est également intégrée et forme un pore permettant l'inclusion et la libération du génome viral. La procapside a alors la même dimension que la future capside mature. L'ADN viral est clivé et encapsidé sous la régulation d'une terminase constituée des protéines sous-unitaires pUL15, pUL38 et pUL32 localisées à la surface des capsides immatures. L'encapsidation se fait *via* le pore formé par la protéine pUL6 et entraîne alors le clivage des protéines échafaud par la protéine pUL26 et leur libération (Newcomb, Homa and Brown 2005; Huffman *et al.* 2008; pour revue, Mettenleiter, Klupp and Granzow 2009). Deux autres protéines pUL17 et pUL25 (la première étant requise à la liaison de la seconde à la nucléocapside) ont également été identifiées comme associées à la capside et jouant probablement un rôle de stabilisation de la structure icosahédrique (Thurlow *et al.* 2006; pour revue, Mettenleiter, Klupp and Granzow 2009; Snijder *et al.* 2017). A ce stade, la nucléocapside, sous sa forme icosahédrique, est prête à quitter le noyau cellulaire. La suite de l'assemblage se fait en plusieurs étapes. Les différentes étapes de la réplication virale sont très compartimentées par des mécanismes peu connus. Il semble cependant que les capsides vont se déplacer au sein du noyau cellulaire à l'aide de filaments d'actine pour bourgeonner avec la membrane interne du noyau, c'est l'enveloppement primaire (Forest, Barnard and Baines 2005; Feierbach *et al.* 2006; pour revue, Mettenleiter, Klupp and Granzow 2009). Ce phénomène est probablement régulé par les protéines conservées pUL31 et pUL34 sans lesquelles la sortie du noyau des herpèsvirus est limitée. Il est d'ailleurs possible que la pUL31 fasse partie de l'enveloppe primaire et que la pUL34 fasse partie du tégument primaire du virion. Bien que non connus, il est possible que d'autres composants interviennent dans la formation de ces virions primaires (Reynolds *et al.* 2001; pour revue, Mettenleiter 2002). Le complexe pUL31-pUL34 également appelé « Nuclear egress complex » (NEC) intervient dans la rupture du complexe laminaire nucléaire libérant la voie et permettant à la nucléocapside de se rapprocher de la membrane nucléaire interne (phosphorylation des lamines A, B et C par des kinases cellulaires et virales) (Fuchs *et al.* 2002b; Reynolds, Liang and Baines 2004; pour revue, Mettenleiter, Klupp and Granzow 2009; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019). Le virion primaire, localisé au niveau de l'espace périnucléaire, va fusionner cette fois avec la membrane externe du noyau, sans que le mécanisme ne soit bien connu. Lors de cette étape, il a été suggéré que le virion perd son enveloppe et son tégument primaire (dé-enveloppement) (pour revue, Mettenleiter 2002; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019). D'autres voies complémentaires de sortie des nucléocapsides d'herpèsvirus ont également été proposées comme la rupture de l'enveloppe

nucléaire ou la sortie par les pores nucléaires (Hofemeister and O'Hare 2008; Grimm *et al.* 2012; pour revue, Lv *et al.* 2019).

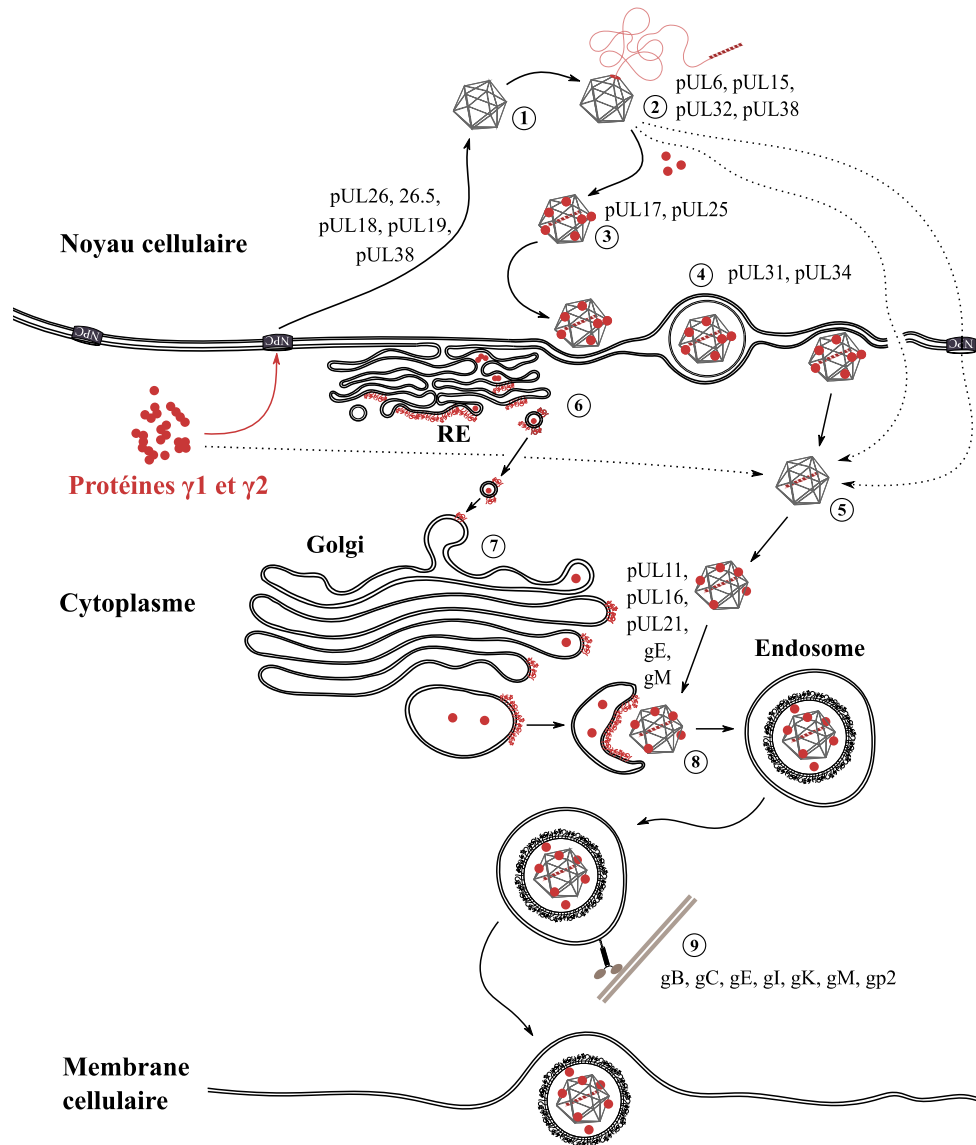


Figure 12 Schématisation de l'assemblage des nouveaux virions et de leur libération/transmission hors de la cellule. (1) Assemblage de la capsid. (2) Encapsidation du génome. (3) Assemblage du tégument primaire à la nucléocapside. (4) Enveloppement primaire par fusion avec la membrane nucléaire interne et formation du virion primaire. (5) Dé-enveloppement par fusion avec la membrane nucléaire externe et libération des nucléocapsides. Sortie possible des nucléocapsides assemblées par rupture de la membrane nucléaire ou au niveau des NPC. (6) et (7) Accumulation de protéines virales au niveau du Reticulum Endoplasmique (RE) puis au niveau de l'appareil de Golgi aboutissant à la formation d'endosomes précoces. (8) Internalisation et tégumentation des nucléocapsides. (9) Transport, le long de microtubules des vésicules contenant les virions assemblés, jusque la membrane cellulaire et libération des virions matures par fusion. Figure inspirée de la revue de Paillot *et al.* (2008).

L'enveloppement/dé-enveloppement est associé à une compression du réticulum endoplasmique sous la régulation de la protéine pUL34 accumulant ainsi des protéines cellulaires au niveau de la membrane nucléaire sans que ce phénomène n'ait pu encore être élucidé (Maeda *et al.* 2017; pour revue, Lv *et al.* 2019). Les nucléocapsides libérées dans le cytoplasme vont quant à elles subir une étape d'enveloppement secondaire. Il est possible que l'ensemble des protéines virales structurales s'accumulent et s'incorporent (pour les glycoprotéines) dans la membrane d'organites tels que l'appareil trans-Golgi ou des endosomes précoces, qui en internalisant les nucléocapsides permettent la tégumentation et l'enveloppement des virions. L'assemblage des virions à partir de la nucléocapside se fait grâce à une fine interaction protéines-protéines, comme c'est le cas des protéines pUL11, pUL16 et pUL21 associées à la partie extra-membranaire de la gE (Han *et al.* 2012; pour revue, Lv *et al.* 2019). Par ailleurs, la protéine pUL11 ainsi que la glycoprotéine M pourraient être impliquées dans le recrutement des protéines d'enveloppe et des glycoprotéines au niveau du site d'enveloppement (Leege *et al.* 2009; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019). Les vésicules contenant les virions assemblés vont ensuite être transportées vers la membrane plasmique cellulaire le long de microtubules pour fusionner avec cette dernière et permettre la libération des virions matures. Il semble que plusieurs glycoprotéines (gB, gC, gE, gI, gK, gM, gp2 pour l'EHV-1) soient impliquées dans les étapes d'enveloppement secondaire et de libération des virions ou encore de transmission de cellule à cellule, mais de manière non essentielle (Wellington *et al.* 1996; Neubauer *et al.* 1997; Matsumura *et al.* 1998; Osterrieder 1999; Csellner *et al.* 2000; Rudolph and Osterrieder 2002; Neubauer and Osterrieder 2004; Guggemoos, Just and Neubauer 2006; Selvaraj 2019)

L'ensemble des étapes du cycle viral de l'EHV-1 décrites dans cette partie sont récapitulées en Figure 13.

Ses caractéristiques structurales et fonctionnelles vont permettre à l'EHV-1 d'infecter son hôte provoquant un ensemble de réponses physiologiques symptomatiques ou non. Nous décrirons donc dans le chapitre suivant, l'effet du virus sur l'organisme de son hôte ainsi que son mode de transmission.

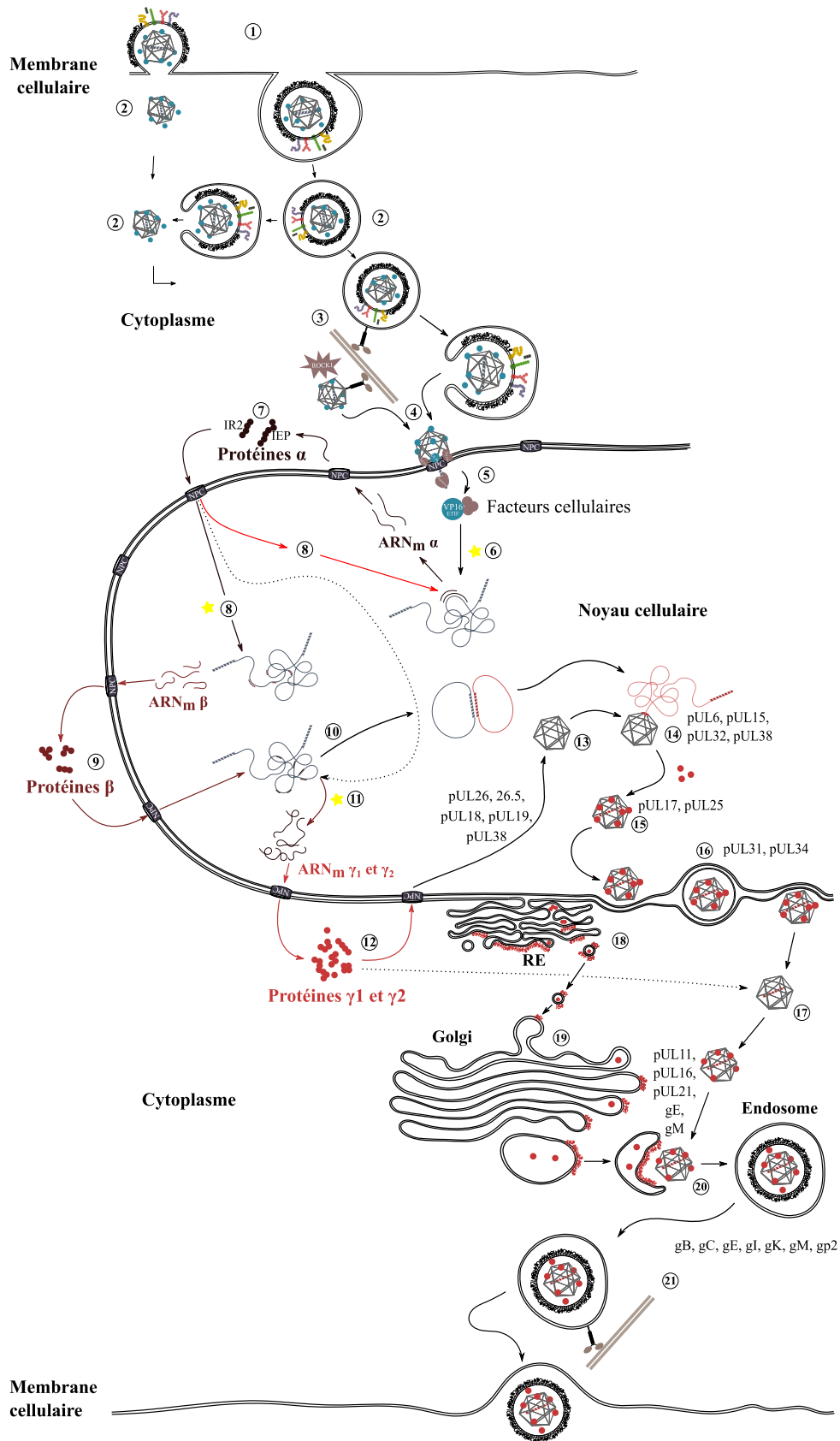


Figure 13 Schéma récapitulatif du cycle viral de l'EHV-1. Les différentes étapes décrites précédemment sont numérotées de 1 à 21. Figure inspirée de la revue de Paillot et al. (2008).

C. Pathogénicité de l'EHV-1

L'EHV-1 et l'EHV-4 sont omniprésents au sein de la population équine mondiale, avec une estimation à 80 % de chevaux infectés avant l'âge de deux ans par l'un de ces deux virus (Allen 2002; Lunn *et al.* 2009). L'Islande est considérée comme seul pays indemne d'EHV-1 (Porsteinsdóttir 2020). La première infection a lieu dans les premiers mois de vie des chevaux qui pourront être sujets tout au long de leur vie à des épisodes de réactivation ou de réinfection. Bien que très souvent asymptomatiques chez les chevaux adultes en bonne forme physique, les infections par l'EHV-1 peuvent engendrer des signes cliniques de plusieurs formes et d'intensité variable. Dans la majorité des cas, ces signes se manifestent sous la forme d'une maladie respiratoire. Mais l'infection peut également atteindre d'autres sphères de l'organisme tel que l'appareil reproducteur entraînant des avortements, la naissance de poulains malades ou une altération de la reproduction pour les étalons. Le système nerveux peut également être impacté par le virus entraînant des signes nerveux compromettant parfois la survie de l'animal. Enfin, des signes oculaires ont également pu être observés. De nombreuses études expérimentales montrent des variabilités dans l'intensité et la durée des signes cliniques observés (Gibson *et al.* 1992b; Hannant *et al.* 1993; Kydd *et al.* 1994a; Smith, Mumford and Lakhani 1996; Smith *et al.* 2000). Bien qu'encore mal connus, les facteurs déterminant l'étendue et l'intensité de ces signes sont probablement l'état du système immunitaire de l'hôte, sa forme physique mais également le pouvoir infectieux de la souche ou encore l'apparition ou non d'une infection bactérienne secondaire. Il semblerait que les chevaux ayant déjà pu mettre en place une réponse immunitaire par infection ou par vaccination, développent des signes cliniques moins sévères et sur une durée plus courte (Kydd, Wattrang and Hannant 2003).

a. Virémie et tropisme cellulaire

Le premier site d'infection de l'EHV-1 chez les chevaux après inhalation de particules virales est le tractus respiratoire supérieur (Figure 14). Le premier cycle de réplication de l'EHV-1 a ainsi lieu au niveau des cellules de l'épithélium de la muqueuse respiratoire (Kydd *et al.* 1994a). L'infection de ces cellules est à l'origine de lésions érosives et inflammatoires de l'épithélium résultant en un jetage séreux contenant des particules virales. Basé sur de récentes études, un modèle théorique décrivant l'installation de la virémie a été décrit en 2019 par Poelaert *et al.* L'équipe suggère qu'à la suite de la première réplication virale au niveau des cellules épithéliales du système respiratoire supérieur, les virions vont se propager au sein

de l'épithélium respiratoire et entrainer le recrutement de monocytes et de lymphocytes T au niveau du site d'infection. Les monocytes extravasés des vaisseaux sanguins vont être infectés par des virions libres et vont activer ainsi les lymphocytes T présents au niveau du site d'infection ou des nœuds lymphatiques avoisinants. Ces lymphocytes T vont être à leur tour infectés par contact cellulaire ou par des virions libres. Les monocytes et lymphocytes T infectés rejoignent la circulation sanguine et lymphatique et sont transportés vers les cellules épithéliales des organes cibles auxquelles ils transmettent les nouveaux virions (van Der Meulen *et al.* 2000; van der Meulen, Nauwynck and Pensaert 2001; Gryspeerdt *et al.* 2010; Laval, Favoreel and Nauwynck 2015; Laval *et al.* 2016; Poelaert *et al.* 2019b). La virémie est alors cellulaire, c'est-à-dire que ce sont des cellules infectées qui circulent dans le sang et non des particules virales libres (Figure 14). Le virus se propage par contact entre les leucocytes et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des organes cibles (Kydd *et al.* 1994b). L'expression mythologique du cheval de Troie est parfois utilisée pour caractériser cette virémie cellulaire *via* les lymphocytes et monocytes (aussi appelés cellules mononuclées périphériques du sang ou PBMC) qui vont ainsi permettre à l'EHV-1 de se propager dans l'organisme en échappant au système immunitaire de l'hôte (Laval, Favoreel and Nauwynck 2015). Le virus a pu être détecté au niveau des nœuds lymphatiques submandibulaires drainant le tractus respiratoire de chevaux infectés dès 12h post infection (Patel, Edington and Mumford 1982; Kydd *et al.* 1994b; Slater *et al.* 1994; pour revue, Paillot *et al.* 2008; Allen). Plusieurs natures de leucocytes infectés par l'EHV-1 ont été identifiées à ce jour, mais leur proportion n'est pas clairement définie. Les cellules dendritiques CD172a+ issues de monocytes ont été identifiées au niveau de l'épithélium respiratoire supérieur comme les principales cellules transportant l'EHV-1 vers les tissus profonds et les circulations lymphatique et sanguine. Cette manière discrète de passer la membrane basale, caractéristique de l'EHV-1 a été décrite sur des modèles d'explants respiratoires muqueux (Vandekerckhove *et al.* 2010). Une hypothèse serait qu'au sein de ces cellules, l'EHV-1 régule et ralentit son cycle de réplication pour le reprendre une fois les organes cibles atteints (Gryspeerdt *et al.* 2010; Vandekerckhove *et al.* 2010; Laval, Favoreel and Nauwynck 2015; Poelaert *et al.* 2019b). Les lymphocytes CD4+ et CD8+ ont également été identifiés parmi la population de PBMC infectés par l'EHV-1, mais également les lymphocytes B (Gryspeerdt *et al.* 2010; Wilsterman *et al.* 2011; Baghi and Nauwynck 2014).

La virémie cellulaire va permettre la propagation du virus au niveau des nœuds lymphatiques ainsi que l'infection de l'endothélium vasculaire au niveau d'autres tissus tels

que les cavités nasales, les poumons, l'uvée, l'endomètre ou encore le système nerveux central. Cette infection va parfois entraîner une thrombose et induire différentes formes cliniques dites secondaires. Les mécanismes du phénomène de thrombose ne sont pas bien connus mais il a été suggéré que les avortements et myéloencéphalopathies causées par l'EHV-1 (« Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy » : EHM) pourraient être accentués par une activité pro-coagulante activée par l'expression de facteurs tissulaires, par les monocytes infectés par l'EHV-1 (Yeo, Osterrieder and Stokol 2013; Stokol *et al.* 2015; Wilson *et al.* 2019).

L'atteinte du système nerveux central (SNC) se caractérise par une infection de l'endothélium des vaisseaux sanguins au niveau du cerveau et de la moelle épinière. A ce niveau, l'infection peut entraîner une thrombose puis une ischémie à l'origine de la nécrose des artérioles, artères et veines du SNC induisant parfois un œdème péri-vasculaire et une hémorragie au niveau des tissus neuronaux (Figure 14) (Little and Thorsen 1976; Jackson *et al.* 1977; Edington, Bridges and Patel 1986; pour revue, Wilson 1997; Stierstorfer *et al.* 2002; Allen *et al.* 2004; pour revue, Borchers, Thein and Sterner-Kock 2006). En fonction de leur ampleur et des tissus neuronaux atteints, ces lésions seront à l'origine de troubles nerveux plus ou moins graves, comme décrits précédemment.

Dans le cas d'une atteinte de l'utérus de juments gestantes, l'infection de l'endothélium vasculaire au niveau de l'endomètre utérin (possiblement sous l'influence de molécules d'adhésion) (Smith *et al.* 2000; Smith and Borchers 2001) va entraîner une inflammation, provoquant ainsi une thrombose et une ischémie s'étendant aux microcotylédons et provoquant leur nécrose (Jackson *et al.* 1977; Edington, Smyth and Griffiths 1991; Smith *et al.* 1993; Smith and Borchers 2001; Allen *et al.* 2004; pour revue, Paillot *et al.* 2008). En fonction de l'étendue des lésions, plusieurs cas de figure semblent possibles. Dans le cas de lésions majeures provoquant la nécrose des microcotylédons, la mort par anoxie du poulain ainsi qu'une séparation entre le placenta et l'endomètre aboutissent à l'expulsion soudaine du poulain mort (Figure 14). Le virus ne sera alors pas détecté dans le placenta ou au niveau des organes du poulain (Smith *et al.* 1992, 1993; Walker *et al.* 1999; Smith and Borchers 2001). Dans le cas de lésions plus faibles, l'infection peut être transmise au fœtus sans détachement du placenta et provoquer l'avortement d'un fœtus infecté vivant ou non (en fonction du stade de la gestation notamment) avec cette fois une détection possible au niveau du placenta et/ou des organes du fœtus ou dans les sécrétions nasales (Dixon *et al.*

1978; Murray *et al.* 1998; Gardiner *et al.* 2012). La possibilité de détecter le virus seulement au niveau du placenta a conduit les experts à recommander l'envoi du placenta et des organes du fœtus pour réaliser le diagnostic (Smith *et al.* 2004; Léon *et al.* 2008). Plusieurs facteurs encore peu décrits semblent intervenir dans l'étendue des lésions et la susceptibilité des juments à avorter. Lors d'une expérimentation animale, un groupe de juments gestantes s'est avéré plus susceptible de développer des signes nerveux suite à une infection par l'EHV-1 qu'un groupe de juments non gestantes, évoquant une possible immunosuppression hormono-dépendante (Jackson *et al.* 1977). Cette immunosuppression exposerait de la même manière l'endomètre des juments gestantes à l'infection, même si d'autres mécanismes entrent en jeu puisque les lésions de l'endomètre et les avortements sont plus fréquemment observés en fin de gestation qu'en début de gestation (Smith, Mumford and Lakhani 1996; Léon *et al.* 2008). Un autre phénomène a également été reporté et pourrait contribuer à expliquer l'absence de détection virale au niveau du placenta et des organes du fœtus. Il s'agit de la répression de la réplication virale (faible expression des gènes E et L) au niveau de trophoblastes de juments gestantes infectées (Mukaiya *et al.* 2000; Smith and Borchers 2001; Kimura 2004).

Ainsi en terme de tropisme cellulaire, l'EHV-1 semble infecter préférentiellement les cellules épithéliales du tractus respiratoire lors des premiers cycles de réplication, puis les monocytes CD172a⁺ et les lymphocytes T qui seront les principaux transporteurs du virus au sein de l'organisme, puis les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, en périphérie d'organes tels que l'utérus, le système nerveux ou autour de la rétine. Comme souligné par Osterrieder *et al.* (2010) dans leur revue, il est intéressant de noter que l'EHV-4, qui n'engendre que rarement des avortements, infecte plus difficilement les PBMCs que l'EHV-1. Une variation de résidu en position 152 de la gD impliquée dans l'entrée du virus dans les PBMCs pourrait expliquer cette différence de tropisme. Sur cette observation, les auteurs ont d'ailleurs suggéré que l'EHV-9 était susceptible d'avoir le même tropisme pour les PBMCs que l'EHV-1 (pour revue, Osterrieder and Van de Walle 2010).

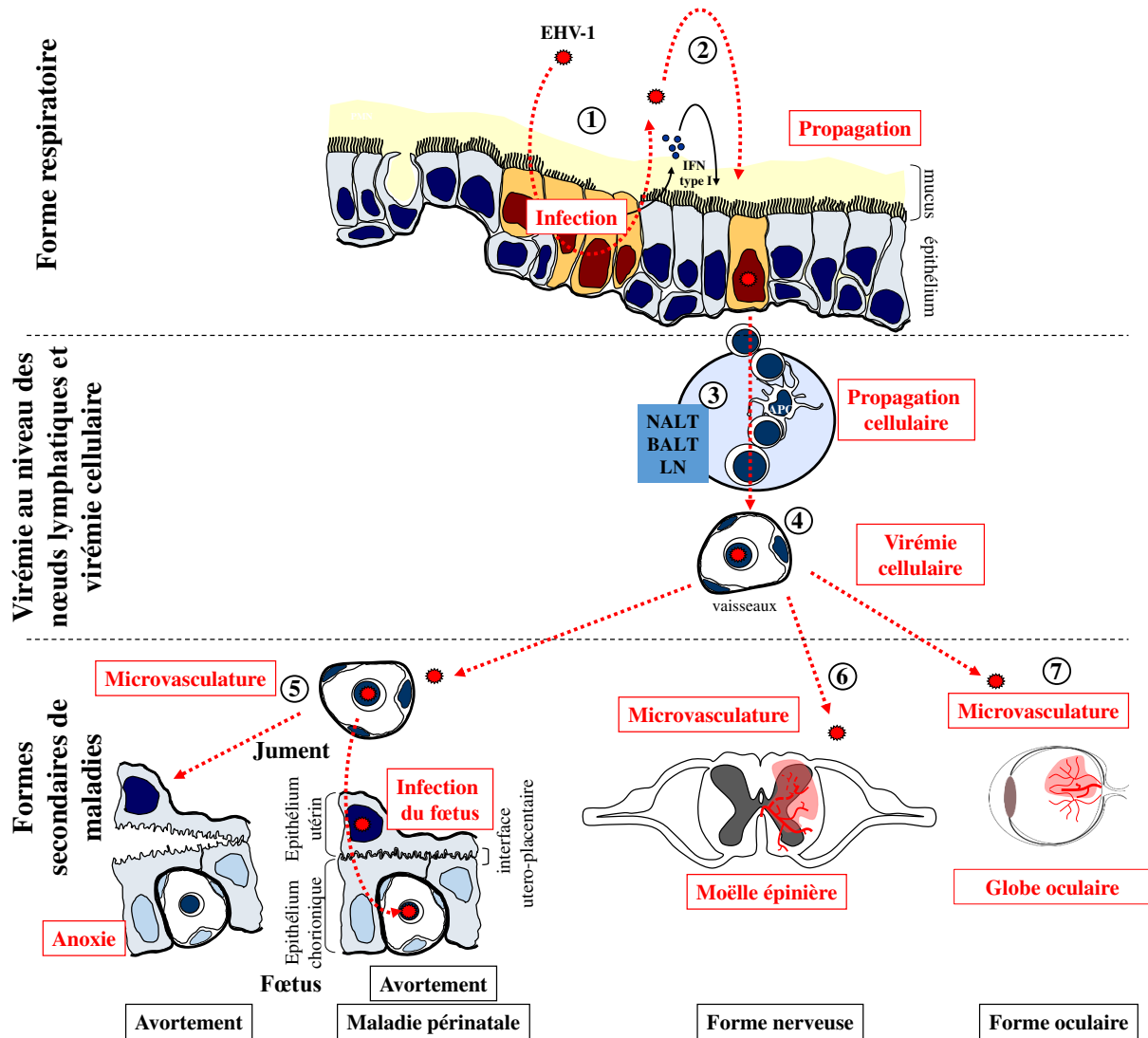


Figure 14 Schématisation du premier cycle d'infection de l'EHV-1 au niveau de l'épithélium respiratoire provoquant la maladie respiratoire et l'installation de la virémie cellulaire à l'origine des formes secondaires de la maladie comme l'avortement et la forme nerveuse. (1) Infection initiale et libération de virions. (2) Dissémination au niveau de l'épithélium respiratoire. (3) Recrutement de monocytes (tout particulièrement les cellules dendritiques CD172a+ issues de monocytes) et de lymphocytes T au niveau du site d'infection. (4) Installation de la virémie cellulaire et dissémination de l'EHV-1 dans l'organisme par l'intermédiaire des leucocytes infectés. (5) Infection des vaisseaux sanguins périphériques de l'utérus de la jument provoquant la mort du fœtus par anoxie, ou encore la séparation du placenta de l'endomètre, ou encore l'infection du fœtus, aboutissant à un avortement ou la naissance d'un poulain infecté. (6) Infection des vaisseaux sanguins périphériques du système nerveux central provoquant des atteintes nerveuses. (7) Infection des vaisseaux sanguins périphériques de la rétine provoquant des lésions oculaires. Figure inspirée la revue de Paillot et al. (2008) et de Hue et al. (2017).

b. Signes cliniques*Forme respiratoire*

La forme respiratoire de la maladie (rhinopharyngite ou trachéobronchite) est la forme la plus couramment observée (Figure 15). Elle se caractérise par de la fièvre (pyrexie) en premier lieu. Cette dernière, parfois qualifiée comme bi-phasique est généralement observée lors des premiers jours post-infection lors d'expérimentations animales avec un second pic quelques jours plus tard. La fièvre est suivie par un jetage nasal et oculaire séreux à partir duquel le virus est excrété. Ce jetage peut évoluer en jetage muco-purulent témoignant alors d'une surinfection bactérienne. Une augmentation du volume des ganglions submandibulaires et parfois rétropharyngés s'installe également dans les premiers jours post-infection. Enfin, une toux sporadique peut-être observée mais reste mineure (Gibson *et al.* 1992b; Hannant *et al.* 1993; Smith *et al.* 1993; Kydd *et al.* 1994b, 1994a; Tearle *et al.* 1996; Sutton *et al.* 1998; Allen 2002).

Forme abortive

La forme abortive peut se manifester par un avortement soudain de juments infectées (Figure 15). Cet avortement a lieu majoritairement en fin de gestation (8^e-11^e mois), avec des cas plus rares en début de gestation, observés sur le terrain et en expérimentation animale (Schulman *et al.* 2013; Walter *et al.* 2013). En fin de gestation, l'avortement se manifeste par l'expulsion rapide d'un poulain mort par asphyxie ; mais en fonction de la sévérité de l'infection et du stade de la gestation, des naissances de poulains vivants mais atteints ont pu être observées (van Maanen *et al.* 2000; Allen *et al.* 2004; Damiani *et al.* 2014; Stasiak, Dunowska and Rola 2020). Il a effectivement été suggéré que l'issue dépend du moment de l'infection lors de la gestation. Egalement, selon le stade de l'infection, certains poulains meurent dans les heures suivant leur naissance, certains présentent des signes respiratoires dans les jours suivant la naissance et succombent parfois à des infections bactériennes secondaires, alors que d'autres survivent mais présentent des signes respiratoires chroniques (Dixon *et al.* 1978; Murray *et al.* 1998; Damiani *et al.* 2014; Stasiak, Dunowska and Rola 2020). Les cas d'avortements sont généralement isolés mais des épisodes d'avortements groupés sont parfois observés (communément appelés « abortion storms ») pouvant toucher jusqu'à 75 % des juments gestantes d'un effectif (van Maanen *et al.* 2000; Allen *et al.* 2004; Damiani *et al.* 2014). Ces « abortions storms » sont cependant plus rares depuis la mise en place de la vaccination.

Forme Nerveuse

La forme nerveuse de la maladie est également désignée sous le nom de « Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy » (EHM) ou myéloencéphalopathie (Figure 15). D'intensité variable selon l'étendue de l'infection, elle se manifeste 6 à 10 jours après l'infection du tractus respiratoire supérieur et se caractérise par des signes cliniques allant de l'ataxie légère, la faiblesse des membres et le chancellement à la paralysie en position couchée aboutissant souvent à l'euthanasie de l'animal (pour revue, Wilson 1997; Stierstorfer *et al.* 2002; Studdert *et al.* 2003; Allen *et al.* 2004; Henninger *et al.* 2007; pour revue, Paillet *et al.* 2008; Maanen *et al.* 2010; pour revue, Pusterla and Hussey 2014). Lors d'épisodes infectieux, il est estimé que 10 à 40 % des chevaux affectés sont susceptibles de développer la forme nerveuse de la maladie, les juments étant les plus touchées (Lunn *et al.* 2009; pour revue, Pusterla and Hussey 2014; Zarski *et al.* 2021). L'âge et le statut immunitaire des chevaux sont deux autres paramètres pouvant influencer l'apparition de la maladie (Doll and Bryans 1963; Allen 2008).

Forme Oculaire

La maladie oculaire est caractérisée par l'apparition de lésions au niveau des vaisseaux sanguins oculaires affectant plus ou moins la rétine (Figure 15). Ces lésions observées dans 50 à 90 % des infections expérimentales n'entraînent pas systématiquement de signes cliniques. Lorsqu'ils sont observés, les signes cliniques se caractérisent par une uvéite, une chorioretinite voire une perte de la vision (Slater *et al.* 1992; Whitwell and Blunden 1992; Hussey *et al.* 2013).

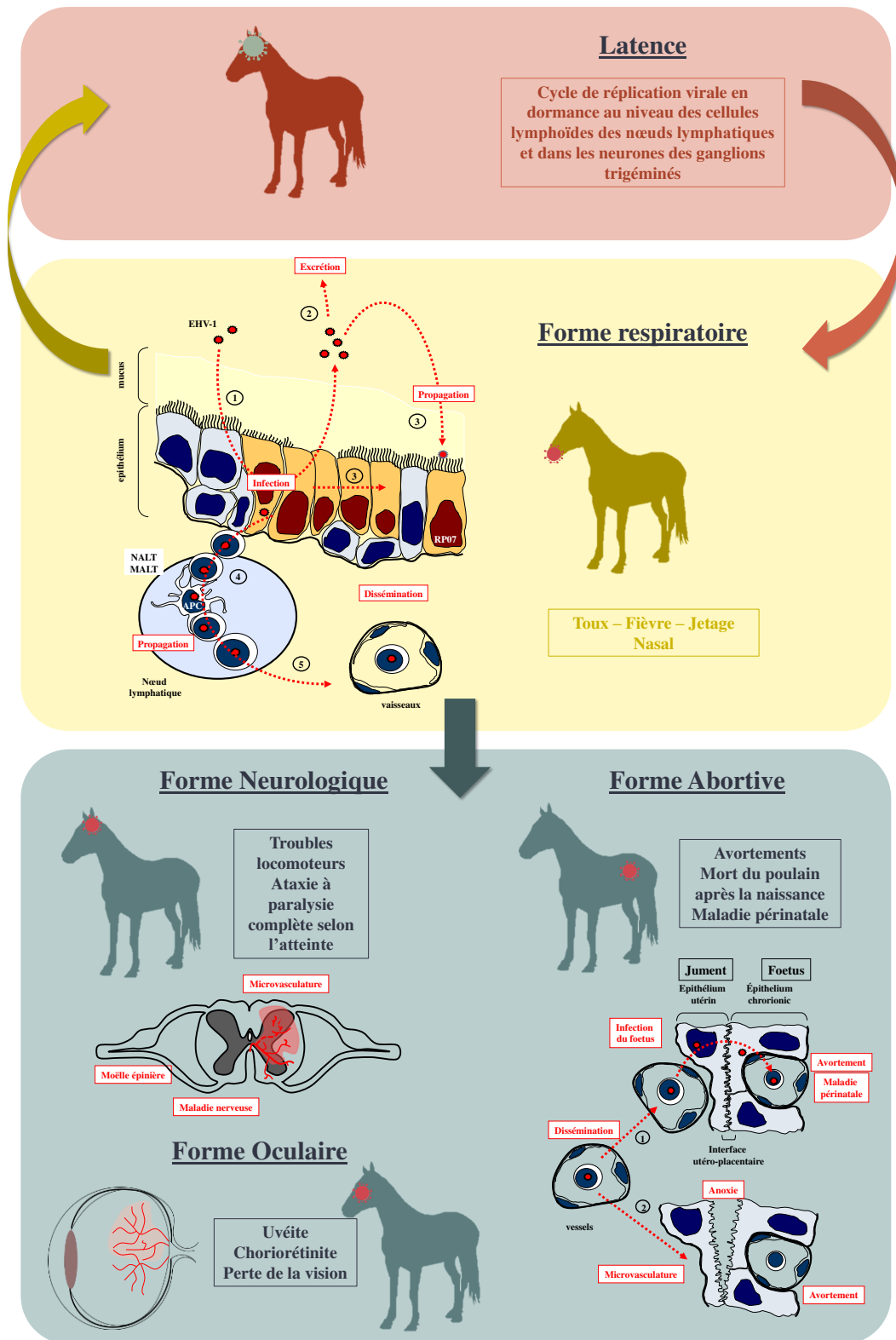


Figure 15 Schéma récapitulatif des signes cliniques pouvant être observés chez les chevaux lors d'une infection par l'EHV-1, en association avec l'installation de la virémie, puis de la latence qui sera décrite plus en détail par la suite. Le virus pourra alors se réactiver tout au long de la vie de l'animal. Utilisation de schémas produits par Romain Paillot, (Paillot et al. 2008).

c. Latence

La latence est la stratégie de persistance commune à tous les herpesvirus. De manière globale, elle se caractérise par le maintien d'un petit nombre de copies de génome viral circulaire dans le noyau de cellules spécifiques ainsi que par une transcription limitée de ces copies de génome (pour revue, Stevens 1994). Le maintien du génome viral permet une réactivation du virus vers un état lytique suite à un stimulus, et ce, tout au long de la vie de l'hôte. Durant la phase de latence, l'hôte n'excrète pas de virus ni ne manifeste de signe clinique. Chaque famille de virus va établir sa latence dans un type cellulaire spécifique (pour revue, Penkert and Kalejta 2011; pour revue, Koyuncu, MacGibeny and Enquist 2018). Les bêtaherpesvirus et les gammaherpesvirus établissent leur latence au niveau des cellules souches hématopoïétiques et des lymphocytes B respectivement, tandis que les alphaherpesvirus établissent leur latence au niveau des neurones. Alors que la « mise en route » du cycle lytique du virus dépend du transport vers le noyau à la fois du génome mais de protéines du tégment essentielles à l'activation de la transcription (protéine VP16-E pour l'EHV-1), il a été suggéré que la latence des alphaherpesvirus pourrait se mettre en place lorsque seul le génome viral est libéré au niveau du noyau. Cette situation est particulièrement plausible au niveau des neurones où le nombre de moteurs cellulaires de dynéine (permettant le transport de la nucléocapside et des protéines du tégment le long des microtubules) est limité. Dans les cas de figure où seul le génome est libéré dans le noyau, ce dernier sera circularisé et mis sous silence avec la transcription de petites régions du génome seulement, désignées sous le nom de « latent associated transcripts » (LATs) (Kubat *et al.* 2004; pour revue, Koyuncu, MacGibeny and Enquist 2018). Cette stratégie profite à la fois au virus comme moyen de persistance, mais également à l'hôte dont les cellules neuronales ne se renouvellent pas, les rendant particulièrement vulnérables aux infections lytiques. Dans le cas de l'EHV-1, la latence a été mise en évidence au niveau des cellules lymphoïdes des nœuds lymphatiques (submandibulaires notamment) et dans les neurones des ganglions trigéminalés (Slater *et al.* 1994; Baxi *et al.* 1995; Chesters *et al.* 1997; Smith *et al.* 1998; Taouji *et al.* 2002; Allen *et al.* 2004; pour revue, Slater 2007; Pusterla, Mapes and Wilson 2010). Les lymphocytes T CD5+/CD8+ sont la principale population de cellules lymphoïdes permettant l'établissement de la latence pour l'EHV-1 (Smith *et al.* 1998).

Chez les chevaux, la réactivation de l'EHV-1 a pu être observée dans des situations de stress, notamment lors de déplacements ou de saillies, mais également à la suite d'un traitement à base de corticostéroïdes (Edington, Bridges and Huckle 1985). Les mécanismes

de réactivation ne sont pas bien connus. La protéine VP16-E identifiée comme activatrice de la réplication virale n'étant pas produite lors de la phase latente, il a été suggéré que la réactivation dépendrait plutôt du microenvironnement du site de latence. Par exemple, les gonadotrophines chorioniques équine (eCG), probablement libérées en grande quantité au niveau de l'endomètre durant la gestation, sont des acteurs de la réactivation de l'EHV-1 (Smith *et al.* 1998). Il n'est ainsi pas surprenant que des juments avortent plusieurs mois après avoir excrété du virus. L'interleukine 2 (IL-2) a également été identifiée comme facteur de réactivation. Cette cytokine est produite par les lymphocytes T auxiliaires (« helpers » Th) et parfois par les lymphocytes T CD8+. Elle intervient dans l'activation de l'immunité. Ces deux facteurs (eCG et IL-2) agissent de manière indépendante mais cibleraient probablement tous deux les récepteurs de monocytes entraînant la libération de médiateurs eux-mêmes responsables de la réactivation (Smith *et al.* 1998). Un autre acteur essentiel de la réactivation des alphaherpèsvirus est la thymidine kinase (TK) virale (ou cellulaire) (Slater *et al.* 1994; pour revue, Xie *et al.* 2019). La latence au niveau des ganglions trigémés va permettre au virus, à la suite de la réactivation, de rejoindre à nouveau les tissus respiratoires et d'être excrété puis transmis à d'autres individus (Slater *et al.* 1994).

d. Ecologie du virus

La transmission de l'EHV-1 a lieu par contact direct entre les chevaux (nasaux, placenta et fœtus infectés) ou indirects (matériel contaminé, personnel en contact avec des animaux infectés) (Allen *et al.* 2004; Lunn *et al.* 2009). Alors que la transmission semble se faire majoritairement par contact direct dans les élevages équine domestiques, des cas de franchissements de barrière d'espèce de l'EHV-1 ont été reportés chez des animaux en captivité n'ayant pas de contact direct entre eux (Wohlsein *et al.* 2011). Suite à ce constat, une étude a été menée en 2017 par Dayaram *et al.* pour évaluer la persistance de l'EHV-1 dans l'eau parfois partagée entre les espèces de zoo. Il a ainsi été mis en évidence que l'EHV-1 peut persister 7 à 21 jours dans l'eau selon les conditions (pH, turbidité, température) et qu'une température basse ainsi qu'un pH élevé favorise sa survie. Les eaux de sources alcalines sont alors un environnement propice à la persistance du virus. Il semble également que l'EHV-1 soit encore plus stable dans un environnement aquatique sédimenteux (Dayaram *et al.* 2017). L'influence des conditions météorologiques a également été étudiée montrant une bonne stabilité de l'EHV-1 dans un milieu humide et pluvieux, ce type de milieu favorisant les aérosols et la persistance du virus. Cette survie est améliorée à basse température, les mois d'été contribuant ainsi à stopper les épizooties (Bonassies 2019). Enfin,

une dernière étude menée par Saklou *et al.* (2020) a mis en évidence la persistance de virus infectieux jusque 48h sur des matériaux typiquement retrouvés dans l'étable, cette persistance étant également favorisée à basse température. Ce temps de persistance pourrait par ailleurs être sous-estimé, comme le soulignent les auteurs, puisque le milieu des sécrétions nasales qui n'a pas été reproduit pour cette étude pourrait protéger les particules virales et prolonger leur durée de vie sur les surfaces testées (Saklou *et al.* 2013, 2020).

Une hypothèse récente a été émise par des chercheurs suggérant qu'une recrudescence de franchissement de barrière d'espèce pour les animaux sauvages pourrait s'expliquer par un plus grand brassage des espèces autour de points d'eau pour s'abreuver notamment dans des zones où les points d'eau se font rares (Dayaram *et al.* 2021).

Lors d'une infection par l'EHV-1, la capacité de l'hôte à se défendre est l'un des facteurs déterminant l'impact de ce dernier sur l'organisme. Nous verrons donc dans le prochain chapitre quels sont les moyens de défense mis en place par l'hôte ainsi que les stratégies d'évasion du virus face à cette protection.

D. Réponse Immunitaire après infection par l'EHV-1

Chez les mammifères, la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures est désignée sous le terme d'immunité. La première réponse mise en place face à une agression quelle qu'elle soit est la réponse immunitaire innée ou réponse inflammatoire. En plus de constituer une première barrière de défense, elle va permettre le déclenchement d'une seconde réponse immunitaire, cette fois-ci spécifique de l'agent fauteur de trouble, qui prendra le relais si l'agression perdure et s'intensifie. Il s'agit de la réponse immunitaire adaptative qui gardera en mémoire l'antigène rencontré pour être déployée plus rapidement en cas de nouvelle agression. Les virus dans leur ensemble élaborent diverses stratégies de survie au sein de leur hôte. Pour l'EHV-1, les deux principales sont la latence, abordée précédemment, et la stratégie d'évasion de l'immunité, grâce à laquelle le virus sera capable d'être disséminé au sein de l'organisme lui permettant d'établir la latence. Nous décrirons donc ici, la mise en place de l'immunité chez l'hôte face à l'infection rusée de l'EHV-1 résultant d'une co-évolution avec l'hôte.

a. Immunité innée induite

La réponse immunitaire innée face à un agent infectieux consiste en une réponse constitutive (ex : le mucus au niveau des muqueuses du tractus respiratoire pour l'EHV-1) et une réponse induite activée par l'interaction de récepteurs du soi (PRR = « Pattern recognition receptor », de plusieurs natures) avec les molécules du non-soi (PAMP= « Pathogen associated molecule pattern », de plusieurs natures) présentes à la surface de l'agent infectieux. Cette réponse induite va alors impliquer la phagocytose de l'agent étranger par les macrophages, cellules dendritiques ou polynucléaires, et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, vasodilatatrices et anti-inflammatoires déclenchant ainsi la réaction inflammatoire (et le recrutement de cellules immunitaires et dendritiques pour l'activation de la réponse immunitaire adaptative). C'est à ce niveau que l'EHV-1 va débiter le détournement de la réponse immunitaire de son hôte. Les études portées sur des modèles cellulaires *in vitro* visant à étudier la régulation de la réponse immunitaire innée montrent parfois des résultats divergeants en comparaison aux études menées sur des modèles *in vivo*. Sur modèle cellulaire des cellules épithéliales respiratoires équine (ERECs) infecté par la souche Ab4, une stimulation de la réponse pro-inflammatoire a pu être observée par l'augmentation de l'expression des récepteurs « Toll-Like » (TLR)-3 et 9 (PRR), des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, Tumor Necrosis Factor(TNF)- α , Immune interferon

(IFN)- α et IL-6, IL-8 et IL-10), des « Monocyte Chemoattractant Proteins » (MCP)-1 (Soboll Hussey *et al.* 2014a, 2014b). L'infection de PBMCs par trois souches RaL11, NY03 et Ab4 a cette fois mis en évidence la stimulation des chimiokines à motif C-C ou C-X-C pro-inflammatoires CCL5, CXCL9 et CXCL10 (Wimer *et al.* 2011). En revanche, sur ces deux modèles cellulaires, une diminution de l'IFN- γ sur les cellules ERECs, un activateur des macrophages, et des chimiokines pro-inflammatoires CCL2 and CCL3 sur les PBMCs, a été observée *in vitro* (Wimer *et al.* 2011; Soboll Hussey *et al.* 2014a). Cette observation étant contradictoire avec de nombreuses précédentes études montrant à l'inverse une augmentation de IFN- γ chez des chevaux infectés, il a été suggéré que la sécrétion de cet interféron était cellule dépendante (Coombs *et al.* 2006; Soboll Hussey *et al.* 2014b; Huang, Ma and Osterrieder 2015). Plusieurs études *in vivo* (infections expérimentales avec la souche d'EHV-1 Ab4) ont pour leur part mis en évidence la sécrétion d'IFN- α dans les premières 24 à 48h post-infection dans les sécrétions nasales, suivie de chimiokines pro-inflammatoires telles que les CCL2 et CCL3, de la protéine CD14 soluble puis d'autres chimiokines telles que l'IL-10, l'IFN- γ , la CCL5 and la CCL11 (Schnabel *et al.* 2018, 2019; Wimer *et al.* 2018; Perkins *et al.* 2019, Larson & Wagner, communication personnelle). Il a été proposé que l'EHV-1 régule finement et stratégiquement les acteurs de la réponse immunitaire innée afin de favoriser sa future propagation au sein de l'organisme (amélioration du recrutement des monocytes tels que les CD172+ utiles pour le « transport » dans l'organisme par chimiotactisme et limitation du recrutement des macrophages) (Zhao *et al.* 2017). Les mécanismes de cette régulation ne sont pas encore bien connus, mais il semble par exemple que la gG, présente sous forme membranaire et soluble, a une activité de liaison des chimiokines (« viral chemokine binding protein », vCKBP), probablement de manière spécifique à différents types de chimiokines et perturberait ainsi le chimiotactisme (Bryant 2003; Van de Walle *et al.* 2007).

Tractus respiratoire supérieur

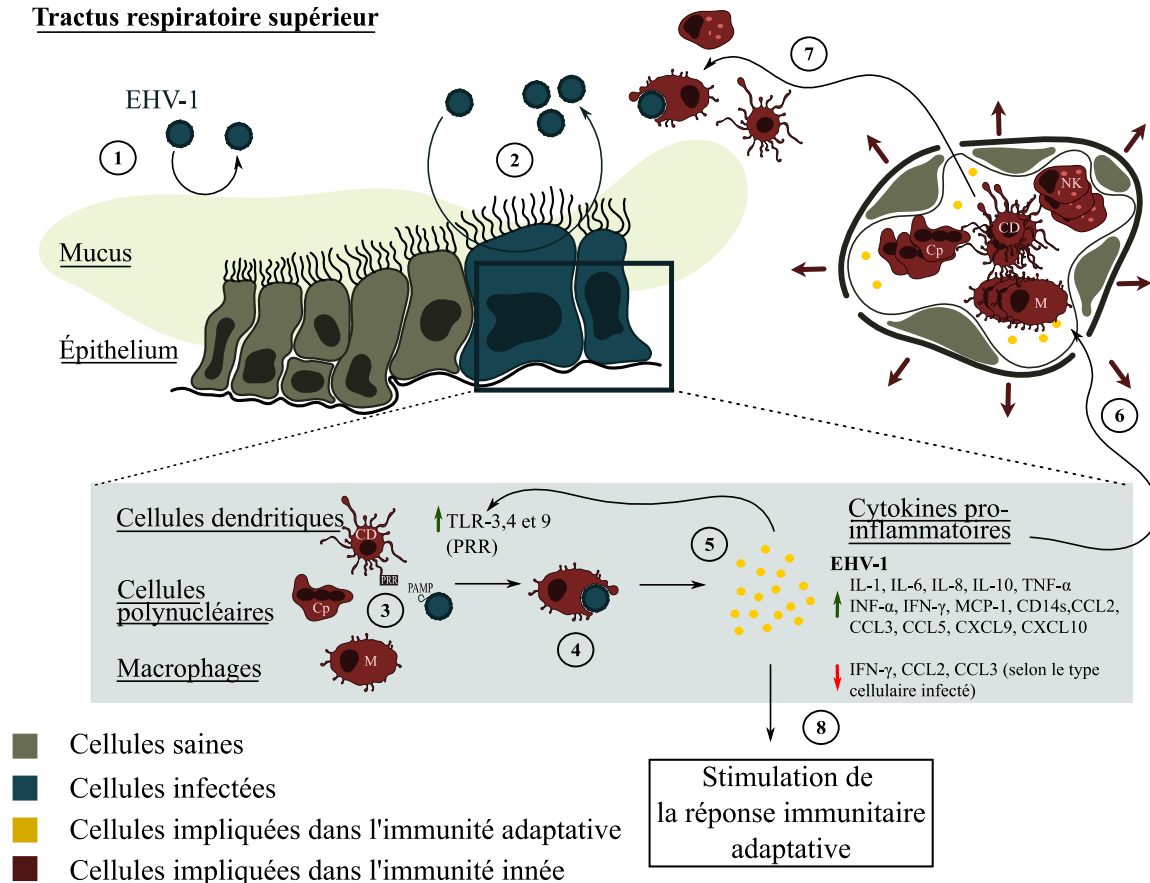


Figure 16 Schématisation de la mise en place de la réponse immunitaire innée lors d'une infection par l'EHV-1. (1) Le mucus de l'épithélium respiratoire fait partie des premières barrières protectrices contre les pathogènes respiratoires. (2) Lorsque l'EHV-1 parvient à infecter les cellules de l'épithélium respiratoire, les cellules de la réponse immunitaire innée vont reconnaître l'EHV-1 comme un élément du non soi (interaction PAMP-PRR) (3), phagocyter les particules virales (4) et induire la production de cytokines pro-inflammatoires et vasodilatatrices (5), (6) permettre le recrutement de nouvelles cellules de la réponse immunitaire innée (7), mais également l'activation de la réponse immunitaire adaptative (8). Figure inspirée de la revue de Paillot et al. (2008).

b. Immunité adaptative induite

L'immunité adaptative se divise en deux types de réponses : la réponse cellulaire spécifique et la réponse humorale spécifique (Figure 17). L'activation de la réponse cellulaire spécifique se fait grâce aux cellules présentatrices d'antigène (porteuses des complexes majeurs d'histocompatibilité CMH-I ou II, importants dans la présentation de peptides antigéniques) et en particulier les cellules dendritiques capables de migrer vers le site de l'inflammation suite au signal de cytokines. En effet, les CMH permettent l'activation des lymphocytes T immatures (réponse cellulaire spécifique) en lymphocytes CD4+ (CMH-II) ou

CD8+ (CMH-I). Les lymphocytes T activés permettront par la suite l'activation d'autres lymphocytes (T et B) ou l'élimination des cellules infectées portant l'antigène cible ou un CMH-II lié à un peptide antigénique. L'activation de la réponse humorale spécifique se fait par l'activation des lymphocytes B immatures par reconnaissance de l'antigène comme élément du non soi et suite à la mise en place de la réponse cellulaire. Les lymphocytes B produisent alors différentes catégories d'anticorps dans le but de neutraliser l'antigène, le « marquer » comme élément à phagocyter (opsonisation) ou encore activent le complément (ensemble protéique dont l'activation en cascade des composants permet au complexe d'assurer un rôle actif dans les réponses immunitaires innée et adaptative). La production d'anticorps de type IgM (d'une durée de vie de 3 mois) et IgG (d'une durée de vie d'environ 1 an) est observée dans les 4 à 15 jours et 14 à 21 jours, respectivement, suite à une première infection par l'EHV-1 (Hannant *et al.* 1993; Bannai *et al.* 2011; pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019). La production d'IgM sera moindre lors de ré-infections ou à la suite de rappels de vaccination (Gibson *et al.* 1992a). Des anticorps de type IgA spécifiques de l'EHV-1 ont également été mis en évidence au niveau de sécrétions nasales de chevaux infectés dans les 2 semaines post-infection, et ce, de manière prédominante et plus durable que les IgGa et IgGb produits localement et capables d'opsoniser les éléments à phagocyter mais aussi d'activer le complément. La durée de vie de ces IgA est courte (quelques semaines), mais augmente au fil des ré-infections (Breathnach *et al.* 2001; pour revue, Kydd, Townsend and Hannant 2006). Ces derniers, ainsi que les IgG(T) (pouvant bloquer l'action des IgGa et b) sont les principaux anticorps produits lors de la mise en place de la réponse immunitaire humorale chez les chevaux (Sheoran *et al.* 2000). Enfin, lors d'une récente étude, 15 chevaux infectés préalablement, ou non, avec la souche d'EHV-1 Ab4 ou un mutant de cette souche, ont ensuite été de nouveau infectés expérimentalement avec la souche Ab4. A l'issue de cette étude, les auteurs ont pu montrer une meilleure protection des chevaux préalablement infectés (par la souche ou son mutant) face à la deuxième infection expérimentale. Cette meilleure protection a pu être corrélée avec un niveau plus élevé d'anticorps de type Ig4/7 au niveau des sécrétions nasales que le groupe contrôle non préalablement infecté. Les auteurs ont alors suggéré que ces isotopes d'anticorps permettaient une neutralisation rapide des particules virales limitant leur cheminement au sein de l'organisme. Cette hypothèse, appuyée par l'absence d'INF- α au niveau du site d'infection et par une faible réponse inflammatoire chez les chevaux complètement protégés lors du challenge a également conduit les auteurs à suggérer qu'un niveau élevé d'anticorps IgG4/7 spécifiques de l'EHV-1 était gage d'une

bonne protection contre les formes abortive et nerveuse de maladie causées par ce virus (Perkins *et al.* 2019).

Virémie cellulaire et évasion de l'immunité :

La mise en place de l'immunité adaptative chez le cheval infecté par l'EHV-1 est, elle aussi, déjouée à différents niveaux par les différentes stratégies d'évasion du virus. Une première stratégie de l'EHV-1 est liée au type de transmission du virus de cellule à cellule. Il a été montré chez l'HSV-1 et le PrV, que lorsque les virions étaient libérés à l'extérieur de la cellule, cette sortie avait lieu préférentiellement au niveau de la partie basolatérale de la cellule, moins exposée aux anticorps (Johnson *et al.* 2001; pour revue, Favoreel *et al.* 2006). Dans ce même contexte, les vésicules extracellulaires parfois impliquées dans la transmission de virions d'une cellule infectée à une cellule non infectée pourraient protéger ces derniers des anticorps neutralisants par l'absence d'exposition des protéines virales, comme de premières études l'ont montré chez l'HSV-1 (pour revue, Bello-Morales and López-Guerrero 2018; Bello-Morales *et al.* 2018). Une seconde stratégie d'évasion de l'immunité est la virémie cellulaire par l'infection des PBMCs et plus particulièrement des monocytes (CD172a+), des lymphocytes T (CD8+ et CD4+) et des lymphocytes B au niveau du tractus respiratoire supérieur, permettant ainsi le transport du virus vers les organes cibles périphériques (Wilsterman *et al.* 2011; Poelaert *et al.* 2019b). Lors d'une étude expérimentale, il a été mis en évidence qu'il n'y avait pas d'expression de protéines virales à leur surface pour 98 % des PBMCs collectés durant la phase de virémie cellulaire, rendant ces protéines virales invisibles au système immunitaire (van der Meulen *et al.* 2006a). Durant cette virémie cellulaire, seules l'IEP et quelques protéines E ont pu être détectées suggérant que lors de cette phase, le cycle viral est ralenti et restreint à l'expression des premiers gènes de la cascade uniquement (Laval, Favoreel and Nauwynck 2015). De cette manière, les PBMCs infectés ne sont pas reconnus par les anticorps spécifiques de l'EHV-1 et les mécanismes immunitaires parallèles ne sont pas activés (comme l'activation du complément par exemple). Cette mise sous silence de l'expression des gènes viraux et par conséquent le ralentissement du cycle viral pourraient être liés à l'intervention d'histone déacétylases comme le suggère l'équipe de Laval *et al.* (Laval, Favoreel and Nauwynck 2015). Concernant les PBMCs exprimant des protéines virales à leur surface, il est probable que ces dernières contribuent à l'attachement des PBMCs à l'endothélium vasculaire permettant son infection par le virus (van der Meulen, Nauwynck and Pensaert 2003; van der Meulen *et al.* 2006a). Ainsi, une fois

la virémie cellulaire installée, ni la réponse humorale (cytotoxicité dépendante des anticorps) et ni les cellules « natural killers » (NK) ne sont efficaces pour protéger l'organisme de l'infection virale. En effet, deux tiers des PBMCs porteurs de protéines virales à leur surface survivraient en présence d'anticorps et de complément, soit en raison de la faible capacité du complément équin à lyser les cellules, soit car les protéines de surfaces virales interfèreraient avec les anticorps (ex gC) (pour revue, van der Meulen *et al.* 2006b). La protection de l'hôte reposera sur la réponse cellulaire, plus particulièrement sur les lymphocytes T cytotoxiques (LTc), également mise à mal par l'EHV-1 (pour revue, Paillot *et al.* 2008; pour revue, Oladunni, Horohov and Chambers 2019).

IFN γ et lymphocytes cytotoxiques :

Un marqueur de la réponse cellulaire est l'IFN- γ . Ce marqueur est produit en réponse à la présentation d'un antigène aux lymphocytes T naïfs. L'IFN- γ est un stimulateur de la réponse immunitaire innée (effet sur la régulation de la présentation des antigènes par les macrophages et cellules dendritiques) et de la réponse adaptative cellulaire (stimulation de la différenciation des lymphocytes B et des lymphocytes CD4+ en lymphocytes auxiliaires 1 (« T helpers 1 » ou Th1) qui stimulent les lymphocytes T cytotoxiques) (pour revue, Paillot *et al.* 2008). L'IFN- γ est alors produit en grande quantité par les lymphocytes de la voie Th1, les LTc CD8+ et les cellules NK. Il semble que la production d'IFN- γ en réponse à l'EHV-1 évolue avec l'âge chez les chevaux. Les cellules productrices d'IFN- γ chez les poulains et chevaux âgés d'un an sont en plus faible quantité que chez des chevaux plus âgés. Le type de cellules productrices d'IFN- γ semble également varier dans le temps, dépendamment des réinfections, réactivations et vaccinations qu'un individu peut subir tout au long de sa vie (pour revue, Paillot *et al.* 2008). Un niveau élevé de LTc spécifique de l'EHV-1 a été associé avec une bonne protection contre l'installation de la virémie. Il semble que ce niveau soit, comme pour l'IFN- γ , dépendant de l'âge de l'hôte et du nombre d'épisodes de réactivations, réinfections ou vaccination rencontrés qui permettraient de constituer un réservoir de LTc mémoires spécifiques de l'EHV-1 (Kydd, Watrang and Hannant 2003; Allen 2008; pour revue, Paillot *et al.* 2008). Ces LTc spécifiques de l'EHV-1 peuvent être détectés une semaine après une infection par le virus et peuvent atteindre leur niveau maximum après 3 semaines. Ils jouent un rôle majeur dans l'efficacité de la réponse immunitaire cellulaire contre l'EHV-1 (Allen *et al.* 1995; pour revue, Paillot *et al.* 2008).

Régulation de l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité:

Une troisième stratégie d'évasion de l'immunité de l'EHV-1 semble portée sur l'inhibition du transport de peptides antigéniques à la surface des cellules infectées, la sous-expression des CMH-I et CMH-II jouant un rôle essentiel dans la réponse immunitaire adaptative, ou encore la destruction des lymphocytes cytotoxiques (van der Meulen *et al.* 2006a, 2006b; Soboll Hussey *et al.* 2014a; Huang, Ma and Osterrieder 2015). La diminution de l'expression des CMH-I paraît surprenante du fait que ces molécules ont également été identifiées comme des récepteurs de la gD impliqués dans l'entrée du virus dans certains types cellulaires. Néanmoins, il a été suggéré que la sous-régulation des CMH-I dépendait également du type cellulaire (pas de diminution de l'expression des CMH-I dans les PBMCs par exemple, qui sont les cellules permettant l'installation de la virémie du virus) (van der Meulen, Nauwynck and Pensaert 2003; pour revue, van der Meulen *et al.* 2006b; Sasaki *et al.* 2011; Soboll Hussey *et al.* 2014b).

La régulation de ces mécanismes d'évasion de l'immunité est peu connue, mais il semble que la diminution de l'expression des CMH-I et l'inhibition du transport des peptides viraux à la surface des cellules (protéine de transport TAP inhibée) impliquent l'ORF10 homologue de l'UL49.5 chez l'HSV-1 et la protéine pUL56 (encodée par l'ORF1)(Koppers-Lalic *et al.* 2005; Ma *et al.* 2012; Soboll Hussey *et al.* 2014b). Certaines glycoprotéines de surfaces ont également montré un rôle dans l'évasion de l'immunité adaptative, comme c'est le cas de la glycoprotéine C, par exemple, qui interférerait avec la protéine C3 du complément perturbant ainsi la cascade d'activation de ce dernier (McNearney *et al.* 1987). Ou encore le complexe gE/gI qui, chez l'HSV-1 par exemple, semble capable de fixer la région Fc des immunoglobulines de l'hôte permettant leur internalisation et leur dégradation (Johnson *et al.* 1988; pour revue, Favoreel *et al.* 2006; Ndjamen *et al.* 2014).

Pour conclure, la réplication des herpèsvirus et l'immunité de leur hôte sont parfois décrites comme formant un équilibre sensible pouvant basculer en faveur de l'un ou de l'autre.

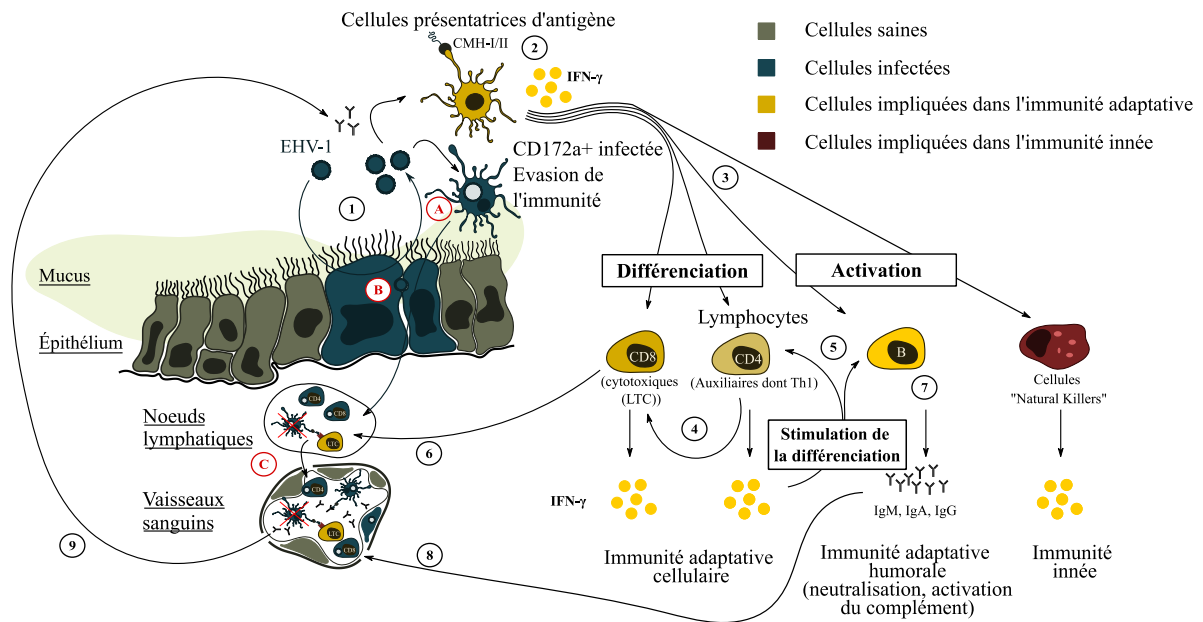


Figure 17 Schématisation de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative lors d'une infection par l'EHV-1. (1) Infection et réplication virale au niveau de l'épithélium respiratoire supérieur. (2) Certaines cellules de la réponse immunitaire innée vont pouvoir présenter des antigènes viraux au niveau des CMH-I ou II présents à leur surface, activant ainsi la réponse immunitaire adaptative et la production d'IFN- γ . (3) Ces deux phénomènes vont permettre la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes CD8+ (LTC) et CD4+ (Th1), et l'activation des lymphocytes B et des cellules NK. (4) Les LTC et lymphocytes Th1 (qui stimulent les LTC) vont produire de l'IFN- γ stimulateur de la différenciation des lymphocytes Th1 et B (5). (6) Les LTC et Th1 vont permettre l'élimination spécifique de particules virales ou cellules infectées à condition que ces dernières soient présentatrices d'un antigène de l'EHV-1, c'est la réponse cellulaire. (7) Les lymphocytes B vont produire des anticorps spécifiques de l'EHV-1 de plusieurs natures. (8) Ces anticorps vont être disséminés dans l'organisme et rejoindre les sites de l'infection pour neutraliser les particules virales libres, les cellules présentatrices d'antigène, certains d'entre eux activeront le complément. C'est la réponse humorale. L'EHV-1 présente plusieurs stratégies d'évasion de l'immunité qui sont (A) l'infection de PBMCs incluant les cellules de la réponse immunitaire (CD172a+), (B) la transmission de virions nouvellement produits de cellules à cellules, (C) la sous régulation des CMH-I et II limitant ainsi la présentation des antigènes Figure inspirée de la revue de Paillot et al. 2008.

Après avoir décrit les caractéristiques intrinsèques du virus chez le cheval, nous décrirons désormais les moyens disponibles pour minimiser l'impact d'une infection par l'EHV-1 sur le terrain.

E. Prophylaxie et Traitement des infections dues à l'EHV-1

La complexité des mécanismes d'infection de l'EHV-1 et l'adaptation de ce virus au système immunitaire de l'hôte rendent la prévention et le traitement difficiles. La prévention repose essentiellement sur la vaccination et le diagnostic permettant l'isolement rapide des chevaux atteints. Il n'existe encore aucun traitement commercialisé permettant de stopper la réplication virale, mais des travaux ont permis d'étudier l'efficacité d'un panel de molécules anti-herpétiques contre l'EHV-1. Quoiqu'il en soit, la gestion d'un épisode infectieux ne peut être efficace sans la mise en place de mesures sanitaires strictes sur le terrain.

a. Vaccination

La vaccination comme moyen de stimulation de la réponse immunitaire essentielle à la maîtrise de la virémie cellulaire représente une solution de lutte contre les différentes formes de maladies. L'intérêt d'un vaccin contre l'EHV-1 réside dans sa capacité à stimuler activement une réponse immunitaire au niveau des muqueuses pour limiter l'excrétion virale, une réponse humorale pour neutraliser les virions libérés, lyser les cellules infectées et limiter l'étendue des signes cliniques respiratoires, et enfin une réponse cellulaire pour maîtriser la virémie cellulaire et prévenir des formes secondaires que sont les avortements, l'atteinte des fœtus, et la forme nerveuse. Par ailleurs, si la vaccination représente un moyen de lutte pour chaque individu contre les infections ou réactivations de l'EHV-1, elle permet également l'établissement d'une immunité de groupe ou couverture vaccinale, notamment grâce à l'excrétion virale réduite chez les animaux protégés. La complexité de la mise au point d'un vaccin ne repose pas tant sur la variabilité des souches, les herpesvirus des équidés ayant une faible variabilité génétique qui ne semble pas avoir un grand impact sur l'immunogénicité de leurs protéines, mais plutôt sur la difficulté à induire toutes les formes d'immunité, indispensables à la maîtrise du virus.

De nombreuses investigations ont été menées dans le but de tester différentes technologies comme potentiels vaccins. Comme rapporté par Paillot *et al.* (2008), il existe deux grandes catégories de vaccins qui sont les vaccins inertes et les vaccins vivants. Concernant l'EHV-1, plusieurs technologies classées dans chacune de ces deux catégories ont été étudiées, certaines ayant abouti à des vaccins commercialisés (pour revue, Paillot *et al.* 2008).

Vaccins inertes :

Les vaccins inertes immunisants contre l'EHV-1 étudiés sont de cinq sortes. On distingue ainsi les virus inactivés, les vaccins sous-unitaires, les vaccins à base de complexes immunostimulants, les vaccins à ADN et enfin les particules virales « allégées » désignées sous le nom de L-particules (Light particules) (pour revue, Paillot *et al.* 2008).

Les virus inactivés présentent l'avantage de ne pas être pathogène et de ne représenter de danger infectieux pour les chevaux vaccinés. Les études expérimentales menées sur ce type de vaccin montrent une bonne stimulation de la réponse humorale (anticorps neutralisants et fixation du complément), une protection contre les signes cliniques et contre l'excrétion virale (Thomson, Numford and Smith 1979; pour revue, Paillot *et al.* 2008). Une étude menée sur le vaccin commercialisé Duvaxyn[®] (EHV-1/EHV-4) a par ailleurs montré une bonne protection des juments contre les avortements après l'infection de trois doses vaccinales, sans pour autant qu'une immunité cellulaire ait pu être observée (Heldens *et al.* 2001a). Les résultats sur le terrain montrent malgré tout que cette protection est partielle, comme le décrit une étude menée en Australie sur 159 juments et 101 poulains ayant permis la protection de 30 % des juments et 50 % des poulains (Foote *et al.* 2004; pour revue, Paillot *et al.* 2008). Les possibles effets secondaires observés sont liés à la forte charge antigénique induisant une réaction inflammatoire et les signes cliniques classiques associés (fièvre, réaction locale). Parmi les vaccins commercialisés, six sont des vaccins à base de virus inactivés (Tableau 4) (Selvaraj 2019).

Les vaccins sous-unitaires sont constitués d'un ou plusieurs d'antigènes viraux issus de la fragmentation de virions ou exprimés à partir de baculovirus recombinants. Cette technologie cible les protéines virales immunogènes (gB, gC ou gD) et ne provoque pas d'autres effets secondaires qu'un virus inactivé (pour revue, Paillot *et al.* 2008). A notre connaissance, il n'y a actuellement pas de vaccin sous-unitaire commercialisé concernant l'EHV-1.

Les vaccins à base de complexe immunostimulant correspondent à des protéines virales immunisantes couplées à des complexes ou adjuvants permettant la stimulation de la réponse immunitaire (Hannant *et al.* 1993).

Les vaccins à ADN sont constitués de plasmides exprimant des gènes d'intérêt (protéines immunisantes ou parties immunisantes d'une protéine). Cette technologie permet

l'expression de la protéine antigénique au sein même des cellules cibles, et permet sa présentation et la stimulation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique de cet antigène, de la même manière que lors d'une infection par le virus. Cette stimulation peut être renforcée en couplant les plasmides à des adjuvant co-stimulants (cytokines par exemple) (pour revue, Paillot *et al.* 2008).

Enfin, les particules « allégées » ou L-particles sont des virions enveloppés portant des protéines du tégument mais dépourvus de nucléocapside et d'ADN viral. Ces particules portent à leur surface les glycoprotéines nécessaires à l'entrée des virus dans la cellule. A nouveau, et comme les vaccins à ADN, la stimulation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire a lieu de la même manière que lors d'une infection par l'EHV-1. Bien qu'encourageante cette méthode présente néanmoins des risques qui sont la présence de particules infectieuses dans les complexes de vaccins ou encore que ces particules induisent une réactivation de la latence (pour revue, Paillot *et al.* 2008).

Les vaccins inactivés dans leur ensemble ne suffisent pas à générer une protection efficace contre l'EHV-1. Bien qu'ils représentent la majorité des vaccins commercialisés à ce jour, ils ne permettent qu'une réduction de l'intensité des signes respiratoires et diminuent le risque d'avortement (Bryans 1980; Burrows, Goodridge and Denyer 1984; Bürki *et al.* 1990; Goehring *et al.* 2010; Bresgen *et al.* 2012). Il n'existe pas à ce jour d'étude permettant d'évaluer leur efficacité contre les formes nerveuses provoquées par l'EHV-1. Ceci est essentiellement dû à la difficulté de reproduire la forme nerveuse lors d'infections expérimentales. Une nouvelle approche dite « old mare model » pourrait permettre de lever cette difficulté, les juments âgées étant plus susceptibles de développer une forme nerveuse que des mâles plus jeunes (Zarski *et al.* 2021).

Vaccins vivants :

Les vaccins vivants étudiés contre l'EHV-1 sont de deux types. On distingue ainsi les vaccins à base de virus atténué et les poxvirus non pathogènes porteurs de gènes viraux d'intérêt (pour revue, Paillot *et al.* 2008). Le premier vaccin décrit (Pneumabort equine rhinopneumonitis virus) était un vaccin vivant atténué administré selon le protocole de l'équipe de Doll *et al.* (1961). Ce vaccin était administré par voie intranasale et n'était pas recommandé au-delà d'un certain stade de la gestation (Doll 1961; pour revue, Minke, Audonnet and Fischer 2004). D'autres vaccins atténués ont été utilisés par la suite mais ont été remplacés par des vaccins inactivés, malgré leur faible efficacité, en raisons de forts

épisodes d'avortements observés chez des populations de juments suite à la vaccination (Eaglesome, Henry and McKnight 1979; pour revue, Gilkerson, Love and Whalley 1997).

Les vaccins atténués correspondent soit à des souches atténuées par des passages successifs sur culture cellulaire ou bien à des souches virales mutées pour en diminuer la virulence. L'atténuation par passages en culture est le résultat de mutations (inactivation ou délétion de gènes) survenues au fil des cultures, comme c'est le cas de la souche RacH atténuée issue de la souche RacL (Mayr and Pette 1968; Mayr *et al.* 1968). La délétion de gènes d'intérêt peut cependant être réalisée par génie génétique comme ce fut le cas d'un mutant RacHΔgM construit par l'équipe de Kydd *et al.*, afin de générer une souche atténuée altérée dans sa fonction de pénétration et sortie des cellules et de circulation de cellules en cellules et ce, dans le but de stimuler la réponse immunitaire cellulaire (Kydd *et al.* 2020). La délétion des gènes des glycoprotéines gE et gI a également été explorée aboutissant à la construction de mutants atténués néanmoins capables d'induire une réponse immunitaire chez la souris (Tsujimura *et al.* 2006). D'autres mutants d'EHV-1 étudiés comme vaccins atténués peuvent également être des souches ayant subi un traitement stoppant l'action de la thymidine kinase ou bien les rendant sensibles à une température $\geq 38,5$ °C comme c'est le cas des souches H6b et C147 respectivement (Cornick *et al.* 1990; Patel *et al.* 2003a, 2003b; pour revue, Paillot *et al.* 2008). Deux des vaccins vivants actuellement sur le marché contiennent la souche ou un dérivé de la souche atténuée RacH.

Les vaccins vivants atténués (« Modified Live Vaccines » (MLV)) semblent plus efficaces pour diminuer les signes cliniques que les vaccins inactivés (Goehring *et al.* 2010). Ils sont considérés comme les meilleurs candidats pour stimuler à la fois la réponse immunitaire humorale, mucoale et cellulaire. Cependant, aucune étude à ce jour n'a permis de mettre en évidence une protection aussi complète, l'immunité stimulée étant majoritairement humorale. En ce qui concerne la réponse mucoale par exemple, il a été constaté que l'administration intranasale d'une souche vaccinale atténuée n'induisait pas la production d'IgA au niveau de la muqueuse respiratoire alors qu'une souche terrain (Army 183) induisait la production *in vivo* de ces anticorps, sans qu'une explication ait pu être apportée (Breathnach *et al.* 2001). Une autre étude a été menée en 2012 par Goodman *et al.* sur une population de 47 chevaux dont l'historique d'infection par l'EHV-1 et de vaccination était connu. Cette étude a permis de constater que les IgG produits par les chevaux infectés naturellement étaient plus variés que ceux provenant des chevaux vaccinés (notamment par

des souches de vaccins vivants atténués). Toujours dans cette étude, l'isotype prédominant mesuré chez des chevaux après vaccination par un vaccin MLV contre l'EHV-1 est l'IgG4/7 et pourrait être associé à une meilleure protection immunitaire (Goodman *et al.* 2012). Les résultats de l'étude ont appuyé une fois de plus l'importance de la voie Th1 de l'immunité cellulaire pour contrôler la virémie cellulaire (Goodman *et al.* 2012). De plus, comme mentionné précédemment, les LTc sont activés par la présentation de peptides antigéniques présentés par des molécules CMH-I. Il existe plusieurs catégories de CMH-I spécifiques du patrimoine génétique de chaque individu, les mieux définis chez les chevaux étant ceux codés par le locus ELA-A (« equine leucocyte antigen A »). En introduisant leur étude visant à identifier les peptides antigéniques stimulateurs des LTc, Soboll *et al.* (2003) expliquent que la difficulté repose justement sur la détermination de quel peptide antigénique reconnu par quel CMH-I (ELA-A) permet la stimulation de LTc spécifiques de l'EHV-1, puisque d'un individu à l'autre, le répertoire de ELA-A pouvant chacun reconnaître des peptides antigéniques différents est variable. L'objectif final étant de pouvoir construire de futurs vaccins avec des épitopes antigéniques permettant ainsi la forte stimulation de LTc quel que soit le profil génétique des chevaux. L'étude menée par Soboll *et al.* a d'ailleurs permis de mettre en évidence la stimulation de LTc par la protéine IE présentée par des cellules dendritiques chez 4 des 6 chevaux testés et ayant un profil ELA-A commun de type ELA-A.3. Les protéines virales gC, gD, gI et gL ont permis la stimulation de LTc également, mais de manière plus individuelle et donc probablement dépendante de profils ELA-A qui n'étaient pas communs aux 6 chevaux (Soboll *et al.* 2003). Cette contrainte est également importante dans le développement de vaccins recombinants à ADN comme le soulignent Minke *et al.* (2004) dans leur revue (pour revue, Minke, Audonnet and Fischer 2004).

Enfin, une étude portant sur un vaccin inactivé et combiné contre l'EHV-1 et l'EHV-4 a montré une durée d'immunisation par les anticorps neutralisants de 6 mois, ce qui correspond à la durée de protection observée après infection expérimentale (Heldens *et al.* 2001b). L'intérêt de vaccins combinant EHV-1 et EHV-4 repose sur la cross-réactivité de certains anticorps spécifiques produits au contact des deux virus. Par ailleurs, il semble qu'il n'y ait pas de différence de durée de l'immunité selon que le vaccin soit vivant ou inactivé comme le montre une étude menée en 2012 sur 775 juments gestantes (Bresgen *et al.* 2012). Une étude menée par Attili *et al.* (2020) sur 3 vaccins inactivés suggère qu'un vaccin administré à un cheval dont le titre d'anticorps spécifiques est élevé interagira probablement avec ces anticorps et ne stimulera pas la réponse immunitaire aussi efficacement que lors

d'une injection à un cheval au titre d'anticorps spécifiques faible (Attili *et al.* 2020). Cette hypothèse semble pouvoir s'appliquer à tous les types de vaccins décrits précédemment.

Tableau 4 Récapitulatif des vaccins commercialisés connus dans le monde. Tableau inspiré de Selvaraj, 2019 (Selvaraj 2019).

Type de vaccin	Appellation	Fournisseur
Vaccins inactivés	Pneumabort K®+1B	Zoetis
	Duvaxyn® EHV-1/EHV-4 désormais Equip® EHV 1,4	Zoetis
	Flu-Vacc Innovator®6	Zoetis
	Equivac innovator ® EHV-1/4	Zoetis
	Vetera®2 ^{XP} /Calvenza®-03 EIV/EHV	Boehringer Ingelheim
	Prestige®2/Prodigy®/Havlogen®	Merck Animal health
	Equine Rhinopneumonitis Inactivated Vaccine	Nisseiken
Vaccins vivants	Bioequin H	Bioveta a.s
	Prevaccinol®	Intervet/MSD
	Rhinomune	Boehringer Ingelheim
	Equi N Tect ERP	Nisseiken

b. Méthodes de diagnostic

Comme pour toute maladie, le diagnostic tient une place importante dans la gestion d'un épisode infectieux lié à l'EHV-1 car il permet d'identifier les chevaux infectés et de gérer les sorties de quarantaines, mais aussi de suivre la séroconversion des chevaux ayant été en contact avec le virus ou encore de connaître le niveau de protection d'une population donnée. On distingue ainsi deux types de méthodes de diagnostic. Celles qui permettront de

savoir si un animal est porteur du virus au moment du prélèvement sont qualifiées de méthodes directes. Celles qui permettent de savoir si l'animal a été en contact avec le virus et a produit des anticorps neutralisants spécifiques sont qualifiées de méthodes indirectes. Les techniques directes d'isolement viral, de PCR, et indirectes de séroneutralisation, de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée et de fixation du complément font partie des techniques recommandées par l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE « World Organisation for Animal Health ») pour le diagnostic de la rhinopneumonie (terme utilisé pour désigner l'ensemble des maladies causées par l'EHV-1 et l'EHV-4) (International Office of Epizootics and Biological Standards Commission 2018).

Méthodes de diagnostic directes

i. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La détection d'acides nucléiques est une méthode rapide, sensible et spécifique, couramment utilisée pour identifier la présence d'EHV-1 dans un prélèvement. Cette méthode a l'avantage de détecter la présence du virus qu'il soit infectieux ou non, posant ainsi moins de contraintes de conservation des prélèvements (temps et conditions d'acheminement au laboratoire) que des techniques nécessitant que le virus soit infectieux pour le détecter. Initialement analysées en point final, les méthodes de PCR ont évolué vers une analyse en temps réel permettant la quantification de l'ADN viral présent dans le prélèvement à l'aide de plasmides porteurs de la région ciblée (qPCR). Il est probable que ces méthodes de PCR soient par la suite remplacées par le séquençage haut débit du génome viral qui devient de plus en plus accessible (Paim *et al.* 2019). Les tests PCR peuvent être réalisés sur tout type de prélèvement susceptible de contenir de l'ADN. En phase infectieuse aiguë, synonyme d'excrétion virale nasale, les écouvillons naso-pharyngés sont les prélèvements de prédilection (Lunn *et al.* 2009). L'analyse peut également être réalisée sur des prélèvements de sang, d'encéphale, de moelle épinière, de liquide céphalorachidien, de placenta ou encore sur les organes d'un fœtus avorté (foie, poumon, thymus ou rate par exemple).

Comme expliqué par Balasuriya *et al.* (2015), pour présenter une efficacité stable les systèmes PCR doivent cibler des régions non mutagènes et spécifiques de l'EHV-1 (pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). Les gènes cibles majoritaires pour l'hybridation d'amorces sont ceux codant la gB (Wagner *et al.* 1992; Borchers and Slater 1993; Kirisawa *et al.* 1993a; McCann, Mumford and Binns 1995; Diallo *et al.* 2006; Hussey *et al.* 2006; Diallo *et al.* 2007; Hu *et al.* 2014; El-Husseini, Helmy and Tammam 2017;

Pusterla, Madigan and Leutenegger), la gC (Sharma *et al.* 1992; Lawrence *et al.* 1994; Carvalho *et al.* 2000), la gH ou encore la thymidine kinase (Sharma *et al.* 1992; Carvalho *et al.* 2000) (Figure 18). Suite à la mise en évidence d'un polymorphisme au niveau du gène de l'ADN polymérase, en corrélation avec les formes abortive ou nerveuse de la maladie, des tests PCR ont été mis au point pour différencier les souches entre elles (Allen 2007; Leutenegger *et al.* 2008; Malik, Pálfi and Bálint 2010; Smith *et al.* 2012) (Figure 18). Le gène de l'ADN polymérase avait déjà été la cible d'un système PCR mis au point par VanDevanter *et al.* (1996) à base d'amorces dégénérées. Ce système PCR a la particularité de permettre la détection plus générale des herpèsvirus de mammifères. Il peut être complété par du séquençage Sanger pour une identification plus précise (VanDevanter *et al.* 1996; Léon *et al.* 2008). Un test PCR a également été développé dans le but de discriminer les souches terrain de la souche vaccinale atténuée RaCh (Osterrieder *et al.* 1994).

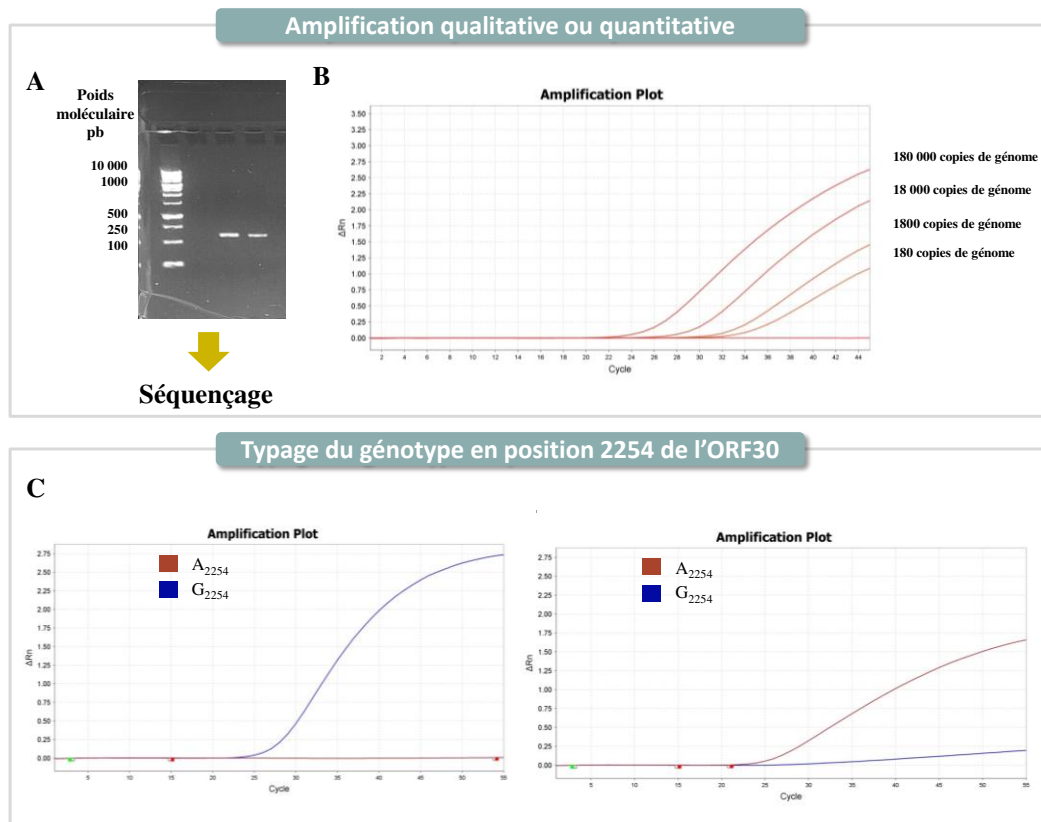


Figure 18 Outils de PCR pour la détection et le typage de souches d'EHV-1. (A) et (B) outils de PCR classique ou en temps réel permettant respectivement l'identification et la quantification de génome d'EHV-1 (Diallo *et al.* 2007). (C) Amplification discriminative de fragments de l'ORF30 de l'EHV-1 selon leur génotype en position 2 254 de l'ORF30, obtenue à l'aide du système PCR Allen *et al.* (2007) (Allen 2007).

ii. Isolement viral par culture cellulaire

L'isolement viral est une seconde méthode directe permettant de mettre en évidence la présence de l'EHV-1 dans un prélèvement. Elle nécessite cependant que les particules virales présentes soient infectieuses, ce qui requiert des précautions particulières pour le traitement et la conservation des échantillons. L'isolement peut se faire à partir d'écouvillons nasopharyngés, de lavages trachéaux ou broncho-alvéolaires, de tissus issus d'un fœtus avorté (placenta, poumon, foie, thymus ou rate) ou suite à l'euthanasie d'un animal infecté (foie poumon, rate, liquide céphalo-rachidien, moelle épinière, encéphale) ou encore à partir de sang total ou de PBMCs isolés d'un prélèvement sanguin (pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). Les lignées cellulaires de prédilection pour l'isolement de l'EHV-1 sont les cellules rénales de lapin (« Rabbit Kidney » : RK13), les cellules dermales équines (« Equine Dermal » : E.Derm), les cellules embryonnaires de rein équin (« Equine Embryonic Kidney » : EEK), les cellules rénales de hamster (« Baby Hamster Kidney » : BHK-21), les cellules rénales bovines Madin-Darby (MDBK), les cellules rénales de cochon (« Pig Kidney » : PK-15) ou encore les cellules équines primaires ou secondaires diploïdes en général (pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). La culture *in vitro* de l'EHV-1 sur lignée cellulaire entraîne le gonflement des cellules infectées, et la fusion de ces dernières en polykaryocytes ce qui entraîne une destruction progressive du tapis cellulaire (Wellington, Love and Whalley 1996). Ce phénomène de transformation des cellules en culture *in vitro* par le virus est nommé effet cytopathique (ECP) (Figure 19).

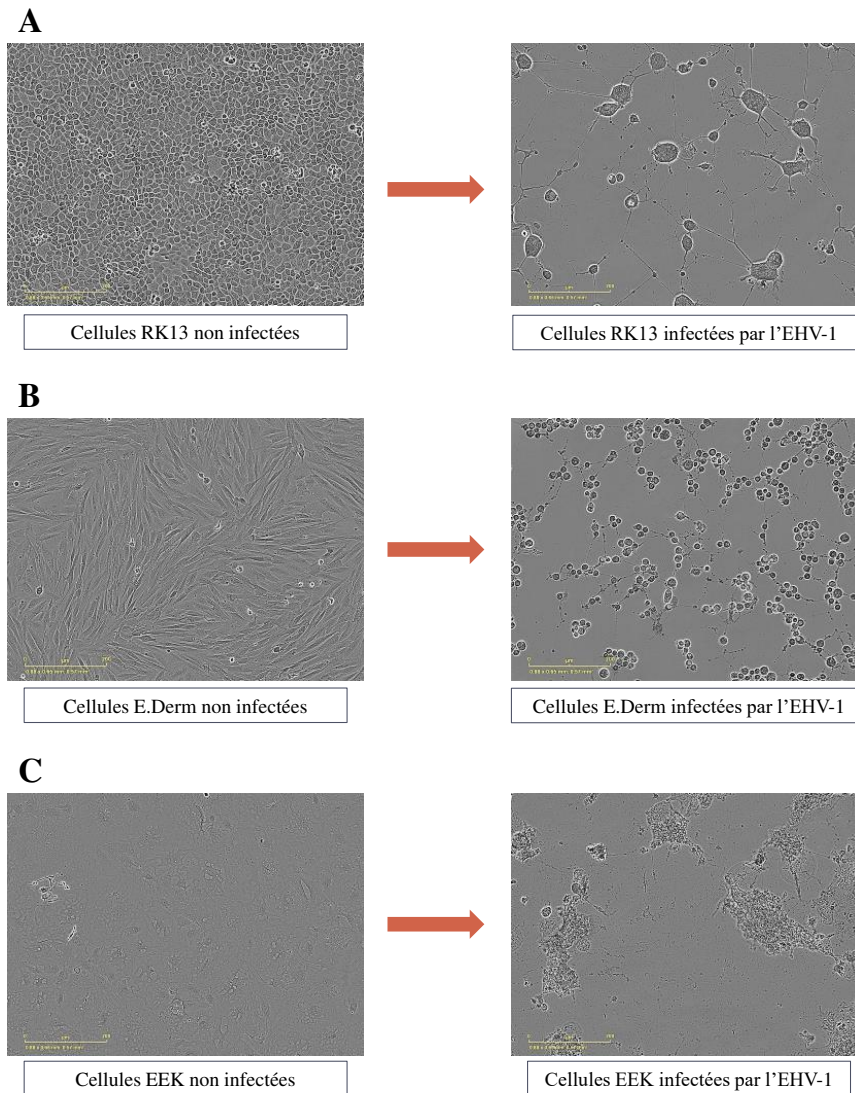


Figure 19 Exemple d'ECPs observés sur trois lignées cellulaires différentes (cellules non infectées à gauche et cellules infectées à droite) : (A) Cellules RK13, (B) cellules E.Derm, (C) cellules EEK. Microscopie optique – Objectif x20 – Echelle 100 μ M. (LABEO Frank Duncombe)

iii. Détection par immunomarquage et histopathologie

Il est possible de détecter la présence de l'EHV-1 à partir de tissus collectés post-mortem (euthanasie ou fœtus avorté). Cette détection peut se faire par immunofluorescence directe. Cela consiste à mettre des coupes de tissu fixées en contact avec des anticorps anti-EHV-1 conjugués à un marqueur fluorescent. La fluorescence activée lors d'une fixation d'un anticorps spécifique de l'EHV-1 à son substrat, sera observable par microscopie (International Office of Epizootics and Biological Standards Commission 2018). La détection peut également se faire par coloration à l'immunoperoxydase sur tissus fixés selon le même

principe et nécessite également une confirmation par PCR selon la spécificité des anticorps utilisés. Enfin, l'histologie peut également être un moyen de rechercher des lésions tissulaires au niveau des organes cibles (épithélium du tractus respiratoire, placenta, encéphale, moelle épinière et organes du fœtus) caractéristiques de l'EHV-1. L'inflammation et la thrombose des vaisseaux sanguins irriguant les organes « cibles », par exemple, sont des lésions qui pourront être observées sur des coupes histologiques d'organes. L'immunohistochimie (couplée à des colorations tissulaires) ou encore l'usage d'anticorps monoclonaux associés à un marqueur fluorescent permettront de détecter la présence ciblée de protéines antigéniques sur les coupes effectuées (pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015) (Figure 20).

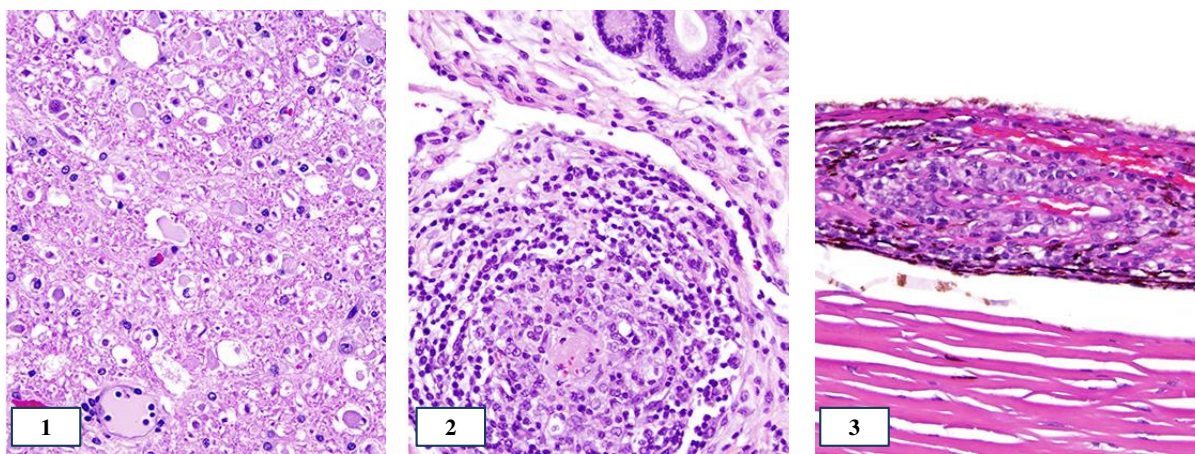


Figure 20 Coupes histologiques présentées par Holz et al. (2019) de tissus infectés par l'EHV-1 : (1) moelle épinière, (2) endomètre et (3) et œil de chevaux différents. Les tissus ont été teintés à l'hématoxyline et l'éosine et montrent (1) une dégénérescence axonale et la présence de compartiments de digestion contenant des macrophages, (2) et (3) une infiltration de lymphocytes et histiocytes autour des vaisseaux sanguins de l'endomètre et choroïda. Coupes et légendes issues de Holz et al. 2019 (Holz et al. 2019).

Méthodes de diagnostic indirectes

Les méthodes de diagnostic indirectes permettent la détection d'anticorps spécifiques du pathogène recherché. Ces tests ne permettent pas de distinguer les anticorps produits à la suite d'une vaccination ou lors d'une infection naturelle. Quoiqu'il en soit, ils sont utiles pour évaluer la mise en place de la réponse immunitaire humorale et, plus particulièrement, pour suivre une éventuelle séroconversion après infection ou vaccination. La séroconversion a lieu lorsque le titre d'anticorps dosés augmente d'un facteur quatre entre la phase aiguë de l'infection (ou durant les jours suivant la vaccination) et la phase de convalescence (15-20 jours post-infection/post-vaccination). Des études suggèrent que les anticorps produits suite à

une infection par l'EHV-1 ou l'EHV-4 conduisent à des réactions croisées (Fitzpatrick and Studdert 1984; Edington and Bridges 1990; Hartley *et al.* 2005). Les tests actuels utilisés en diagnostic ne permettent pas tous de distinguer ces détections croisées des détections spécifiques.

i. Réaction de Fixation du Complément

La réaction de fixation du complément (RFC) permet de doser les anticorps activateurs du complément. Ces derniers sont les IgM, IgG₁ et IgG₂. Ils sont produits dans les jours suivant l'infection par l'EHV-1, atteignent leur pic dans les 20 à 30 jours post-infection et diminuent entre 60-80 jours post-infection (pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). Leur dosage et leur suivi sont utiles pour connaître l'historique infectieux de l'animal à court terme, mais ne donnent pas d'information sur les anticorps plus durables et donc la protection humorale de l'animal contre l'EHV-1 (Hartley *et al.* 2005; pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). La réaction de fixation du complément consiste à mettre le sérum décomplémenté à tester en présence d'un antigène spécifique du pathogène étudié et de complément en quantité connue et d'origine connue. Le mélange réactionnel sera ensuite exposé à des hématies de mouton ainsi qu'à des anticorps fixant le complément dirigés contre ces hématies. Ainsi plusieurs cas de figures sont possibles : soit le sérum équin contient des anticorps fixant le complément dirigés contre l'antigène spécifique choisi, dans ce cas, il n'y aura plus de complément disponible pour fixer les anticorps dirigés contre les hématies qui resteront intactes. En revanche, dans le cas où le sérum ne contient pas d'anticorps fixant le complément et dirigé contre l'antigène choisi, le complexe hématies + anticorps dirigés contre ces hématies activera le complément disponible entraînant la lyse des hématies, ce qui se traduira par une précipitation rouge (Figure 21). Une particularité de la RFC pour les sérums de chevaux est l'observation d'une hémolyse non spécifique lors de la dernière étape du test liée à la présence d'un facteur procomplémentaire (également présent dans le sérum de cygne) et non désactivé lors de l'étape de désactivation du complément équin. La désactivation de ce facteur par le periodate de potassium a été mise en évidence par l'équipe de Bannai *et al.*, permettant ainsi de réduire la non-spécificité du test (Bannai *et al.* 2013). Le test de fixation du complément est probablement le plus sensible comme le montre une étude menée par Hartley *et al.* (2005) mais il est trop spécifique en terme de type d'anticorps et ne dose que des anticorps précoces (Hartley *et al.* 2005).

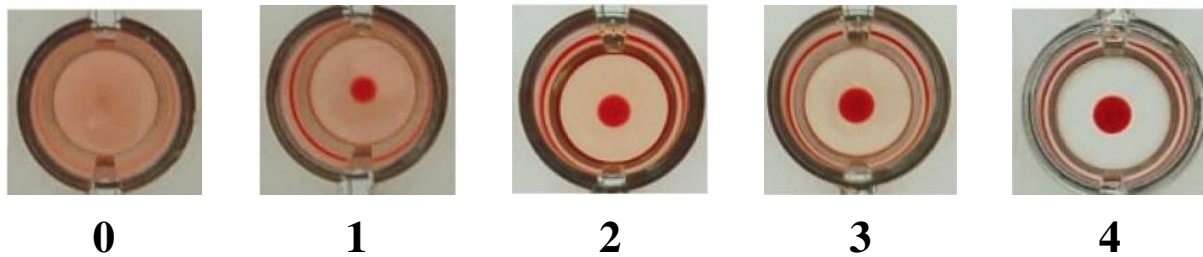


Figure 21 Observation de différents degrés d'hémolyse à la suite d'un test RFC dirigée contre l'EHV-1 lors d'une étude menée par Bannai et al. (2013), le stade 0 montrant une absence d'hémolyse et traduisant donc la présence d'anticorps anti-EHV-1, le stade 4 montrant une hémolyse complète et traduisant l'absence totale d'anticorps anti-EHV-1 (Bannai et al. 2013).

ii. Séroneutralisation

Le test de séroneutralisation (SN) permet un dosage de l'intégralité des anticorps capables de neutraliser l'EHV-1 et, par conséquent, capables d'empêcher l'entrée de ce dernier dans des cellules permissives. Le principe de la SN consiste à exposer un tapis cellulaire à une quantité définie de virus préalablement incubée en présence de plusieurs dilutions d'un sérum à tester. La quantité d'anticorps neutralisants présente initialement dans le sérum sera donc amoindrie à chaque palier de dilution. Le titre du sérum sera alors déterminé selon la dernière dilution permettant une neutralisation du virus se traduisant par une absence d'effet cytopathique sur le tapis cellulaire, à un temps choisi. La méthode de SN est universelle, les paramètres pouvant varier étant le modèle cellulaire, l'état du tapis cellulaire, la dose de virus lors de l'infection ainsi que la souche virale. Ce test a l'avantage de donner une estimation de l'état de la réponse humorale active contre l'EHV-1 dans sa globalité. Il ne permet en revanche pas de discriminer ni les anticorps entre eux, ni les anticorps cross-réagissant avec l'EHV-1 et l'EHV-4. Le test de SN ne permet pas de doser de faibles titres détectés avec le test de fixation du complément, il est donc moins sensible, mais présente l'avantage de permettre le titrage d'anticorps dont la durée de vie est plus longue (Hartley *et al.* 2005; pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015).

iii. Dosage par méthode ELISA

La technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (« Enzyme-Linked Immuno Assay » : ELISA) permet le dosage d'anticorps IgG spécifique à un antigène donné. Cette technique consiste à mettre un sérum à tester en contact d'un antigène spécifique du

pathogène étudié. Après lavage, des anticorps secondaires liant les immunoglobulines équine et couplés à un conjugué enzymatique sont ajoutés. Si le sérum initial contient des anticorps dirigés contre l'antigène spécifique choisi, l'anticorps secondaire (anti-équin) se fixera. L'ajout du substrat entraînera une coloration proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon testé. Le test ne permet pas de doser l'ensemble des anticorps neutralisants produits par les chevaux suite à une infection ou une campagne de vaccination et n'est par conséquent pas très sensible (Hartley *et al.* 2005; pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). En revanche, seuls certains anticorps spécifiques à l'EHV-4 (pour revue, Patel and Heldens 2005; Mahmoud *et al.* 2013) cross-réagissent avec l'EHV-1, il est donc possible avec le test ELISA, de cibler des antigènes permettant de discriminer les deux virus. Plusieurs tests ELISA ont été décrits ciblant la gG ou encore la gE et permettant la discrimination de l'EHV-1 et de l'EHV-4 (Crabb and Studdert 1993; Crabb *et al.* 1995; Drummer *et al.* 1995; Yasunaga *et al.* 1998, 2000; Singh, Ahuja and Gulati 2004; Hartley *et al.* 2005; Lang *et al.* 2013). Une variante du test décrit par Crabb *et al.* (1995) est d'ailleurs commercialisée (Crabb *et al.* 1995).

Des méthodes de cytologie et de biochimie peuvent également être informatives de l'état immunitaire et inflammatoire des chevaux et aider ainsi au diagnostic, comme c'est le cas de l'exemple pratique proposé par Pusterla *et al.* (2009) pour le diagnostic d'une myéloencéphalopathie causée par l'EHV-1 (Figure 22) (pour revue, Pusterla *et al.* 2009).

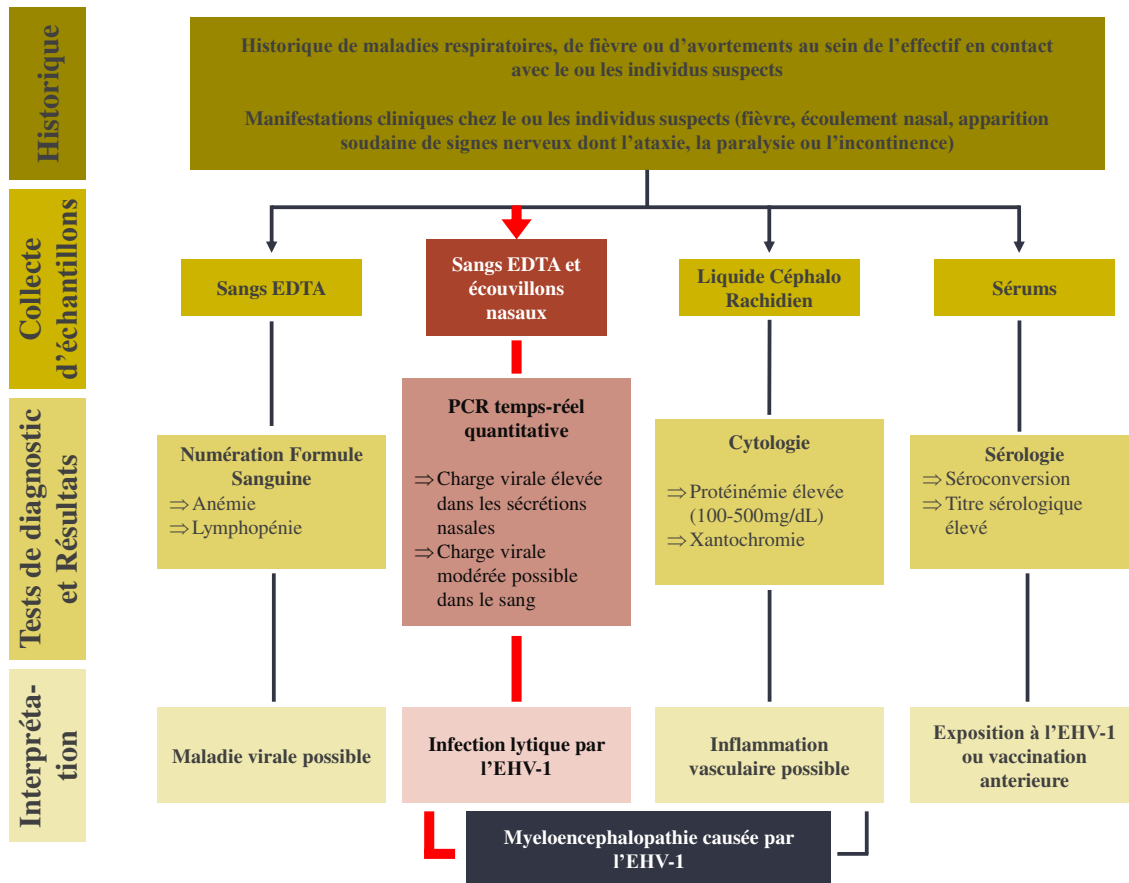


Figure 22 Mise en application du diagnostic d'un cas de myeloencéphalopathie proposée par Pusterla et al. (2009). La procédure permettant un diagnostic de certitude est indiquée en rouge. Diagramme issu de la revue de Pusterla et al. (2009).

iv. Détection de la latence

Lors de la phase latente de l'EHV-1, la réplication virale est mise sous silence et seuls quelques gènes sont transcrits (LATs « latency-associated transcripts ») dans seulement certaines cellules. La détection de la latence est donc complexe et repose sur l'identification de ces transcrits (pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). Une première étape de détection de la latence est la recherche d'ADN viral au niveau des sites d'établissement de la latence (ganglions sensoriels, cellules lymphoïdes). La présence d'ADN viral au niveau de ces sites ne permet cependant pas d'en déduire une latence, le virus en phase lytique pouvant également y être présent. Une analyse supplémentaire s'impose donc, qui est l'étude de l'activité transcriptionnelle de gènes mis sous silence lors de la phase latente (gène de la gB par exemple) et des seuls gènes transcrits durant cette phase (LATs). Cette analyse transcriptionnelle est réalisée par l'analyse des ARNm présents au sein des sites précédemment identifiés comme porteur d'ADN viral. Ces ARNm sont transcrits en ADN

complémentaire (ADNc) pour pouvoir mettre en évidence par PCR l'absence ou la présence de rétrotranscrits de la gB, par exemple, et de LATs. Une étude illustrant bien cette démarche est celle d'Abdelgawad *et al.* (2016) montrant la présence d'EHV-1 et d'EHV-9 à l'état lytique et latent, chez des zèbres en captivité (Abdelgawad *et al.* 2016).

c. Traitements antiviraux

En cas d'herpès virose avérée et confirmée par le diagnostic, une autre stratégie de lutte est le traitement antiviral. Les anti-herpétiques sont couramment utilisés contre les herpès virus humains pour réduire la durée des signes cliniques et limiter la transmission entre individus, et ont conduit à initier de nombreuses études pour le traitement des herpès équins (pour revue, Vissani *et al.* 2016). A ce jour, il n'existe pas de traitement antiviral commercialisé contre l'EHV-1, même si l'utilisation de l'aciclovir, un antiherpétique humain, a été décrite lors d'épisodes avec des formes nerveuses (Murray *et al.* 1998; Friday *et al.* 2000; Henninger *et al.* 2007).

Utilisés pour la première fois dans les années 1960 contre des virus humains, les antiviraux sont des molécules naturelles ou produites de manière synthétique. Le rôle d'un antiviral est d'empêcher ou de freiner la réplication virale, limitant ainsi l'évolution des signes cliniques chez l'hôte et laissant au système immunitaire la tâche d'élimination des virions déjà produits. Ils représentent ainsi de bons compléments de la vaccination (pour revue, Villa *et al.* 2017). Cette répression peut être exercée à deux niveaux : au niveau de la cellule indispensable à la réplication virale ou au niveau de la réplication virale elle-même. Il est cependant beaucoup plus complexe de sélectionner une molécule cytotoxique pour un type cellulaire précis (celui susceptible d'être infecté) que de sélectionner une molécule qui affectera le virus lors d'une des étapes de son cycle viral (pour revue, Maxwell 2017). Les molécules antivirales utilisées chez les alphaherpès virus agissent principalement au niveau du cycle viral en inhibant l'action d'une protéine virale essentielle dont le fonctionnement diffère suffisamment de son homologue cellulaire (pour revue, Vissani *et al.* 2016). A ce jour, les antiviraux utilisés pour le traitement d'herpès virus humains sont principalement des analogues de nucléosides ciblant l'ADN polymérase virale (pour revue, De Clercq and Li 2016). Ces analogues de nucléosides qui nécessitent ou non une phosphorylation par la thymidine kinase virale et/ou cellulaire interagissent avec l'ADN polymérase de manière compétitive vis-à-vis des désoxyribonucléosides triphosphates naturels. Ils sont alors incorporés dans le brin d'ADN et bloquent la synthèse ou agissent simplement comme

inhibiteur de la synthèse de ce brin. Les analogues de nucléosides utilisés contre les herpèsvirus sont classés en trois groupes qui sont les analogues de guanosine acyclique, les analogues de thymidine acyclique et de phosphonate acyclique. Les analogues de guanosine et de thymidine nécessitent 3 étapes de phosphorylation pour être actifs, la première et/ou la deuxième étant réalisée par la thymidine kinase virale. L'intervention de la thymidine kinase virale pour phosphoryler et activer ces analogues de nucléosides permet à ces molécules d'être très spécifiques des herpèsvirus. En revanche, une résistance à ces molécules peut se mettre en place si la thymidine kinase virale est altérée et non fonctionnelle. Les analogues de phosphonates acycliques possèdent déjà un groupement phosphate et ne nécessitent que deux phosphorylations qui peuvent être réalisées par la thymidine kinase cellulaire. Ce sont par conséquent de bons candidats antiviraux face aux souches virales délétées en thymidine kinase et résistantes aux autres analogues de nucléosides, même s'ils peuvent aussi se montrer toxiques pour les cellules infectées (pour revue, De Clercq and Holý 2005). Les premiers analogues de nucléosides utilisés pour traiter l'HSV-1 sont l'idoxuridine (analogue de la thymidine, mais cardiotoxique et inefficace contre l'HSV-2 et le VZV) et la trifluridine (Prusoff 1959; Kaufman and Heidelberger 1964; pour revue, Luczkowiak *et al.* 2019). L'aciclovir a été découvert par la suite (1977) avec un effet plus spécifique que ses prédécesseurs notamment contre l'HSV-1 et le VZV (Elion *et al.* 1977; Schaeffer *et al.* 1978; Crumpacker *et al.* 1979; De Clercq *et al.* 1982; pour revue, Collins 1983). D'autres analogues de nucléosides ont ensuite été découverts tels que la brivudine, le ganciclovir et le penciclovir, ainsi que des analogues de nucléosides avec groupement phosphonate tel que le cidofovir (De Clercq *et al.* 1979; Smith *et al.* 1982; Boyd *et al.* 1987; pour revue, De Clercq 2004). Le foscarnet est un autre inhibiteur de l'ADN polymérase également étudié comme anti-herpétique et classé parmi les analogues de pyrophosphates (Helgstrand *et al.* 1978; pour revue, Crumpacker 1992). L'ensemble des antiviraux décrits précédemment dépendent de la machinerie de la cellule infectée pour être actifs (pour revue, De Clercq and Field 2006). Cependant ces antiviraux de « première génération » ont, pour certains, montré des contraintes de biodisponibilité orale et de toxicité nécessitant le développement d'une « seconde génération » de molécules qualifiées de prodrogues (Weller *et al.* 1993; Bentz *et al.* 2006; pour revue, De Clercq and Field 2006; Carmichael, Whitfield and Maxwell 2013). Les prodrogues ne sont autres que les versions plus stables et biodisponibles des molécules de première génération. Par l'intervention d'enzymes cellulaires, elles seront converties en leur homologue actif dans une concentration d'efficacité optimale au sein de l'organisme. Par ailleurs, les doses à administrer pour un même effet sont moindres, réduisant ainsi le coût du

traitement (pour revue, Maxwell 2017). Le valaciclovir (prodrogue de l'aciclovir), le valganciclovir (pro-drogue du ganciclovir) et le famciclovir (prodrogue du penciclovir) font partie de ces prodrogues (Weller *et al.* 1993; Sacks and Wilson 1999; pour revue, Ormrod and Goa 2000; Pescovitz *et al.* 2000; pour revue, De Clercq and Field 2006; Garré *et al.* 2007; Maxwell *et al.* 2008; Carmichael, Whitfield and Maxwell 2013; pour revue, Vissani *et al.* 2016). D'autres analogues de nucléosides ont également été sélectionnés comme potentiels antiherpétiques (brincidofovir, valomaciclovir, N-Méthanocarbothymidine), mais également des inhibiteurs d'hélicase-primase (pritelivir, aménamévir) ou encore un inhibiteur de la protéine kinase UL97 du CMV bloquant la sortie des particules virale du noyau cellulaire (maribavir) (pour revue, Poole and James 2018).

En ce qui concerne l'EHV-1, sur la base des antiherpétiques humains, les principales molécules antivirales étudiées *in vitro* appartiennent aux trois groupes d'analogues de nucléosides. Parmi elles, figurent l'aciclovir, le ganciclovir et le penciclovir, dont les prodrogues sont respectivement le valaciclovir, le valganciclovir et le famciclovir, mais également la brivudine, le cidofovir ou encore l'adéfovir (de la Fuente, Awan and Field 1992; pour revue, Clercq 1997; Garre *et al.* 2007; Azab *et al.* 2010a; Tsujimura *et al.* 2010; Carmichael, Whitfield and Maxwell 2013; pour revue, Vissani *et al.* 2016; Thieulent *et al.* 2020a, 2020b). L'effet inhibiteur du foscarnet contre l'EHV-1 a également été étudié (Garre *et al.* 2007). Enfin, l'aphidicoline, un inhibiteur d'ADN polymérase de famille B par compétition avec les déoxynucléotides triphosphates, a également montré un bon effet inhibiteur de l'EHV-1 (Goodman *et al.* 2007; Thieulent *et al.* 2020b, 2020a). L'efficacité des différentes molécules testées est exprimée en concentration entraînant une inhibition de 50 % de la réplication virale (« Concentration Inhibitrice 50 » : CI_{50}). Les valeurs de CI_{50} peuvent varier pour une même molécule selon le modèle cellulaire et la méthodologie utilisée dans les différentes études. Le ganciclovir semble être la molécule la plus efficace contre l'EHV-1 avec une CI_{50} moyenne *in vitro* comprise entre 0,02 et 1,9 $\mu\text{g/mL}$ selon les différentes études (Rollinson and White 1983; Smith *et al.* 1983; Clercq *et al.* 1986; Boyd *et al.* 1987; Rollinson 1987; Garre *et al.* 2007; Azab *et al.* 2010a; pour revue, Maxwell 2017; Oliveira *et al.* 2018; Thieulent *et al.* 2019). L'efficacité *in vitro* de l'aciclovir, a également été mise en évidence contre l'EHV-1, avec une CI_{50} moyenne de 0.3 à 22.2 $\mu\text{g/mL}$ selon les différentes études, soit 20 fois inférieure à celle du ganciclovir (Rollinson and White 1983; Wilkins, Papich and Sweeney 2005; Garre *et al.* 2007; Azab *et al.* 2010a; pour revue, Vissani *et al.* 2016; pour revue, Maxwell 2017; Maxwell *et al.* 2017; Oliveira *et al.* 2018; Thieulent *et al.* 2019). Les

essais *in vitro* sur le penciclovir ont montré une CI_{50} moyenne de 1,3 à plus de 10 μ g/mL (Boyd *et al.* 1987; de la Fuente, Awan and Field 1992; pour revue, Vissani *et al.* 2016; pour revue, Maxwell 2017; Maxwell *et al.* 2017; Thieulent *et al.* 2020a, 2020a). L'adéfovir et le cidofovir ne nécessitent pas de phosphorylation par la thymidine kinase virale et ne sont donc pas spécifiques des herpèsvirus. Ces molécules ont néanmoins montré un bon effet *in vitro* contre l'EHV-1, avec des CI_{50} moyennes comprises entre 2,8 et 5,6 μ g/mL pour l'adéfovir et 0,01 et 6,8 μ g/mL pour le cidofovir (Gibson, Slater and Field 1992; Garre *et al.* 2007; pour revue, Vissani *et al.* 2016; pour revue, Maxwell 2017; Oliveira *et al.* 2018; Thieulent *et al.* 2020b, 2020a). En ce qui concerne le foscarnet, cet antiviral n'a pas montré de bon effet *in vitro* contre l'EHV-1 avec une CI_{50} moyenne comprise entre 6,6 μ g/mL et 49,5 μ g/mL (Garre *et al.* 2007; pour revue, Vissani *et al.* 2016; Oliveira *et al.* 2018).

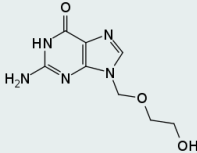
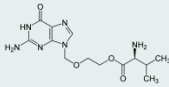
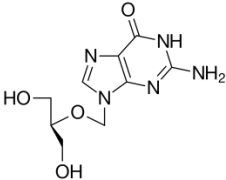
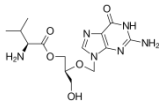
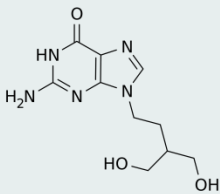
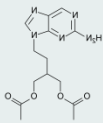
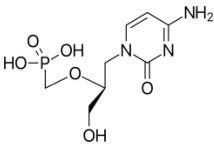
L'efficacité *in vivo* de l'aciclovir, de sa prodrogue le valaciclovir et du ganciclovir a été étudiée lors d'infections naturelles ou expérimentales. Lors d'infections naturelles de poulains et chevaux adultes, dont certaines impliquant des signes nerveux, l'utilisation de l'aciclovir comme traitement a été rapportée sans pour autant démontrer une amélioration des signes cliniques observés (Friday *et al.* 2000; Henninger *et al.* 2007; Maxwell *et al.* 2008; pour revue, Maxwell 2017). Le valaciclovir a été utilisé lors d'infections naturelles et expérimentales montrant des effets controversés (Garré *et al.* 2009; Goehring, Landolt and Morley 2010; Estell *et al.* 2015; Maxwell *et al.* 2017). Le ganciclovir a fait l'objet d'une étude expérimentale montrant une réduction de la charge virale et une diminution de l'ataxie (Maxwell *et al.* 2011). L'effet du valganciclovir a été étudié lors d'une infection expérimentale par l'EHV-1 par voie intranasale (Thieulent *et al.* En préparation) (Thieulent 2020). Cette étude a permis de montrer une réduction des signes cliniques, de l'excrétion de particules virales infectieuses et de la virémie cellulaire de manière significative chez les chevaux infectés ayant été traités par le valganciclovir. Enfin, le cidofovir a également été étudié *in vivo*. A forte dose, il a également permis de réduire l'intensité des signes cliniques chez des poulains lors d'une expérimentation animale (Gibson, Slater and Field 1992).

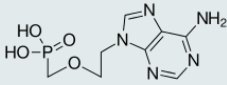
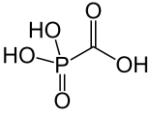
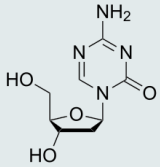
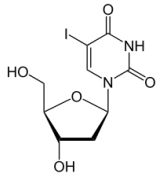
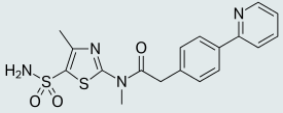
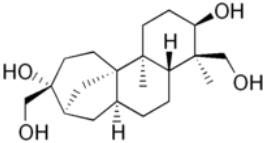
D'autres études ont été menées *in vitro* comme la combinaison du ganciclovir à un inhibiteur de l'histone déméthylase, montrant un effet synergique encourageant mais dépendant du type cellulaire (Tallmadge *et al.* 2018) ou encore le criblage haut débit de banques de molécules bio-actives et commercialisées dans le but d'étudier leur effet sur la réplication virale pour un éventuel repositionnement selon leur efficacité d'inhibition

(Thieulent *et al.* 2020b, 2020a). Cette étude a permis non seulement de sélectionner 22 composants ayant une bonne efficacité *in vitro* contre l'EHV-1, dont certains étaient déjà décrits comme antiherpétiques (valganciclovir, ganciclovir, décitabine, aphidicoline, idoxuridine et pritélivir), mais également de montrer un effet synergique *in vitro* de deux d'entre eux qui sont la décitabine et le valganciclovir (Thieulent *et al.* 2020b, 2020a).

Pour finir, une étape cible particulièrement intéressante pour le traitement des herpèsvirus est la latence. La réplication virale étant restreinte lors de cette étape, les analogues de nucléosides ne sont probablement pas les meilleures molécules pour l'inhiber. Des études *in vitro* ou sur modèle animal essentiellement portées sur l'HSV-1 mais également sur l'EHV-1 ont cependant exploré l'impact d'un traitement antiviral par un analogue de nucléoside sur l'établissement de la latence ou encore sur la fréquence de réactivation de souches latentes (Field, Awan and de la Fuente 1992; Dobson, Little and Scott 1998; Thackray and Field 1998, 2000a, 2000b; LeBlanc *et al.* 1999a, 1999b; Field and Thackray 2000). Les résultats parfois controversés pourraient s'expliquer par la difficulté à mesurer, quantifier, suivre la latence. Quoi qu'il en soit une étude publiée en 2001 semble suggérer que la mise en place précoce d'un traitement antiviral sur plusieurs jours permettrait de limiter le « pool » de virus atteignant la latence et par conséquent de limiter les épisodes de réactivation (Sawtell *et al.* 2001). Inhiber l'étape de latence en elle-même n'en reste pas moins complexe. Alors que les différentes protéines impliquées dans le cycle de réplication virale sont de mieux en mieux connues, promettant le développement de nouvelles molécules antivirales spécifiques à moyen terme, les connaissances concernant les mécanismes viraux et cellulaires impliqués dans la latence sont plus restreintes et nécessitent d'être approfondies pour permettre la mise au point de traitement ciblant cette étape du cycle viral (pour revue, Coen and Schaffer 2003).

Tableau 5 Récapitulatif des molécules antivirales testées contre l'EHV-1 *in vitro* et/ou *in vivo* et leur mode d'action.

Molécule antivirale	Formule	Mécanisme d'action	Etudes
Aciclovir (Valaciclovir)		Analogues de la désoxyguanosine. Bloque la réplication virale après son incorporation	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>
			<i>In vivo</i>
Ganciclovir (Valganciclovir)		Analogues de la désoxyguanosine. Bloque la réplication virale après son incorporation	<i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>
			<i>In vitro</i>
Penciclovir (Famciclovir)		Analogues de la désoxyguanosine. Bloque la réplication virale après son incorporation	<i>In vitro</i>
			<i>In vivo</i> (pharmacocinétique seulement)
Cidofovir		Analogue de la désoxycytidine. Bloque la réplication virale après son incorporation	<i>In vitro</i>

Molécule antivirale	Formule	Mécanisme d'action	Etudes
Adefovir		Analogue de la déoxyadénosine. Bloque la réplication virale après son incorporation	<i>In vitro</i>
Foscarnet		Analogue de pyrophosphate. Bloque le clivage des pyrophosphates par l'ADN polymérase.	<i>In vitro</i>
Décitabine		Analogue de la désoxycytidine. Bloque la réplication virale après son incorporation	<i>In vitro</i>
Idoxuridine		Analogue de la désoxythymidine. Bloque la réplication virale après son incorporation.	<i>In vitro</i>
Pritélivir		Inhibiteur de l'hélicase primase.	<i>In vitro</i>
Aphidicoline		Inhibition des ADN polymérase de famille B par compétition avec les désoxynucléotides triphosphates.	<i>In vitro</i>

En complément de ces différentes stratégies prophylactiques et thérapeutiques, la mise en place de mesures sanitaires et la surveillance épidémiologique sur le terrain sont d'une importance majeure pour la gestion de foyers d'EHV-1 (Lunn *et al.* 2009).

F. Filière équine et gestion de crise

a. Mesures sanitaires

Selon le protocole proposé par Gonzalez-Medina & Newton (2015) et appliqué au Royaume-Uni (pour revue, Gonzalez-Medina and Newton 2015), la gestion d'une crise EHV-1 sans signes nerveux au sein d'un élevage peut être décrite en 6 étapes qui sont les suivantes :

1. La perception de signes cliniques par les propriétaires.
2. L'auscultation par le vétérinaire de l'ensemble de la population. Un premier isolement sera effectué, ainsi que la restriction des mouvements au sein de la structure selon les signes cliniques observés. L'historique infectieux et les potentiels facteurs de réactivation auxquels les chevaux auraient pu être exposés sont pris en compte.
3. Le dépistage sur prélèvements nasaux, placenta ou organes de fœtus avortés confirmant ou non le diagnostic.
4. La mise en place de mesures sanitaires adaptées selon le diagnostic comprenant l'isolement des animaux infectés, la restriction des mouvements, la séparation éventuelle des juments gestantes des autres groupes et la mise en place de mesures d'hygiène strictes pour le personnel soignant en contact avec les animaux.
5. L'adaptation des mesures sanitaires selon l'évolution de l'infection en formant des petits groupes convalescents ainsi que le suivi de l'évolution de la charge virale.
6. Le retour à l'organisation normale de l'élevage appuyé par une absence de détection virale chez tous les individus de l'élevage.

Dans le cas d'épisodes nerveux, une approche à trois échelles (Bronze, Argent et Or) est également proposée au Royaume-Uni allant de la collecte d'échantillon nasaux (charge virale) et de sérums (anticorps neutralisants) pour la congélation sur une partie de l'effectif dans le but de ne réaliser des tests qu'en fonction de l'évolution des signes cliniques, à la collecte d'échantillons nasaux, de sérums et de sangs héparinés (virémie cellulaire) sur l'ensemble de l'effectif pour un dépistage et suivi complet quelle que soit l'évolution des signes cliniques. Ces trois approches diffèrent dans la profondeur de l'analyse de la crise ainsi que dans le coût qu'elles impliquent (pour revue, Gonzalez-Medina and Newton 2015). Des

études de cas ont également été publiées décrivant les différentes mesures appliquées à la gestion d'une crise infectieuse par l'EHV-1, le consensus étant l'identification du « patient zéro », l'isolement en effectifs réduits, le suivi de la charge virale et la mise en place de mesures d'hygiène (Drummer *et al.* 1995; Goehring, Landolt and Morley 2010; Pronost *et al.* 2012; Traub-Dargatz *et al.* 2013).

En France, le Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en Pathologie Équine est grandement impliqué dans la gestion des foyers infectieux. Cette association basée sur un réseau de Vétérinaires Sentinelles a été créée par en 1999 par la commission « Maladies Infectieuses et parasitaires » de l'Association Vétérinaire Equine Française (AVEF). Le RESPE joue principalement un rôle de veille sanitaire concernant des maladies infectieuses, parasitaires et d'origine toxique des équidés dont fait partie l'EHV-1, d'information notamment en ce qui concerne les bonnes pratiques sanitaires, mais aussi de collectes de nouvelles connaissances. Environ 800 vétérinaires sentinelles répartis sur le terrain contribuent à l'épidémiosurveillance des pathologies équines suivies par le RESPE. En cas de suspicion de foyer, ces vétérinaires sentinelles vont suivre un protocole précis d'examen clinique, de prélèvement et d'alerte du RESPE. Une alerte anonyme sera alors lancée par le réseau qui permettra d'informer la filière équine et de mettre en place les mesures sanitaires nécessaires. Depuis 2008, les membres du RESPE comptent parmi eux des professionnels représentants des courses, du sport, de l'élevage, vétérinaires praticiens, écoles vétérinaires, laboratoires d'analyses, universités, chercheurs. Cela permet ainsi à l'association d'organiser des cellules de crise sanitaires et de regrouper l'expertise de l'ensemble de ses membres pour établir des recommandations adaptées à la filière équine (Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en Pathologie Equine (RESPE) 2021). Ce système de surveillance a été le premier mis en place en France. Depuis, de nouveaux réseaux ont vu le jour dans différents pays comme l'Irlande, l'Angleterre, la Suisse et la Belgique. Depuis sa création, le RESPE a été impliqué dans la gestion de différentes crises aux côtés de professionnels, comme ce fut le cas pour l'épizootie d'artérite virale équine en 2007 (Pronost *et al.* 2010c), la crise de grippe équine en 2019 (Paillot *et al.* 2019), ou encore la crise d'EHV-1 en 2018 qui fera l'objet d'une partie de ce travail de thèse.

b. Épidémiologie / séroprévalence dans le monde

L'EHV-1 a fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques visant à estimer la séroprévalence du pathogène à l'échelle de différentes populations équine.

La prévalence d'un pathogène latent et parfois asymptomatique tel que l'EHV-1 au sein d'une population, peut être estimée par la détection de transcrits associés à la latence au niveau des leucocytes ou par l'étude sérologique. La sérologie implique plusieurs contraintes qui ont rendu ou rendent l'estimation de sa prévalence au niveau de la population équine complexe. La première contrainte est celle de l'immunité croisée de l'EHV-1 avec l'EHV-4 nécessitant l'emploi de tests sérologiques spécifiques. Plusieurs études se sont par conséquent attelées à la mise au point d'outils sérologiques discriminants et particulièrement utiles lors d'études épidémiologiques (Crabb and Studdert 1993, 1995; Andoh *et al.* 2013; Lang *et al.* 2013). Une autre contrainte est celle de la vaccination qui rend difficile l'évaluation d'une immunité mise en place à la suite d'une infection naturelle. Une étude publiée en 2013 décrit la mise au point d'un test ELISA capable de détecter les anticorps spécifiques de la gE de l'EHV-1 et ne détectant pas les anticorps produits au contact d'une potentielle souche vaccinale atténuée dont le gène de la gE a été délété (Andoh *et al.* 2013). Une telle discrimination connue sous le nom de « differentiating infected from vaccinated animals » ou DIVA test est déjà en place par exemple pour le virus de la grippe équine (« equine influenza virus » EIV). Un des vaccins commercialisés contre ce virus est en effet un vaccin comportant deux canarypoxvirus recombinants exprimant l'hémagglutinine de deux souches d'EIV. Contrairement aux souches naturelles d'EIV, ce type de vaccin n'induit pas d'anticorps dirigés contre la nucléoprotéine de l'EIV. Il est ainsi possible, à l'aide notamment d'un test ELISA dirigé contre la nucléoprotéine de l'EIV, de différencier les chevaux ayant répondu à la vaccination de ceux ayant été infectés naturellement (pour revue, Paillot and El-Hage 2016; Fougerolle *et al.* 2019). Ce type d'outil, s'il était mis en application pour l'EHV-1, faciliterait également les études épidémiologiques à venir concernant ce virus. Plusieurs études sérologiques ont été menées sur différents types de populations équine. En 1965, une étude a permis une première évaluation de la prévalence cumulée de l'EHV-1 et l'EHV-4 chez 388 chevaux de 17 pays du monde (Matumoto, Ishizaki and Shimizu 1965). Des anticorps fixant le complément spécifique d'un antigène du virus ou d'un antigène soluble ont été détectés respectivement chez 75,1% et 36,5% de 386 des chevaux. Des tests de séroneutralisation ont également été réalisés contre la souche américaine d'EHV-1 Kentucky D et la souche japonaise H-45. Les résultats de cette étude ont montré une réponse neutralisante chez 85,2%

des 384 sérums chevaux testés contre la première souche et chez 85,2% des 312 sérums de chevaux testés contre la seconde souche. Différentes études menées en Australie avant la mise en place de la vaccination et sur des populations différentes de chevaux (pur-sang, pur-sang pratiquant des courses en compétition, poulinières et poulains) ont permis de mettre en évidence une prévalence de l'EHV-1 allant de 9 % à 28 % selon les populations, contre une prévalence proche de 100 % pour l'EHV-4 chez les chevaux étudiés (pour revue, Crabb and Studdert 1995; pour revue, Gilkerson, Love and Whalley 1997; Gilkerson *et al.* 1999a, 1999b; pour revue, Dunowska 2014). Une autre étude menée en Nouvelle-Zélande dans le cadre d'une thèse soutenue en 1998, a mis en évidence une prévalence plus élevée de l'EHV-1 et qui évoluait selon la tranche d'âge des populations testées (Donald 1998; pour revue, Dunowska 2014). En accord avec les études australiennes, une étude publiée en 2008 sur 139 sérums de chevaux colombiens a montré des pourcentages similaires avec une séroprévalence pour l'EHV-4 de 96,6 à 98,7 % selon la région de prélèvement et pour l'EHV-1 de 18,8 à 33,3 % (Ruiz-Saenz *et al.* 2009). Une autre étude, menée sur 188 chevaux de 4 régions de Turquie, a montré, bien qu'avec des taux plus bas, une tendance similaire de séroprévalence pour l'EHV-4 (56,9 %) plus élevée que pour l'EHV-1 (3,7 %) (Gür and Yapici 2008). Toujours en Turquie, une étude publiée en 2009 rapporte cette fois une séroprévalence de 14,5 % pour l'EHV-1 contre 81,7 % pour l'EHV-4 sur 290 chevaux testés (Ataseven *et al.* 2009). Bien que toutes ces études montrent une séroprévalence pour l'EHV-4 plus élevée que pour l'EHV-1, les variations entre pays pourraient s'expliquer par des modes de vie et des pratiques différentes mais également par la diversité des tests sérologiques utilisés lors des études. Par ailleurs, de par la courte durée de l'immunité contre l'EHV-1, il est possible que l'estimation de la séroprévalence de l'EHV-1 soit biaisée par des profils de chevaux porteurs non immunisés mais porteurs de l'EHV-1 à l'état latent. C'est pourquoi certaines équipes ont également étudié la prévalence de l'EHV-1 et de l'EHV-4 en recherchant la présence de ces virus à l'état latent. De nouveau, la tendance va vers une plus forte prévalence de l'EHV-4 par rapport à l'EHV-1 comme c'est le cas dans une étude menée sur des prélèvements de 40 chevaux au profil variable (âge, race, activité) et issus d'un abattoir du Sud Est de l'Angleterre, qui décrit cette fois l'isolement d'EHV-1 ou EHV-4 chez 60 % des chevaux (22/40) avec 14 % d'EHV-1 seul, 36 % d'EHV-4 seul et 50 % d'EHV-1 et EHV-4. Lors de l'analyse PCR au niveau des nœuds lymphatiques bronchiques, une proportion plus importante de tissus infectés a été observée avec 87,5 % des 40 chevaux positifs pour l'EHV-1 et/ou EHV-4 et une distribution de 30 % de positifs pour l'EHV-1, de 25 % de positifs pour l'EHV-4 et de 32 % de positifs pour les deux virus (Edington, Welch and Griffiths 1994). Une

autre étude menée dans le Kentucky (Etats-Unis) par Allen *et al.* et publiée en 2006 montre une détection d'ADN d'EHV-1 latent chez 8/12 (66 %) chevaux âgés au passé infectieux inconnu et chez 18/24 (75 %) juments ayant subi une infection expérimentale 4 à 5 ans avant l'étude (Allen 2006). Enfin, une étude portant sur 70 pur-sangs pratiquant la course en compétition en Californie (Etats-Unis), a montré que 82,8 % des chevaux étaient porteurs de l'EHV-4 à l'état latent contre 25,7 % porteurs de l'EHV-1 à l'état latent (Pusterla *et al.* 2012). Comme souligné par Lunn *et al.* (2009), la prévalence de l'EHV-1 à l'état latent semble variable selon la population ciblée, la région géographique ou encore les techniques de détection utilisées. Les auteurs de ce « Consensus Statement » suggèrent, par conséquent, que les cliniciens devraient considérer que 60 % de la population équine est porteuse de l'EHV-1 à l'état latent (Lunn *et al.* 2009).

c. EHV-1 en France

Il existe peu d'études rendant compte de la prévalence de l'EHV-1 en France. Comme mentionné précédemment, la collecte des données épidémiologiques de l'EHV-1 en France est prise en charge par le RESPE. En ce qui concerne l'EHV-1, les déclarations, non obligatoires et effectuées par des vétérinaires sentinelles, sont organisées en 3 réseaux selon les trois formes de la maladie (syndrome respiratoire aigu, syndrome nerveux, avortement) comme l'expliquent Legrand *et al.* (2012) dans leur communication sur la prévalence de l'EHV-1 en 2010 (Figure 23) (Legrand *et al.* 2012). Une analyse détaillée des données collectées entre janvier 2010 et décembre 2012 par le RESPE a par ailleurs été présentée en 2014 par Adeline Petit dans le cadre d'une thèse vétérinaire (Petit 2014). Cette analyse a permis de rendre compte d'une proportion plus élevée de la forme respiratoire en comparaison avec les formes abortive et nerveuse de la maladie, d'un nombre élevé de cas positifs déclarés en Basse Normandie qui est une région ayant un pourcentage de jeunes chevaux et de naissances supérieur aux autres régions, et d'une prévalence d'infection à l'EHV-1 détectée par PCR de 7,4 % sur trois années (158 positifs sur 2 150 déclarations) (Petit 2014).

Un autre aspect de l'épidémiologie est le suivi des souches sur le terrain. L'analyse moléculaire de souches collectées en complément des données cliniques associées permet parfois d'amorcer la compréhension des mécanismes d'infection des souches, mais a également pour but d'aider à établir des liens épidémiologiques entre des épisodes infectieux rapprochés dans le temps et/ou dans l'espace.

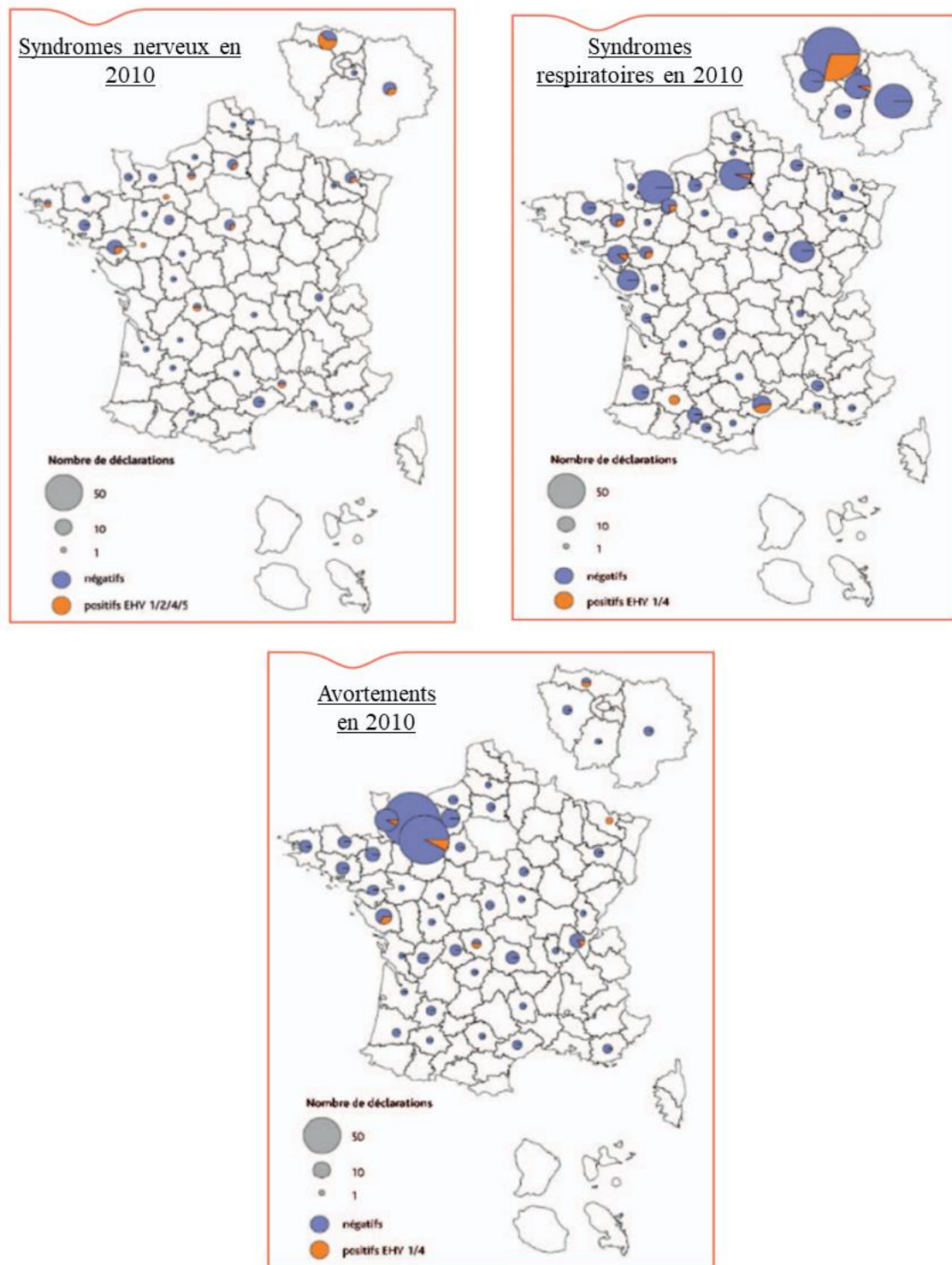


Figure 23 Répartitions géographiques des déclarations au RESPE selon les trois réseaux (respiratoire aigu, syndrome nerveux, et avortement) en France pour l'année 2010.

G. Phylogénie et caractère neuropathogène des variants d'EHV-1

La phylogénie permet de suivre l'évolution génétique d'espèces biologiques, dont les virus, caractérisée par l'apparition de mutations (substitutions, délétions ou insertions) ou de recombinaisons et les distinguant de leurs ancêtres. La théorie Darwinienne suppose que l'évolution reflète une sélection en faveur de la persistance des organismes. Dans le cas des virus, cette persistance n'est possible qu'à travers leur hôte. C'est pourquoi la phylogénie des virus peut aussi être interprétée comme reflet d'une co-évolution virus/hôte (pour revue, Gorbalenya 2008). Comme expliqué par Gorbalenya *et al.*, alors que l'évolution des espèces cellulaires se fait selon un modèle d'horloge moléculaire, il semble que l'évolution des virus soit plus fluctuante et que leur génome possède des régions parfois plus mutagènes que d'autres (pour revue, Gorbalenya 2008). Cette évolution n'est pas systématiquement linéaire dans le temps, particulièrement lorsque des phénomènes dits horizontaux, tels que la recombinaison par exemple, se produisent. L'EHV-1 est un virus à ADN. Contrairement aux virus à ARN, la réplication de ces virus à ADN est plus fidèle et le nombre de mutations observées sur un même laps de temps est plus faible. Le suivi de l'évolution en est complexifié, le taux de variabilité d'une souche à l'autre étant faible (0,1 % entre les souches Ab4 et V592 ; Nugent *et al.* 2006). Par ailleurs, les herpesvirus ont la capacité d'entrer en phase latente au cours de laquelle la réplication est fortement réduite, limitant ainsi les phénomènes de mutation et recombinaison. La recombinaison lors de la phase lytique a cependant été montrée lors de co-infections *in vivo* (Schynts *et al.* 2003). De telles caractéristiques sont en faveur de l'absence de linéarité dans l'évolution des variants. Enfin, l'évolution d'une espèce de virus correspond à l'évolution des différents variants (souches) de cette espèce et peut aussi être comparée à celle d'une espèce proche. L'analyse du génome de souches virales en complément des données épidémiologiques et cliniques est donc une étape clé dans la compréhension du fonctionnement d'un virus en comparaison ou non avec des virus de même famille/sous-famille/genre et de l'impact d'une mutation sur son cycle de vie.

En ce qui concerne l'EHV-1, l'analyse du génome a été initiée grâce à la technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction («restriction fragment length polymorphism » RFLP). Le séquençage Sanger a ensuite permis d'obtenir la première séquence complète du génome d'une souche d'EHV-1 mais également d'analyser de manière plus précise certaines portions du génome. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) rend désormais le séquençage du génome complet de souches d'EHV-1 moins laborieux que le

séquençage Sanger et a permis d'initier des analyses génomiques sur un plus grand nombre de souches (Bryant *et al.* 2018).

a. Etude du génome de l'EHV-1

Les premières caractéristiques physico-chimiques (taille du génome, densité) et nucléotidiques du génome de l'EHV-1 ont été déterminées au début des années 1960 (Darlington and Randall 1963; Soehner, Gentry and Randall 1965). L'analyse par enzyme de restriction ainsi que la microscopie électronique ont ensuite permis d'identifier la structure du génome, de différencier l'EHV-1 de l'EHV-4 et de distinguer 16 variants de l'EHV-1, dont deux dominants, EHV-1.1B et EHV1.1P (Henry *et al.* 1981; Whalley, Robertson and Davison 1981; Ruyechan, Dauenhauer and O'Callaghan 1982; Allen *et al.* 1983; Chowdhury, Ludwig and Buhk 1988; Kirisawa *et al.* 1993b; pour revue, van Maanen 2002; Pagamjav *et al.* 2005). Il a alors été observé que les souches EHV-1.1B étaient majoritairement isolées lors d'avortements, alors que seul le prototype EHV-1.1P était isolé lors de cas associés à des formes nerveuses, bien qu'isolé également lors de cas d'avortements (Allen *et al.* 1983; Pagamjav *et al.* 2005). Par la suite, l'analyse par PCR de longs fragments a permis de montrer que le prototype EHV-1.1B était le fruit d'une recombinaison entre le prototype EHV-1.1P et l'EHV-4 au niveau de l'ORF64 (Pagamjav *et al.* 2005). Le premier séquençage complet de l'EHV-1 a été réalisé par Telford *et al.* en 1992 sur un clone de la souche Ab4 (Ab4b) isolée lors d'un épisode infectieux impliquant la paralysie de l'animal. La comparaison de ce génome aux deux autres séquences d'herpèsvirus disponibles à cette date (HSV et VZV) a permis une avancée considérable des connaissances du génome de l'EHV-1 (Mumford and Edington 1980; Telford *et al.* 1992). Cette souche est aujourd'hui considérée comme une des souches de référence pour l'EHV-1. Depuis, d'autres souches d'EHV-1 ont pu être séquencées dans leur intégralité, comme c'est le cas de la souche V592 isolée lors d'un épisode d'avortements et également qualifiée de souche de référence aux côtés de la souche Ab4 (Mumford *et al.* 1987; Nugent *et al.* 2006). En 2018, le séquençage complet de 78 souches par une équipe anglaise a permis d'alimenter de manière considérable la banque de séquences complètes d'EHV-1 (Bryant *et al.* 2018). Les auteurs ont pu ainsi construire la première phylogénie sur génome complet incluant un panel de souches d'autres pays (Australie, Nouvelle-Zélande, Japon, Etats-Unis et Chine principalement) dont le génome complet était déjà disponible. Une des classifications proposées, basée sur la région U_L du génome (80 % du génome), a permis de différencier les souches en 13 clades (Bryant *et al.* 2018). L'étude a permis d'évaluer la diversité des souches au sein du Royaume-Uni et de faire

un premier constat que cette diversité ne distinguait probablement pas les souches d'autres continents des souches anglaises.

Désormais, l'analyse du génome de l'EHV-1 peut se faire à trois échelles. La plus grande échelle est celle du séquençage complet comme nous l'avons décrit précédemment. Elle représente cependant un certain investissement technique et financier qui a motivé un grand nombre d'équipes à mettre au point des techniques moins coûteuses et laborieuses mais permettant une analyse phylogénique et une caractérisation génétique la plus robuste possible. Ainsi, à moyenne échelle, l'analyse multiple de loci positionnés sur l'ensemble du génome viral représente une bonne alternative au séquençage complet. Cette technique de « Multi Locus Sequence Typing » (MLST) pour l'EHV-1 a été mise au point par Garvey *et al.* en se basant sur les travaux d'une autre équipe (Nugent *et al.* 2006) ayant comparé les deux souches de références décrites précédemment (Garvey *et al.* 2019). Cette comparaison avait, en effet, permis de mettre en évidence un certain nombre de mutations, silencieuses ou non. Ce sont ces mutations non silencieuses (n=31), c'est-à-dire entraînant un changement d'acide aminé dans la séquence protéique encodée, qui ont été sélectionnées pour la MLST de l'EHV-1 et complétées de 7 loci additionnels identifiés sur d'autres souches (Nugent *et al.* 2006; Garvey *et al.* 2019). A partir du simple typage de 36 loci (au total 38 acides aminés) répartis sur 26 ORFs, Garvey *et al.* ont pu retrouver une classification similaire à celle en 13 clades proposée grâce au séquençage complet de la région U_L, validant ainsi la robustesse de la technique MLST (Bryant *et al.* 2018; Garvey *et al.* 2019). A plus petite échelle encore, l'étude du génome de l'EHV-1 peut se faire par le séquençage d'un ORF cible. L'enjeu repose alors sur le choix de l'ORF selon le sujet d'étude. Deux ORFs sont régulièrement séquencés et considérés comme des marqueurs génétiques de la phylogénie, il s'agit des ORF68 (codant la protéine U_S2) et 30 (codant l'ADN polymérase). Toujours selon l'étude publiée par Nugent *et al.* (2006), l'ORF68 semble avoir un taux de variation des plus élevés parmi l'ensemble des ORFs (2 %) et tout particulièrement au niveau d'une région d'environ 60 pb (Nugent *et al.* 2006). Cet ORF représente donc un marqueur génétique adéquat pour évaluer l'évolution des souches. Suite à leur étude en 2006, Nugent *et al.* ont proposé une classification en 6 groupes précurseurs des clades décrits par Bryant *et al.* en séquençage complet et Garvey *et al.* en MLST, en se basant sur l'ORF68 (Goodman *et al.* 2007; Bryant *et al.* 2018; Garvey *et al.* 2019). L'ORF30, comme décrit précédemment, est le gène codant l'ADN polymérase. Ce gène indispensable à la réplication porte plusieurs régions très conservées parmi les herpesvirus (Nugent *et al.* 2006). Chez l'HSV-1 et l'HSV-2, l'ADN

polymérase est décrite comme particulièrement polymorphique. Chez l'EHV-1, ce polymorphisme est approximativement de 10 (Nugent *et al.* 2006; Burrell *et al.* 2010; Schmidt *et al.* 2015; Bryant *et al.* 2018). Une substitution non silencieuse a été identifiée au niveau de cet ORF30 en position 2 254 (752 de la séquence protéique) comme significativement corrélée aux signes cliniques, distinguant les signes nerveux des signes non-nerveux (Nugent *et al.* 2006). Le typage de cette mutation constitue un dernier échelon d'analyse du génome de l'EHV-1 qui a entraîné de nombreux travaux au sein de la communauté scientifiques et que nous décrirons dans la section suivante.

b. Souches neuropathogènes et non-neuropathogènes

Les facteurs déterminants l'apparition de signes nerveux ou d'avortements ne sont pas encore bien définis et font l'objet de nombreuses recherches. Au vu du nombre croissant de cas de myéloencéphalopathies liées à l'EHV-1, une évaluation approfondie des possibles facteurs de risques pour cette forme de maladie a été publiée lors d'une crise infectieuse touchant 242 chevaux dans 19 états américains, en prenant en compte les données cliniques, biologiques, épidémiologiques et environnementales (Traub-Dargatz *et al.* 2013). Les principaux facteurs identifiés étaient liés aux mesures de biosécurité mises en place, au sexe des animaux (les juments étant plus touchées que les mâles) et à une vaccination moins de 5 semaines avant l'épisode infectieux. Ces facteurs bien qu'aggravants ne suffisent cependant pas à expliquer l'apparition variable de la maladie nerveuse lors d'une infection par l'EHV-1. Une autre étude menée en France a pour sa part étudié les données cliniques et épidémiologiques de 26 cas de myéloencéphalopathie liée à l'EHV-1 en comparaison avec 29 cas de myéloencéphalopathie non associée à l'EHV-1 par les outils de diagnostic. Le principal facteur de risque identifié à l'issue de cette étude est l'introduction d'un nouvel animal au sein effectif. La vaccination étant variable au sein des deux groupes étudiés, cette dernière n'a pas été identifiée comme un facteur de risque dans l'étude (van Galen *et al.* 2015).

Actuellement, seulement un marqueur génétique a pu être associé à la neuropathogénicité. Les données épidémiologiques en lien avec ce marqueur génétique seront reprises dans les prochains paragraphes, puis les investigations plus en lien avec la physiopathologie des souches selon leur génotype pour ce marqueur seront abordées.

En 2006, les travaux de Nugent *et al.* ont mis en évidence une corrélation significative entre l'apparition de signes nerveux et l'infection par des souches portant une mutation non silencieuse en position 2 254 du gène de l'ADN polymérase (ORF30) (Nugent *et al.* 2006).

Sur un total de 131 souches isolées sur le terrain, 95 % isolées à partir de cas non nerveux portaient une adénine en position 2 254 (A₂₂₅₄ – asparagine en position 752 de la séquence protéique (N₇₅₂) et 86 % isolées lors de cas nerveux portaient une guanine en cette même position (G₂₂₅₄ – acide aspartique D₇₅₂). La qualification de souches non-neuropathogènes a donc été donnée aux souches porteuses A₂₂₅₄ (N₇₅₂), alors que la qualification de souches neuropathogènes a été donnée aux souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂). Deux études ont alors cherché à montrer le degré d'implication de cette mutation dans les formes nerveuses de la maladie causée par l'EHV-1. La première étude menée par Goodman *et al.* (2007) s'est intéressée à la souche Ab4 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) (Goodman *et al.* 2007). Cette étude a été menée sur deux groupes de 4 poneys Welsh Mountain de 2 ans et sur deux groupes de 7 chevaux de races variées et d'âges allant de 3 à 16 ans. L'inoculation du mutant N₇₅₂ de cette souche n'a pas entraîné l'apparition de signes cliniques neurologiques chez les chevaux infectés, alors que l'inoculation de son révertant D₇₅₂ a entraîné chez certains chevaux une inflammation du système nerveux central et une ataxie. L'infection *in vitro* de PBMCs par les deux variants a permis de mettre en évidence une différence de tropisme cellulaire. Les souches D₇₅₂ ont en effet infecté préférentiellement et de manière significative les CD4+ alors que les souches N₇₅₂ ont infecté les monocytes et les lymphocytes B. Une seconde étude menée par Van de Walle *et al.* (2009) s'est cette fois intéressée à la souche NY03 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) (Van de Walle *et al.* 2009). Des formes recombinantes N₇₅₂ et D₇₅₂ de cette souche ont été inoculées chez respectivement 3 et 6 chevaux. A l'issue de l'étude, les auteurs ont pu montrer l'induction de signes neurologiques chez 2 des 6 chevaux infectés par le mutant D₇₅₂ ainsi qu'une virémie dans les PBMC augmentée en comparaison au groupe infecté par le variant N₇₅₂ qui n'a pas montré de signes neurologiques (Van de Walle *et al.* 2009). Ces deux études ont permis aux auteurs de suggérer que les deux types de souches avaient bien un potentiel pathogénique différent. Cette corrélation n'a pas toujours été retrouvée lors d'études similaires. Alors que dans une étude menée par Perkins *et al.* (2009) une grande tendance des deux génotypes A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂) à engendrer respectivement des cas d'avortement et nerveux a été retrouvée, un pourcentage de 24 % des isolats issus de cas nerveux arborant le génotype A₂₂₅₄ (N₇₅₂) a été mis en évidence (Perkins 2009). Cette étude a cependant estimé que la probabilité qu'une forme nerveuse soit associée à une souche de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂) est 162 fois supérieure à celle qu'elle soit associée à une souche de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂). Alors que Smith *et al.* en 2010 ont montré l'isolement croissant au fil des années de souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) à partir de prélèvements issus d'avortements, il semble que les souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) seraient plutôt qualifiables d'abortives se distinguant des souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) retrouvées dans les différentes

formes de maladies (pour revue, Vissani *et al.* 2009; Pronost *et al.* 2010b; Smith *et al.* 2010; Fritsche and Borchers 2011; Damiani *et al.* 2014; Stasiak *et al.* 2015; Garvey *et al.* 2019; Pusterla *et al.* 2020; Stasiak, Dunowska and Rola 2020). Cette relation entre le génotype et le pathotype a fait l'objet d'une revue publiée en 2010 par Pronost *et al.* qui suggéraient alors que cette association était peut-être « simpliste », invitant ainsi l'étude d'autres facteurs impliquant l'environnement et l'hôte (Pronost *et al.* 2010a).

Lors de l'étude menée par Smith *et al.* (2010) mentionnée précédemment, l'équipe a pu identifier des souches d'EHV-1 porteuses de la mutation G₂₂₅₄ (D₇₅₂) isolées dans les années 1950 (Smith *et al.* 2010). A travers le typage de 426 isolats récoltés entre 1951 et 2006, l'équipe a ainsi pu faire état d'une augmentation de la prévalence du génotype G₂₂₅₄ (D₇₅₂) au fil des années. Il semble cependant que cette augmentation de la prévalence soit particulièrement prononcée en Amérique du Nord et en Europe (pour revue, Gulati *et al.* 2016). Comme vu précédemment, il est intéressant de noter qu'une telle corrélation génotype/pathotype avait déjà été soumise par Allen *et al.* 1985 avec les prototypes EHV-1.1B (plutôt associés aux formes abortives) et les prototypes EHV-1.1P (uniquement trouvés lors d'épisodes nerveux), mais une seule étude à notre connaissance a exploré une possible corrélation entre le génotype en position 2 254 et les prototypes B et P (Allen *et al.* 1985; Costa *et al.* 2015). Cette étude, bien que portant sur un faible nombre d'isolats (n=8) montrait que les souches P (associées à la neuropathogénicité) étaient toutes de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂) (Costa *et al.* 2015).

Le gène de l'ADN polymérase comporte des régions conservées parmi les herpèsvirus. La position équivalente à la position 2 254 (752 pour la protéine) en fait partie. Comme l'a souligné l'équipe anglaise de Nugent *et al.* (2006), il semble que l'acide aspartique (D) soit l'acide aminé le plus conservé en cette position chez de nombreux herpèsvirus. Cela suggère ainsi que tout autre acide aminé en cette position serait le fruit d'une évolution à partir d'une souche ancestrale porteuse d'un acide aspartique. Bien que les cas nerveux associés à l'EHV-1 aient été observés chronologiquement plus tardivement que les cas abortifs, cela laisse à penser que les souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) qualifiées de non-neuropathogènes auraient évolué à partir des souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) communément qualifiées de neuropathogènes.

Par ailleurs, la mutation, bien que non essentielle à la croissance du virus *in vitro*, a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* mettant en évidence des différences de comportement entre les deux souches notamment lors de la mise en place de la virémie

(Gryspeerdt *et al.* 2010; Ma, Lu and Osterrieder 2010; Vandekerckhove *et al.* 2010; Laval *et al.* 2017; Poelaert *et al.* 2018, 2019b, 2019a). De nouveau cette différence de comportement va dans le sens d'une évolution adaptative des souches qualifiées d'abortigéniques (N₇₅₂). C'est ce que suggèrent Poelaert *et al.* (2018) qui, après avoir mesuré les niveaux d'IFN- α (inhibiteur de la réplication virale) induits par les deux types de souche (abortigénique (N₇₅₂) et neuropathogène (D₇₅₂)), ont pu constater une variation de sensibilité à l'IFN- α et de comportement au contact d'un inhibiteur de l'IFN- α . Cette étude soutient l'hypothèse que les souches abortives auraient développé un mécanisme de résistance à l'IFN- α leur permettant d'échapper à la mise en place de la réponse immunitaire innée (Poelaert *et al.* 2018). Ce phénomène de résistance à l'IFN- α a déjà été décrit chez d'autres alphaherpèsvirus tels que l'HSV-1 par exemple, par l'inhibition des voies de signalisation des interférons de type I par des protéines virales (Härle *et al.* 2002; pour revue, Melchjorsen, Matikainen and Paludan 2009; Johnson and Knipe 2010). De même, la régulation de l'expression de chimiokines activatrices de la réponse innée est également une stratégie employée par l'EHV-1 pour contourner la réponse immunitaire. Il semblerait que la souche Ab4 qualifiée de neuropathogène sous-régule l'expression de ce type de chimiokine en comparaison avec une souche non-neuropathogène NY03 et la souche vaccinale RACL11, augmentant ainsi sa pathogénicité (Wimer *et al.* 2011). Une autre étude allant dans le même sens montre cette fois une réduction de la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par des PBMCs infectés par la souche neuropathogène Ab4, en comparaison aux mêmes souches RACL11 et NY03. Cette sous-régulation de la production d'IL-10 pourrait expliquer une capacité accrue de la souche à causer une inflammation et expliquer l'apparition de formes nerveuses de la maladie (Wagner *et al.* 2011). D'autre part, après avoir montré l'implication d'histones déacétylases dans la répression de la réplication de PBMC et plus précisément de CD172a⁺ nasaux et sanguins, Laval *et al.* ont également pu mettre en évidence que cette régulation semblait être plutôt restreinte aux souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂). D'autres investigations menées par Poelaert *et al.* montrent pour leur part une induction accrue par les souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) de la production des chimiokines CXCL9 and CXCL10 impliquées dans le recrutement de cellules mononuclées (Poelaert *et al.* 2019a). Ces résultats vont de nouveau dans le sens d'une évolution des souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) vers les souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) capables de rester sous silence au sein des PBMCs et d'ainsi mieux éviter la réponse immunitaire de l'hôte. Cela pourrait conditionner un pathotype plutôt qu'un autre (Laval, Favoreel and Nauwynck 2015; Laval *et al.* 2017). Cette suggestion, en accord avec des études précédentes, s'inscrit dans un contexte de stratégies multiples d'évasion puisque les deux types de souches sont capables d'installer une

virémie cellulaire et d'infecter des organes périphériques (Vandekerckhove *et al.* 2010; Laval, Favoreel and Nauwynck 2015; Laval *et al.* 2017). Un autre phénomène du même type observé *in vivo* et *in vitro* est le franchissement retardé de la membrane basale par les souches N₇₅₂ au niveau de l'épithélium respiratoire sans qu'une explication n'ait pu être apportée (Gryspeerd *et al.* 2010; Vandekerckhove *et al.* 2010). En ce qui concerne le tropisme cellulaire des deux types de souche, les connaissances sont controversées. Une étude menée par Goodman *et al.* rapporte une infection plus prononcée des lymphocytes CD4⁺ par les souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) (Goodman *et al.* 2007). Deux autres études menées sur différents isolats de types A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂), ont montré que les souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂) infectaient préférentiellement les cellules CD172a⁺ alors que les souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) montraient un tropisme à la fois pour les cellules CD172a⁺ et les lymphocytes T (Gryspeerd *et al.* 2010; Vandekerckhove *et al.* 2010). Enfin des études *in vitro* portant sur des molécules antivirales ciblant l'ADN polymérase ont également montré des résultats divergents. Goodman *et al.* (2007) et Van de Walle *et al.* (2009) ont montré une sensibilité accrue des souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) à l'aphidicoline en comparaison aux souches mutantes (Goodman *et al.* 2007; Van de Walle *et al.* 2009). A l'inverse Thieulent *et al.* (2020) n'ont pas montré de différence de sensibilité significative à l'aphidicoline entre deux souches isolées sur le terrain et de profil respectif A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂). Cette explication pourrait s'expliquer encore une fois par des profils de souches différents (Thieulent *et al.* 2020b).

Les études menées sur les mécanismes d'infection des deux types de souches (D/N₇₅₂) sont récentes, il est probable que les prochaines années apporteront de nouveaux éléments aux connaissances jusqu'alors acquises.

D'ailleurs, une étude publiée en 2019 par Brosnahan *et al.* porte sur la recherche de marqueurs génétiques chez l'hôte, pouvant expliquer l'apparition d'une forme nerveuse suite à une infection par l'EHV-1 chez certains chevaux mais pas chez d'autres. Un premier marqueur génétique équin a pu être corrélé avec l'apparition de cette forme de maladie au sein de l'échantillonnage de l'étude (Brosnahan *et al.* 2019). Les résultats de cette étude n'ont cependant pas été confirmés par une étude plus récente publiée par Dunuwille *et al.* 2020 (Dunuwille *et al.* 2020). Bien qu'aucun marqueur génétique spécifiquement associé à la forme nerveuse de maladie causée par l'EHV-1 n'ait pu être identifié, les auteurs n'excluent pas que le patrimoine génétique soit impliqué dans la façon dont l'hôte réagit à l'infection par ce

virus. Ces approches par métagénomique, comme celle menée par Zarski *et al.* (2021), ouvrent la voie à l'identification de nouveaux marqueurs (Zarski *et al.* 2021).

Cette introduction bibliographique rend compte de la complexité des interactions entre l'EHV-1 et son hôte naturel. A l'issue de cette dernière partie introduisant la phylogénie de l'EHV-1, nous énoncerons dans un second chapitre les objectifs de cette thèse visant à mesurer la variabilité de souches d'EHV-1 en France mais aussi à estimer le niveau de protection de la population équine face à ce virus par le développement d'une méthode innovante de séroneutralisation en temps réel.

Chapitre 2.

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

Ce projet de thèse s'inscrit dans une problématique d'étude et de gestion de crises sanitaires liées à l'EHV-1. Ce virus latent après la première infection n'a d'incidence que sur la proportion la plus fragile de la population équine mais représente certainement le pathogène viral ayant l'impact sanitaire et économique le plus important sur cette filière. L'étude de ce pathogène est donc primordiale pour optimiser les stratégies de lutte existantes. Ces stratégies s'inscrivent à plusieurs échelles, celle des mesures sanitaires, celle du dépistage et du suivi moléculaire des souches, celle de la prévention et celle de la thérapie antivirale. C'est sur deux de ces stratégies que le projet de cette thèse s'est porté, qui sont le suivi moléculaire des souches d'EHV-1 en France et la prévention par l'étude d'un paramètre du statut immunitaire de populations ciblées.

Le suivi moléculaire de l'EHV-1, permet l'acquisition d'informations précieuses concernant les souches infectieuses, leur circulation et leur potentielle évolution. Ces informations ne sont pas forcément utilisées au moment même des épisodes infectieux, mais permettent une meilleure compréhension des événements et éventuellement de leur origine. En effet des traceurs génétiques permettant de trouver l'origine d'un épisode infectieux (introduction d'un animal infecté ou réactivation d'une souche latente suite à un stress, une faiblesse immunitaire, etc.) pourraient par exemple présenter l'utilité d'adapter les pratiques de l'élevage et minimiser les risques pour l'avenir. Ce suivi moléculaire a déjà fait l'objet de plusieurs études de par le monde mettant en lumière différents types d'outils permettant une étude du génome plus ou moins large. Dans le cadre de cette étude, nous avons cherché à réaliser un état des lieux de souches collectées en France et en Belgique et conservées dans notre laboratoire depuis les dix dernières années, et ce, à l'aide de trois outils moléculaires. Le premier outil utilisé nous a permis de classer les souches selon leur génotype en position 2 254 de l'ORF30. Nous avons ensuite analysé certaines de ces souches sur l'ORF30 complet cette fois dans le but d'étudier leur lien phylogénique à partir de cette portion du génome. Enfin, nous avons utilisé la méthode du Multi Locus Sequence Typing présentée en 2019 par Garvey *et al.*, et considérée comme représentative de l'ensemble du génome de l'EHV-1, pour une analyse phylogénique cette fois plus globale des souches. Nous avons également souhaité élargir nos investigations auprès de 3 souches d'alphaherpèsvirus d'intérêt isolées sur terrain, en étudiant leur croissance *in vitro* mais également leur réponse à des molécules antivirales d'efficacité connue contre l'EHV-1.

L'étude du statut immunitaire de la population équine constitue également une des méthodes les plus robustes de lutte. Bien que les techniques de vaccination ne permettent pas de contrer complètement les infections par l'EHV-1, et par conséquent de contrôler l'occurrence de la forme abortive et de la forme nerveuse de maladie, le principe d'immunité de groupe reste applicable et nécessite, pour une application rigoureuse, un suivi immunologique. De nombreuses techniques décrites dans la partie introductive de ce document permettent un tel suivi. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à la méthode de séroneutralisation (SN) permettant un dosage de l'ensemble des anticorps neutralisant l'EHV-1. Nous avons souhaité développer, à partir de la méthode de référence actuelle, un modèle quantitatif de mesure en temps réel par l'utilisation de la technologie xCELLigence® (Real Time Cell Analysis (RTCA), ACEA) et ainsi établir une preuve de concept de l'utilisation de cette méthode de « Real-Time Neutralisation Assay » (RTNA) pour mesurer les anticorps neutralisant l'EHV-1. Par l'utilisation de cette méthode, nous avons voulu étudier le statut immunitaire de différentes populations de chevaux exposées à une infection expérimentale ou à la vaccination.

Chapitre 3.

PROJET SCIENTIFIQUE ET METHODE

A. Etude phylogénique de l’EHV-1 en France et découverte fortuite de deux autres alphaherpèsvirus des équidés

a. *Article 1: Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion*

Introduction

Comme mentionné précédemment, les herpesvirus ont très largement conquis le règne animal et ont co-évolué avec de nombreuses espèces. Leur spectre d’hôte est probablement plus large que ce dont rendent compte les connaissances actuelles, comme le suggère Andrew J. Davison dans sa revue publiée en 2002. L’auteur explique notamment que cette co-évolution semble avoir été perturbée chez l’humain et certaines espèces domestiquées causant chez leur(s) hôte(s) des signes cliniques parfois graves (pour revue, Davison 2002). C’est probablement le cas de l’EHV-1 engendrant des signes cliniques chez le cheval qui suscitent de grandes inquiétudes pour la filière équine, notamment en raison de la difficulté de traitement des formes nerveuses. L’importance d’un suivi phylogénique de l’EHV-1 et, par conséquent, de l’étude de son génome à travers différentes souches collectées sur le terrain, prend alors tout son sens. Ce suivi permet en effet d’enrichir les connaissances acquises et, à la manière d’un puzzle, de comprendre la complexité de ce virus pour mieux anticiper les épizooties et en limiter l’étendue. Cette étude phylogénique, comme nous l’avons décrit précédemment, peut se faire à plusieurs échelles. Un premier niveau d’analyse correspond au simple typage d’une mutation d’intérêt, comme c’est le cas avec la mutation non-silencieuse en position 2 254 du gène de l’ADN polymérase. Ce polymorphisme a en effet été identifié comme potentiellement associé à la neuropathogénicité des souches (Nugent *et al.* 2006). Un second niveau d’analyse du génome est le séquençage d’ORFs d’intérêts comme les ORF30 et ORF68 souvent utilisés comme marqueurs phylogéniques ces dernières années (Nugent *et al.* 2006; Bryant *et al.* 2018; Garvey *et al.* 2019). Un troisième niveau d’analyse est le typage par « multi locus sequence typing » (MLST), récemment montré chez l’EHV-1 par Garvey *et al.* (2019) comme étant très représentatif du dernier niveau d’analyse qui est le séquençage complet du génome, ce dernier ayant permis de différencier un panel de souches d’EHV-1 en 13 clades (Bryant *et al.* 2018; Garvey *et al.* 2019). Alors que ces outils ont été utilisés dans différents pays, aucune analyse phylogénique n’a été réalisée sur des souches françaises d’EHV-1. L’objectif de cette première partie de projet de thèse était donc de réaliser un état des lieux phylogénique de souches circulant en France depuis 2009, en utilisant trois outils

moléculaires différents : le typage de la mutation non-silencieuse en position 2 254 de l'ORF30, le séquençage complet de l'ORF30 et l'analyse par MLST permettant d'obtenir des séquences d'acides aminés concaténées. La technique de MLST sur le génome de l'EHV-1 a été développée par Marie Garvey et ses collaborateurs à l'Irish Equine Centre (IEC), localisé à Naas en Irlande. C'est à l'issue d'un séjour à l'IEC aux côtés de cette équipe que la technique et les subtilités de cette analyse m'ont été transmises, me permettant ainsi d'enrichir notre étude. Les résultats de cette étude, ainsi que la description d'un épisode infectieux impliquant les trois formes de maladies dans un haras normand et nous donnant accès à différentes souches, ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Viruses*.

En complément, l'analyse des séquences nucléotidiques concaténées obtenues par MLST d'une partie des souches présentées dans l'article qui suivra, a permis d'ajouter des éléments de discussion concernant cette technique.

Article

Sutton G, Garvey M, Cullinane A, Jourdan M, Fortier C, Moreau P, Foursin M, Gryspeerdt A, Maisonnier V, Marcillaud-Pitel C, Legrand L, Paillot R, Pronost S. **Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion.** *Viruses*. 2019 Oct 4;11(10):916. doi: 10.3390/v11100916. PMID: 31590336; PMCID: PMC6832873.

Remarque : des erreurs de mise en forme des données ont été identifiées après publication, c'est donc une version corrigée qui est présentée dans ce manuscrit.

Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion

Gabrielle Sutton ^{1,2,*}, Marie Garvey ³, Ann Cullinane ³, Marion Jourdan ⁴, Christine Fortier ^{1,2}, Peggy Moreau ⁵, Marc Foursin ⁵, Annick Gryspeerdt ⁶, Virginie Maisonnier ⁴, Christel Marcillaud-Pitel ⁴, Loïc Legrand ^{1,2}, Romain Paillot ^{1,2,†} and Stéphane Pronost ^{1,2,†}

¹ LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France; christine.fortier@laboratoire-labeo.fr (C.F.); loic.legrand@laboratoire-labeo.fr (L.L.); romain.paillot@laboratoire-labeo.fr (R.P.); stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr (S.P.)

² NORMANDIE UNIV, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France

³ Irish Equine Centre, Johnstown, Naas, County Kildare, Eircode: W91 RH93, Ireland; MGarvey@irishequinecentre.ie (M.G.); ACullinane@irishequinecentre.ie (A.C.);

⁴ RESPE, 14280 Saint-Contest, France; technicien@respe.net (M.J.); contact@respe.net (V.M.); c.marillaud-pitel@respe.net (C.M.-P.);

⁵ Clinique équine de la Boisrie, 61500, Chailloué, France; peg_moreau@yahoo.fr (P.M.); clin.eq.laboisrie@laposte.net (M.F.);

⁶ Equi Focus Point Belgium, 8900 Ypres, Belgium; annick.gryspeerdt@gmail.com ;

[†] The authors have contributed equally to the work

* Correspondence: gabrielle.sutton@laboratoire-labeo.fr ; Tel.: +33 2 31 41 93 61

Received: 14 August 2019; Accepted: 1 October 2019; Published: date

Abstract: Equine herpesvirus 1 (EHV-1) is an Alphaherpesvirus infecting not only horses but also other equid and non-equid mammals. It can cause respiratory distress, stillbirth and neonatal death, abortion, and neurological disease. The different forms of disease induced by EHV-1 infection can have dramatic consequences on the equine industry, and thus the virus represents a great challenge for the equine and scientific community. This report describes the progress of a major EHV-1 outbreak that took place in Normandy in 2009, during which the three forms of disease were observed. A collection of EHV-1 strains isolated in France and Belgium from 2012 to 2018 were subsequently genetically analysed in order to characterise EHV-1 strain circulation. The open reading frame 30 (ORF30) non-neuropathogenic associated mutation A₂₂₅₄ was the most represented among 148 samples analysed in this study. ORF30 was also sequenced for 14 strains and compared to previously published sequences. Finally, a more global phylogenetic approach was performed based on a recently described Multilocus Sequence Typing (MLST) method. French and Belgian strains were clustered with known strains isolated in United Kingdom and Ireland, with no correlation between the phylogeny and the time of collection or location. This new MLST approach could be a tool to help understand epidemics in stud farms.

Keywords: equine herpesvirus type 1; outbreak; respiratory disease; abortion; neuropathogenic strain; myeloencephalopathy; phylogeny; ORF30; MLST

1. Introduction

Equine herpesvirus 1 (EHV-1) is a member of the *Varicellovirus* genus, in the Alphaherpesvirus sub-family [1]. EHV-1 is known to infect horses as principal hosts but some cases have been reported in other equids and non-equid mammals [2–5]. Virus transmission occurs through direct

contact between horses, infectious aerosols, fomites, and/or indirectly by humans. More recently, transmission of herpesvirus after survival in water was reported. Experimentally, EHV-1 was shown to be stable and infectious in water for over a week under different conditions of pH, salinity, temperature, and turbidity, and up to three weeks under some of these conditions [6]. EHV-1 infection may induce several clinical forms of disease including respiratory infection (also called rhinopneumonitis) associated with pyrexia, cough, and respiratory distress, abortion in pregnant mares, stillbirth and neonatal death, and neurological disorders with symptoms ranging from mild ataxia to complete paralysis of the animal (EHV-1 inducing neurological disease is usually referred as Equine Herpesvirus Encephalomyelitis (EHM)) [7]. However, numerous factors may affect the nature and the extent of clinical signs of disease, such as age, sex, physical condition, prior infection history, and/or the nature of the EHV-1 strain. [8] After infection, the trigeminal ganglia and leukocytes have been identified as the sites of latency for EHV-1 [9,10]. The virus can be reactivated after environmental stimuli (e.g., stress) or therapeutic treatment (e.g., dexamethasone) and replicate in mucous tissues with subsequent dissemination to other hosts [11]. EHV-1 latency mechanisms are poorly understood, although gene regulation has been shown to play a major role in the process [12].

The linear double-stranded genome of EHV-1 is 150 kb long and consists of a unique long (U_L) and unique short region (U_S). Each of these regions is surrounded by small inverted sequences (Terminal Repeat Long (TRL)/Internal Repeat Long (IRL) and Terminal Repeat Short (TRS)/Internal repeat Short (IRS), respectively). The genome contains 80 open reading frames (ORFs), some of which show more genetic variability than others and contain sufficient variation for phylogenetic analysis [13]. Previous studies performed ORF and/or whole genome sequencing to study genetic polymorphism [14,15]. Whole genome comparison of two characterised strains, Ab4 [16] and V592 [17], identified a polymorphic region within ORF68 (herpes simplex virus type 1 US2 homologue), which was used to examine the genetic heterogeneity of EHV-1 isolates in several different countries [15,18]. Furthermore, a single point mutation of adenine to guanine at nucleotide position 2254 within ORF30 (DNA polymerase catalytic subunit) is often associated with EHV-1 different forms of disease [19–24]. Although it is not exclusive, A_{2254} (non-neuropathogenic) and G_{2254} (neuropathogenic) strains were more frequently associated with abortion and neurological disease, respectively [19,25]. Additionally, genome comparison of Ab4 and V592 identified non-synonymous substitutions that could be used for multi-locus sequence typing (MLST) of EHV-1 strains [19,26].

Due to its impact on animal welfare and performance, EHV-1 represents a major threat to the equine industry and a great interest and challenge for the equine veterinary and scientific community. This report aims to illustrate how challenging EHV-1 infection could be in the field through the description of a multi-syndromic outbreak that lasted over 9 months in 2009 and 2010. This outbreak involved 28 animals and different forms of disease were observed, including two EHM cases and four abortions. Both neuropathogenic and non-neuropathogenic strains were isolated from this major outbreak and were investigated alongside samples collected from 2012 to 2018. Different molecular analytic methods were applied to specimens from these outbreaks (2009, and from 2012 to 2018), including the ORF30 substitution $A_{2254}G$ typing, complete ORF30 sequencing, and Multi Locus Sequence Typing (MLST). These samples included EHV-1 strains isolated from the 2018 EHV-1 epizootic, which is considered to be the most important recorded in France for the last 30 years, with at least 56 outbreaks reported and leading to the cancellation of numerous equestrian events.

2. Materials and Methods

2.1. EHV-1 Outbreak Data Collection

Data related to EHV-1 outbreaks were collected from the diagnostic and equine research Institute LABEO and the French Epidemiological Surveillance Network for Equine Pathologies (Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Equine (RESPE)) and associated equine veterinary practitioners (see Table 1). From August 2009 to June 2010, 242 samples were collected on a stud farm during one single EHV-1 infectious episode (four tissue samples, 115 nasal swabs, one cerebrospinal fluid, 114 blood samples, and eight vaginal swabs). Concerning this outbreak, which happened on the same premise, mares and foals from the stud farm were divided in six groups while yearlings were kept apart. Mares with foals were divided in groups 1, 2, 3, and 4, while mares without foals were divided in groups 5 and 6. From 2012 to 2018, 180 samples were collected from individual EHV-1 outbreaks by the diagnostic and equine research Institute LABEO (France) (85 tissue samples, 82 nasal swabs, one tracheal liquid, four cerebro-spinal fluids, and 19 blood samples). Detailed information is presented in Supplementary Material (Table S1).

Table 1. Number of individual outbreaks of equine herpesvirus 1 (EHV-1) reported to Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Equine (RESPE) from 2012 to 2018.

Year	Respiratory	Abortion	Neurological	ND ¹	Total
2012	MD ²	MD	MD	MD	MD
2013	1	1	3	0	5
2014	14	10	3	0	27
2015	11	16	1	0	28
2016	11	8	7	3	32
2017	5	9	6	3	27
2018	15	16	5	20	56

¹ND = clinical form of disease not defined or reported. ²MD = missing data.

2.2. Biological Samples And Nucleic acids

Samples collected included body fluids (nasopharyngeal swabs, cerebrospinal fluid, tracheal liquid, vaginal swabs), fetal organs (lungs, liver, and placenta), or whole blood samples (EDTA). Nasal swabs were processed in 4 mL Eagle Minimal Essential medium or phosphate-buffered saline (PBS). For nucleic acid extraction, 140 µL of biological fluids extracts, 30 mg of organs, or 2–3 mL of blood were used. DNA was extracted using different extraction kits according to the type of sample: fluid extracts and organs were treated as previously described [27], blood samples were processed using the DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, Germany) prior to May 2015, and the NucleoSpin Blood L (Macherey-Nagel, Germany) post May 2015 according to manufacturer's recommendations. Twenty strains amongst the 180 strains collected were selected for ORF30 sequencing, including three strains collected from outbreaks of EHV-1 in Belgium. Belgian strains were available through a diagnostic collaboration with Equi Focus Point Belgium (equine infectious diseases surveillance network in Belgium) and were incorporated in this study due to the close epidemiological relationship between these two neighbouring countries. Sequenced strains were identified according to their location (French Region or Country) and year of collection, as follows: LOC/ID NUMBER/YEAR.

2.3. EHV-1 Identification And Quantification

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed on purified nucleic acids using Diallo et al. (2006) [28] primers and probe targeting glycoprotein B of EHV-1 (Forward Primer F1: 5'-CAT GTC AAC GCA CTC CCA-3'; Reverse Primer R1: 5'-GGG TCG GGC GTT TCT GT-3' and probe FAM-CCC TAC GCT GCT CC-MGB-NFQ). Viral load quantification was performed as

previously described [27,29]. A standard curve based on a cloned sequence was used. Results are expressed as a copy number per mL of nasopharyngeal swab extract. A volume of 2.5 µL of each sample was added to the PCR mixture composed of 12.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1.25 µL of each primer (at a concentration of 20 µM) and a defined volume of probe depending on the titration. The mixture was completed with nuclease free water to a final volume of 25 µL.

2.4. EHV-1 Strain Typing (ORF30 DNA Polymerase, Position 2254)

Real-time discriminatory allelic PCR was performed on purified nucleic acids using Allen et al. (2007) [22] primers targeting the EHV-1 ORF30 DNA polymerase (Forward Primer 5'-CCA CCC TGG CGC TCG-3'; Reverse Primer 5'-AGC CAG TCG CGC AGC AAG ATG-3') and probes ("non-neuropathogenic" A2254 Probe VIC-CAT CCG TCA ACT ACT C-MGB; "neuropathogenic" G2254 Probe 6-FAM-TCC GTC GAC TAC TC-MGB). The same mix as described in 2.3. was used for PCR, with 0.6 µL of each primer (at a concentration of 20 µM) and a defined volume of each probe.

2.5. ORF30 Sequencing And Analysis

Twenty EHV-1 samples were chosen for ORF30 sequencing, based on the disease type and the year of sampling (see Table S2 in Supplementary Material). Due to a lesser number of neurological outbreaks and low viral load of these samples of neurological origin, only one sample (BRE/13/2018) isolated during a neurological episode was selected. The EHV-1 strains NORM/1/2009 and NORM/2/2010 correspond to strains isolated from a foal during the 2009 outbreak (Section 3.1.2.) and the strain isolated from the foetus after Mare E abortion (Section 3.1.3), respectively. Biofidal (France) performed primer design and ORF30 (3.665 kb) sequencing. First, a primer set (EHV-1-ORF30-PCR-F: 5'-GAACGTGCGAGTGCTGTTTT-3' and EHV-1-ORF30-PCR-RC: 5'TGTGAAGGTCTGTTTCGACGG-3') was designed to amplify a 5kb region of EHV-1 including ORF30. The amplification mixture was composed of 5 µL of 5× PrimeSTAR Buffer (Takara, Japan), 2 µL deoxyribo-nucleotide triphosphates (dNTPs) Mix (2.5 mM each), 1 µL of each primer (10 µM), 0.5 µL PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara, Kusatu, Shiga, Japan), 13.5 µL RNase Free Water, and 2 µL of sample. Thermocycling conditions were as follows: initial denaturation at 98 °C for 30 s, 35 cycles of denaturation at 96 °C for 20 s, annealing at 61 °C for 20 s, elongation at 68 °C for 5 min, and final elongation at 68 °C for 5 min. Sequencing PCR was subsequently performed using the two external (PCR) primers and nine internal (sequencing) primers detailed in Supplementary Material (Table S3). Amplicons were purified using ExoSAP-IT™ kit (ThermoFisher Scientific). Sanger sequencing was performed using Big Dye Terminator Sequencing Mix (ThermoFisher Scientific). Samples were purified before electrophoresis using BigDye XTerminator kit (ThermoFisher Scientific). Then, 3730XL DNA Analyzer was then used for sequence electrophoresis. Single nucleotide polymorphisms (SNP) and consensus sequences were analysed using BioEdit version 7.0.5.3 (Tom Hall, Carlsbad, CA, US) [30] and CodonCode Aligner version 8.0.2 (Codon Code Corporation, Centerville, MA, US) [31] software. Sequences were analysed using MEGA 7 software version 7.2.26 (Koichiro Tamura, Glen Stecher, Sudhir Kumar, the Pennsylvania State University, University Park, PA, US) [32] and phylogenetic trees were built using Neighbour-Joining statistical method [33] and Maximum Composite Likelihood model [34]. Finally, all ORF30 sequences used to build the tree were converted into a Nexus format using Seqret EMBOSS (The European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridgeshire, UK) [35], and a median joining network was built using Population Analysis with Reticulate Trees (PopART) software (Jessica Leigh, David Bryant and Mike Steel, Dunedin, New Zealand) [36].

2.6. Multi-locus Sequence Typing (MLST) Analysis

For Multi Locus Sequence analysis, 37 loci in 26 ORFs were analysed based on non-synonymous changes identified between different published data including Ab4 and V592 protein coding regions as reported by Garvey et al. (2019) [14,19,26]. The MSLT was performed according to methodology described by Garvey et al. (2019) [26]. The method and reactional products used were the same as described by the authors. The MLST based on 37 non-synonymous U_s and U_L amino acid changes (located in 26 ORFs; ORF2, 5, 8, 11, 13, 14, 15, 22, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 39, 40, 42, 45, 46, 50, 52, 57, 73, and 76) was performed on eight EHV-1 strains. A reduced MLST based on 14 of the 37 loci (located in 6 ORFs; ORF11, 13, 30, 37, 52 and 76), suspected to be determinant in clade attribution, was performed on seven other EHV-1 strains (see Supplementary Table S2). Amplification products of target ORFs were purified and sequenced using forward primers (except for ORF13, which needed both forward and reverse sequencing). Sequences were analysed using CodonCode Aligner and BioEdit software. Clade attribution is based on U_L sequences distribution and was correlated with MLST segregation by Garvey et al. [14,26]. Sequence analysis was conducted on concatenated amino acids sequences. Both a phylogenetic tree and a network were built using MEGA7 and Splits Tree4 [37], respectively. The phylogenetic tree was built using Maximum Likelihood method and Jones Taylor Thornton model, while the network was built using a Neighbour-Net method [38].

2.7. Statistical Analysis

Chi-squared was used to test the null hypothesis that there was no correlation between the A₂₂₅₄/G₂₂₅₄ typing and the form of disease (strains isolated from respiratory cases, abortion cases, or neurological cases).

3. Results

3.1. The 2009 Multi-Syndromic EHV-1 Outbreak

The outbreak occurred on a thoroughbred stud farm in Normandy that consisted of 169 horses in total (60 broodmares—44 with and 16 without a foal—and 65 yearlings). The first case was reported at the end of August 2009. Two cases of EHM, 23 cases of respiratory disease, and four abortion cases were reported over a period of nine and a half months (see Figure 1). The mares and their foals were kept on one site but separated into six groups (see Table 2). Mares were vaccinated twice a year against equine influenza (EI) with the EIV-HA coding recombinant canarypoxvirus-based vaccine (ProteqFlu-Te, Merial SAS, Lyon, France) and against rhinopneumonitis on the fifth, seventh, and ninth months of gestation with a whole EHV-1/4 inactivated carbomer-adjuvanted vaccine (Duvaxyn EHV1-4, Fort DodgeAnimalHealth, Overland Park, KS, US). Due to reports of EHV-1 outbreaks in other countries in the weeks and months prior to this case (29 August), a booster dose of a whole inactivated EHV-1 vaccine (Pneumequine, Merial) had been given to mares before their return from abroad (Ireland, the UK, and the US), approximately two and a half months before the commencement of the outbreak on the French stud farm. None of the foals had received a primary vaccination in August. Yearlings were kept on a second site located a few kilometers from the main yard. They had received two immunisations one month apart and a booster immunisation six months later (from April 2009 to June 2009, depending on the foals age).

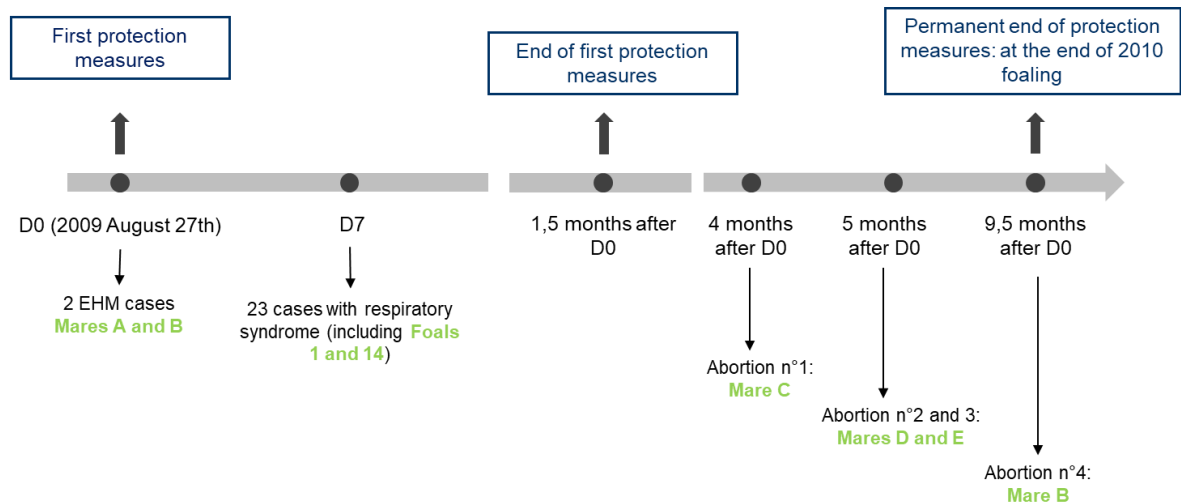


Figure 1. The 2009 EHV-1 outbreak chronology from D0 = day of the first case declaration, to 9.5 months after D0. D7 = Day 7 after the first case was declared. The biosecurity measures that were taken during this outbreak are described in blue boxes.

Table 2. Group composition for mares and foals on the French stud farm.

Group	Total number	Mares			Foals		
		Respiratory Disease	Abortion ¹	EHM	Total number	Sex	Respiratory Disease
1	13	0	3 ¹	2	13 ²	Female	6
2	9	0	1	0	9 ²	Male	4
3	10	0	0	0	10 ³	Female	0
4	12	4	2 ¹	0	12 ³	Male	9
5	6 ²	0	0	0	0	0	0
6	10 ³	0	0	0	0	0	0

¹ only four out of six were EHV-1-induced abortion (cf Section 3.1.3.). ² returned from/born abroad. ³ stay in/born in France.

3.1.1. Neurological Cases

Index Case: Mare A

On 27 August 2009 (D0), a pregnant 12-year-old broodmare (information not available concerning pregnancy duration) with an accompanying foal was found in lateral decubitus position and was unable to stand (see Figure 1 and clinical and treatment details are presented in Supplementary Materials S4). Despite treatment and due to a persistent nystagmus, a generalised stiffness and apparition of seizures, the mare was euthanized 14 h after being found in the paddock. Cerebrospinal fluid was collected on the atlantooccipital joint just after the death, and post-mortem examination was performed. EHV-1 was detected by PCR in the cerebrospinal fluid, the brain, and spinal cord. The strain was characterised as “G2254, neuropathogenic” in all three biological compartments.

Second Case: Mare B

Twelve hours after the onset of clinical signs in mare A, another pregnant mare (11 years old and 3.5 months pregnant, with an accompanying foal from the same group, mare B) presented with depression, shivering, and incoordination from the posterior limbs (see Figure 1 and Supplementary Materials S5). EHV-1 was detected on nasopharyngeal swab and whole blood sample, and typed as “G2254, neuropathogenic.” Forty-eight hours after the first clinical signs were observed, the mare’s condition improved. Mare B made a full recovery one month later.

3.1.2. Respiratory Infections

Between D7 and D10, five foals from group 1 and one foal from group 2 presented with hyperthermia and nasal discharge. Horses were treated depending on their clinical signs. Foals presenting a hyperthermia higher than 39.5 °C received anti-inflammatory drugs (0.3 mg/kg flunixin meglumine intravenously or 17 mg/kg aspirine orally). Foals were also treated with mucolytic drugs (0.5 mg/kg bromhexine orally once a day). Those with a persisting hyperthermia (> 48 h) or more severe clinical signs (coughing, breathing abnormalities) were treated with antibiotics (5 mg/kg trimethoprim-sulfadiazine orally once a day for five days).

Nasopharyngeal swabs were taken from foals and from other animals in each group. Four mares and 13 foals were found positive for EHV-1 in groups 1, 2, and 4, whereas all horses tested in groups 3, 5, and 6 (15 in total) were negative. Further whole blood samples and nasopharyngeal swabs were taken from groups 1, 2, and 4 animals over a six-week period and analysed by qPCR to monitor virus shedding and cell-associated viraemia, respectively. For example, on D7, a foal (foal 1; Table 3) tested positive (high transmission risk) with a high viral load, while foal 14 tested negative. This other foal (foal 14) tested positive on D14, and the viral load significantly increased on D21. It then decreased on D28 and was negative on D42. Overall, virus shedding in foals reached a maximum of $2.14 \cdot 10^8$ viral particle/mL of nasopharyngeal swab extract between Day 7 and Day 49. Virus loads in blood samples were lower than on swabs extracts and reached a maximum of $2.98 \cdot 10^3$ viral particle/mL between Day 14 and Day 49 (see Table 3).

Table 3. Monitoring of the viral shedding on 14 horses from groups 1, 2, and 3 over a period of seven weeks (copy/mL).

	Horse	D7		D14		D21		D28		D35		D42		D49	
		NS	blood	NS	blood	NS	blood	NS	blood	NS	blood	NS	blood	NS	blood
Group 1 and Group 2	1	2.14E + 08	nd	6.75E + 05	1.05E + 03	7.04E + 02	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	2	3.02E + 08	nd	4.52E + 04	NEG	7.04E + 02	NEG	6.05E + 03	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	3	9.29E + 07	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	8.09E + 02	NEG	2.14E + 03	4.58E + 02	1.11E + 05	NEG	NEG	NEG
	4	1.91E + 06	nd	1.81E + 05	2.98E + 03	7.34E + 04	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	5	1.66E + 06	nd	NEG	NEG	3.67E + 04	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	6	1.08E + 07	nd	1.30E + 04	NEG	1.23E + 03	NEG	6.05E + 03	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	7	2.23E + 05	nd	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
	8	1.28E + 05	nd	3.93E + 04	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	9	4.84E + 04	nd	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	10	NEG	nd	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	11	NEG	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	12	POS	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	13	NEG	nd	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	5.64E + 02	NEG	NEG	NEG	NEG
	14	NEG	nd	6.75E + 05	NEG	1.31E + 08	NEG	POS	NEG	6.48E + 03	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	15	nd	nd	nd	nd	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
Group 4	16	2.26E + 04	nd	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
	17	1.18E + 06	nd	4.27E + 03	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
	18	1.97E + 04	nd	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	

Viral load in nasal swab (NS) from D0 to D42, and in blood from D7 to D42. POS = positive samples non quantifiable; NEG = negative samples. The boxes in gray indicate the period when the horse became negative (when both the NS and blood samples from horses were negative).

3.1.3. Abortion Cases

Between four and five months after the first neurological case (see Figure 1), a mare (C) from group 1 and two mares (D and E) from group 4 aborted and were confirmed EHV-1 positive. Tests were carried out on fetal tissues (liver, lung, and kidney) and the mares' placentas. Mare C foetus kidney tested negative. The EHV-1 strains were identified as "non-neuropathogenic" (A₂₂₅₄) for the three cases.

Six months after developing neurological signs of disease, mare B (9.5 months pregnant) showed signs of dystocic abortion (liquid loss and contractions without delivery of the foal). Intra-uterine examination revealed an anterior dorsal position of the foal and bended legs and head. The foal was moved in the appropriate position under epidural anaesthesia. It was found dead and icteric. Delivery was immediate and complete (see Supplementary Materials S6). The following day, a uterine wash was performed. The mare was isolated in a stable, and sanitary measures were put in place (Section 3.1.4. Biosafety measures). Post-mortem examination of the foetus revealed a densification of lung parenchyma with interlobular oedema. Placenta and lung/liver samples tested positive for EHV-1. The strains were identified as "neuropathogenic" (G₂₂₅₄), as previously detected for this mare during this neurological episode (Section 3.1.1.).

Uterine swabs were performed eight days and 30 days post-abortion on mares B, C, D and E. All samples were positive for EHV-1 eight days post-abortion and negative 30 days post-abortion. Mare B was moved to Ireland for breeding five weeks post-abortion. Mare B was confirmed pregnant two months post-abortion and subsequently delivered a healthy foal after a normal pregnancy.

Overall, six of the 60 mares from this stud farm aborted during the year. EHV-1 infection was confirmed for mares B, C, D, and E. One of the two other mares aborted due to *Enterobacter amnigenus* infection, while no cause could be confirmed for the last mare (the dead foal could not be recovered).

3.1.4. Biosafety Measures

The first two cases (Mares A and B) were reported to the RESPE. A safety perimeter was put in place around sick horses. Gloves, gowns, and over-boots were used to manipulate the animals. Movement restrictions were put in place, including foot baths with disinfectant installed at the paddock entrance, car wheels cleaning, and movement restriction for horses.

Mares and foals that tested positive for EHV-1 were moved to isolation from the other horses. All mares were sampled (nasal swabs) before leaving or returning to the stud farm. A negative PCR result for EHV-1 was a prerequisite for movement. Booster vaccination against rhinopneumonitis was also administered. The following year, all pregnant mares stayed in France, including mare B.

To conclude, the overall EHV-1-induced morbidity rate reached 16.6% of the herd (28 clinically affected animals out of 169), including 6.7% of the broodmares, 1.2% EHM cases, and 13.6% respiratory cases.

3.2. Surveillance and Phylogeny from 2009 to 2018

3.2.1. Outbreaks, Forms of Disease, and ORF30 A2254G Typing

This epidemiological study involved the 2009 outbreak described in Section 3.1 and EHV-1 outbreaks from 2012 to 2018. Samples collected from 2012 to 2018 are represented in Supplementary Materials (Table S1). From 2012 to 2017, 42 respiratory cases, 44 abortion cases, 20 neurological cases, and six cases with no clinical information were reported. Significantly, in 2018, several outbreaks of EHV-1 occurred. During this year, an increased number of outbreaks (56 in total) were reported to the RESPE, including 15 respiratory outbreaks, 16 cases of abortion, five neurological

outbreaks, and 20 outbreaks with no clinical information (see Table 4 and Figure 2). The majority of the outbreaks were reported on the western part of the country, which has the highest concentration of breeding farms. Neurological outbreaks occurred in Normandy and Brittany and lead to the euthanasia of five animals. From these outbreaks, 71 samples were received and analysed (i.e., 15 samples from respiratory cases, 19 samples from abortion cases and 18 samples from neurological cases; clinical information was missing for 19 samples). Of these 71 samples, 12 could not be typed for A2254G substitution (two samples from respiratory cases, one sample from an abortion case, six samples from neurological cases, and three samples missing clinical information).

Table 4. Details of EHV-1 strains, per year, disease type, and strain typing (ORF30 A2254G).

Year	Strains	Respiratory Syndrome		Abortion		Neurological Syndrome		ND ¹		No A/G typing	Outbreaks (RESPE)
		A2254	G2254	A2254	G2254	A2254	G2254	A2254	G2254		
1 major outbreak 2009	30	24	0	2	2	0	2	0	0	0	/
2012	8	0	0	0	2	0	1	0	0	5*	Missing data
2013	19	0	0	6	7	2	1	0	1	2*	4
2014	10	0	0	8	0	0	0	0	0	2*	26
2015	32	0	0	17	0	1	1	1	0	12*	27
2016	18	1	0	8	0	2	4	0	1	2*	32
2017	22	1	0	2	1	0	7	1	2	8*	23
2018	71	9	4	17	1	10	2	5	11	12*	56

Abbreviations: ND1= clinical form of disease not defined or reported. * Respiratory syndrome was assigned only if corresponding clinical information was submitted with nasal swab samples. / = for 2009, all EHV-1 strains included in this study were linked to the outbreak described in Section 3.1.

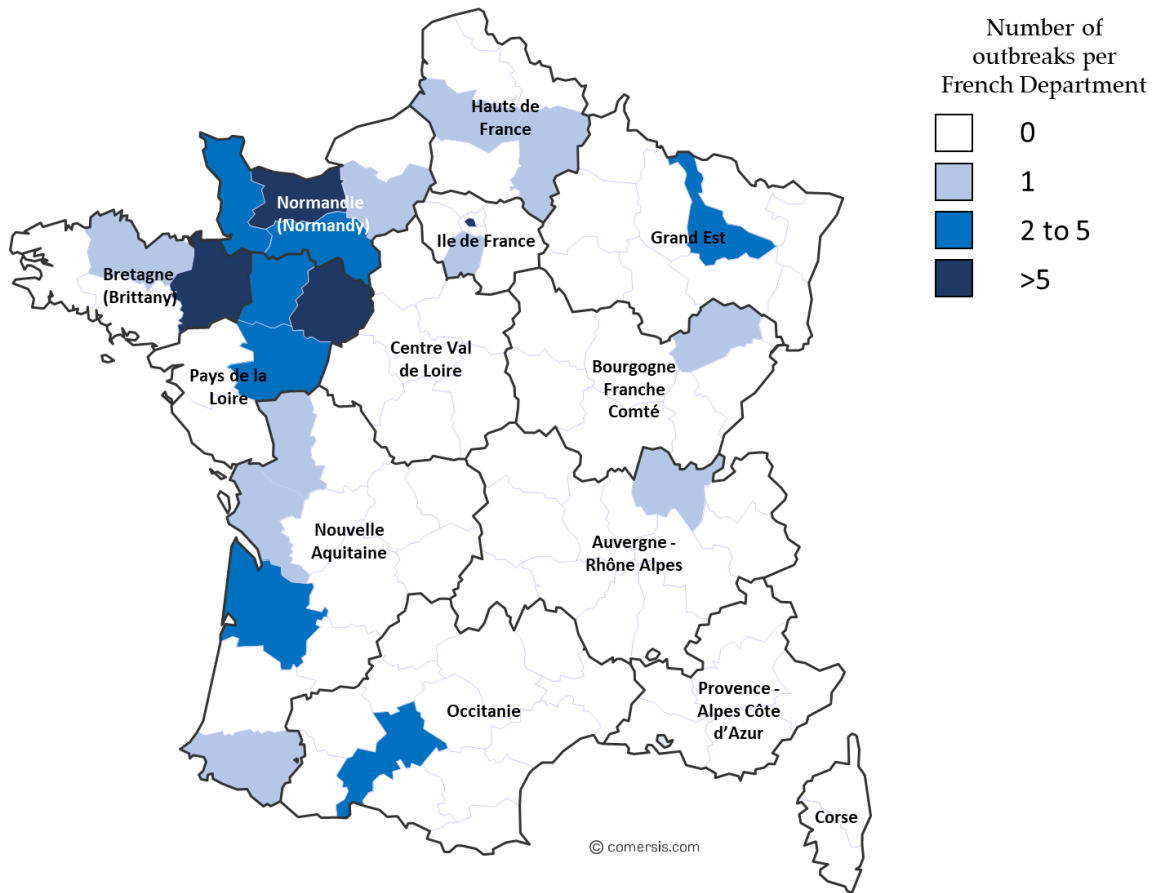


Figure 2. Map of France illustrating EHV-1 outbreaks reported to the RESPE in 2018, with frequency and geographical location.

Among all the strains collected from 2012 to 2018, 137 could be typed for the neuropathogenic/non-neuropathogenic mutation at the ORF30 2254 position. As shown in Table 4, both A₂₂₅₄ (non-neuropathogenic type) and G₂₂₅₄ (neuropathogenic type) strains have been isolated in respiratory cases, abortion, and neurological outbreaks. The Chi square test indicates a significant statistical association between the ORF30 types and both abortion and neurological disorder (*p*-value= 0.000202, see Table 5). Ninety-one A₂₂₅₄ strains have been isolated over the years (66% of all the strains typed), when compared with 46 (34% of all the strains typed) G₂₂₅₄ strains.

Table 5. ORF30 2254 mutation according to disease from EHV-1 isolates (2009 to 2018).

Type	Respiratory	Abortion	Neurological	Information missing	Total
A ₂₂₅₄ Non-neuro.	11 (73%)	58 (84%)	15 (48%)	7 (32%)	91(66%)
G ₂₂₅₄ Neuro.	4 (27%)	11 (16%)	16 (52%)	15 (68%)	46 (34%)
Chi square <i>p</i> -value		Resp./Ab.	0.325642		
		Resp./Neu.	0.109608		
		Ab./Neu.	0.000202*		
		All three	0.000996*		

Non-neuro. = non neuropathogenic; Neuro. = neuropathogenic. (%: percentage of ORF30 2254 type among the disease category). Chi Square test null hypothesis “There is no correlation between the disease category and the ORF30 2254 type. Resp./Ab. = Chi square test for Respiratory and Abortion categories; Resp./Neu.= Chi square test for Respiratory and Neurological categories; Ab./Neu.= Chi square test for Abortion and Neurological categories; All three= Chi square test for Respiratory, Abortion and Neurological categories. *significant result at *p*-value *p* < 0.05.

3.2.2. ORF30 Sequence Analysis

Probably because of the DNA quantity and purity, only 14 strains could be completely sequenced. BRE/13/2018, the only strain isolated on a neurological outbreak, could not be sequenced. ORF30 sequences from these 14 EHV-1 strains (see Supplementary Table S2) were compared to the neuropathogenic reference strain Ab4 (Genbank accession number AY665713). SNP and amino acid substitutions are reported in Supplementary Table S7.

Twelve of the 14 strains had an adenine residue at position 2254 of the polymerase gene. Seven of these also had a mutation in position 96 (G96A) and five of them in position 2968 (G2968A) compared to reference AY665713 (Ab4). The mutation (A > G) in position 2254 and 2968 led to an amino acid change (N752D and K990E, respectively). Other punctual mutations were observed on the other strains sequenced and five of them induced an amino acid change. One nucleotide on NORM/5/2012 sequence could not be determined during sequencing electrophoresis and was identified as a K (either thymine or guanine). NORM/17/2018 and NORM/18/2018 showed 100% identity at nucleotide and amino acid level. After further investigation about the outbreak location, it appeared that both strains NORM/17/2018 and NORM/18/2018 were collected, respectively, on February 2018 and March 2018 on the same premise after the abortion of two mares present in the stud farm. Although this comparison only concerns ORF30, it is possible that the same strain infected the two pregnant mares and induced their abortion. Both a phylogenetic tree (Neighbour-joining method and Maximum Composite Likelihood model) and a Median Joining Network were constructed (see Figure 3) based on the ORF30 sequences collected since 2009 and sequences obtained in a recent study in UK [14]. Two groups could be observed. The first group (Group 1 in Figure 3) formed a cluster of 32 strains including UK strains and reference strain Ab4. Of these 32, 26 contained the G₂₂₅₄ substitution in ORF30 (neuropathogenic type). Both G₂₂₅₄ strains collected in France (NORM/4/2012 and ILEDEFR/14/2018) belong to this group. The second group (Group 2 in Figure 3) is divided in three clusters. One of these clusters contains similar strains (NORM/2/2010, NELLEAQU/9/2015, BELG/12/2017, NORM/17/2018, NORM/18/2018) and one UK G₂₂₅₄ strain. NORM/5/2012 unidentified nucleotide in position 2876 did not discriminate the strain from ILEDEFR/3/2012 and NORM/8/2015. ORF30 analysis provides a first statement concerning strain phylogeny and potential neuropathogenicity but it only represents a small part of the genome. Multi-locus typing of EHV-1 as described by Garvey et al. 2019 was used to segregate EHV-1 strains into U_L clades (Bryant et al. 2018) [14,26].

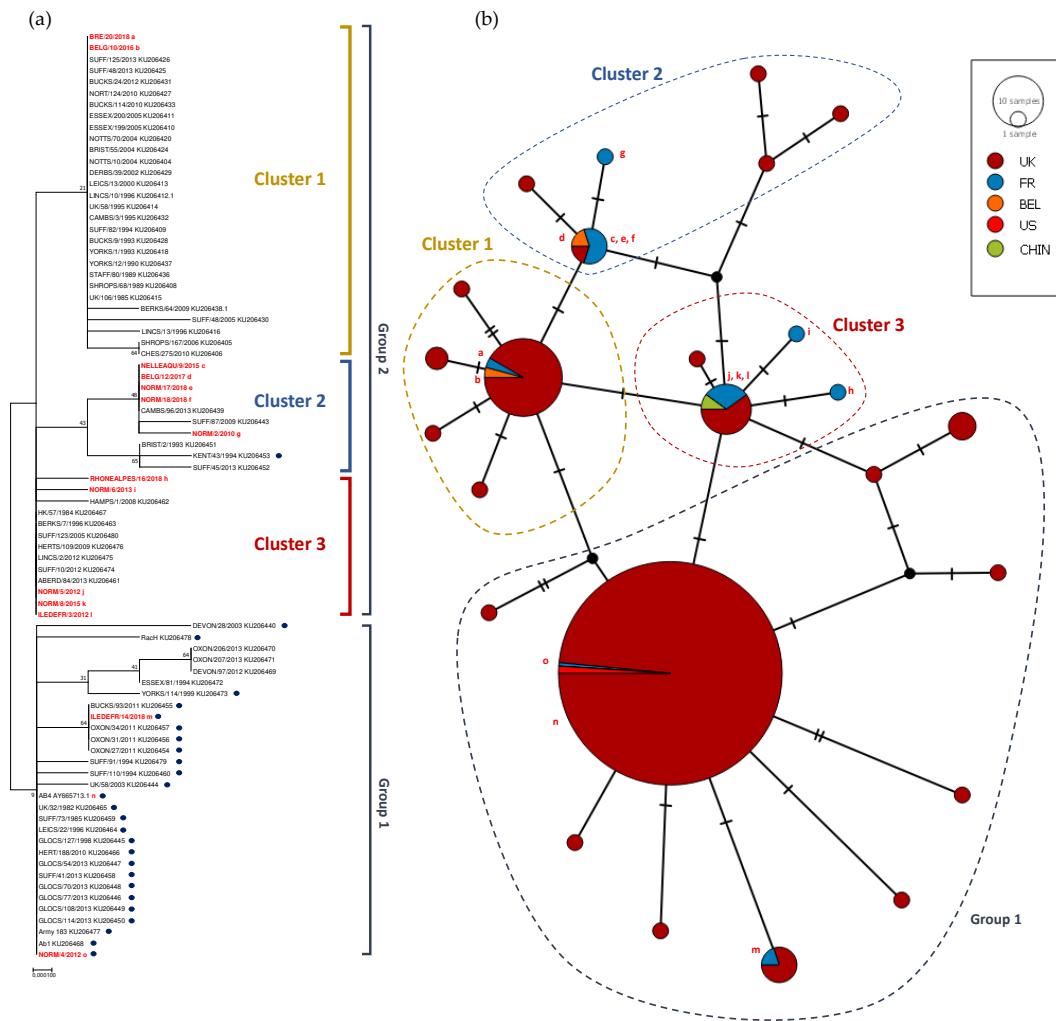


Figure 3. (a) Maximum Composite Likelihood method and Tamura-Nei matrix model phylogenetic tree based on ORF30 nucleotide sequences. Eighty-two strains including 14 strains isolated in France and Belgium from 2009 to 2018 (red bold text), 67 strains sequenced by Bryant et al. (2018) [14], and reference strain AY665713 (Ab4) are represented in this tree. Dots represent strains with the neuropathogenic type (G₂₂₅₄). Bootstrap values after 1000 replication are indicated at major nodes. (b) Median Joining Network based on the same ORF30 nucleotide sequences as for the phylogenetic tree.

3.2.3. Phylogeny and Multi-locus Analysis

MLST analysis for the 15 strains is represented in Table 6 and Figure 4. The analysis grouped five strains as U_L clade 10 (including two strains isolated from the same outbreak: NORM/17/2018 and NORM/18/2018) and three strains as U_L clade 7. Clades 8 and 13 contain two strains each, while clades 1, 6, and 11 contain only one strain. There is no correlation between sites and/or year of collection and clade distribution as also observed with ORF30 sequence comparison. In comparison with ORF30 clusters, strains assigned in group 2 cluster 2 were also assigned in clade 10 according to their MLST profile. The two strains in ORF30 group 1 were assigned to clade 8. No other correlation could be made between ORF30 classification and U_L clade classification.

MLST sequences from strains collected in Belgium and France were compared to strains sequenced by Bryant et al. [14], and a Maximum Likelihood phylogenetic tree was built based on Jones Taylor Thornton model (see Figure 4).

Table 6. Multi Locus Sequence Typing of 15 EHV-1 strains collected from 2010 to 2018. Determinant loci for clade identification are shaded in grey. Ab4 and V292 are included as reference strains.

ORF	U _i /MLST	2	5	8	11	11	11	13	13	13	13	13	13	14	14	14	15	22	29	30	30	31	32	33	33	34	36	37	39	40	42	45	46	50	52	57	73	76
LOCI	Clades	59	114	114	189	235	250	305	405	460	492	493	499	618/20	628	692	166	430	12	752	990	90	42	15	976	66	47	265	440	196	1275	427	140	367	386	804	122	128
Ab4 AY665713	1	G	G	D	Q	R	A	S	A	A	E	T	A	---	R	S	D	S	T	D	E	N	S	N	N	D	S	A	S	R	K	E	F	P	A	K	A	F
NORM/2/2010	10	D	V	D	Q	R	A	L	A	T	E	T	A	PSR	R	S	N	S	T	N	K	S	S	H	D	D	S	V	S	R	K	G	S	P	V	R	A	S
ILEDEFR/3/2012	7				Q	M	A	S	A	T	E	T	A							N	E						V							V	R		S	
NORM/4/2012	8	D	G	D	Q	R	A	S	A	T	E	T	T	PSR	K	N	N	S	T	D	E	N	S	H	D	D	S	V	S	R	K	G	S	P	V	K	A	S
NORM/6/2013	13	D	G	D	Q	R	A	S	A	A	E	T	A	PSR	R	S	D	S	T	N	E	N	S	N	D	D	S	V	S	R	K	G	S	P	A	K	A	S
BELG/7/2014	7	D	G	D	Q	M	A	S	A	T	E	T	A	PSR	K	N	N	S	T	N	E	S	S	H	D	D	S	V	S	R	K	G	S	P	V	R	A	S
NORM/8/2015	6	D	G	D	Q	R	S*	S	T	A	E	T	A	PSR	R	S	N	S	T	N	E	N	S	H	D	D	S	V	S	R	K	G	S	P	V	K	A	S
NELLEQU/9/2015	10				Q	R	A	L	A	T	E	T	A							N	K						V							V	R		S	
BELG/10/2016	1	D	G	D	Q	R	A	S	A	A	E	T	A	---	R	S	D	S	T	N	E	N	S	N	N	D	S	A	S	R	K	E	F	P	A	K	A	F
BELG/12/2017	10	D	V	D	Q	R	A	L	A	T	E	T	A	PSR	R	S	N	S	T	N	K	S	S	H	D	D	S	V	S	R	K	G	S	P	V	R	A	S
ILEDEFR/14/2018	8				Q	R	A	S	A	T	E	T	T							D	E						V							V	K		S	
FRANCE/15/2018	13				Q	R	A	S	A	A	E	T	A							N	E						V							A	K		S	
RHONEALPES/16/2018	11				Q	R	A	L	A	T	E	T	A							N	E						V							V	R		S	
NORM/17/2018	10				Q	R	A	L	A	T	E	T	A							N	K						V							V	R		S	
NORM/18/2018	10	D	V	D	Q	R	A	L	A	T	E	T	A	PSR	R	S	N	S	T	N	K	S	S	H	D	D	S	V	S	R	K	G	S	P	V	R	A	S
BRE/20/2018	7				Q	M	A	S	A	T	E	T	A							N	E						V							V	R		S	
V592 AY464052	9	D	V	N	K	R	A	L	A	T	E	T	A	PSR	R	S	N	P	K	N	K	S	L	H	D	G	R	V	L	H	R	G	S	S	V	R	V	S

*ORF 11(A250S) was used to identify clade 6 strains in this study

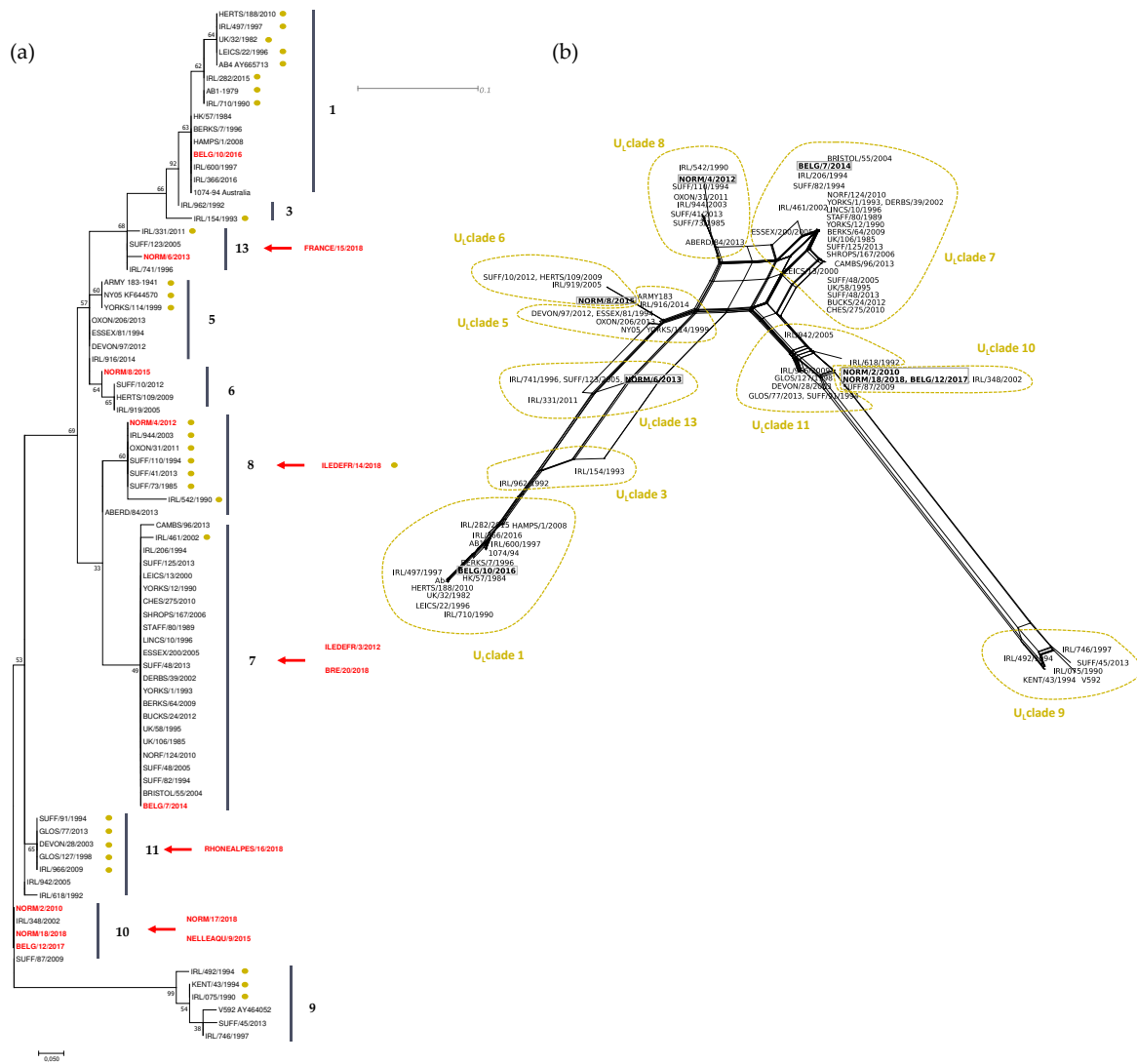


Figure 4. (a) Maximum Likelihood phylogenetic tree based on Jones Taylor Thornton model built with MLST sequences including 8 French and Belgian strains (in red), 47 EHV-1 UK strains [14], 22 EHV-1 Irish strains [26], 2 strains from the US, on strain from China and one strain from Australia. Dots indicate D752 strains (Neuropathogenic type). Strains with partial concatenated amino acid sequence were not included in the Maximum Likelihood analysis but their supposed position in the tree is indicated with red arrows according to their clade identification (see Table 6). U1 Clades [14] are numbered and represented with vertical lines. Bootstrap values after 1000 replication are indicated at major nodes. (b) Network built using Neighbour-Net method with the same sequences as the tree. Only 37 amino acid sequences were included in the network, and French and Belgian strains are represented in grey boxes.

4. Discussion

The 2009 EHV1 outbreak is regrettably a good example of the impact that an EHV-1 infection can have in stud farms and illustrates the diversity of diseases that could be observed and faced by veterinarians. The three clinical forms of disease induced by EHV-1 (respiratory, neurological disorder and abortion) were observed over a nine-and-a-half-month period on a thoroughbred farm (169 horses), which raises questions about the source of EHV-1 infection and its transmission during this

outbreak. The significance of this 2009 EHV-1 outbreak was also the observation of the three clinical forms of disease in the same premise over a long period of time. This phenomenon is rarely described in literature [39], and no other outbreak involving all three forms of disease was reported in France since 2009. The number of horses on this premise and the breeding activities may be factors that have contributed to increase the number of cases, which could have been higher in the absence of vaccination. The identification of two different strains, which may be the result from frequent horse movements in France and abroad, might also have influenced the diseases observed during this unusual outbreak. EHV-1 outbreaks are frequent but are usually limited to the report of one or two forms of the disease for the same outbreak (RESPE, personal communication). However, epidemiological links between outbreaks separated in time are not always available or identified. For example, the 2009 outbreak described here lasted nine and a half months with at least two and a half months between the last respiratory infection and the first abortion. Occurrence of multiple forms of disease may be more frequent than currently imagined.

The three clinical forms of disease were reported on a regular basis from 2009 to 2018 on the different outbreaks of this study. In 2018, a large number of cases were reported during a short period (March 2018 to May 2018), with exceptional sanitary measures needed to control contaminations between horses. This EHV-1 crisis is likely to be associated with the fact that a vaccine shortage occurred in 2016, implying a lower vaccination rate.

At the time of the 2009 outbreak, only a few tools were available to conduct EHV-1 molecular investigation. The PCR designed by Diallo et al. (2006, [28]) was used as an EHV-1 detection and quantification test. Viral loads of samples were quantified, and sanitary measures were lifted when undetected. Results obtained at the time indicated that virus titers in total blood samples were lower than in swab extracts, but these two compartments are not always correlated to each other. Monitoring viral loads provided an overview of the virus excretion and risk of transmission. When none of the group 1 foals tested positive after a seven-week isolation period, the day to day management of the stud farm returned to normal. EHV-1 strains were typed (ORF30 SNP A2254G) and both types were identified (neuropathogenic and non-neuropathogenic).

Although those tools gave useful indicative information concerning the different strains isolated from this outbreak, they proved to be limited to establish potential relationship between cases and virus strains. Other tools have been developed (Nugent et al. 2006, Bryant et al. 2018 and Garvey et al. 2019 [14,19,26]) that have motivated our retrospective and molecular analysis of French and Belgian EHV-1 strains isolated from 2009 outbreak to the major 2018 EHV-1 epizootic. Three different molecular analysis were performed: the ORF30 A2254G typing, the complete ORF30 sequencing and the MLST. In 2006, Nugent et al. [19] reported a significant association between the A2254G SNP in the DNA polymerase gene (ORF30), neuropathogenicity. This single point substitution (A2254G) involves an amino acid change (N752D). N752 (A₂₂₅₄) strains were strongly associated to non-neuropathogenic infection cases, while D752 (G₂₂₅₄) strains were strongly associated to neuropathogenic cases [19]. A2254G typing was subsequently used on a regular basis for strain discrimination [40,41]. In our study, 137 strains collected from 2009 to 2018 were typed, and A₂₂₅₄ strains were more significantly associated with abortion cases than to neurological cases ($p = 0.0002$), as recently described by Lechmann et al. (2019) [42]. However, no significant correlation between G₂₂₅₄ strains and the neurological form of disease was measured. This observation is in agreement with some recent studies showing that A2254G mutation is not exclusively associated to EHM but could be part of a more complex mechanism affecting strains virulence [41]. Both neuropathogenic and non-neuropathogenic strains could be typed among 2018 strains, suggesting that more than one strain was circulating during the crisis. Strain A2254G typing is also interesting as it was reported that the point mutation could change sensitivity to some drugs targeting DNA polymerase activity as it was demonstrated in a study showing that a N752 variant was more sensitive to aphidicolin than the D752 variants. Aphidicolin inhibits some dNTPs binding to a family of DNA polymerase which include herpesvirus DNA polymerase [20].

The A2254G typing was completed with ORF30 sequencing on 14 French and Belgian strains isolated between 2012 and 2018 in order to compare sequences and to perform a phylogenetic analysis. Several synonymous and non-synonymous substitutions were identified. Equine herpesvirus DNA polymerase subunit structures and mechanisms are not well known. Despite a low homology between EHV-1 and Human Simplex Virus (HSV) polymerase amino acid sequence (54%), the latter has been described as closest to α polymerase structure [43]. On this basis, SNP found in EHV-1 strains could be attributed to structure domains identified in HSV polymerase [43]. Amino acid substitutions could be localised in the pre-NH2 terminal domain (R59G), in the 3'-5' exonuclease domain (S419L and R429K), in the palm domain (A694V and D752N), in the thumb domain (E990K). Although some of the domain activities have been studied for human herpesviruses [43,44], it is hard to predict the impact of the substitutions observed in EHV-1 strains on the protein activity. A strong homology (99.86% to 100%) was measured among those strains with no obvious evolutionary tendency. Results were in agreement with those published by Bryant et al. in 2018 [14]. According to ORF30 sequencing, EHV-1 evolution is not linked to sampling location or year of collection, with the exception of the strains NORM/17/2018 and NORM/18/2018 that were isolated from the same stud farm, a few weeks apart, and have similar ORF30 sequences. All G₂₂₅₄ strains, with the exception of the strain KENT/43/1994, were grouped in the same cluster, suggesting that ORF30 sequencing does not provide further information when compared with the A2254G typing. However, three clusters were identified for A2254 strains, primarily differentiated by one SNP (e.g. A2968G). The significance of these different clusters is unknown. MLST analysis provides a more global view concerning EHV-1 strains evolution as it takes into account 37 loci in 26 different ORFs. As observed with ORF30 analysis, there is no obvious correlation between year and location of collection, with the exception of NORM/17/2018 and NORM/18/2018, both located in clade 10, which support a co-circulation of EHV-1 strains from different clades as already described by Bryant et al. and Garvey et al. [14,26]. It is interesting to note that four French strains and one Belgium strain are localised in clade 10. The U_L Clade 12 described by Bryant et al. (2018) [14], which contains a strain from the UK, is not shown here. U_L Clades 2 and 4 were not represented by any of the European strains analysed in this study. It is important to note that the MLST method cannot distinguish U_L Clade 2 and 12 from MLST Clade 1 and 10, respectively [26]. As all the strains compared in this study are from Europe, a broader strain selection would be needed to identify a potential geographical effect on clade differentiation. Finally, two abortion strains isolated from the same premise in a one-month interval after two mare abortions had the exact same MLST profile suggesting that the same strain infected the mares. Obviously, EHV-1 strain surveillance is complicated by the fact that EHV-1 can also establish latency in different sites, implying no viral replication as the viral genome maintains an episomal form blocking transcription and translation of its genes (limited transcription with LATs) [9,11]. This implies that strains circulation and outbreaks are potentially dependent on latency and re-activation.

5. Conclusions

To conclude, this study allowed applying and comparing three different typing approaches to conduct a phylogenetic analysis over a six years period. A significant association was measured between EHV-1 induced abortion and the DNA polymerase A₂₂₅₄ genotype of related strains, while no disease association was observed with the G₂₂₅₄ genotype. This result suggests that the commonly used “neuropathogenic/non-neuropathogenic” designation is not always appropriate. The ORF30 and MLST analysis highlight the diversity of EHV-1 strains circulating in the French equine population and the difficulty to link strain evolution, time of collection, and location. However, the MLST offers new possibilities for EHV-1 epidemiology.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Samples type collected from EHV-1 outbreaks from 2012 to 2018, Table S2: Strains identification, location and year of collection. Table S3. ORF30 sequencing Primers. Supplementary Materials S4: Complementary clinical information concerning Mare A. Supplementary Materials S5: Complementary clinical information concerning Mare B.

Supplementary Materials S6: Complementary clinical information concerning Mare B abortion. Supplementary Table S7: ORF30 amino acid alignments.

Author Contributions: Here are described the contribution of the authors for this research article: conceptualisation, R.P., S.P., and G.S.; investigation, C.F., M.G., and G.S.; resources, M. J., C.F., P.M., M.F., A.G., V.M., C.M-P, and L.L.; writing—original draft preparation, R.P., S.P., and G.S.; writing—review and editing, M.G., A.C., C.F., A.G., and L.L.; supervision, R.P. and S.P.; project administration, R.P. and S.P.; funding acquisition, R.P. and S.P.

Funding: This research was funded by the Fonds Eperon OVERLORD N12-2017, Normandy County Council (17E01598/17EP04324), the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) grant number 2017-008, CENTAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational program 2014-2020.

Acknowledgments: We thank Erika Hue (LABÉO) for her help in solving problems and methodology, Farida Mebarki (BIOFIDAL) for her help in sequencing, and Meriadeg Ar Gouilh (NORMANDIE UNIV) for his help with network construction.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Davison, A.J.; Eberle, R.; Ehlers, B.; Hayward, G.S.; McGeoch, D.J.; Minson, A.C.; Pellett, P.E.; Roizman, B.; Studdert, M.J.; Thiry, E. The Order Herpesvirales. *Arch. Virol.* **2009**, *154*, 171–177.
2. Abdelgawad, A.; Azab, W.; Damiani, A.M.; Baumgartner, K.; Will, H.; Osterrieder, N.; Greenwood, A.D. Zebra-borne equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in non-African captive mammals. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 102–106.
3. Wohlsein, P.; Lehmecker, A.; Spitzbarth, I.; Algermissen, D.; Baumgärtner, W.; Böer, M.; Kummrow, M.; Haas, L.; Grummer, B. Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts. *Vet. Microbiol.* **2011**, *149*, 456–460.
4. Chowdhury, S.I.; Ludwig, H. Molecular biological characterization of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) isolates from ruminant hosts. *Virus Res.* **1988**, *11*, 127–139.
5. Ghanem, Y.M.; Fukushi, H.; Ibrahim, E.S.M.; Ohya, K.; Yamaguchi, T.; Kennedy, M. Molecular phylogeny of equine herpesvirus 1 isolates from onager, zebra and Thomson's gazelle. *Arch. Virol.* **2008**, *153*, 2297–2302.
6. Dayaram, A.; Franz, M.; Schattschneider, A.; Damiani, A.M.; Bischofberger, S.; Osterrieder, N.; Greenwood, A.D. Long term stability and infectivity of herpesviruses in water. *Sci Rep. UK* **2017**, *7*, doi:10.1038/srep46559.
7. Paillot, R.; Case, R.; Ross, J.; Newton, R.; Nugent, J. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. *Open Vet. Sci. J.* **2008**, *2*, 68–91.
8. Lunn, D.P.; Davis-Poynter, N.; Flaminio, M.J.B.F.; Horohov, D.W.; Osterrieder, K.; Pusterla, N.; Townsend, H.G.G. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.* **2009**, *23*, 450–461.
9. Chesters, P.M.; Allsop, R.; Purewal, A.; Edington, N. Detection of Latency-Associated Transcripts of Equid Herpesvirus 1 in Equine Leukocytes but Not in Trigeminal Ganglia. *J. Virol.* **1997**, *71*, 7.
10. Aleman, M.; Pickles, K.J.; Simonek, G.; Madigan, J.E. Latent Equine Herpesvirus-1 in Trigeminal Ganglia and Equine Idiopathic Headshaking. *J. Vet. Intern. Med.* **2012**, *26*, 192–194.
11. Rock, D.L. The molecular basis of latent infections by alphaherpesviruses. *Semin. Virol.* **1993**, *4*, 157–165.
12. Gulati, B.R.; Sharma, H.; Riyesh, T.; K.; Khurana, S.; Kapoor, S. Viral and Host Strategies for Regulation of Latency and Reactivation in Equid Herpesviruses. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* **2015**, *10*, 669–689.
13. Telford, E.A.R.; Watson, M.S.; McBride, K.; Davison, A.J. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **1992**, *189*, 304–316.
14. Bryant, N.A.; Wilkie, G.S.; Russell, C.A.; Compston, L.; Grafham, D.; Clissold, L.; McLay, K.; Medcalf, L.; Newton, R.; Davison, A.J.; et al. Genetic diversity of equine herpesvirus 1 isolated from neurological, abortigenic and respiratory disease outbreaks. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 817–832.
15. Cuxson, J.L.; Hartley, C.A.; Ficorilli, N.P.; Symes, S.J.; Devlin, J.M.; Gilkerson, J.R. Comparing the genetic diversity of ORF30 of Australian isolates of 3 equid alphaherpesviruses. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 50–57.
16. Crowhurst, F.A.; Dickinson, G.; Burrows, R. An outbreak of paresis in mares and geldings associated with equid herpesvirus 1. *Vet. Rec.* **1981**, *109*, 527–528.

17. Mumford, J.A.; Rossdale, P.D.; Jessett, D.M.; Gann, S.J.; Ousey, J.; Cook, R.F. Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J. Reprod. Fertil.* **1987**, *35*, 509–518.
18. Anagha, G.; Gulati, B.R.; Riyesh, T.; Virmani, N. Genetic characterization of equine herpesvirus 1 isolates from abortion outbreaks in India. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 157–163.
19. Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.C.; Mumford, J.A.; Swann, Z.; Newton, J.R.; Bowden, R.J.; Allen, G.P.; Davis-Poynter, N. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *J. Virol.* **2006**, *80*, 4047–4060.
20. Goodman, L.B.; Loregian, A.; Perkins, G.A.; Nugent, J.; Buckles, E.L.; Mercorelli, B.; Kydd, J.H.; Palù, G.; Smith, K.C.; Osterrieder, N.; et al. A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase Determines Neuropathogenicity. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e160.
21. Pronost, S.; Léon, A.; Legrand, L.; Fortier, C.; Miszczak, F.; Freymuth, F.; Fortier, G. Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Vet. Microbiol.* **2010**, *145*, 329–333.
22. Allen, G.P. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Diagnosis of Neuropathogenic Strains of Equine Herpesvirus-1. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2007**, *19*, 69–72.
23. Van de Walle, G.R.; Goupil, R.; Wishon, C.; Damiani, A.; Perkins, G.A.; Osterrieder, N. A Single-Nucleotide Polymorphism in a Herpesvirus DNA Polymerase Is Sufficient to Cause Lethal Neurological Disease. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 20–25.
24. Franz, M.; Goodman, L.; Van de Walle, G.; Osterrieder, N.; Greenwood, A. A Point Mutation in a Herpesvirus Co-Determines Neuropathogenicity and Viral Shedding. *Viruses* **2017**, *9*, 6.
25. Gryspeerdt, A.; Vandekerckhove, A.; Van Doorselaere, J.; Van de Walle, G.; Nauwynck, H. Description of an unusually large outbreak of nervous system disorders caused by equine herpesvirus 1 (EHV1) in 2009 in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **2011**, *80*, 147–153.
26. Garvey, M.; Lyons, R.; Hector, R.; Walsh, C.; Arkins, S.; Cullinane, A. Molecular Characterisation of Equine Herpesvirus 1 Isolates from Cases of Abortion, Respiratory and Neurological Disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens* **2019**, *8*, 7.
27. Pronost, S.; Legrand, L.; Pitel, P.-H.; Wegge, B.; Lissens, J.; Freymuth, F.; Richard, E.; Fortier, G. Outbreak of Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy in France: A Clinical and Molecular Investigation: Outbreak of EHV-1 myeloencephalopathy. *Transbound. Emerg. Dis.* **2012**, *59*, 256–263.
28. Diallo, I.S.; Hewitson, G.; Wright, L.; Rodwell, B.J.; Corney, B.G. Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **2006**, *131*, 92–98.
29. Thieulent, C.J.; Hue, E.S.; Fortier, C.I.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Fortier, G.D.; Pitel, P.-H.; Vidalain, P.-O.; et al. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology* **2019**, *526*, 105–116.
30. Hall, T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **1999**, *41*:95–98.
31. CodonCode Aligner. Available online: <https://www.codoncode.com> (accessed on 27th September 2019).
32. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874.
33. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425.
34. Jones, D.T.; Taylor, W.R.; Thornton, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* **1992**, *8*, 275–282.
35. Madeira, F.; Park, Y.M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.R.N.; Potter, S.C.; Finn, R.D.; et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641.
36. PopART. Available online: <http://popart.otago.ac.nz> (accessed on 27 September 2019).
37. Huson, D.H.; Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* **2006**, *23*, 254–267.
38. Bryant, D. Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Mol. Biol. Evol.* **2003**, *21*, 255–265.

39. Walter, J.; Seeh, C.; Fey, K.; Bleul, U.; Osterrieder, N. Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. *Acta Vet. Scand.* **2013**, *55*, 19.
40. Vissani, M.A.; Becerra, M.L.; Olguín Perglione, C.; Tordoya, M.S.; Miño, S.; Barrandeguy, M. Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Vet. Microbiol.* **2009**, *139*, 361–364.
41. Pronost, S.; Cook, R.F.; Fortier, G.; Timoney, P.J.; Balasuriya, U.B.R. Relationship between equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy and viral genotype: EHV-1, genotype and EHM. *Equine Vet. J.* **2010**, *42*, 672–674.
42. Lechmann, J.; Schoster, A.; Ernstberger, M.; Fouché, N.; Fraefel, C.; Bachofen, C. A novel PCR protocol for detection and differentiation of neuropathogenic and non-neuropathogenic equid alphaherpesvirus 1. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2019**, *31*, 696–703.
43. Liu, S.; Knafels, J.D.; Chang, J.S.; Waszak, G.A.; Baldwin, E.T.; Deibel, M.R.; Thomsen, D.R.; Homa, F.L.; Wells, P.A.; Tory, M.C.; et al. Crystal Structure of the Herpes Simplex Virus 1 DNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18193–18200.
44. Zarrouk, K.; Piret, J.; Boivin, G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Vir. Res.* **2017**, *234*, 177–192.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Table S1 Sample type collected from 2012 to 2018.

Year of collection	Nasal Swabs	Tracheal liquid	Cerebro Spinal fluid	Blood	Tissue	Total
2012	5	None	1	None	2	8
2013	2	None	1	1	15	19
2014	None	None	None	None	10	10
2015	7	None	None	None	25	32
2016	5	None	1	2	10	18
2017	16	None	1	1	4	22
2018	47	None	None	5	19	71

Supplementary Table S2 Strains identification, location and year of collection.

Identification	Accession number	Location	Disease	Year	MLST 37/37	MLST 15/37
NORM/1/2009	nso	Normandie	ND*	2009		
NORM/2/2010	MN688617	Normandie	Abortion	2010	Y	
ILEDEFR/3/2012	MN688618	Ile de France	Abortion	2012		Y
NORM/4/2012	MN688619	Normandie	Abortion	2012	Y	
NORM/5/2012	MN688620	Normandie	ND*	2012		
NORM/6/2013	MN688621	Normandie	Abortion	2013	Y	
BELG/7/2014	nso	Belgium	Abortion	2014	Y	
NORM/8/2015	MN688622	Normandie	Abortion	2015	Y	
NELLEAQU/9/2015	MN688623	Nouvelle Aquitaine	ND*	2015		Y
BELG/10/2016	MN688624	Belgium	Abortion	2016	Y	
NORM/11/2017	nso	Normandie	ND*	2017		
BELG/12/2017	MN688625	Belgium	Abortion	2017	Y	
BRE/13/2018	nso	Bretagne	Neurological	2018		
ILEDEFR/14/2018	MN688626	Ile de France	Respiratory	2018		Y
FRANCE/15/2018	nso	France	Abortion	2018		Y
RHONEALPES/16/2018	MN688627	Auvergne-Rhone-Alpes	Abortion	2018		Y
NORM/17/2018	MN688628	Normandie	Abortion	2018		Y
NORM/18/2018	MN688629	Normandie	Abortion	2018	Y	
NORM/19/2018	nso	Normandie	Respiratory	2018		
BRE/20/2018	MN688630	Bretagne	ND*	2018		Y

nso= no sequence obtained. tbd= to be defined. Y= selected for MLST Analysis. *nasal swabs with no clinical information. MLST 37/37 = 37 of the loci were typed; 15/37 = only the 15 of the 37 loci were typed. ND= clinical form of disease not defined or reported.

Supplementary Table S3 ORF30 sequencing Primers.

Primer name	Sequence	
EHV-1.ORF30-PCR-F	GAACGTGCGAGTGCTGTTTT	PCR
EHV-1.ORF30.PCR.RC	TGTGAAGGTCTGTTCGACGG	PCR
ORF30.F600	GGGTTTTGGGCGGTACCGCGC	Sequencing
ORF30-F1300	CAGCAGCTCGCGGTCGCCCAACG	Sequencing
ORF30-F1550	CAGTCGCGCAGCAGATGCCAGCAG	Sequencing
ORF30-AS800	CTTGGACGTGCGCGAGTTCCG	Sequencing
ORF30-AS1660	CATTATCCAGGCCATAACCTC	Sequencing
ORF30-R1900	GTGTGGGACATCGCCACGAAC	Sequencing
ORF30-R1-450	GGACGTGACCACGCGGCTGTTG	Sequencing
EHV-1-ORF30-PCR-R1	GTAGAGACTTCGGAGAGCGC	Sequencing
ORF30-R-700	GCCTCCGG GGTGCTGGCCTCG	Sequencing

Supplementary Materials S4 Complementary clinical information concerning Mare A.

Mare A: When the mare was first discovered it looked like it had been crawling on several meters. After clinical examination, the mare had a normal rectal temperature (37.2°C), an 80 beats per minute tachycardia, pale mucous membranes, a capillary refill delay 2 seconds higher than normal and low digestive noises. Buttock and thigh muscle mass was hard and painful. The mare also presented with bedsores and wounds on the right limbs and on the head.

Neurological examination showed a degraded mental state (alternating dejection and excitement), a loss of tonus in the tail, a loss of anal tonus and loss of sensitivity of posterior limbs (table 1).

The mare was sedated due to its agitation (0.01mg/kg detomidine and 0.01/kg butorphanol). It received Ringer Lactate Solution (10L) after an intravenous catheter was settled. It also received 10% dimethylsulfoxide (1mg/kg), non-steroidal anti-inflammatory drugs (flunixin meglumine 1mg/kg), corticosteroids (dexamethasone, 01mg/kg) and antibiotics (cefquinome, 2mg/kg). The mare was moved every 3 hours and treated for her multiple wounds.

Complete blood count was normal and only showed hemoconcentration. Biochemical analysis showed a muscle enzymes increase (5000 U/L creatine kinase and 978U/L aminotransferase) probably because of the decubitus and a starting hypocalcemia (90mg/kg).

Infusions were continued with a rate of 5L every 4 hours with a calcium and glucose supplementation (100mL calcium gluconate and 200mL 30% glucose for 5L Ringer Lactate Solution). The mare also received Vitamin E and selenium. A safety perimeter was settled around the horse as it could not be moved. Gloves, gowns and overboots were used to manipulate the animal. None of the other horses were moved and a foot bath was installed to enter the paddock.

After eight hours the mare presented with a nystagmus and was infused with 20% mannitol (1g/kg). It became more and more agitated and was less responsive to sedation.

Supplementary Materials S5 Complementary clinical information concerning Mare B.

Mare B: This mare was isolated in stable and manipulated wearing gloves, a gown and overboots. It immediately received Ringer Lactate Solution infusion (5L, 5 times a day), 10% DMSO infusion, non-steroidal anti-inflammatory drugs (1 mg/kg flunixin administered intravenously, twice a day during 2 days), corticosteroids (dexamethasone, first at a 0.1mg/kg intravenous dose once a day

during 4 days, then at a 0.05mg/kg intravenous dose during 7 days) and antibiotics (trimethoprim.sulfadimidine, 2.5mg/kg administered intravenously twice a day).

Eight hours after the first clinical signs, the mare had neither urinated nor defecated.

The rectum was drained and seven litres of urine were extracted via urinary catheterisation. These operations were repeated three times a day.

Haematological and biochemical analysis did not detect abnormalities.

The mare was livelier, started eating again and could defecate on her own. The mare presented grade 3/5 ataxia on her posterior limbs and grade 2/5 ataxia on her front limbs. It could urinate normally after 5 days and the ataxia was decreasing.

As for the first case, none of the horses were moved. All groups were manipulated with gloves, gowns and overboots. Footbaths were installed at the entry of every paddock. Car wheels circulating in the stud were cleaned when leaving the place.

Supplementary Materials S6 Complementary clinical information concerning Mare B abortion.

Mare B abortion: after abortion the mare received antibiotics (22000 UI/kg penicillin-streptomycine by intramuscular injection once a day during 5 days) and some non.steroidal anti-inflammatory drugs (0.5mg/kg flunixin meglumine intravenously, twice a day for 3 days).

Supplementary Table S7 ORF30 amino acid alignment 1/4.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AB4 AY665713	MAAREQANSVRRSGFFNPF	IGKRPF	FRPGSGQTAETER	PRPPQHSYCTEVGSFKFI	APRCLDEEAPADQRRGVH	VGTLERPPK	VYCDGSEYDVLN	PASGG			
NORM/2/2010
ILDEFR/3/2012
NORM/4/2012
NORM/5/2012
NORM/6/2013
NORM/8/2015
NELLEAQU/9/2015
BELG/10/2016
BELG/12/2017
ILDEFR/14/2018
RHONEALPES/16/2018
NORM/17/2018
NORM/18/2018
BE/20/2018
	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AB4 AY665713	CWPRRIRVWNGQDFR	GDGFNPRFER	FHVYDIVETSESASHDD	PPSRFAELSRPGSVV	TLGMSECGKRVAVH	VHYGVRHYFYMAKA	EVDSACGITTEAELV				
NORM/2/2010
ILDEFR/3/2012
NORM/4/2012
NORM/5/2012
NORM/6/2013
NORM/8/2015
NELLEAQU/9/2015
BELG/10/2016
BELG/12/2017
ILDEFR/14/2018
RHONEALPES/16/2018
NORM/17/2018
NORM/18/2018
BE/20/2018

Supplementary Table S7 ORF30 amino acid alignment 2/4.

	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
AB4 AY665713	R	A	M	V	D	C	A	H	S	S	A	L
NORM/2/2010
ILDEFR/3/2012
NORM/4/2012
NORM/5/2012
NORM/6/2013
NORM/8/2015
NELLEAQU/9/2015
BELG/10/2016
BELG/12/2017
ILEDEFR/14/2018
RHONEALPES/16/2018
NORM/17/2018
NORM/18/2018
BE/20/2018
	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
AB4 AY665713	D	N	E	N	F	T	S	F	G	W	R	L
NORM/2/2010
ILDEFR/3/2012
NORM/4/2012
NORM/5/2012
NORM/6/2013
NORM/8/2015
NELLEAQU/9/2015
BELG/10/2016
BELG/12/2017
ILEDEFR/14/2018
RHONEALPES/16/2018
NORM/17/2018
NORM/18/2018
BE/20/2018
	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
AB4 AY665713	H	E	H	T	L	L	F	L	S	L	G	S
NORM/2/2010
ILDEFR/3/2012
NORM/4/2012
NORM/5/2012
NORM/6/2013
NORM/8/2015
NELLEAQU/9/2015
BELG/10/2016
BELG/12/2017
ILEDEFR/14/2018
RHONEALPES/16/2018
NORM/17/2018
NORM/18/2018
BE/20/2018
	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
AB4 AY665713	T	N	H	F	L	L	T	R	V	I	F	D
NORM/2/2010
ILDEFR/3/2012
NORM/4/2012
NORM/5/2012
NORM/6/2013
NORM/8/2015
NELLEAQU/9/2015
BELG/10/2016
BELG/12/2017
ILEDEFR/14/2018
RHONEALPES/16/2018
NORM/17/2018
NORM/18/2018
BE/20/2018
	601	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
AB4 AY665713	R	I	T	L	T	R	V	I	F	D	G	Q
NORM/2/2010
ILDEFR/3/2012
NORM/4/2012
NORM/5/2012
NORM/6/2013
NORM/8/2015
NELLEAQU/9/2015
BELG/10/2016
BELG/12/2017
ILEDEFR/14/2018
RHONEALPES/16/2018
NORM/17/2018
NORM/18/2018
BE/20/2018

Supplementary Table S7 ORF30 amino acid alignment 3/4.

	701	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
AB4 AY665713	KVLDPVSGFHVDPVVVDFASLYPSIIQAHNLCFTTLALDEVDLAGLQPSVDYSTFEVGDQKLVFVHAHIRESELLGILLRDWLAMRKAVRARIPTSTPEE										
NORM/2/2010N.....										
ILDEFR/3/2012N.....										
NORM/4/2012N.....										
NORM/5/2012N.....										
NORM/6/2013N.....										
NORM/8/2015N.....										
NELLEAQU/9/2015N.....										
BELG/10/2016N.....										
BELG/12/2017N.....										
ILEDEFR/14/2018N.....										
RHONEALPES/16/2018N.....										
NORM/17/2018N.....										
NORM/18/2018N.....										
BE/20/2018N.....										

	801	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
AB4 AY665713	AVLLDKQQSAIKVICNSVYGFVANGLLPCLRIAATVTTIGRDMLLKTRDYVHSRWATRELLEDNFPGAIGFRNHKPYSVRVYIGDTSVFIKFGVGLTY										
NORM/2/2010										
ILDEFR/3/2012										
NORM/4/2012										
NORM/5/2012										
NORM/6/2013										
NORM/8/2015										
NELLEAQU/9/2015										
BELG/10/2016										
BELG/12/2017										
ILEDEFR/14/2018										
RHONEALPES/16/2018										
NORM/17/2018										
NORM/18/2018										
BE/20/2018										

	901	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
AB4 AY665713	EGVSELGDAMSRQISADLFRAPIKLECEKTFQRLLLITKTKYIGVINGGKMLMKGVLDVRKNCSFINLYARHLVLDLLYDEDVATAAAEVDVPPAEWV										
NORM/2/2010K.....										
ILDEFR/3/2012										
NORM/4/2012X.....										
NORM/5/2012										
NORM/6/2013										
NORM/8/2015										
NELLEAQU/9/2015K.....										
BELG/10/2016										
BELG/12/2017K.....										
ILEDEFR/14/2018										
RHONEALPES/16/2018										
NORM/17/2018K.....										
NORM/18/2018K.....										
BE/20/2018										

	1001	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
AB4 AY665713	GRPLPSGFDKPGRVLVEAYNKRIAPNLDVREFVMTAELSSPEYTNKRLPHLTVYFKLAMRNEELPSVKERIPYVIVAQTEAAEREAGVNSMRGTAQN										
NORM/2/2010										
ILDEFR/3/2012										
NORM/4/2012										
NORM/5/2012										
NORM/6/2013										
NORM/8/2015										
NELLEAQU/9/2015										
BELG/10/2016										
BELG/12/2017										
ILEDEFR/14/2018										
RHONEALPES/16/2018										
NORM/17/2018										
NORM/18/2018										
BE/20/2018										

	1101	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
AB4 AY665713	PVVTKTARQPQKRLLVSDLAEDPTYVSENDVPLNTDYVSHLLGTISVTFKALFGNDVRTTENLLKRFIPETPHKTPKTQALLERAGFEKLTPTTPEE										
NORM/2/2010										
ILDEFR/3/2012										
NORM/4/2012										
NORM/5/2012										
NORM/6/2013										
NORM/8/2015										
NELLEAQU/9/2015										
BELG/10/2016										
BELG/12/2017										
ILEDEFR/14/2018										
RHONEALPES/16/2018										
NORM/17/2018										
NORM/18/2018										
BE/20/2018										

Supplementary Table S7 ORF30 amino acid alignment 4/4.

	1201 . 1210 . 1220
AB4 AY665713	ESRRILHTVFCTLEAAPHQS
NORM/2/2010
ILEDEFR/3/2012
NORM/4/2012
NORM/5/2012
NORM/6/2013
NORM/8/2015
NELLEAQU/9/2015
BELG/10/2016
BELG/12/2017
ILEDEFR/14/2018
RHONEALPES/16/2018
NORM/17/2018
NORM/18/2018
BE/20/2018

Supplementary Table S7 bis: ORF30 SNP (a) and amino acid substitutions (b) of 14 strains collected from 2009 to 2018 compared to reference strains Ab4 AY665713.

(a)

Nucleotide Position	96	175	1256	1286	2081	2254	2876	2968	Length
Ab4 AY665713	G	A	C	G	C	G	T	G	3663 bp
NORM/2/2010	A	G	.	.	.	A	.	A	3663 bp
ILEDEFR/3/2012	A	.	.	3663 bp
NORM/4/2012	3663 bp
NORM/5/2012	A	K	.	3665 bp
NORM/6/2013	.	.	.	A	.	A	.	.	3663 bp
NORM/8/2015	A	.	.	3663 bp
NELLEAQU/9/2015	A	A	.	A	3663 bp
BELG/10/2016	A	A	.	.	3663 bp
BELG/12/2017	A	A	.	A	3663 bp
ILEDEFR/14/2018	T	.	.	.	3663 bp
RHONEALPES/16/2018	.	.	T	.	.	A	.	.	3663 bp
NORM/17/2018	A	A	.	A	3663 bp
NORM/18/2018	A	A	.	A	3663 bp
BRE/20/2018	A	A	.	.	3663 bp

Dots represent identity. K = degenerated base, can either represent a Thymine or a Guanine.

b)

Amino acid Position	59	419	429	694	752	959	990	Length
Ab4 AY665713	R	S	R	A	D	V	E	1220 aa
NORM/2/2010	G	.	.	.	N	.	K	1220 aa
ILEDEFR/3/2012	N	.	.	1220 aa
NORM/4/2012	1220 aa
NORM/5/2012	N	X	.	1220 aa
NORM/6/2013	.	.	K	.	N	.	.	1220 aa
NORM/8/2015	N	.	.	1220 aa
NELLEAQU/9/2015	N	.	K	1220 aa
BELG/10/2016	N	.	.	1220 aa
BELG/12/2017	N	.	K	1220 aa
ILEDEFR/14/2018	.	.	.	V	.	.	.	1220 aa
RHONEALPES/16/2018	.	L	.	.	N	.	.	1220 aa
NORM/17/2018	N	.	K	1220 aa
NORM/18/2018	N	.	K	1220 aa
BRE/20/2018	N	.	.	1220 aa
HSV Polymerase domain correspondance	A	B	B	C	C	D	D	

Dots represent identity. X = unidentified amino acid (due to a degenerate nucleotide, see Table 6a)

A= pre-NH2 terminal domain B= 3'-5' exonuclease domain C= palm domain D= thumb domain

Résultats complémentaires

En complément des résultats présentés dans cet article, nous avons souhaité étendre nos investigations concernant l'analyse par MLST. Cette fois, ce sont les codons ayant permis l'identification des acides aminés à chacune des positions citées dans l'article qui ont été concaténés.

i. Matériel et Méthodes

Les outils d'analyse de séquences et de construction d'arbres ou de réseaux phylogéniques utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans l'article présenté précédemment, c'est-à-dire les logiciels BioEdit version 7.0.5.3 (Tom Hall, Carlsbad, CA, US), MEGA7 version 7.2.26 (Koichiro Tamura, Glen Stecher, Sudhir Kumar, the Pennsylvania State University, University Park, PA, US), Splitstree 4.0 et PopArt (Jessica Leigh, David Bryant and Mike Steel, Dunedin, New Zealand) (Hall 1999; pour revue, Huson and Bryant 2006; Leigh and Bryant 2015; Kumar, Stecher and Tamura 2016). Les séquences nucléotidiques des souches référencées sont issues de GenBank.

ii. Séquences MLST nucléotidiques

Afin de simplifier la lecture, l'analyse MLST basée sur les acides aminés sera désignée MLSTaa, et l'analyse MLST basée sur les codons de ces acides aminés sera désignée MLSTnt. Pour l'analyse MLSTaa réalisée dans la première partie de cette étude, nous avons travaillé sur 81 souches, soit 8 souches belges et françaises collectées dans notre laboratoire, 47 souches isolées au Royaume-Uni, 22 souches isolées en Irlande, 2 souches isolées aux Etats Unis, une souche isolée en Chine et une souche isolée en Australie. Afin de mieux représenter l'ensemble des clades U_L proposés par Bryant *et al.* (2018), trois souches ont été ajoutées à l'analyse MLSTnt, soit les souches NY03 (clade U_L 2, Etats-Unis), 3045-07 et 00c19 (clade U_L 3, Australie et Japon, respectivement), ainsi que 3 autres souches anglaises présentant un intérêt épidémiologique (NOTTS/10/2004 et NOTTS/70/2004, et ESSEX/199/2005). Deux souches ont toutefois été retirées pour l'analyse MLSTnt par manque de données n'ayant pas altéré la détermination du clade par MLSTaa (CAMBS/96/2013 et SUFF/45/2013). De même, les souches irlandaises dont les séquences nucléotidiques n'étaient pas disponibles ont été retirées. La séquence de l'unique souche représentant le clade U_L 4 étant incomplète, elle n'a pas été ajoutée à l'analyse. Au total, 63 souches ont donc été prises en compte dans cette seconde analyse MLSTnt. Les séquences de

Les séquences nucléotidiques alignées (MLSTnt) ont été regroupées selon les clades U_L attribués par l'analyse MLST basée sur les acides aminés (MLSTaa) Figure 24. Une première lecture de cet alignement nous permet d'observer que le clade U_L 9 comportant la souche V592 se distingue de tous les autres alors que l'ensemble des autres clades semble arborer un profil plus proche de la souche Ab4. Cette observation est d'ailleurs visible sur les différents réseaux phylogéniques construits à partir de ces séquences et présentés en Figures 25, 26 et 27.

L'arbre construit selon la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood) ne permet pas d'évaluer d'éventuels phénomènes évolutifs horizontaux comme la recombinaison. La limite de ce modèle se reflète d'ailleurs dans certaines valeurs de bootstrap inférieures à 50. Deux autres types de réseaux ont donc été construits visant à représenter de manière plus appropriée les liens évolutifs des souches étudiées. Le premier réseau présenté en Figure 26 est un réseau réticulé construit selon l'algorithme NeighborNet proposé par SplitsTree4. Ce type de réseau permet de visualiser de manière explicite l'évolution des souches en prenant en compte de possibles recombinaisons. Pour l'interprétation de ce type de réseau, l'absence de multiples « bordures et angles » traduirait une évolution linéaire sans évènements horizontaux. Même si certaines branches ont en effet un aspect assez linéaire, dans l'ensemble, de nombreuses bordures et angles nous permettent de suggérer que l'évolution des souches d'EHV-1 étudiées implique des phénomènes de recombinaison. Cette observation est soutenue par l'analyse d'ajustement au moindre carré associée aux données leur donnant une concordance de 99.86% avec le modèle utilisé par le logiciel. Le second réseau, présenté en Figure 27, a quant à lui été construit selon l'algorithme Median Joining Network proposé par le logiciel PopART. Ce type de réseau est plus abstrait et permet simplement de visualiser et de classer les souches. Sur ces deux réseaux apparaissent les différents clades U_L dans lesquels se classent les souches étudiées. Le nombre de mutations au niveau des sites de MLST distinguant les souches entre elles est visible sur le second réseau (Figure 27), ainsi que l'origine géographique des souches utilisées dans l'analyse. Une autre observation est que les souches françaises et belges se classent dans différents clades (clades U_L 1, 6, 7, 8 10 et 13). C'est d'ailleurs également le cas des souches australiennes (clades U_L 1 et 3), des souches nord-américaines (clades U_L 1&2 et 6) et des souches anglaises qui représentent la majorité des souches utilisées dans l'analyse (clades U_L 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 13) (Figure 27).

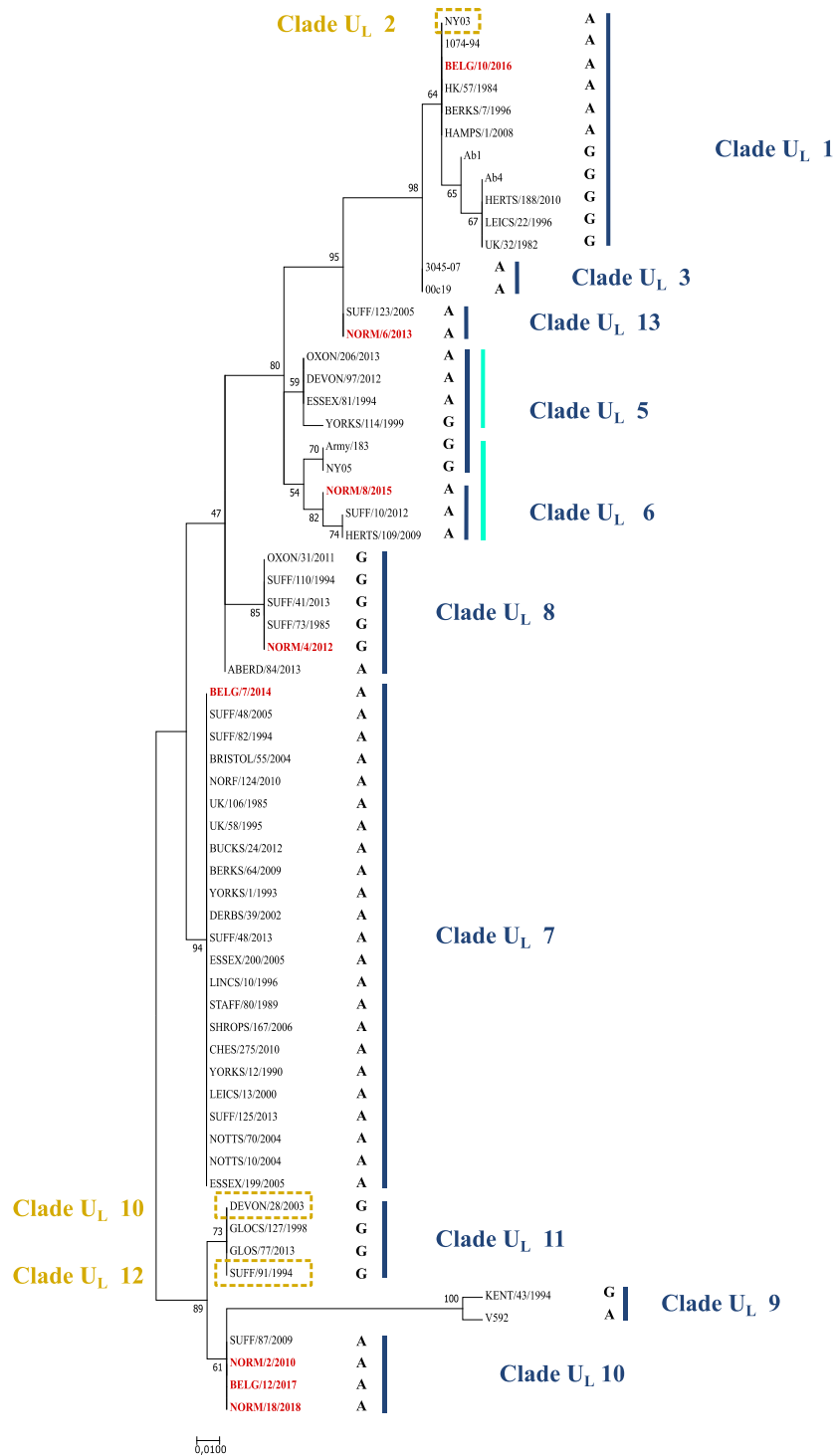


Figure 25 Analyse phylogénique des séquences MLSTnt EHV-1 de 63 souches à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood) et du modèle Kimura-2 (choisi grâce à l'analyse « Model selection » des 63 séquences). Les lignes bleues claires indiquent les clades U_L 5 et 6 identifiés par MLSTnt. Les souches dont les clades U_L ne se différencient pas sont encadrées en pointillés jaunes. Les souches françaises et belges de l'étude sont identifiées en rouge, et le sous-type de la position 254 de l'ORF30 est annoté en face de chacune des souches de l'arbre.

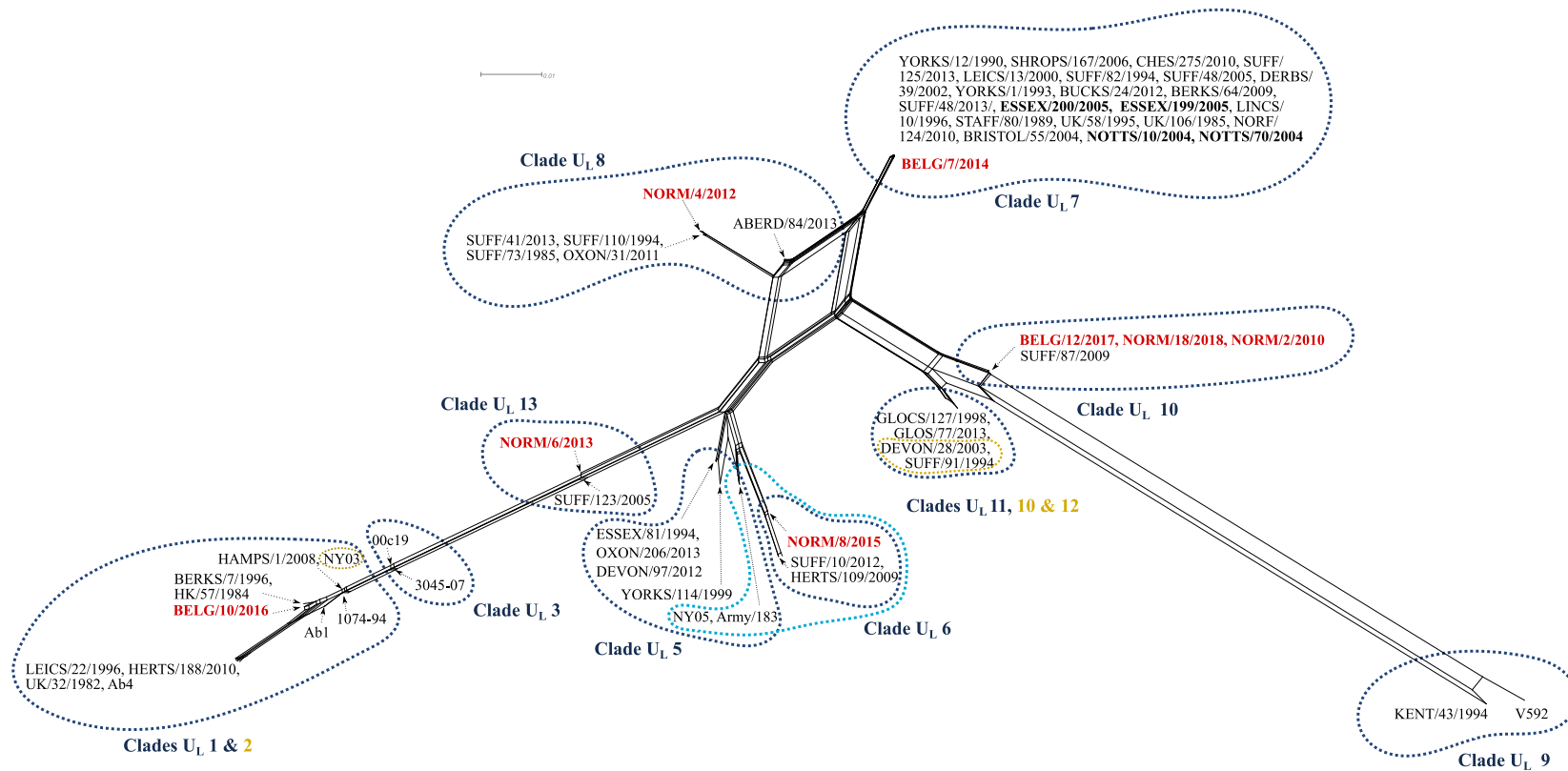


Figure 26 Réseau phylogénique réticulé obtenu grâce à l'algorithme NeighborNet proposé par Splitstree4. Le calcul de l'ajustement au moindre carré a donné un pourcentage de 99,86%. Les différents clades sont entourés de cercles bleu foncé et bleu clair. Les clades non différenciés sont entourés de cercles jaunes. Les souches françaises et belges sont identifiées en rouge.

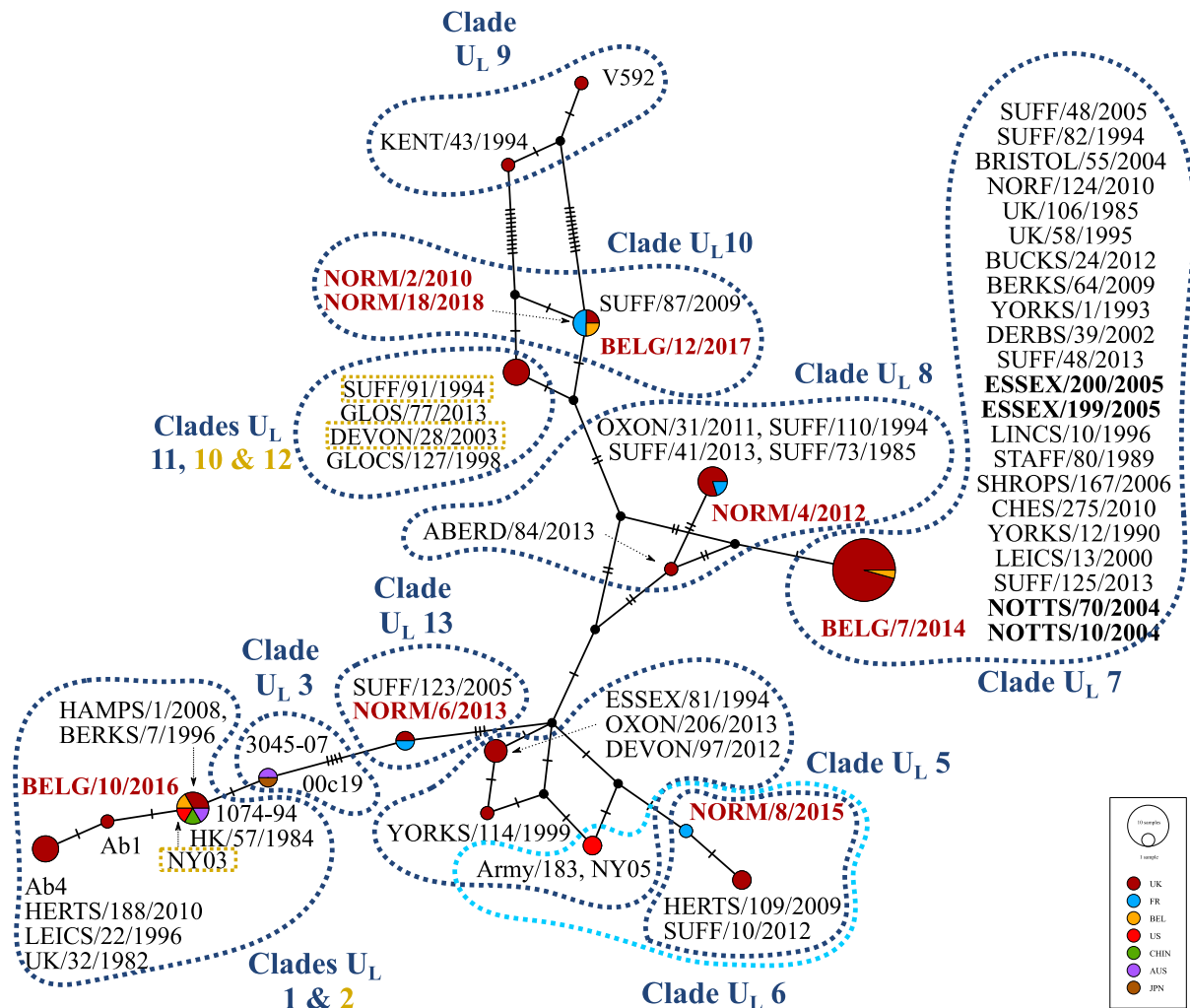


Figure 27 Réseau phylogénique construit selon l'algorithme Median Joining Network proposé par le logiciel PopART. Les différents clades U_L sont entourés d'un cercle en pointillés bleus. Les souches des clades U_L ne se distinguant pas des autres clades sont entourées de cercles pointillés jaunes. Les souches françaises et belges sont identifiées en rouge.

Par ailleurs, l'analyse MLSTnt a permis d'affiner la discrimination de souches entre les clades U_L 5 et 6. En effet, alors que la mutation en position 250 de la séquence en acides aminés de l'ORF11 a été identifiée par Marie Garvey et ses collaborateurs comme déterminante pour le clade U_L 6 (données non publiées), le profil MLSTaa des souches NY05 et Army 183 semble intermédiaire entre le clade U_L 5 et le clade U_L 6, ces souches se classant aux côtés des souches de clade U_L 5 selon l'arbre et le réseau phylogénique. Cette distinction reste subtile, notamment au niveau du réseau phylogénique (voir article). Il est à noter que ces souches sont classées dans le clade U_L 6 selon l'analyse sur génomes complets proposée par

Bryant *et al.* (2018). L'analyse MLSTnt, cette fois, semble apporter une solution à cette difficile distinction entre certaines souches de clade U_L 5 et de clade U_L 6. C'est tout du moins ce que suggèrent les profils MLSTnt des souches ESSEX/81/1994, OXON/206/2013, YORKS/114/1999 et DEVON/97/2012 qui présentent une mutation silencieuse au niveau de l'ORF22 en position 1290 de la séquence d'ADN (équivalent 22-430). La substitution d'une cytosine en adénine entraîne la transformation du codon TCC en TCA, tous deux traduits en sérine. L'absence de changement d'acide aminé induit que cette mutation n'est pas perceptible à l'analyse MLSTaa. Il semble cependant qu'elle ajoute un critère de distinction des souches du clade U_L 5 par rapport aux souches du clade U_L 6 (Figures 24, 25, 26 et 27). Selon l'analyse nucléotidique, les souches NY05 et Army 183 semblent cette fois plus proches du clade U_L 6 que du clade U_L 5, rejoignant la classification proposée par Bryant *et al.* et basée sur le génome complet.

En ce qui concerne les autres clades, aucune mutation silencieuse parmi les codons de l'analyse MLSTnt ne semble distinguer la souche NY03, classée dans le clade U_L 2 par Bryant *et al.* (2018), des souches du clade U_L 1. Deux souches représentant le clade U_L 3 ont été ajoutées et se positionnent à proximité du clade U_L 1 comme le montre également l'analyse MLSTaa proposée par Garvey *et al.* (2019) (Figures 24, 25). Il est également intéressant d'observer que la souche SUFF/91/1994 identifiée comme appartenant à l'U_L clade 12 par Bryant *et al.* (2018), se positionne aux côtés des souches du clade U_L 11 par l'analyse MLSTaa mais également par l'analyse MLSTnt. Il en est de même pour la souche DEVON/28/2003 qui se positionne par MLSTaa et MLSTnt dans le clade U_L 11, alors que la classification sur génomes complets positionne cette souche dans le clade U_L 10.

Discussion

L'étude que nous avons présentée dans cette première partie s'appuie sur la description des trois formes de maladies les plus connues causées par l'EHV-1, soit la forme respiratoire, la forme abortive et la forme nerveuse, au sein d'un même site localisé en Normandie et abritant 169 chevaux. Ces différentes formes ont été observées sur une période de neuf mois et demi et le premier cas a été observé en 2009. L'origine de cet épisode infectieux est inconnue mais l'activité d'élevage impliquant des mouvements fréquents, ainsi que la taille de l'effectif (169 chevaux), sont probablement des paramètres favorables à la transmission ou la réactivation du virus. La pratique de la vaccination au sein de l'effectif a certainement permis de limiter l'étendue de l'épisode infectieux.

Le typage de la mutation en position 2 254 de l'ORF30 (position 752 de la séquence en acides aminés) a permis de constater qu'au moins deux souches ont circulé au sein de l'effectif durant cet épisode infectieux. Cette multiplicité a possiblement joué un rôle dans la diversité des signes cliniques observés durant ce long épisode. Par ailleurs, alors qu'il s'agit de la première description en France d'un tel foyer impliquant les trois principales formes de maladie causées par l'EHV-1, et qu'aucun autre rapport n'a été publié depuis, il n'est cependant pas impossible que l'apparition de plusieurs formes cliniques sur un même site soit plus fréquente qu'on ne l'imagine. Ces différentes formes de maladies sont d'ailleurs observées chaque année, comme le montrent les données collectées entre 2009 et 2018 présentées dans cette étude. En France, c'est en 2018 que le plus grand nombre d'épisodes infectieux de ces 9 dernières années a été enregistré et ce, sur une courte période (mars 2018 à mai 2018, principalement). Durant cette période, des mesures sanitaires exceptionnelles ont été mises en place auprès des éleveurs et des organisateurs d'évènements hippiques afin de limiter l'étendue de la crise sanitaire. Il est probable que l'origine d'une telle augmentation des cas soit en lien avec une rupture des stocks de vaccins, survenue en 2016 et ayant potentiellement entraîné une plus faible vaccination de la part des éleveurs, comme le suggèrent les données sur les stocks et ventes obtenues auprès des fournisseurs de vaccin (Romain Paillot, communication personnelle).

L'objectif de cette étude s'est donc porté sur l'analyse moléculaire des souches isolées en 2009 lors de l'épisode infectieux décrit précédemment, et celles isolées de 2012 à 2018, en France, afin de mieux évaluer leur diversité. Les outils d'analyse moléculaire disponibles en 2009 étant peu nombreux, seules les PCR de quantification et de typage de la mutation en position 2 254 de l'ORF30 ont été utilisées (Allen 2007; Diallo *et al.* 2006). La première a permis à la fois de suivre l'évolution de l'excrétion nasale en vue d'une levée des mesures sanitaires, et l'évolution de la virémie. La seconde a permis d'identifier les deux sous-types connus et associés depuis 2006 à la neuropathogénicité des souches, soit le sous-type A₂₂₅₄ (non-neuropathogène) et le sous-type G₂₂₅₄ (neuropathogène) (Nugent *et al.* 2006). Ces informations, bien qu'utiles pour la gestion des mesures sanitaires sur le terrain, et informatives quant à la possible circulation de plusieurs souches, ne permettent pas d'établir de liens épidémiologiques. Une analyse rétrospective des souches collectées depuis cet épisode, jusqu'en 2018 a donc été réalisée en incluant de nouveaux outils moléculaires développés depuis (Nugent *et al.* 2006; Bryant *et al.* 2018; Garvey *et al.* 2019). Les trois outils utilisés au cours de cette étude, incluant les nouvelles approches, ont permis l'étude du

génomique à plusieurs échelles : le typage de la mutation en position 2 254 de l'ORF30, comme décrit précédemment (Allen 2007) ; le séquençage complet de l'ORF30 ; l'analyse MLST selon la méthode proposée par Garvey *et al.* (Garvey *et al.* 2019).

La mutation en position 2 254 du gène de l'ADN polymérase (ORF30) a été mise en évidence par Nugent *et al.* en 2006 par la comparaison des deux souches de référence Ab4 et V592 (Nugent *et al.* 2006). Ces travaux ont permis d'identifier un certain nombre de mutations entraînant un changement d'acide aminé entre les deux souches, incluant la mutation A2254G entraînant sur la séquence protéique, le changement d'une asparagine en acide aspartique (N752D). L'étude de cette mutation sur plusieurs isolats a permis d'établir une corrélation significative entre cette mutation et le caractère neuropathogène des souches étudiées. Ainsi les souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) étaient significativement isolées lors d'avortements ou de syndromes respiratoires, alors que les souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂) étaient significativement isolées lors d'épisodes nerveux (Nugent *et al.* 2006). Suite à cette étude, un typage des souches pour cette mutation s'est mis en place, notamment suite au développement d'un outil PCR par Allen *et al.* (2007) (Allen 2007; Vissani *et al.* 2009; Pronost *et al.* 2010). Dans notre étude, 137 souches collectées en 2009 et de 2012 à 2018 ont été typées grâce à cet outil. L'étude des données épidémiologiques collectées pour chaque souche en corrélation avec les résultats du typage ont permis de mettre en évidence une association significative des souches A₂₂₅₄ avec les formes abortives (p=0.0002). Cette analyse n'a cependant pas montré de corrélation significative entre les souches G₂₂₅₄ et les formes nerveuses de maladies causées par l'EHV-1. Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant que l'association du sous-type en position 2 254 de l'ORF30 à la neuropathogénicité des souches n'est pas exclusive, suggérant que d'autres mécanismes complexes entrent en jeu dans la pathogénicité des souches (Lunn *et al.* 2009; Perkins *et al.* 2009; Pronost *et al.* 2010; Smith *et al.* 2010; Lechmann *et al.* 2019). Par ailleurs, les deux sous-types A₂₂₅₄ et G₂₂₅₄ ont pu être identifiés parmi les souches collectées en 2018 en France, écartant ainsi la piste d'une nouvelle et unique souche à l'origine de l'explosion de cas observée au printemps 2018. Ainsi, bien que ne représentant qu'une très petite information du génome des souches étudiées, la mutation en position 2 254 de l'ORF30 n'en reste pas moins utile dans l'analyse épidémiologique de l'EHV-1. Ce typage pourrait d'ailleurs présenter d'autres utilités sur le terrain. En effet, l'ADN polymérase indispensable à la réplication virale est la cible d'anti-herpétiques dont l'efficacité chez le cheval fait l'objet de nombreuses études et pourrait être impactée par un changement de conformation de cette protéine cible. C'est

d'ailleurs ce que suggère l'étude menée par Goodman *et al.* dans laquelle l'aphidicoline, une molécule inhibitrice de l'ADN polymérase, montre une meilleure efficacité contre une souche de type N₇₅₂ que contre cette même souche mutée et portant cette fois le sous-type D₇₅₂ (Goodman *et al.* 2007).

Une seconde analyse moléculaire ciblant, cette fois, le gène complet de l'ADN polymérase (ORF30) a été réalisée sur 14 des souches collectées en France et Belgique entre 2009 et 2018. Parmi ces souches, plusieurs mutations silencieuses ou non-silencieuses ont pu être identifiées. Concernant les mutations induisant des changements d'acide aminés, la structure de l'ADN polymérase de l'EHV-1 n'est pour l'heure pas suffisamment bien connue pour que l'on puisse connaître leur impact exact sur la conformation et l'activité de la protéine. Cependant, malgré une faible homologie entre l'ADN polymérase de l'EHV-1 et de l'HSV-1 (environ 54%), il est probable qu'elles arborent une structure commune aux ADN polymérase α (Liu *et al.* 2006). Il est donc possible d'imaginer une projection des mutations non-silencieuses observées lors du séquençage de l'ORF30 des 14 souches françaises et belges sur les différents domaines identifiés de l'ADN polymérase de l'HSV-1. Des substitutions d'acides aminés ont donc été identifiées au niveau du domaine pré-NH₂ (R59G), au niveau du domaine 3'-5' exonucléase (S419L et R429K), au niveau du domaine de la paume (A694V et N752D) et au niveau du domaine du pouce (E990K). Bien que certains domaines d'activités aient été étudiés chez les herpèsvirus humains, il reste difficile d'évaluer l'impact d'un changement de conformation de ces différents domaines sur l'activité des souches d'EHV-1 étudiées (Liu *et al.* 2006; pour revue, Zarrouk, Piret and Boivin 2017). D'un point de vue phylogénique, alors que l'on observe une forte homologie allant de 99.86% à 100% entre les souches séquencées, l'analyse de l'ORF30 complet n'a pas permis de mettre en évidence une tendance évolutive particulière. Cette observation est en accord avec l'analyse de l'ORF30 réalisée par Bryant *et al.* sur 76 souches principalement isolées au Royaume-Uni (Bryant *et al.* 2018). L'évolution des souches ne semble par ailleurs pas corrélée avec le lieu ou la date de collecte, à l'exception de deux souches isolées sur le même site à quelques semaines d'intervalle (NORM/17/2018 et NORM/18/2018). Les deux séquences de l'ORF30 sont en effet identiques pour ces souches. Pour finir, toutes les souches de type G₂₂₅₄ à l'exception de la souche KENT/43/1994 sont regroupées dans un même groupe (Groupe 1). Les souches de type A₂₂₅₄ sont également principalement regroupées dans le groupe 2 et s'y divisent en 3 clusters sans qu'un lien épidémiologique n'ait pu y être associé.

L'analyse MLSTaa, troisième outil de cette étude, cible des régions variables du génome et permet de distinguer l'ensemble des clades identifiés par Bryant *et al.*, à l'exception des clades 2 et 12 (qui n'apparaîtront donc pas dans notre étude) selon Garvey *et al.* 2019 (Bryant *et al.* 2018; Garvey *et al.* 2019). Aucune souche de clade 4 n'a pour l'instant été identifiée avec cet outil. Cette analyse prend en compte 37 loci localisés sur 26 ORFs répartis sur l'ensemble du génome. Le typage MLSTaa des souches françaises et belges, aux côtés de souches anglaises et irlandaises principalement ainsi que de 3 souches australiennes et nord-américaines, ne montre pas non plus de corrélation entre la date ou le lieu de collecte et la distribution des souches, à l'exception des souches NORM/17/2018 et NORM/18/2018 qui se classent au sein du même clade (clade U_L 10). Ces deux souches ont été isolées à un mois d'intervalle suite aux avortements de deux juments sur un même site. Leurs séquences ORF30 et MLSTaa pourraient suggérer qu'il s'agit de la même souche. Une analyse réduite de MLSTaa (15 loci sur 37) a permis d'identifier 7 clades différents où étaient réparties les souches. Les profils MLSTaa des 14 souches françaises et belges permettent de mettre en évidence une co-circulation de souches de différents clades en France, le clade U_L 10 comportant 4 souches françaises et 1 souche belge (soit environ 1/3 des souches étudiées).

Dans le but de mettre en évidence d'éventuelles mutations silencieuses qui accentueraient la distinction des souches et lèveraient certaines ambiguïtés, les codons à l'origine des acides aminés de MLST de chacune des souches ont été recherchés. Les deux profils MLSTaa et MLSTnt permettent par ailleurs de visualiser les similitudes d'un clade à l'autre, l'ensemble des souches étudiées arborant un profil plus proche de la souche de référence Ab4 que de la souche V592. Mais c'est au niveau des clades U_L 5 et 6 que l'intérêt de l'analyse MLSTnt est visible, puisqu'une mutation silencieuse au niveau de l'ORF22 vient rétablir l'attribution des souches Army183 et NY05 au clade U_L 6 (attribuées au clade U_L 5 par la MLST aa). Il s'agit de la seule mutation silencieuse observée sur l'ensemble des souches étudiées, aucune discrimination des clades U_L 1 et 2, ni des clades U_L 11 et 12 ou encore de la souche DEVON/28/2003 (clade U_L 10 selon le génome complet, clade U_L 11 par MLST) n'ayant pu être observée avec cette MLSTnt.

Deux couples de souches ont été inclus à l'étude et analysés par MLSTnt en raison de leur lien épidémiologique. En effet, un premier couple NOTTS/10/2004 et NOTTS/70/2004 correspond à deux souches isolées au Royaume-Uni à partir d'un pool de tissus à la suite d'un avortement (Bryant *et al.* 2018). L'analyse sur génomes complets de Bryant *et al.* (2018) a

permis de classer ces deux souches au sein du clade U_L 7, mais également de montrer une diversité de génomes les distinguant l'une de l'autre. Un second couple également isolé au Royaume-Uni, ESSEX/199/2005 et ESSEX/200/2005, correspond à deux souches isolées à partir de tissus différents d'un même individu lors d'un avortement (Bryant *et al.* 2018). De même, l'analyse sur génomes complets proposée par Bryant *et al.* (2018) a permis de classer ces souches au sein du clade U_L 7 et de montrer l'homologie de leurs séquences. Si les quatre souches sont bien classées dans le clade U_L 7 par l'analyse MLSTnt, les souches NOTTS/10/2004 et NOTTS/70/2004 ne se distinguent pas l'une de l'autre (contrairement à l'analyse sur génomes complets). Cette observation nous invite donc à mesurer les conclusions que l'on pourrait tirer de la classification des souches NORM/17/2018 et NORM/18/2018 isolées sur un même site à un mois d'intervalle. Il est d'ailleurs intéressant de noter que comme ces deux dernières souches NORM/17/2018 et NORM/18/2018, l'analyse phylogénique de l'ORF30 des souches NOTTS/10/2004 et NOTTS/70/2004 proposée par Bryant *et al.* (2018) et reprise dans notre étude montre une homologie de ces souches sur la séquence de ce gène (Bryant *et al.* 2018).

D'un point de vue phylogénique, il est intéressant d'observer que si l'analyse du maximum de vraisemblance ne répartit pas graphiquement les clades MLST de la même manière que l'analyse sur génomes complets proposée par Bryant *et al.*, la représentation phylogénique sous forme de network est, elle, en revanche proche de celle également proposée par Bryant *et al.* (2018). Alors que les modèles mathématiques des arbres phylogéniques ne permettent pas d'évaluer les événements phylogéniques horizontaux, tels que les phénomènes de recombinaison, les réseaux phylogéniques de type splits graph en sont plus représentatifs (pour revue, Nakhleh 2010). L'analyse phylogénique sous forme de réseau des séquences concaténées obtenues par MLST EHV-1 a permis au même titre que l'analyse sur génomes complets de prédire que l'évolution des souches d'EHV-1 implique des phénomènes de recombinaison comme le suggèrent Bryant *et al.* 2018.

Cette première étude phylogénique a également permis, par l'analyse de l'ORF30 de souches collectées sur le terrain, d'identifier un variant de l'EHV-1 se distinguant de tous les autres par une nouvelle mutation non silencieuse en position 2 254. Cette souche a fait l'objet d'une étude plus complète que nous décrirons par la suite.

A. Etude phylogénique de l’EHV-1 en France et découverte fortuite de deux autres alphaherpèsvirus des équidés

- b. *Article 2: Identification of a new equid herpesvirus 1 DNA polymerase (ORF30) genotype with the isolation of a C₂₂₅₄/H₇₅₂ strain in French horses showing no major impact on the strain behaviour*

Introduction

Comme mentionné précédemment, l’EHV-1 peut causer plusieurs formes de maladies, dont la forme respiratoire, la forme abortive et la forme nerveuse. Ces deux dernières résultent de l’installation d’une virémie cellulaire permettant aux particules virales d’atteindre l’endothélium tapissant les vaisseaux sanguins qui irriguent l’utérus et le système nerveux central. Les facteurs déterminant l’issue d’une infection par l’EHV-1 chez le cheval sont probablement de plusieurs natures, impliquant, par exemple, la condition physique et l’âge de l’animal ou encore son statut immunitaire (Lunn *et al.* 2009). Alors que le nombre de cas rapportés de myéloencéphalopathie liée à l’EHV-1 semble augmenter dans le monde, plusieurs hypothèses ont été émises. Pour reprendre l’historique des études menées à ce sujet, le début des investigations moléculaires en association avec les signes cliniques observés est marqué par la description de deux souches, 1B et 1P, isolées respectivement lors d’un cas d’avortement et lors d’un épisode nerveux, et montrant chacune un profil de restriction par endonucléase différent (Allen *et al.* 1985). En 2006, une infection expérimentale de 20 poulains sevrés par 5 souches d’EHV-1 isolées lors d’avortements (qualifiées de souches abortives) et 5 souches isolées lors de formes nerveuses (qualifiées de souches paralytiques) a été menée par Allen & Breathnach. L’isolement de PBMCs chez ces poulains a permis de montrer une durée et intensité accrue de la virémie cellulaire chez les poulains infectés par les souches paralytiques en comparaison avec les poulains infectés avec les souches abortives (Allen and Breathnach 2006). Le polymorphisme non silencieux d’un seul nucléotide A2254G/N752D au niveau de l’ORF30 de souches d’EHV-1 va apporter une pièce au puzzle, avec l’association significative des souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) à un caractère non-neuropathogène, et des souches

G₂₂₅₄ (D₇₅₂) à un caractère neuropathogène au cours d'une étude publiée également en 2006 (Nugent *et al.* 2006). Deux études expérimentales ont suivi cette dernière étude. En s'intéressant à la pathogénicité des mutants et révertants N/D₇₅₂ (A/G₂₂₅₄) de deux souches, Ab4 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) et NY03 (A₂₂₅₄ /N₇₅₂), les auteurs ont pu montrer l'absence de signe clinique neurologique au sein des groupes infectés par les mutants/révertants N₇₅₂, à l'inverse des groupes infectés par les mutants/révertants D₇₅₂ (Goodman *et al.* 2007; Van de Walle *et al.* 2009). Ces premières études ont motivé le typage des souches dans plusieurs régions du monde multipliant ainsi les données épidémiologiques dont la tendance générale semble aller vers une association des souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) avec les cas d'avortement mais montrant des résultats plus conflictuels concernant l'association des souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) à leur caractère neuropathogène (Vissani *et al.* 2009; Pronost *et al.* 2010b; Fritsche and Borchers 2011; Stasiak *et al.* 2015; Garvey *et al.* 2019; Pusterla *et al.* 2020). Cette tendance a également été illustrée dans notre première étude présentée en Partie A.a du Chapitre 3 de ce manuscrit.

Des études s'intéressant au caractère plus fonctionnel des souches de profil A₂₂₅₄ (N₇₅₂) ou G₂₂₅₄ (D₇₅₂) ont, de leur côté, suggéré une affinité cellulaire différente selon le génotype. Les souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) ont en effet montré une réplication plus intense au niveau des cellules épithéliales, alors que les souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) ont été transportées plus tôt que les souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) au-delà de la membrane basale par des cellules immunitaires, suggérant une affinité accrue des souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) pour les cellules immunitaires (Vandekerckhove *et al.* 2010). En accord avec cette étude, une autre étude a montré un recrutement massif des monocytes CD172a⁺ et des lymphocytes T par des souches dites neurovirulentes ou neuropathogéniques (G₂₂₅₄/D₇₅₂). Ce type de cellules, une fois infecté par les souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂), leur permet de passer la membrane basale (Poelaert *et al.* 2019a). D'autres études ont également mis en évidence une stratégie plus affûtée d'évasion des souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂), la sous-régulation de cytokines anti-inflammatoires par les souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂), ou encore une différence de régulation de l'expression de chimiokines, et de réplication au sein des monocytes CD172a⁺ entre les

deux sous-types. Une théorie exposée par plusieurs de ces études est que les souches dites neurovirulentes (G₂₂₅₄/D₇₅₂) dont l'organe cible serait le système nerveux central, vont infecter préférentiellement les cellules immunitaires, rapidement passer la membrane basale et continuer leur infection en masse des cellules immunitaires qui leur servent de transporteur dans la circulation sanguine. Cette stratégie d'infection qualifiée d'explosive par de multiples stratégies, et donc moins discrète, va permettre à l'immunité cellulaire de l'hôte de maîtriser plus facilement l'infection avant qu'elle n'atteigne le système nerveux central, ce qui, malgré tout, arrive dans certain cas. A l'inverse, les souches dites abortives (A₂₂₅₄/N₇₅₂) pourraient être le fruit d'une co-évolution avec l'hôte, aboutissant à une stratégie d'évasion de l'immunité plus silencieuse, démarrant par une forte réplication au niveau de l'épithélium respiratoire, puis un passage discret de la membrane basale par l'infection de quelques cellules immunitaires. Ces souches atteindraient l'utérus de manière discrète, à la façon d'un cheval de Troie, provoquant les signes cliniques d'avortement ou d'atteinte du fœtus que nous avons pu décrire plus tôt dans ce manuscrit (Gryspeerd *et al.* 2010; Wagner *et al.* 2011; Wimer *et al.* 2011; Laval *et al.* 2017; Poelaert *et al.* 2018, 2019b).

Il est également intéressant de noter que par deux fois, l'aphidicoline, un diterpénoïde tétracyclique antimicrobien, antimitotique et inhibiteur de l'ADN polymérase, a montré une efficacité accrue face aux souches de type G₂₂₅₄ (N₇₅₂) par rapport aux mêmes souches mutées A₂₂₅₄ (D₇₅₂) (Goodman *et al.* 2007; Van de Walle *et al.* 2009).

Bien que l'ensemble de ces études aient, à leur tour, apporté de nouvelles pièces au puzzle, ce dernier reste incomplet, et ne permet pas d'expliquer intégralement les mécanismes impliqués dans le développement de certaines formes de maladie chez des chevaux infectés par l'EHV-1. La découverte d'une nouvelle pièce de ce puzzle sera présentée dans cette Partie A.b. Cette découverte s'est inscrite dans le cadre de notre première étude présentée précédemment (Chapitre 3, Partie A.a) et a permis de mettre en évidence une souche portant un troisième génotype en position 2 254 de l'ORF30 différent

de ceux déjà décrits A₂₂₅₄/G₂₂₅₄ (N₇₅₂/D₇₅₂). Les signes cliniques qu'elle a pu engendrer, ainsi que les premières investigations que nous avons pu mener seront présentés au travers d'un nouvel article publié dans le journal *Viruses* (Sutton *et al.* 2020) faisant suite à une lettre de communication publiée dans *Veterinary Records* (Paillot *et al.* 2020).

Lettre de communication

Paillot R, Sutton G, Thieulent C, Marcillaud-Pitel C, Pronost S. **New EHV-1 variant identified.** *Vet Rec.* 2020 May 30;186(17):573. doi: 10.1136/vr.m1441.

LETTERS & NOTICES

Veterinary Record first published as 10.1136/vr.m1441 on 25 May 2020. Downloaded from <http://veterinaryrecord.bmj.com/> on August 17, 2020 at University of Connecticut Health - L. M. Stowe Library. Protected by copyright.

EQUINE DISEASE

New EHV-1 variant identified

EQUINE herpesvirus type 1 (EHV-1) is an important threat to the equine industry worldwide. EHV-1 infection can induce respiratory disease, abortion in mares, neonatal death of foals and myeloencephalopathy (EHM). The reasons for the development of different forms of the disease remain largely unknown, but are likely to involve factors such as virus pathogenicity, environmental conditions, host immunity and genetic background.

A potential explanation was reported which identified that different ORF30 (DNA polymerase subunit) genotypes were significantly associated with different forms of disease.¹ Subsequently, EHV-1 strains were often generally categorised as neuropathogenic (G2254/D752) or non-neuropathogenic (A2254/N752).¹ While the association between the ORF30 A2254 genotype and abortion is now well described,¹⁻⁴ the association between a specific ORF30 genotype and EHM is less evident. ORF30 A2254G genotyping is still used

on a regular basis globally for strain discrimination and epidemiological surveys.²

In 2018, a surge of EHV-1/4 outbreaks was recorded in France by RESPE, the French epidemiological surveillance network in equine pathology. ORF30 A2254G genotyping allowed us to quickly rule out the emergence of one specific EHV-1 strain as the explanation for this situation (ie, both A2254 and G2254 variants were frequently identified).⁴ It was more likely the result of a noticeable decrease in EHV vaccine uptake in the preceding months.

However, investigation of one specific outbreak that lasted several weeks in 2018, led to the fortuitous identification of a new ORF30 variant in gene position 2254. While all EHV strains from this outbreak were detected by a conventional gB qPCR method, the conventional ORF30 2254 genotyping repeatedly failed to provide any results. ORF30 sequencing subsequently revealed that all strains carried a C2254 mutation (H752). All affected horses were vaccinated, with booster immunisations every six months. At least 58 horses (approximately 25 per cent of the total) showed clinical signs of respiratory disease, with hyperthermia and hindlimb oedema. Two horses also developed neurological signs of disease, including one that died.

To our knowledge, this mutation has never been described before. The extent of the genetic variation and the significance of this mutation on DNA polymerase activity, virus replication and pathogenicity is now under investigation. Preliminary results indicate that experimental infection with the C2254 EHV-1 strain under controlled conditions induces a rapid onset of marked respiratory disease lasting at least two weeks in Welsh mountain ponies, with significant virus shedding and cell-associated viraemia.

Despite whole genome sequencing and multilocus sequence typing,^{4,6} it is encouraging that the single nucleotide polymorphism (SNP) approach still proved useful. However, the sole use of the current ORF30 2254 genotype assay by some diagnostic laboratories should be an immediate concern

“ Investigation of one specific outbreak... led to the fortuitous identification of a new ORF30 variant

as this new ORF30 2254 variant will induce false negative results. This event also highlights the importance of multiple diagnostic methods for EHV surveillance in the field.

Romain Paillot, head of equine health
Gabrielle Sutton, Côme Thieulent, PhD students
Christel Marcillaud-Pitel, head of RESPE
Stéphane Pronost, deputy head of research LABÉO Frank Duncombe/UniCAEN Biotargen/RESPE, 14280, Saint-Cordest, France
 email: romain.paillot@laboratoire-labeo.fr

References

- 1 Nugent J, Birch-Machin I, Smith K, *et al.* Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J Virology* 2006;80:4047–60
- 2 Lunn D, Davis-Poynter N, Flaminio M, *et al.* Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J Vet Intern Med* 2009;23:450–61
- 3 Pronost S, Cook R, Fortier G, *et al.* Relationship between equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy and viral genotype. *Equine Vet J* 2010;42:672–74
- 4 Sutton G, Garvey M, Cullinane A, *et al.* Molecular surveillance of EHV-1 strains circulating in France during and after the major 2009 outbreak in Normandy involving respiratory infection, neurological disorder, and abortion. *Viruses* 2019;11:916
- 5 Bryant N, Wilkie G, Russell C, *et al.* Genetic diversity of equine herpesvirus 1 isolated from neurological, abortigenic and respiratory disease outbreaks. *Transbound Emerg Dis* 2018;65:817–32
- 6 Garvey M, Lyons R, Hector R, *et al.* Molecular characterisation of equine herpesvirus 1 isolates from cases of abortion, respiratory and neurological disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens* 2019; doi: 10.3390/pathogens8010007

doi: 10.1136/vr.m1441

Article

Sutton G, Thieulent C, Fortier C, Hue E.S, Marcillaud-Pitel C, Pléau, A.; Deslis, A.; Guitton, E.; Paillot, R.; Pronost, S. **Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C₂₂₅₄/H₇₅₂ Strain in French Horses Showing no Major Impact on the Strain Behaviour.** *Viruses* **2020**, 12, 1160. <https://doi.org/10.3390/v12101160>

Remarque : des erreurs de mise en forme des données ont été identifiées après publication, c'est donc une version corrigée qui est présentée dans ce manuscrit.

Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C₂₂₅₄/H₇₅₂ Strain in French Horses Showing no Major Impact on the Strain Behaviour

Gabrielle Sutton ^{1,2}, Côme Thieulent ^{1,2}, Christine Fortier ^{1,2,3}, Erika S. Hue ^{1,2,3}, Christel Marcillaud-Pitel ⁴, Alexis Pléau ⁵, Alain Deslis ⁵, Edouard Guitton ⁵, Romain Paillot ^{1,2,6†} and Stéphane Pronost ^{1,2,3,*†}

¹ LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France; gabrielle.sutton@laboratoire-labeo.fr (G.S.); come.thieulent@laboratoire-labeo.fr (C.T.); christine.fortier@laboratoire-labeo.fr (C.F.); erika.hue@laboratoire-labeo.fr (E.S.H.);

² BIOTARGEN, Normandie Univ, UNICAEN, 14000 Caen, France

³ ImpedanCELL, Normandie Univ, UNICAEN, 14280 Saint-Contest, France

⁴ RESPE, 14280 Saint-Contest, France; c.marcillaud-pitel@respe.net (C.M.-P.)

⁵ INRAE, UE-1277 Plateforme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE), Centre de Recherche Val de Loire, 37380 Nouzilly, France; alexis.pleau@inrae.fr (A.P.); alain.deslis@inrae.fr (A.D.); edouard.guitton@inrae.fr (E.G.)

⁶ School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle, Chelmsford CM1 3RR, United Kingdom. romain.paillot@writtle.ac.uk (R.P.)

* Correspondence: stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr; Tel.: +33-2-3147-1919

† These authors contributed equally to this work.

Received: 9 September 2020; Accepted: 8 October 2020; Published: date

Abstract: Equid herpesvirus 1 is one of the most common viral pathogens in the horse population and is associated with respiratory disease, abortion and still-birth, neonatal death and neurological disease. A single point mutation in the DNA polymerase gene (ORF30: A2254G, N752D) has been widely associated with neuropathogenicity of strains, although this association has not been exclusive. This study describes the fortuitous isolation of a strain carrying a new genotype C₂₂₅₄ (H₇₅₂) from an outbreak in France that lasted several weeks in 2018 and involved 82 horses, two of which showed neurological signs of disease. The strain was characterised as U_L clade 10 using the equid herpesvirus 1 (EHV-1) multi-locus sequence typing (MLST) classification but has not been identified or isolated since 2018. The retrospective screening of EHV-1 strains collected between 2016 and 2018 did not reveal the presence of the C₂₂₅₄ mutation. When cultured in vitro, the C₂₂₅₄ EHV-1 strain induced a typical EHV-1 syncytium and cytopathic effect but no significant difference was observed when compared with A₂₂₅₄ and G₂₂₅₄ EHV-1 strains. An experimental infection was carried out on four Welsh mountain ponies to confirm the infectious nature of the C₂₂₅₄ strain. A rapid onset of marked respiratory disease lasting at least 2 weeks, with significant virus shedding and cell-associated viraemia, was observed. Finally, an in vitro antiviral assay using impedance measurement and viral load quantification was performed with three antiviral molecules (ganciclovir (GCV), aciclovir (ACV) and aphidicolin (APD)) on the newly isolated C₂₂₅₄ strain and two other A/G₂₂₅₄ field strains. The three strains showed similar sensitivity to ganciclovir and aphidicolin but both C₂₂₅₄ and A₂₂₅₄ strains were more sensitive to aciclovir than the G₂₂₅₄ strain, based on viral load measurement.

Keywords: equid herpesvirus 1; DNA polymerase; ORF30; EHV-1; antivirals; experimental infection

1. Introduction

Equid herpesvirus 1 (EHV-1) is an alphaherpesvirus, classified among the Herpesviridae family and the *Varicellovirus* genus [1]. EHV-1 is one of the most important viral pathogens infecting horses. Some cases have also been reported in other equid and non-equid mammals [2,3].

Transmission of the EHV-1 occurs through direct contact between horses; inhalation of infectious aerosols; direct contact with infected fomites, placenta and aborted foetus; or indirect contact with humans. EHV-1 first infects and replicates in the epithelial cells of the upper respiratory tract [4,5]. At this stage of EHV-1 infection, horses may present a respiratory form of disease associated with nasal discharge, cough and pyrexia. EHV-1 quickly translocates to the draining lymph nodes and associated lymphoid tissues, where it infects leucocytes [6]. Circulation of infected leucocytes during cell-associated viraemia disseminates EHV-1 through the organism to secondary sites such as the central nervous system or the reproductive tract. In these cases, EHV-1 can induce equine herpesvirus encephalomyelitis (EHM; from a mild limb ataxia to quadriplegia) or abortion, stillbirth and neonatal death [7–10]. Finally, like all herpesviruses, EHV-1 has the ability to establish latency after primo-infection and to reactivate under environmental stress conditions, immune weakness or after corticoid-based treatments [11–15].

EHV-1 genome is 150 kbp and carries 76 open reading frames (ORFs) encoding for proteins involved at different stages of the viral replication cycle. Among them, the 3663-kb-long open reading frame 30 (ORF30) encodes for the DNA polymerase [16]. The mechanisms conditioning one type of disease from another are not well-known, but a correlation between a non-synonymous mutation in position 2254 of ORF30 and the pathogenicity of EHV-1 strains was presented in 2006 by Nugent et al. [17]. Strains carrying a guanine (G) in position 2254 (aspartic acid (D) in position 752 of the protein), were identified as neuropathogenic, whereas those carrying an adenine (A) in the same position (asparagine (N752)) were identified as non-neuropathogenic [17–19]. Several studies based on field isolates have since suggested that abortion is largely associated with A₂₂₅₄ EHV-1 strains, whereas in the case of EHM, the genotype/pathotype association is less obvious [20–22]. It has been reported that G₂₂₅₄ EHV-1 strains replicate more efficiently in the horse and produce significantly higher viral loads [23].

Due to the diseases it causes, EHV-1 has a significant impact on equine health and the equine industry. As a preventive strategy, thorough vaccination against EHV-1 reduces the intensity of the clinical signs, virus shedding and therefore the extent of an outbreak [24]. It is generally accepted that implementation of EHV-1 vaccination in the late 1960s, alongside biosafety measures and herd management, have reduced the abortion storm occurrence [10]. To date, no vaccine exists against EHM among the various vaccines against EHV-1, possibly due to the difficulty of experimentally reproducing this form of disease [20,25,26]. Concerning the therapeutic strategy, no EHV-1 specific treatment has been commercialised. However, some studies have shown the in vitro efficacy of antiviral compounds such as ganciclovir (GCV) and aciclovir (ACV) [27,28]. The ORF30 position 2254 mutation has no effect on these molecules' efficacy in vitro but has been shown to modify EHV-1's sensitivity to aphidicolin (APD) in vitro. Indeed, APD had a better antiviral effect against A₂₂₅₄ (N₇₅₂) EHV-1 strains than against G₂₂₅₄ (D₇₅₂) EHV-1 strains [18]. However, in vivo experimental infections showed heterogeneous data after aciclovir treatment [29,30].

This study describes a new ORF30 genetic profile, with the identification of a strain carrying a cytosine (C) in position 2254, resulting in a histidine (H) in amino acid position 752. The strain was isolated at several occasions over 6 months in 2018 from one single and localised EHV-1 outbreak, during which 82 vaccinated horses were affected and showed clinical signs of respiratory diseases, associated with hyperthermia and hind limb oedema [31]. Two horses showed neurological signs of disease and one of them was euthanised. Virus isolation, complete ORF30 sequencing and multi-locus sequence typing (MLST) allowed the identification of a U_L clade 10 EHV-1 strain. A new PCR genotyping test was developed to identify specifically the C₂₂₅₄ strain. Experimental infection on

four Welsh mountain ponies confirmed the infectious nature of the newly isolated strain. In vitro antiviral assays using real-time cell analysis (RTCA) technology [27] against the newly isolated strain and two other A/G₂₂₅₄ field strains showed that these three strains had good sensitivity to GCV, ACV and APD.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection and EHV-1 Strains

One hundred and sixty samples related to EHV-1 outbreaks were collected between 2016 and 2020 from the diagnostic and equine research Institut LABÉO (Saint-Contest, France), the French Epidemiological Surveillance Network for Equine Pathology (Réseau d'Épidémiologie-Surveillance en Pathologie Equine (RESPE), Saint-Contest, France) and associated equine veterinary practitioners (109 nasal swabs or tracheal washes; 6 spinal cord, brain or cerebrospinal fluid samples; 36 liver, lung or placenta samples; and 9 blood samples) (Supplementary Table S1). These data included samples collected from 21 horses housed at the same premises during an EHV-1 outbreak that occurred between March and November 2018. During this outbreak, nasal swabs were taken from 9 horses (Horses 1 to 9) at the onset of clinical signs of respiratory disease. Nasal swabs, heparinised blood and serum samples were taken from 12 horses at the same time (Horses 10 to 21). Serum samples were also collected 14 days later from 11 out of these 12 horses (Horses 10 to 20).

Two other EHV-1 strains, FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) and FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂), collected at LABÉO in 2013 and 2009 respectively, were also used in this study for antiviral assays [27].

2.2. Nucleic Acid Extraction

Nasal swabs were sampled in 4 mL Eagle minimal essential medium complemented with 1% antibiotics (penicillin-streptomycin-amphotericin, reference: CABPSA00-0U, Eurobio, Courtaboeuf, France) or phosphate-buffered saline (PBS). Nucleic acids from nasal swabs and from culture supernatant for the antiviral assay were extracted using QIAmp[®] Viral RNA Mini Kit extraction kits (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's recommendations.

2.3. PCR Assays

Detection/quantitative PCR (PCR 1), a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay, was performed on purified nucleic acids for EHV-1 glycoprotein B (gB) gene detection and quantification using Diallo et al. (2006) primers and probe. All qPCR details are summarised in Supplementary Table S2 [32]. TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for this assay. A standard curve based on a cloned sequence was used for the calculation of the number of copies per sample, as described previously [27,33].

Typing PCR (PCR 2), a second real-time PCR assay, was performed using Allen et al. (2007) primers and probes for the ORF30 A/G₂₂₅₄ typing [34]. TaqMan Universal Master Mix was also used for this PCR and all details are summarised in Supplementary Table S2.

A new PCR (PCR 3) assay was designed with a specific probe for the detection of a cytosine at the ORF30 2254 position (see Results section 3.2).

2.4. Sequencing Assay, MLST, Phylogenetic Analysis and 3D Modeling

ORF30 position 2254 sequencing was performed using Allen et al. (2007) PCR primers (Supplementary Table S2). Amplification PCR (PCR 4) was performed using Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/ μ L) chemistry (Thermo Fisher Scientific). Amplicons were purified using a QIAquick PCR Purification Kit[®] (Qiagen). Sequencing PCR (PCR 5) was performed using a BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). All details are described

in Supplementary Table S2. Sequencing products were purified using a ZR DNA Sequencing Clean-Up® Kit (Zymo Research, CA, USA) and electrophoresis was performed using the 3500 Genetic Analyser® (Thermo Fisher Scientific). Complete ORF30 sequencing was performed by BIOFIDAL (Vaulx-en-Velin, France), as previously described [22] (Supplementary Table S3 and Figure S3). Sequences were analysed using BioEdit version 7.0.5.3 (Tom Hall, Carlsbad, CA, USA) [35]. A median joining network based on ORF30 was built using Population Analysis with Reticulate Trees (PopART) software (Jessica Leigh, David Bryant and Mike Steel, Dunedin, New Zealand) [36].

The MLST analysis was performed as previously described [22,37]. Sequences were also analysed using BioEdit, and a neighbour joining network was built using Splitstree 4 [38].

DNA polymerase three-dimensional models were built using Phyre2 and Phyre2 Investigator web servers and based on the new C₂₂₅₄ EHV-1 strain (identified as FR-56628 in Section 3.3 (accession number: MT968035)) and EHV-1 reference strains Ab4 (AY665713) and V592 (AY464052) ORF30 amino acid sequence homologies with herpes simplex virus 1 (HSV-1, also identified as human herpesvirus 1 (HHV-1)) [39].

2.5. Cell Culture and Virus Culture and Titration

The cell lines from RK13 (rabbit kidney cells, ATCC®, Molsheim, France), EEKs (equine embryonic kidney cells, kindly provided by Merial, Lyon, France) and E. Derm (equine dermal fibroblasts, ATCC®) were used in this study. All the cell lines were cultured at 37 °C with 5% CO₂. RK13 cells were maintained in minimum essential medium (MEM) with Earle's salts (reference: CM1MEM10-01, Eurobio) complemented with 1% L-glutamine (reference: CSTGLY00-0U Eurobio). EEKs were maintained using MEM Alpha (reference: L0476-500, Biowest, Nuaille, France) complemented with 2% Lactalbumine 50× (reference 58901C, Sigma-Aldrich, MO, USA), 1% L-glutamine and 0.2% D-glucose 45% (reference G8769, Sigma-Aldrich). E. Derm cells were maintained in ATCC® 30-2003 Eagle's minimum essential medium (EMEM, ATCC®). All media were also complemented with 10% fetal bovine serum (FBS, reference: CVFSVF00-01, Eurobio) and 1% antibiotics (penicillin-streptomycin-amphotericin, Eurobio).

Peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) were isolated from heparinised blood samples using the Hue et al. method [40] and were co-cultured with a RK13 cell monolayer for up to 6 days. Nasal swabs were sampled in 4 mL, from which 500 µL were inoculated on E. Derm and RK13 cells and cultured for up to 7 days. Co-culture was monitored using IncuCyte® Live Cell Analysis technology (Essen BioScience, MI, USA). The newly isolated EHV-1 strain (FR-56628) was amplified on both E. Derm and RK13 cells. Second passage virus titer was determined on RK13, E. Derm and EEK cells lines using the Karber method [41].

EEK cells were inoculated (1.2×10^4 cells per well) in three 96-well plates for xCELLigence acquisition (E-plate VIEW 96 PET, ACEA Biosciences, CA, USA), IncuCyte® acquisition and viral load quantification, respectively. Cells were cultured for 24 h prior to infection with four EHV-1 strains (the newly isolated C₂₂₅₄ EHV-1 strain, strains FR-6815 (A₂₂₅₄) and FR-38991 (G₂₂₅₄) isolated from the field, and the reference EHV-1 strain KyD (VR700™, ATCC®)) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.05. The time corresponding to 50% of the cell index decrease (CIT₅₀) was measured [42].

2.6. Neutralisation Assay

A neutralisation assay was performed following the World Organisation for Animal Health (OIE) method. E. Derm cells (1.2×10^4 cells per well) and the EHV-1 KyD strain (VR-700™, ATCC®) were used for this assay [43].

2.7. Experimental Infection with EHV-1, Clinical Signs of Diseases, Virus Shedding and Cell-Associated Viraemia

Four 10-month-old male Welsh mountain ponies, seronegative for EHV-1 and EHV-4 (confirmed by seroneutralisation (SN) and complement fixing (CF) assays) and with no history of EHV infection (EHV-1 PCR was negative 3 days before infection), were experimentally infected by individual nebulisation (Flexineb® nebuliser; VLC Europe, Bazoches sur Guyonne, France) [44] with the C₂₂₅₄ EHV-1 strain (third passage on RK13 cells; 2 mL dose per pony, containing a total of 5.10⁷ tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀)). The day of experimental infection was defined as Day 0.

All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council, in the facilities of the EU-1277 Plateforme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE, Infectiology of Farm, Model and Wild Animals facility, [45], INRAE, 2018, Centre Val de Loire, Nouzilly, France). All experimental procedures were approved by the Loire Valley ethical review board (CEEA VdL, committee number 19).

Rectal temperature (RT) was recorded twice a day from Day -5 to Day +21 post-infection (pi). Pyrexia was defined as a rectal temperature exceeding 38.8 °C. Clinical scores were recorded twice a day from Day -5 to Day +21 for cough, attitude, nasal discharge, ocular discharge, mandibular lymph node enlargement, ataxia and other signs of neurological disease. The cumulative clinical score after experimental infection with EHV-1 was calculated using the score for each clinical sign, according to the formula used and reported previously for equine influenza virus infection in Welsh mountain ponies, with some minor modifications [46]:

Cumulative clinical score = score RT + score nasal discharge + 2*(score cough) + score lymph node enlargement + score ocular discharge.

Nasopharyngeal swabs were collected on Day -3, from Day +1 to Day +10 and on Days +12, +14, +16, +18, +20 and +21. The swabs were placed directly into 3 mL of EMEM + 1% antibiotics. Virus DNA extraction was performed from nasopharyngeal swab extracts to measure virus shedding using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen) and according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed as described in Section 2.3. Blood samples were collected by jugular venepuncture into EDTA and dry tubes each day from Day 0 to Day +21. Virus DNA extraction from 2 mL of EDTA blood was performed to determine cell-associated viraemia, using the Nucleospin® Blood L kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR (PCR 1) was performed as described in Section 2.3.

2.8. In Vitro Antiviral Assay

Antiviral assay was performed using xCELLigence Real-Time Cell Analysis (ACEA, Bioscience) and Incucyte® technologies. Cells were infected with three EHV-1 strains (the newly isolated C₂₂₅₄ EHV-1 strain (FR-56628), and two EHV-1 strains FR-6815 (A₂₂₅₄) and FR-38991 (G₂₂₅₄) isolated from the field), as described in Section 2.5, and treated simultaneously with three antiviral drugs in a dose-response manner, as presented in Table 1. All compounds were previously dissolved at 20 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20 °C. One plate was frozen 48 h post-infection (hpi) for viral load quantification. From this plate, nucleic acids were extracted as described in Section 2.2, and viral load was quantified as described in Section 2.3. The two other plates were kept in culture for up to 140 hpi. Infected or non-infected cells treated with 0.5% DMSO were used in each plate as controls. The half maximal effective concentration (EC₅₀) was calculated as previously described [27]. Experiments were carried out at least three times.

Table 1. Antiviral molecules tested against the newly isolated equid herpesvirus 1 (EHV-1) strain (FR-56628) and EHV-1 strains FR-6815 and FR-38991.

Antiviral Molecule Name	Abbreviation	Empirical Formula	DNA Polymerase Inhibitor	Initial Concentration	Final Concentration	Dilution Fold	Replicates
Ganciclovir	GCV	C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄	Nucleoside analogue ¹	50 µM	0.10 µM	2	3
Aciclovir	ACV	C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃	Nucleoside analogue ²	100 µM	0.78 µM	2	3
Aphidicolin	ADP	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	Nucleoside-binding site homology ³	2.5 µM	0.02 µM	2	4

¹ Elion et al. 1983 [47], ² Matthews and Boehme 1988 [48], ³ Sheaff et al. 1991 [49].

2.9. Statistical Analysis

For the antiviral assay results, statistical analysis was performed on StatGraphics® Centurion XVI Version 16.1.12 for Windows (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA) [50]. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare CIT₅₀. EC₅₀ were compared using Tukey's multiple comparison test. Data were considered significant for *p* values < 0.05.

3. Results

3.1. EHV-1 Outbreak Description

In 2018, 82 horses located in a single site in France and kept in different stable blocks showed clinical signs of disease associated with EHV-1 infection (i.e., cough, nasal discharge, anorexia, pyrexia, depression and limb oedema) over a 6-month period from March 2018 to November 2018. The origin of this specific outbreak is unknown.

Due to the increased number of EHV infection cases reported to RESPE in February and March 2018 (12 outbreaks between 1 January 2018 and 31 March 2018), and rapidly after the first clinical signs appeared in a first stable block (5 March), the 64 horses kept in this stable block were monitored for a set of clinical signs of respiratory disease (e.g., cough, nasal discharge, anorexia, defined as "respiratory signs" in this report); temperature; depression and limb oedema from 5 March 2018 to the 22 April 2018. There are no data available for the first block after this date.

As illustrated in Figure 1A, an increased frequency of clinical signs of disease was observed around 22 days (26 March 2018) after the first clinical signs were reported in this group. Sixty-three horses out of 64 showed clinical signs of disease during the monitoring period. The available data showed the first peak on the 25th day (29 March 2018) after the beginning of the monitoring, and this was followed by a second and major peak on the 33rd day (6 April 2018). Overall, 62 (96.9%) horses displayed respiratory signs with a duration ranging from 1 to 13 days (average: 3.2 ± 2.4 days), 45 (70.3%) horses showed pyrexia (>38.8 °C) lasting 1 to 7 days (average: 1.8 ± 1.4 days), 38 (59.4%) horses showed limb oedema lasting 1 to 6 days (average: 2.5 ± 1.5 days) and finally 18 (28.1%) horses presented signs of depression lasting 1 to 4 days (average: 1.5 ± 1 days) (Figure 1B).

The clinical picture was variable from horse to horse, as shown in Figure 1B. Clinical signs appeared alone or in combination, with the most represented combinations being respiratory signs + pyrexia + leg oedema + depression (29.7%); respiratory signs + pyrexia (20.3%); and respiratory signs + pyrexia + leg oedema (14.1%).

Among this population, two horses showed neurological signs of disease (9 April 2018), which required euthanasia for one of them. There is no information available concerning treatments administered during the outbreak or concerning the clinical signs' evolution after 22 April 2018.

During this period, nasal swabs were taken from four horses from the first stable block (Horses 1 to 4) and tested positive for EHV-1 using the PCR 1 assay (5 April 2018). Soon after this first episode, three other horses from a second stable block in the premises (Horses 5 to 7) were sampled and also tested positive for EHV-1 using the same PCR assay (19 April and 26 April 2018). Finally, a new episode was reported from October to November 2018, during which 14 horses from a third stable block in the premises (Horses 8 to 21) were sampled and 11 of them tested positive for EHV-1 using the PCR 1 assay (samples from Horses 12, 15 and 20 were negative; Supplementary Table S4).

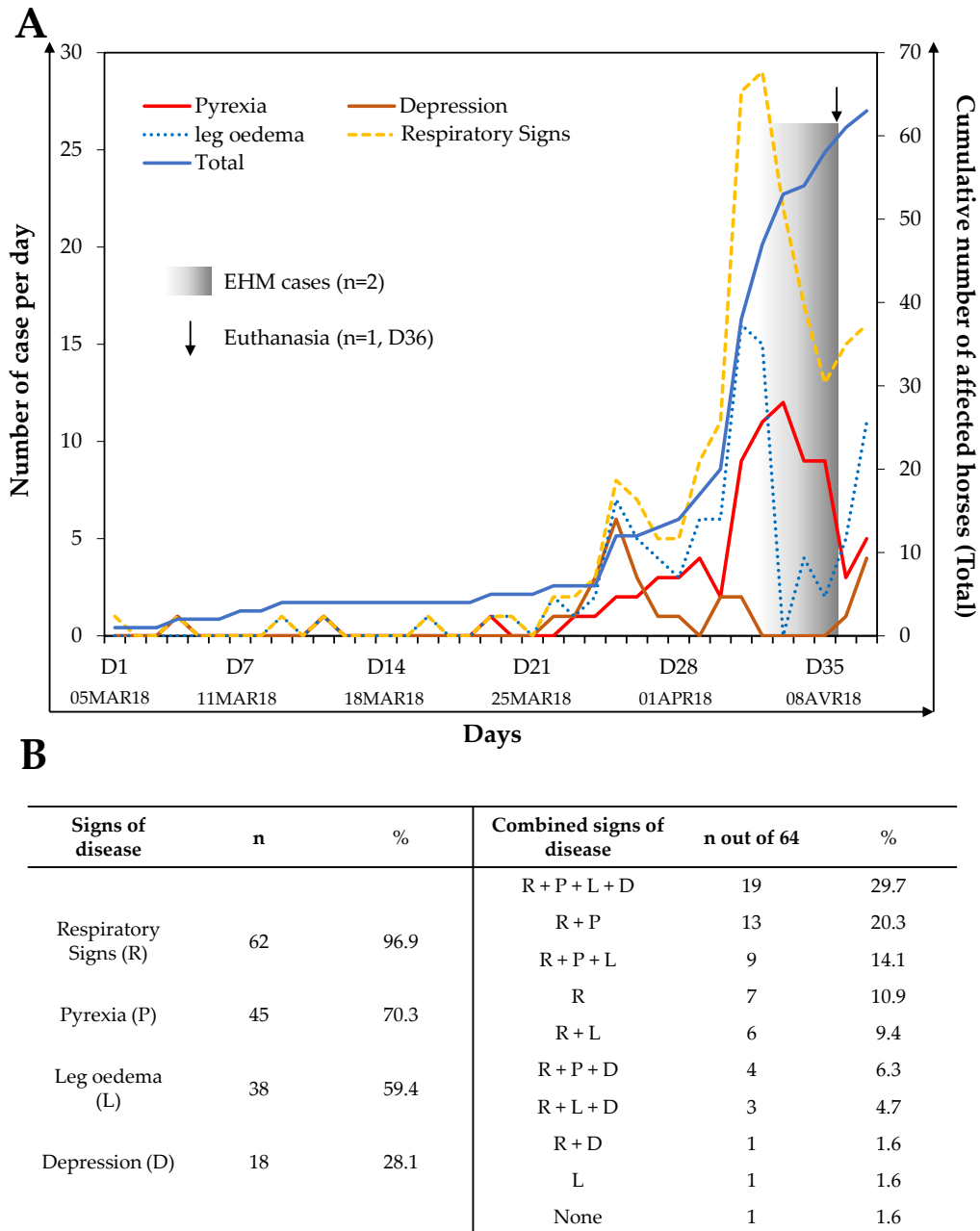


Figure 1. Clinical signs monitored from 5 March 2018 to 22 April 2018 in a group of 64 horses from a single stable block in the premises (A). The left axis represents the number of cases per day with pyrexia, depression, leg oedema or general clinical signs; the right axis represents the total number of horses affected each day (blue line). Frequency of horses showing a sign of disease, alone or in combination, is presented in (B).

3.2. New (ORF30) C₂₂₅₄ Mutation Identification

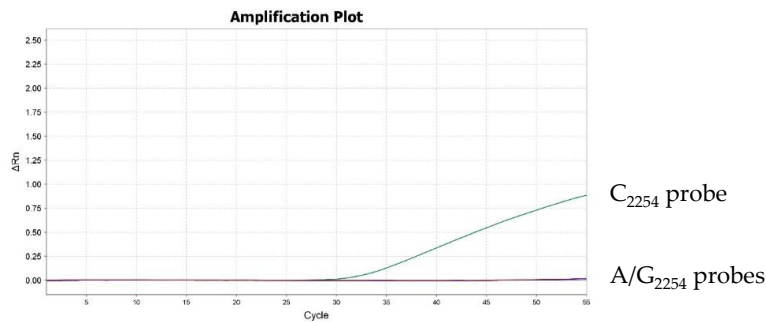
As described above, EHV-1 was detected in 18 nasal swab samples out of 21, all taken from different horses from the premises described previously, using a detection PCR assay (PCR 1) that amplifies a 63-bp fragment of the EHV-1 gB gene (Supplementary Table S4). As the A/G typing of the ORF30 mutation in position 2254 (PCR 2) was unsuccessful, 145-bp ORF30 fragments from the samples taken from Horses 2, 6 and 7 were sequenced, which revealed a cytosine at position 2254.

In order to identify new C₂₂₅₄ strains using a PCR assay (PCR 3), a modified MGB probe was designed based on the existing probe sequences of Allen et al. (2007) (Table 2). Though A₂₂₅₄ and G₂₂₅₄ probes were used in a multiplex PCR (PCR 2), a C₂₂₅₄ probe was used in a simplex PCR (PCR 3), and amplification curves are shown in Figure 2. The specificity of the C₂₂₅₄ probe was validated with the EHV-1 isolates FR-6815 (A₂₂₅₄) and FR-38991 (G₂₂₅₄) and 160 DNA EHV-1 positive field samples (including the 21 samples collected in this study) obtained from different biological matrices and collected between 2016 and 2018 (Supplementary Table S1). Seventeen of the 18 EHV-1 positive (PCR 1) nasal swabs collected in 2018 from the premises described in Section 3.1 were tested and confirmed to contain C₂₂₅₄ EHV-1 strains only. These samples were the only ones to contain the C₂₂₅₄ subtype. No further samples from these premises were available (in 2019 and 2020). Thirty out of the 160 EHV-1 positive samples could not be typed due to low EHV-1 viral load. Fifty-six samples contained the A₂₂₅₄ subtype and 57 samples contained the G₂₂₅₄ subtype.

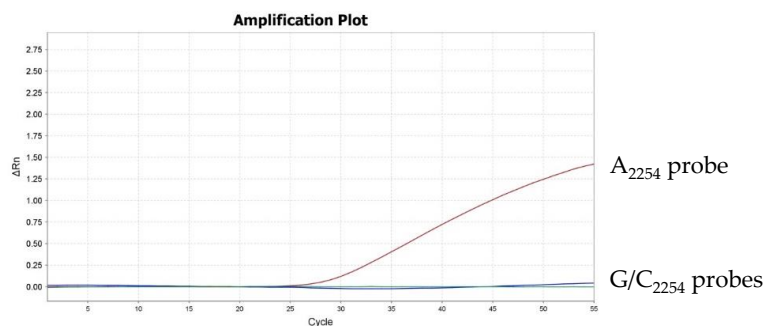
Table 2. PCR conditions of the newly developed assay (PCR 3) for C₂₂₅₄ strain detection.

Primers and Probe	Sequence
Primer GaF	5'-CCACCCTGGCGCTCG-3'
Primer GaR	5'-AGCCAGTCGCGCAGCAAGATG-3'
Probe C ₂₂₅₄	5'- NED-CATCCGTCCACTACTC-MGB-NFQ-3'
Thermoprofile	95 °C during 10 min, 55 cycles x {95 °C during 15 s, 65 °C during 1 min} - QuantStudio™ 12K Flex Real-time PCR System
Mixture for 1 sample	2.5 µL DNA extract + 12.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix + 0.6 µL of each primer (20µM) + 0.5 µL of 10µM probe (depending on titration) + nuclease free water to complete to 25 µL

A C₂₂₅₄ probe amplification curve on EHV-1 strain isolated from Horse 9



B A₂₂₅₄ probe amplification curve on EHV-1 strain FR-6815



C G₂₂₅₄ probe amplification curve on EHV-1 strain FR-38991

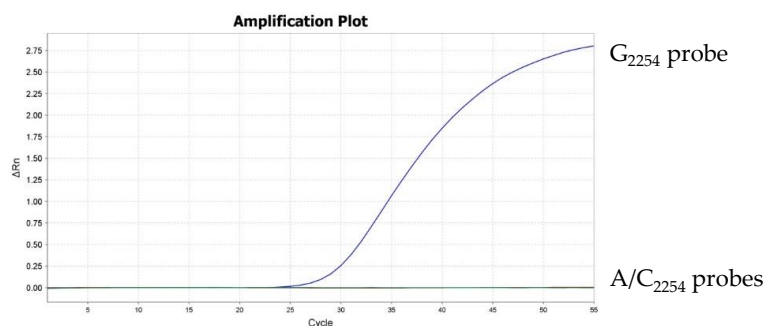


Figure 2. Real-time PCR amplification curves using C₂₂₅₄ probe (green curve) and both A₂₂₅₄ (red curve) and G₂₂₅₄ (blue curve) probes on a 145-bp fragment of the ORF30 for the typing of an EHV-1-positive sample from the premises described in Section 3.1 (C₂₂₅₄) (A), EHV-1 strains FR-6815 (A₂₂₅₄) (B) and FR-38991 (G₂₂₅₄) (C). Simplex amplification curve (C₂₂₅₄) and multiplex amplification curves (A/G₂₂₅₄) are combined in each graph.

3.3. Virus Isolation

Virus isolation from three nasal swabs (Horses 2, 6 and 7) was attempted without success. Consequently, PBMCs were isolated from heparinised blood taken from six other horses (Horses 10 to 15) and co-cultured on RK13 cells. Cytopathic effects (CPEs) characterised by syncytia formation were observed for two samples (from Horses 10 and 13) after 1 and 4 days of incubation, respectively (Figure 3A). The new C₂₂₅₄ probe (PCR 3) confirmed the presence of C₂₂₅₄ EHV-1 in the

culture supernatants collected after 5 days (Horse 13) and 6 days (Horse 10) of incubation (Figure 3B). The strain isolated from Horse 13 was identified as FR-56628 (MT968035). Virus isolation on an E. Derm cell monolayer from a nasal swab collected from Horse 13, at the same time, was also successful. The presence of mucosal neutralising antibodies was investigated in five nasal swabs (when sample quantity allowed it) isolated from Horses 16 to 19 and from Horse 21 in a neutralisation assay using the EHV-1 strain KyD VR700™. No neutralisation was measured (data not shown). In vitro growth of the strain FR-56628 (C₂₂₅₄) on EEK cells was compared to three other EHV-1 strains FR-6815 (A₂₂₅₄), FR-38991 (G₂₂₅₄) and reference strain KyD VR700™ (G₂₂₅₄), showing a similar decrease of the cell index for the four strains (Figure 3C). The viral load was measured and calculated in Log₁₀ for each strain 48 h post-infection (hpi) on EEK cells (MOI of 0.05) (Supplementary Table S5). There was no significant variation ($p = 0.77$) of viral load 48 hpi between the EHV-1 strains FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂), FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) and FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) and KyD VR700™. The viral load values in Log₁₀ for each strain are as follows: 8.99 ± 0.46 (FR-56628); 9.21 ± 0.20 (FR-6815); 9.14 ± 0.18 (FR-38991); and 9.04 ± 0.07 (KyD VR700™). However, there was a significant difference in the CIT₅₀ mean \pm standard between the EHV-1 strain FR-6815 and the EHV-1 strains FR-38991 and FR-56628 ($p = 0.033$). The CIT₅₀ values for each strain are as follows: 1.11 ± 0.10 (FR-56628); 1.00 ± 0.06 (FR-6815); 1.12 ± 0.13 (FR-38991); and 1.00 ± 0.05 (KyD VR700™).

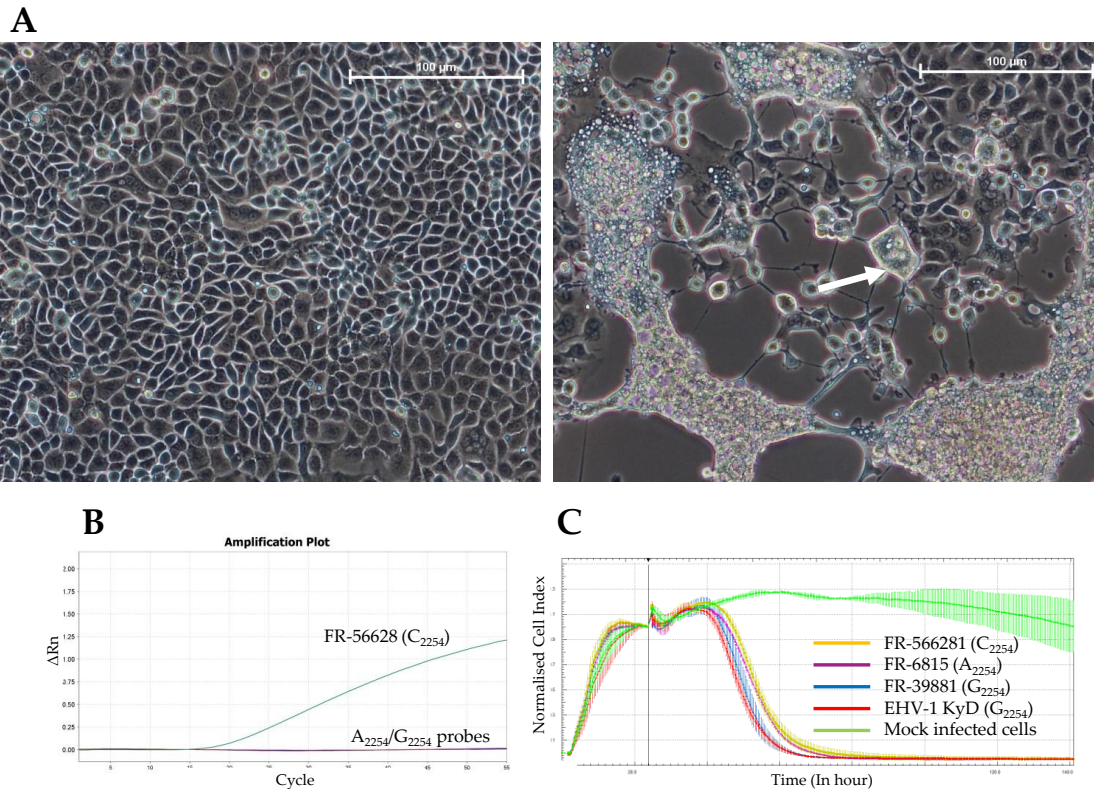


Figure 3. Microscopic observation of RK13 cell monolayer without (left) or with infection with the EHV-1 strain FR-56628 (120 hpi; right). Microscope lens: $\times 20$. Scale bar: $100 \mu\text{m}$. White arrow indicates an example of syncytia formation (A). Amplification curves for the EHV-1 strain FR-56628 detected with the C₂₂₅₄ probe (B). Real-time cell analysis of EEK cells infected with EHV-1 strains FR-56628 (C₂₂₅₄; yellow curve), FR-6815 (A₂₂₅₄; purple curve), FR38991 (G₂₂₅₄; blue curve), and reference strain KyD VR700™ (G₂₂₅₄; red curve) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.05, in comparison with mock infected cells (green curve) (C).

3.4. Phylogeny

The full ORF30 sequence was obtained from the newly isolated EHV-1 strain FR-56628 and compared with ORF30 from the EHV-1 reference strains Ab4 and V592. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified between EHV-1 strains FR-56628 and Ab4 (positions 96, 2254 and 2968) and three SNPs were also identified between EHV-1 strains FR-56628 and V592 (positions 96, 924 and 2254), as shown in Figure 4 (complete ORF30 alignment in Supplementary Figures S5 and S6). The 2254 and 2968 SNPs are non-synonymous (D752H or N752H and E990K, respectively).

(a)	90-----100	920-----930	2250-----2260	2960-----2970
Ab4 (AY665713)	CGGGCAGACCG	GTTTCGGGTGGTA	CGTCGACTACT	CGGCAGCAGAG
FR-56628A.....C.....A..
V592 (KC924819)T.....A.....A..

(b)	740-----750-----760	980-----990-----1000
Ab4 (AY665713)	DEVDLAGLQPSVDYSTFEVGD	YDEDVATAAAEVTDVPPAEWV
FR-56628H.....K.....
V592 (KC924819)N.....K.....

Figure 4. Open reading frame 30 (ORF30) nucleotide (A) and amino acid (B) sequence alignments between the EHV-1 reference strains Ab4, V592 and the newly isolated strain FR-56628.

Three dimensional models of the DNA polymerase were obtained based on the homology of the ORF30 amino acid sequences from EHV-1 strains Ab4 (G₂₂₅₄), V592 (A₂₂₅₄) and FR-56628 (C₂₂₅₄) with herpes simplex virus 1 (HSV-1) (Figure 5). The amino acid residue in position 752 is located in the palm domain and remains close to the fingers domain. After analysis of the sequence by Phyre2 Investigator, the web server predicted that this residue change was unlikely to affect the protein function (data not shown).

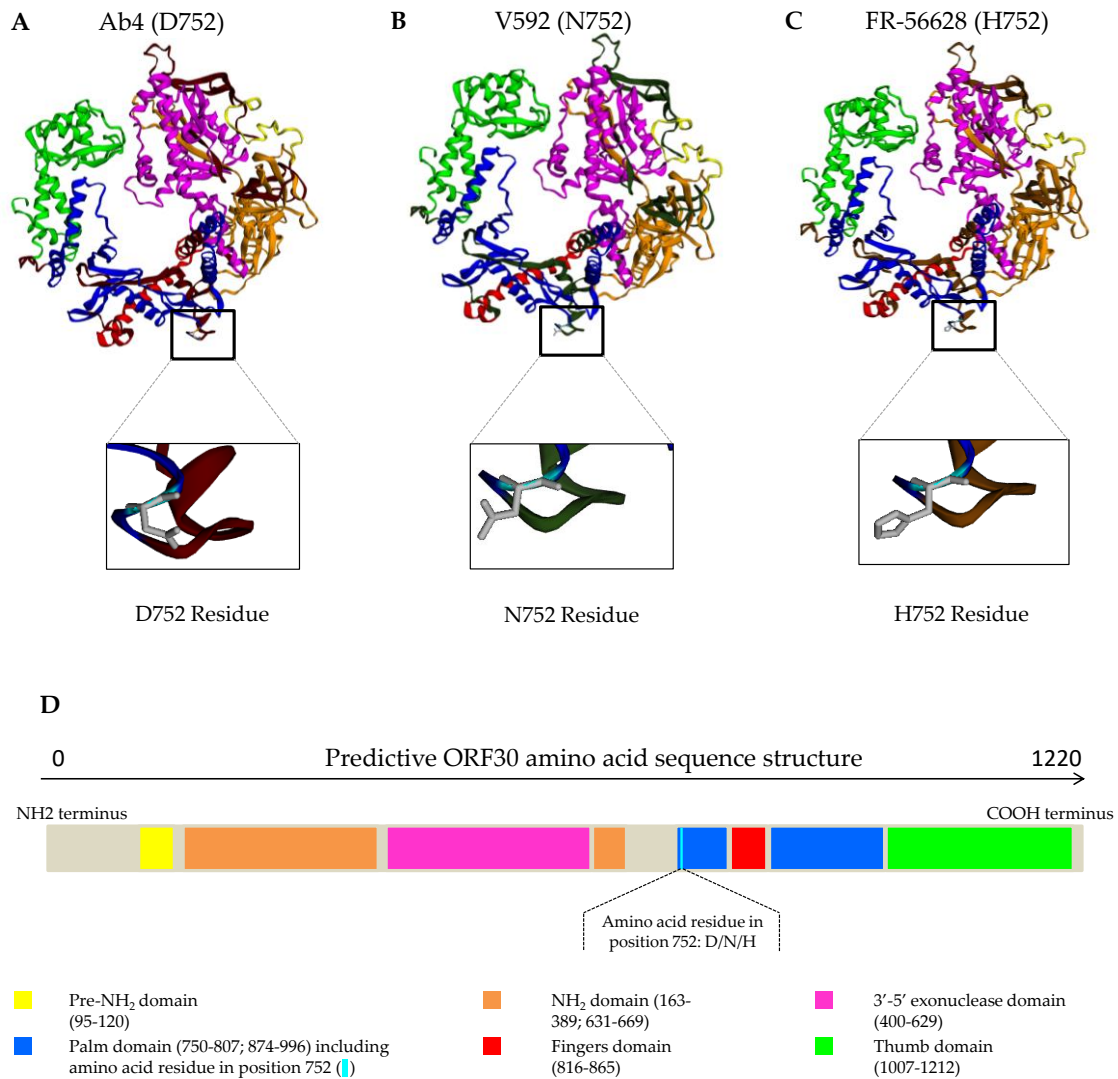


Figure 5. Three-dimensional models of EHV-1 strains Ab4 (D₇₅₂) (A), V592 (N₇₅₂) (B) and the newly isolated EHV-1 strain FR-56628 (H₇₅₂) (C). ORF30 amino acid sequences based on their homology with HSV-1 DNA polymerase and predictive structure of the ORF30 amino acid sequence (D).

The complete ORF30 gene sequence was compared with previously published sequences from 14 EHV-1 strains from France and Belgium, 67 EHV-1 strains mostly from the United Kingdom and reference strains Ab4 and V592 (Figure 6) [22,51]. As previously described, the ORF30 median joining network discriminates these strains in two groups, the second one being a group of three clusters. The EHV-1 strain FR-56628 is located in cluster 2 with one French strain isolated in 2010, three other French strains isolated between 2015 and 2018, a Belgium strain isolated in 2017 and six strains from the UK isolated between 1993 and 2013 (ORF30 maximum likelihood tree shown in Supplementary Figure S7). The EHV-1 strain FR-56628 showed one to four nucleotide differences when compared with the other EHV-1 strains from cluster 2 (including the mutation in position 2254), and from one to five nucleotide differences when compared with all 83 EHV-1 strains of the network (including the mutation in position 2254).

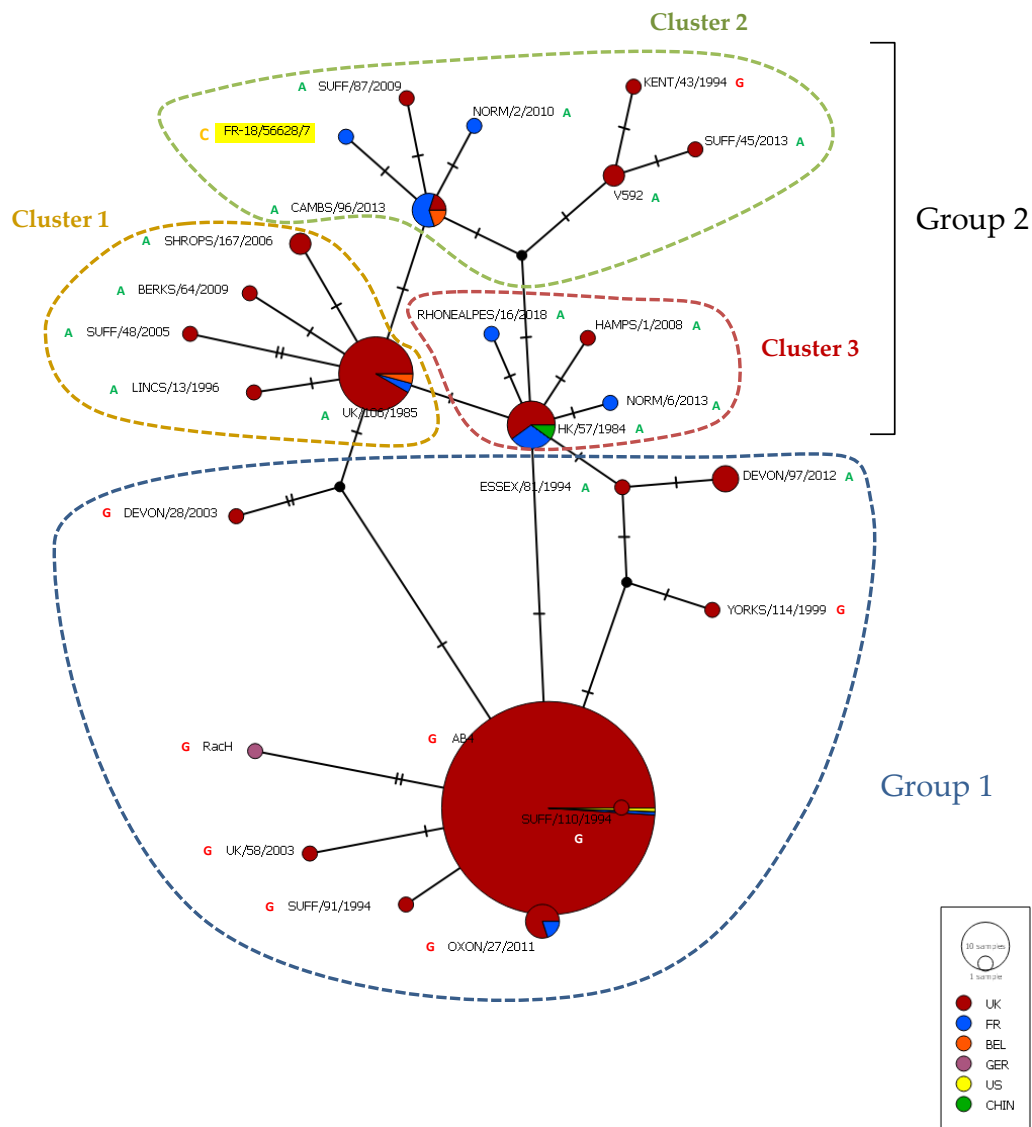


Figure 6. Median joining network representing ORF30 nucleotide sequences of Ab4 and V592 reference strains, 67 EHV-1 strains previously described [51] and 15 EHV-1 strains from France and Belgium [22], including the newly isolated EHV-1 strain FR-56628 (highlighted in yellow). The ORF30 position 2254 nucleotide is annotated.

The EHV-1 MLST, as described by Garvey et al. (2019) [37], was also performed, and the newly isolated strain was classified as U_L clade 10 (Supplementary Table S8). The EHV-1 strain FR-56628 MLST amino acid sequence was compared to 79 EHV-1 strains from the UK, Ireland, China, Australia, the United States, Belgium and France and was grouped with the EHV-1 French strains NORM/2/2010, NORM/18/2018, the EHV-1 Belgium strain BELG/12/2017, the EHV-1 UK strain SUFF/87/2009 and the EHV-1 Irish strain IRL/348/2002, all from U_L clade 10 (Figure 7). The amino acid change in ORF30 position 752 was the only feature discriminating the EHV-1 strain FR-56628 from the five other U_L clade 10 strains shown in this report (Supplementary Table S8). The U_L clade 10 EHV-1 strains NORM/2/2010, NORM/18/2018, BELG/12/2017 and SUFF/87/2009 were also grouped in ORF30 cluster 2, as shown in the ORF30 maximum likelihood tree in Supplementary Figure S7.

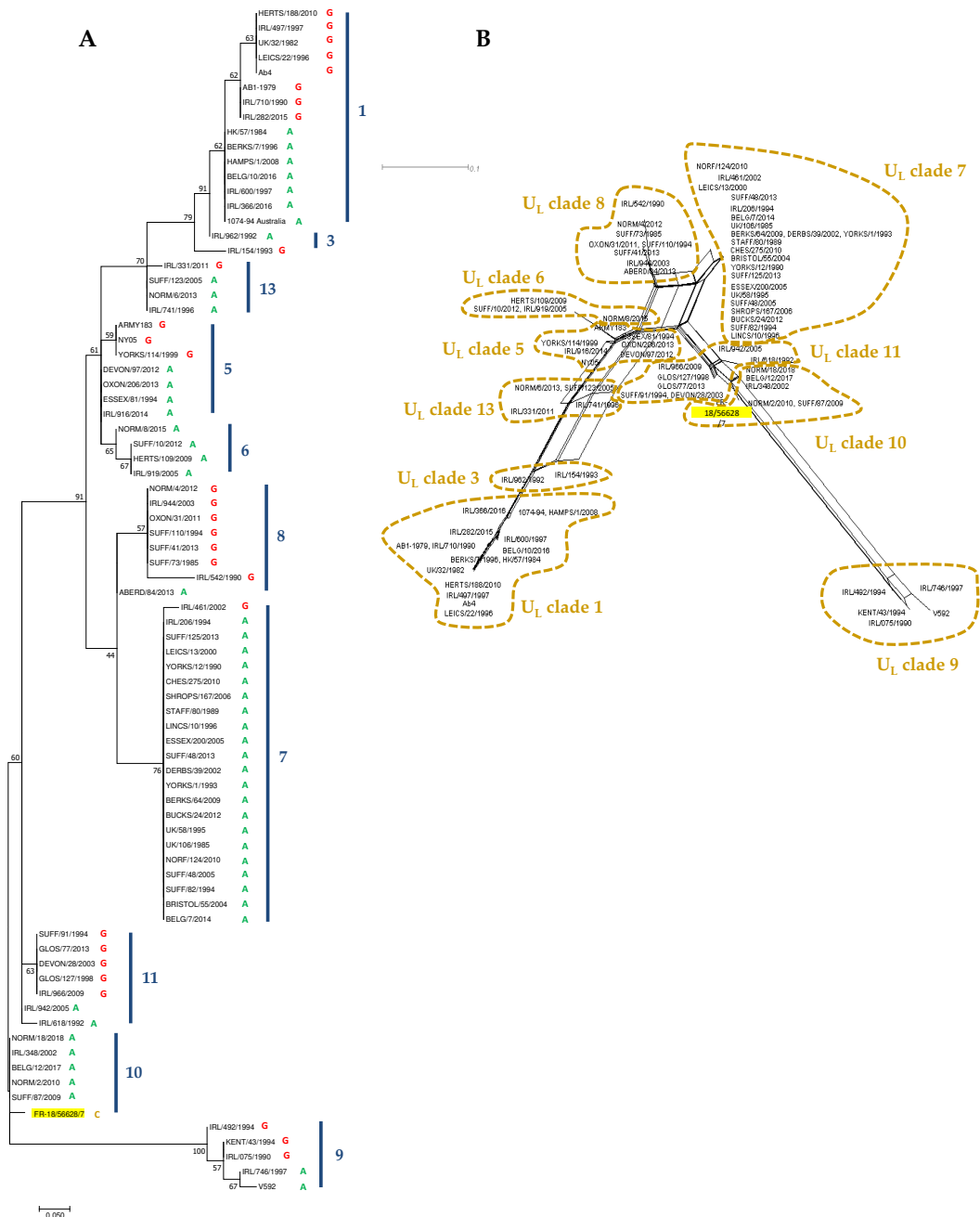


Figure 7. Maximum likelihood phylogenetic tree based on Jones–Taylor–Thornton model (A) and neighbour joining network (B) both built from multi-locus sequence typing (MLST) amino acid sequences from 46 strains from UK, 1 strain from China, 1 strain from the US, 1 strain from Australia, 9 other strains from France and Belgium including the new strain FR-56628 (highlighted in yellow) and 22 strains from Ireland.

Two different ORF37 profiles were identified and confirmed for the EHV-1 strain FR-56628 isolated from Horse 13 (A₇₉₅ and G₇₉₅), which did not induce an amino acid change but which suggests that two variants of the strain were isolated (V1 and V2, Table 3). V2 was the only variant isolated from the Horse 10 sample.

Table 3. MLST codon alignment between reference strains Ab4 and V592, and strain FR-56628 variants V1 and V2, based on MLST. FR-56628 nucleotides in ORF30 position 2254 and ORF37 are highlighted in grey.

Strain	U _L	ORF 2	5	8	11	11	13	13	13	13	13	13	14	14	14	15	22	29	30	30	31	32	33	33	34	36	37	39	40	42	45	46	50	52	57	73	76	
	Clade	nt	175	340	340	565	703	913	1213	1378	1474	1477	1495	1852–1860	1882	2074	496	1288	34	2254	2968	268	124	43	2926	196	139	793	1318	586	3823	1279	418	1009	1156	2410	364	382
Ab4	1	GGC	GGC	GAC	CAG	AGG	TCA	GCA	GCC	GAA	ACT	GCA	---	AGA	AGC	GAT	TCC	ACG	GAC	GAG	AAC	TCG	AAT	AAT	GAT	AGC	GCG	TCA	CGT	AAG	GAA	TTT	CCG	GCC	AAG	GCC	TTT	
FR-56628 V1	10	.A.	.T.T.	.	A.	.	.	CCCAGCCG	.	.	A.	.	.	C	A.	.G.	.	C.	G.	.	.	.TAG.	.C.	.	.	.T.	.G.	.	.C.
FR-56628 V2	10	.A.	.T.T.	.	A.	.	.	CCCAGCCG	.	.	A.	.	.	C	A.	.G.	.	C.	G.	.	.	.T.	.	.	.G.	.C.	.	.	.T.	.G.	.	.C.	
V592	9	.A.	.T.	A.	A.	.	.	.T.	.	A.	.	.	CCCAGCCG	.	.	A.	C.	.A.	A.	A.	.G.	.T.	C.	G.	.G.	C.	.T.	.T.	.A.	.G.	.G.	.C.	T.	.T.	.G.	.T.	.C.	

nt = nucleotide position.

3.5. Experimental Infection

Four 10 month-old Welsh ponies were experimentally infected by nebulisation with EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄). Daily clinical scores were evaluated twice a day. As illustrated in Figure 8A and Supplementary Figure S9, all ponies showed a significant increase ($p < 0.0001$, multifactorial ANOVA with days as main effect and pony ID as covariates) of the cumulative clinical score from day 1 post-experimental infection, from the second checking point of the day. Overall, the cumulative clinical score started to decrease 10 to 14 days post-infection, depending on the individual, but remained above pre-infection level until the end of the study (i.e., 21 days after experimental infection). Pyrexia (i.e., body temperature > 38.8 °C) was measured in all ponies on day 1.5 post-infection, on the second checking point of the day (Figure 8B). Abnormal body temperatures were mostly recorded in the afternoon and lasted from 4 to 8 days, with peaks of temperature up to 40.6 °C. Nasal discharge was first observed on day 1 and was recorded until the end of the study. Cough was recorded in all ponies on day 2 post-infection and intermittently thereafter. Mandibular lymph node enlargement was observed for one pony on day 2, and all four ponies from day 3 to day 11. All ponies showed signs of lethargy on day 2, and an overall reduction in food consumption was also noted during the first week post-infection. Finally, tail hypotonia was observed for all ponies, from day 2 post-infection and lasted from 4 to 5 days.

Viral load quantification showed that virus shedding started on day 1, with a peak between days 2 and 6, depending on the pony (Figure 8C). From day 7, nasal shedding started to decrease but EHV-1 remained detectable in nasopharyngeal swabs from all ponies on day 16 post-infection, and was still detected in two out of four ponies on day 20. EHV-1 was detected in the blood sample collected from one pony on day 3, from three out of four ponies on day 5 and in blood samples from all four ponies from day 6 to the end of sampling (day 20). The peak was measured on day 9 (Figure 8D).

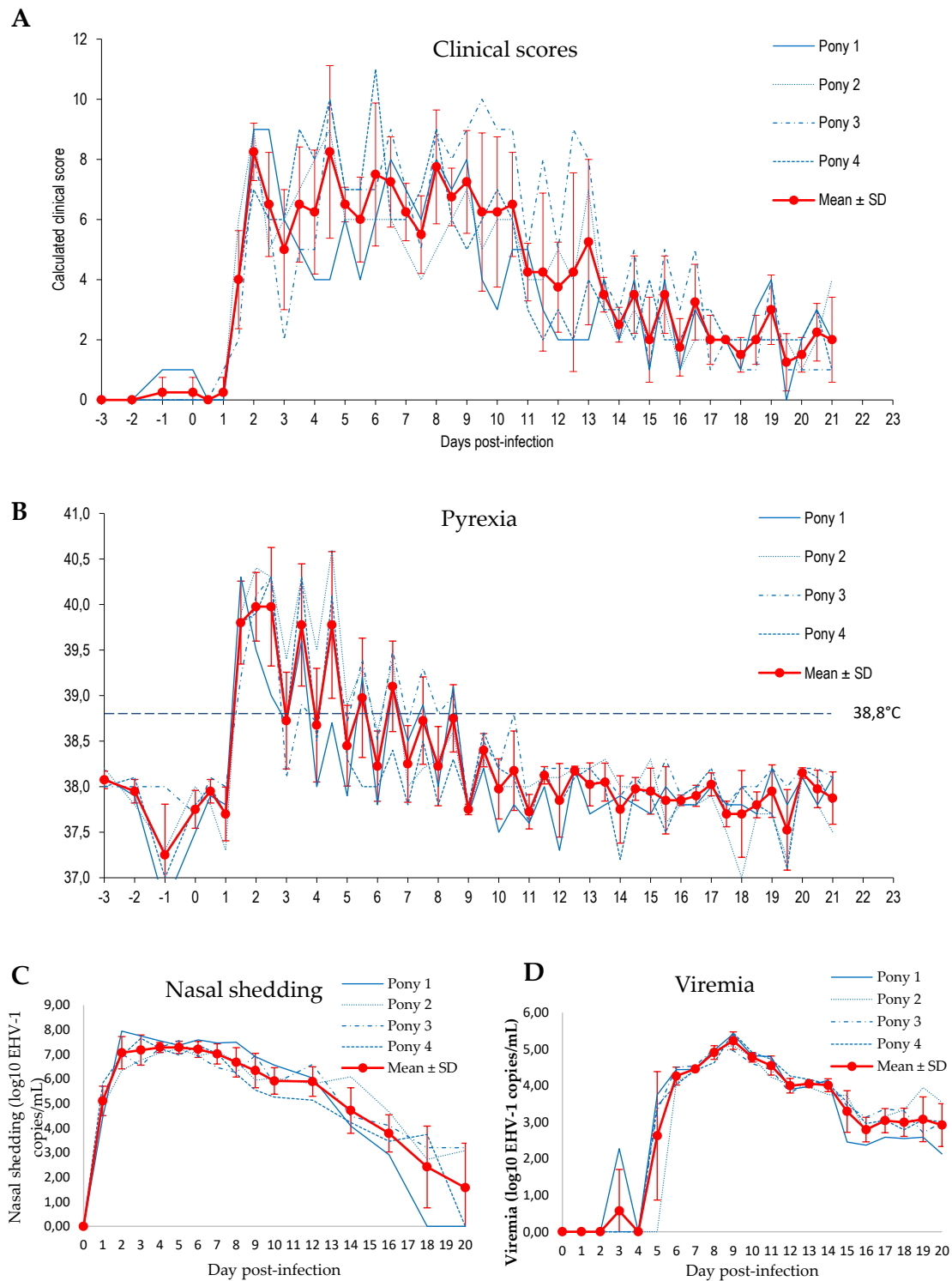


Figure 8. Clinical scores (A), pyrexia (B), nasal shedding (C) and viraemia (D) observed from -3 days to 21 days post-infection with EHV-1 strain FR-56628 in four Welsh ponies.

3.6. Antiviral Assay

The activity of three antiviral compounds (aciclovir, aphidicolin and ganciclovir) was measured against three EHV-1 strains carrying the C₂₂₅₄ (H₇₅₂), A₂₂₅₄ (N₇₅₂) and G₂₂₅₄ (D₇₅₂) mutations

(FR-56628, FR-6815 and FR-38991, respectively) and results are shown in Table 4. RTCA curves and viral load at 48 hpi for each concentration of ganciclovir, aciclovir and aphidicolin against EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄) are shown in Supplementary Figure S10. Concerning the antiviral assay, results obtained by qPCR and RTCA showed that aphidicolin was the most effective compound against the three EHV-1 strains, whereas aciclovir was the least effective. There was no significant difference of sensitivity ($p > 0.05$) between the three EHV-1 strains (FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂), FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) and FR-38991(G₂₂₅₄/D₇₅₂)) to ganciclovir and aphidicolin according to EC₅₀ values obtained from the qPCR assay. When measured by impedancemetry, the EHV-1 strains FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) appeared to be more sensitive ($p = 0.046$) to aphidicolin than the FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) strain. According to EC₅₀ obtained from the qPCR assay, the FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) and FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) strains were significantly more sensitive to aciclovir ($p = 0.012$ and 0.036 , respectively) than FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂). There was no significant difference in sensitivity between FR-56628 and FR-6815 compared with aciclovir using the qPCR assay. Impedance measurements showed that FR-56628 was significantly more sensitive to aciclovir ($p = 0.019$) than FR-6815, but showed no significant difference of sensitivity between FR-56628 and FR-38991, and between FR-6815 and FR-38991.

Table 4. EC₅₀ (μM) ± standard deviation (SD) of ganciclovir (GCV), aciclovir (ACV) and aphidicolin (APD) against three different EHV-1 ORF30 2254 variants measured by qPCR assays and real time cell analysis (RTCA).

Strains	GCV		ACV		APD	
	qPCR	RTCA	qPCR	RTCA	qPCR	RTCA
FR-56628 (C ₂₂₅₄ /H ₇₅₂)	0.57±0.2	1.29±0.69	7.87±0.98 ^a	30.32±3.89 ^c	0.05±0.03	0.14±0.07
FR-6815 (A ₂₂₅₄ /N ₇₅₂)	0.75±0.44	2.49±1.20	14.15±5.27 ^b	56.19±11.04 ^c	0.09±0.04	0.19±0.03 ^b
FR-38991 (G ₂₂₅₄ /D ₇₅₂)	0.73±0.42	1.20±0.55	35.98±10.97 ^{ab}	35.09±10.32	0.09±0.04	0.09±0.05 ^b

^a Significant difference between strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) and strain FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) ($p < 0.05$)

^b Significant difference between strain FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) and strain FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) ($p < 0.05$)

^c Significant difference between strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) and strain FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) ($p < 0.05$).

4. Discussion

Equid herpesvirus 1, which was first designated as equine abortion virus [52] is a major cause of infectious abortion and can also cause sporadic EHM cases, in addition to usually mild respiratory infection. In 2006, Nugent et al. suggested that ORF30 position 2254 could discriminate a neuropathogenic genotype (G₂₂₅₄/D₇₅₂) from a non-neuropathogenic genotype (A₂₂₅₄/N₇₅₂), although the mechanisms involved are not well defined [17,20]. The current study reports the discovery of a third genotype with the isolation of a C₂₂₅₄/H₇₅₂ strain in one single site in France. The EHV-1 strain affecting these premises was isolated in 2018 and a new PCR assay was designed for the detection of the C₂₂₅₄ mutation and successfully discriminated A/G and C₂₂₅₄ strains, in combination with a PCR assay designed by Allen et al. [34]. The C₂₂₅₄ mutation was not detected in strains from other premises in France between 2016 and 2020. Due to the absence of breeding activity on the affected premises, and the absence of further C₂₂₅₄/H₇₅₂ EHV-1 outbreaks since 2018, it is not possible to evaluate the effect of the C₂₂₅₄/H₇₅₂ EHV-1 strain in pregnant mares at the current time. In addition, the site from which the strain was isolated is very restrictive on horse mixing and circulation, which could explain the absence of identification of any other C₂₂₅₄ strains since the 2018 outbreak. It should also be taken into account that 2018 was a year with a large number of EHV outbreaks and consequently with a large number of samples taken. The number of EHV outbreaks in France and associated sampling is usually much lower, limiting opportunities for virus isolation. Despite anecdotal reports of frequent vaccination in these premises (every 6 months), there was no information available on the immune status of the horses at the time of infection. Vaccine efficacy against this strain would need to be further investigated. Isolation from nasal swabs was not as

successful as from co-culture with PBMCs, which could be explained by the possible presence of interferon alpha (INF- α) in infected horses' nasal secretions, as shown in 2010 by Gryspeerdt et al. [53]. When cultured in vitro, the strain induced cytopathic effects (CPEs) associated with polykaryocytes and syncytia formation, as usually observed by microscopy in cell culture after infection with EHV-1 [54]. The new EHV-1 strain, named FR-5628, questions the effect of ORF30 position 2254 mutation on the strain activity.

Based on the amino acid in position 752 (or equivalent) of DNA polymerase gene comparison between several herpesviruses, including the eight known equid herpesviruses (EHV-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 and 9), as already pointed out by Nugent et al. (2006), D₇₅₂ (or an equivalent position in other herpesviruses) appears to be a highly conserved amino acid amongst the Herpesviridae family (supplementary Figure S11) [17]. It has been suggested that D₇₅₂ strains are more likely to be ancestral strains from which N₇₅₂ would have evolved, as shown in Figure 9, in which the G₂₂₅₄ strain KENT/43/1994 (see Figure 6) was proposed to have evolved from an A₂₂₅₄ strain from group 2 cluster 2. All of the sequences compared carried an aspartic acid (D) at this position, with the exception of numerous EHV-1 strains (with V592 as a representative N₇₅₂ EHV-1 strain) and EHV-1 FR-56628, the only H₇₅₂ strain described to date [31]. To our knowledge, asparagine (N) and histidine (H) are the only two other amino acids identified in equid herpesviruses' DNA polymerase gene in position 752. In addition, a study showed that N₇₅₂ strains (isolated from abortion) could infect equally monocytic CD172a+ cells and T lymphocytes, whereas D₇₅₂ strains (isolated from neurological cases) could infect CD172a+ cells in a larger proportion than T lymphocytes. In accordance with other studies, the authors suggested that N₇₅₂ had adapted its immune evasion strategy after co-evolving from D₇₅₂ strains with the host immune system [53,55,56]. Concerning the genotype/pathotype association suggested by Nugent et al. (2006), it was followed by a statistical report by Perkins et al. performed on 176 EHV-1 isolates, showing a strong but not strict association between G₂₂₅₄/D₇₅₂ strains and neurological disease, and A₂₂₅₄ strains and abortion disease. According to the authors, the probability of neurological disease being associated with G₂₂₅₄/D₇₅₂ strains was 162 times greater than the probability of it being associated with A₂₂₅₄/N₇₅₂ strains [57]. Several studies then showed that this genotype/pathotype association is not exclusive [21,22,58–60]. The discovery of a third genotype C₂₂₅₄/H₇₅₂ and its potential association with neurological signs makes the understanding of the genotype/pathotype association even more complex. EHV-1 is the only equid herpesvirus known to have possibly evolved from D₇₅₂ strains to N₇₅₂ and H₇₅₂ strains. Along with EHV-8 and EHV-9, these three viruses are also the only equid herpesviruses to our knowledge that have been reported as causing neurological diseases. This observation is in line with other statements suggesting that the amino acid in position 2254 is not the only determinant for neurovirulence and could also depend on the environment (air quality, stress, training management, etc.), the immune status of the horse and its genetic background [9,57,61].

An antiviral assay with the newly isolated FR-56628 EHV-1 strain and two other A/G₂₂₅₄ strains was performed with ganciclovir, aciclovir and aphidicolin. Ganciclovir and aciclovir are two nucleoside analogues (analogues to deoxyguanosine). Indeed, triphosphorylated ganciclovir and aciclovir act as competitive nucleotide substrates for DNA polymerase [47,48]. When phosphorylated, first by the viral thymidine kinase (TK) and then by the cellular TK, ganciclovir and aciclovir are incorporated in the synthesised DNA strand. Replication stops either immediately after treatment (aciclovir), or after the incorporation of several nucleotides (ganciclovir) [62]. Aphidicolin is a tetracyclic diterpen that has been described to inhibit the activity of B-family DNA polymerase (to which EHV-1 DNA polymerase belongs) as a competitive dNTP binding site molecule [63]. Some studies have shown a good efficacy of this molecule against human herpesviruses, especially in strains resistant to nucleoside analogues [64–66]. The herpesvirus DNA polymerase crystal structure has only been described for HSV-1. However, as explained in 2007 by Goodman et al., the EHV-1 amino acid D₇₅₂ (G₂₂₅₄) residue is homologous to HSV-1 amino acid D751

residue, which is located in the palm domain, a region close to the dNTP binding domain (fingers domain) [18,67,68]. In addition, in their *in vivo* study, Goodman et al. (2007) suggest that amino acid change from D₇₅₂ (G₂₂₅₄) to N₇₅₂ (A₂₂₅₄) could alter DNA polymerase activity, after they highlighted that aphidicolin was more effective against DNA polymerase N₇₅₂ (A₂₂₅₄) mutant and N₇₅₂ (A₂₂₅₄) strains than against DNA polymerase D₇₅₂ (G₂₂₅₄) mutant and D₇₅₂ (G₂₂₅₄) strains [18]. After binding with dNTP, the DNA polymerase subdomain rotates and changes conformation to allow dNTP incorporation [67,69]. Aphidicolin may change the fingers and palm domain interaction, as it is described with Human Pol α by Baranosvki et al. [63]. The effect of an amino acid change in the palm domain on the interaction of aphidicolin (but also possibly of ganciclovir and aciclovir) with the DNA polymerase dNTP binding site was therefore questioned. In this study, aphidicolin and ganciclovir showed a good *in vitro* effect against the three EHV-1 strains (FR-56628, FR-6815 and FR-38991), whereas a higher concentration of aciclovir was required to inhibit these three strains' replication. As both ganciclovir and aciclovir require the viral TK for their first phosphorylation, it is unlikely that aciclovir's lower efficacy was due to strain TK resistances. The 3D models of the EHV-1 DNA polymerase, based on the HSV-1 DNA polymerase model, did not predict an effect of an amino acid change in position 752 on the protein function. In addition, antiviral assays did not show an evident influence of position 752 amino acid residue on the efficacy of either ganciclovir or aphidicolin *in vitro* (no significant EC₅₀ difference was found between FR-56628 and FR-6815, and between FR-56628 and FR-38991). EC₅₀, measured by impedance measurements, showed that aphidicolin was significantly more efficient against FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) than against FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂), but this was not confirmed by the qPCR assay. Even if a good correlation between RTCA and qPCR EC₅₀ values has been demonstrated, the impedance method depends on parameters that are more variable than the qPCR assay, which can explain the differences [70]. Aciclovir showed differences in efficacy against the three strains which were not reproduced with the two methods. As nucleotide position 2254 is not the only site where non-synonymous mutations occur in ORF30, these could also imply changes of DNA polymerase conformation, different from the strains used by Goodman et al. (2007) and constitute a possible explanation for the aphidicolin effects observed in the two studies.

When compared to 83 other EHV-1 strains, the complete ORF30 nucleotide sequence of the newly isolated EHV-1 strain FR-56628 showed that, in addition to the mutation in position 2254, this part of the genome had from zero to three other mutations, when compared to the other EHV-1 strains in group 2 cluster 2. This cluster is mainly represented by A₂₂₅₄ strains, with the exception of one G₂₂₅₄ strain and the FR-56628 C₂₂₅₄ strain. As all other G₂₂₅₄ strains are clustered in the ORF30 group 1, the possibility is not excluded that some EHV-1 A₂₂₅₄ strains from this cluster (group 2) reversed to EHV-1 G₂₂₅₄ strains or evolved to a C₂₂₅₄ strain (Figure 9). Considering the amino acid sequence, the EHV-1 MLST placed the EHV-1 strain FR-56628 among U_L clade 10, alongside five EHV-1 strains also classified into ORF30 group 2 cluster 2. The amino acid change in ORF30 position 752 differentiates the strain FR-56628 MLST sequence from the other members of the U_L clade 10 used in this study. However, the nucleotide MLST sequence not only showed another silent variation site in ORF37, but also suggested that two different FR-56628 variants have been isolated from Horse 13. ORF37 is a conserved gene among alphaherpesviruses and encodes the HSV-1 UL24 homolog [16]. On the contrary to ORF30, this gene has been classified among the non-essential genes for growth on cultured cells [71,72]. HSV-1 UL24 has been shown to play a role in pathogenicity and to affect *in vivo* and *in vitro* replication and reactivation from latency [73,74]. This protein seems to carry numerous functions, such as viral gene expression regulation, dispersion of cellular proteins in the nucleus and glycoproteins distribution in the cytoplasm [75,76]. It was also shown to be required for EHV-1 pathogenicity in a mouse model [71]. Numerous transcription initiation sites and therefore transcripts have been identified for HSV-1 UL24. The impact of the silent mutation detected in this study on different transcripts from different transcription initiation sites is unknown, although all the ATG codons from EHV-1 ORF37 seemed

to be in the same reading frame. This silent mutation was not identified in the EHV-1 strain isolated from Horse 10, but no information is available concerning other horses, making it difficult to date the mutation event. Indeed, the strain could either have mutated after infecting Horse 13, or this could also be the result of a double infection with the two variants, after physical contact with different horses.

Experimental infection of four 10-month-old Welsh ponies with EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄) induced characteristic clinical signs of EHV-1 infection in all ponies starting from Day 1 post-infection. None of the horses showed neurological clinical signs, but EHM is difficult to reproduce in experimental infections [7,77–79]. However, the rapid onset of clinical signs, nasal shedding and viraemia were in accordance with previous experimental challenges performed using EHV-1 strains V592 (A₂₂₅₄) and Ab4 (G₂₂₅₄) with slightly lower (10^{5.5} TCID₅₀ and 10^{6.6} TCID₅₀, for example) or similar (10^{7.5}, 10^{7.6}, for example) infectious doses [6,7,78,80].

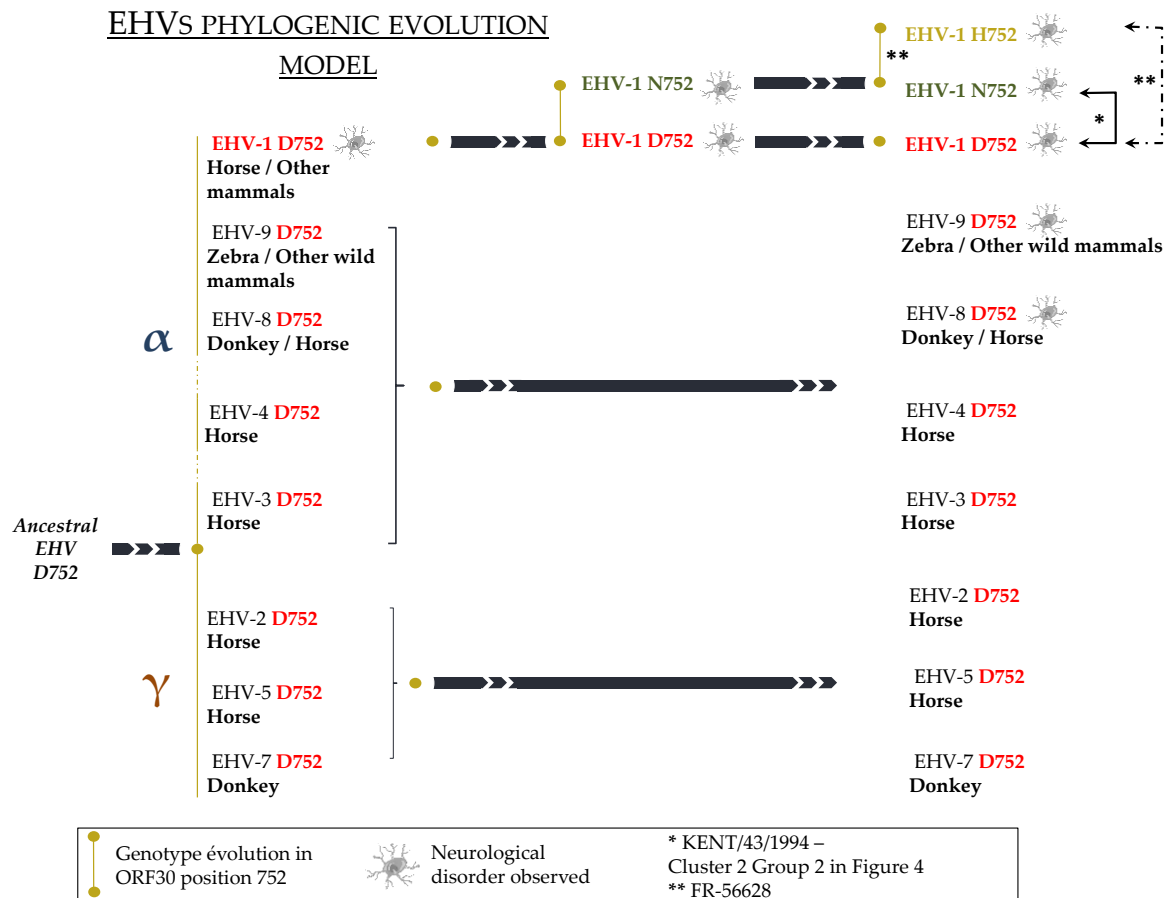


Figure 9. Possible evolutionary model for equid herpesviruses. Reverse evolution is shown with black arrows and illustrated with strains from the current study (KENT/43/1994 (*) and FR-56628 (**)).

5. Conclusions

This study describes the isolation of a new 2254 mutant strain (C₂₂₅₄/H₇₅₂) from a unique site in France in 2018 which was associated with a large number of affected animals, despite frequent vaccination. There was no other identification or isolation of C₂₂₅₄ EHV-1 strains before 2018, nor in 2019 and 2020. The pathogenicity of this strain was confirmed in the context of an in vivo experimental infection that highlighted the rapid onset of disease and significant excretion and cell-associated viraemia. The impact of the mutation on ganciclovir, aciclovir and aphidicolin

susceptibility was limited. The molecular characterisation of the strain, the predictive 3D model of the ORF30 and the in vitro culture taken altogether did not show evidence of a major effect of this new C₂₂₅₄ mutation on the strain's behaviour. Most equine herpesviruses have the D₇₅₂ mutation. EHV-1 is the only equine herpesvirus to carry the N₇₅₂ or H₇₅₂ mutations. This is why ORF30 and MLST phylogeny tend to indicate that this C₂₂₅₄/H₇₅₂ has evolved from N₇₅₂ strains.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: ORF30 position 2254 typing using the three different probes (A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ and C₂₂₅₄) in order to check the probe C₂₂₅₄ specificity. Samples isolated from the premises described in Section 3.1, are indicated in bold. ND = not determined. Table S2: PCR 1, 2, 4 and 5 primers and probe sequences, thermoprofiles and mixtures. Table and Figure S3: complete ORF30 sequencing primers (A) and their distribution on ORF30 (B). Table S4: PCR results, viral load and ORF30 position 2254 subtype in the 14 nasal swabs collected on the premises described in Section 3.1. ND = not determined. Figure S5: ORF30 nucleotide alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052). Figure S6: ORF30 amino acid alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052). Figure S7: Maximum likelihood tree based on Tamura–Nei model and built using ORF30 sequences of Ab4 and V592 reference strains, 67 EHV-1 strains previously described (Bryant et al. 2018), 14 EHV-1 strains from France and Belgium (Sutton et al. 2019) and the EHV-1 strain FR-56628 (highlighted in yellow). The ORF30 2254 nucleotide is annotated. Table S8: EHV-1 strain FR-56628 MLST amino acid sequence compared to EHV-1 reference strains Ab4 and V592 (A) and to U_L clade 10 EHV-1 strains (B). Figure S9: Number of horses experimenting nasal discharge/cough/ocular discharge (A), mandibular lymph node enlargement (B) and pyrexia/attitude (C). Figure S10: Antiviral analysis of the effect of (A) GCV, (B) ACV and (C) APD using (i) impedance measurement, (ii) viral load quantification. Figure S11: Amino acid in ORF30 position 752 (or equivalent region) of 18 herpesviruses (A). Conserved amino acids on a 106-bp region of 18 herpesviruses DNA polymerase genes are highlighted in shades of blue (when 9/18 or more herpesviruses contained the same amino acid). Aspartic acids in position 752 or equivalent are highlighted in red and variants are highlighted in yellow (B).

Author Contributions: Conceptualisation, R.P., S.P., and G.S.; investigation, C.T., C.F., E.S.H., R.P., S.P., A.P., A.D., E.G. and G.S.; resources, C.F., E.S.H., C.M-P.; writing—original draft preparation, R.P., S.P., C.T. and G.S.; writing—review and editing, R.P., S.P., C.T., E.S.H., E.G. and G.S.; supervision, R.P. and S.P.; project administration, R.P. and S.P.; funding acquisition, R.P. and S.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Fonds Eperon OVERLORD N12-2017, Normandy County Council (17E01598/17EP04324), the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) grant number 2017-008, CENTAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational programme 2014–2020.

Acknowledgments: We would like to thank the veterinarians who allowed the collection of samples on the infectious premises, Udeni Balasuriya for sharing some discussion elements and the UEPAO and its members for their work during the experimental infection. We would also like to thank Samuel Frémaux for his help during his internship.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Davison, A.J. Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* **2010**, *143*, 52–69, doi:10.1016/j.vetmic.2010.02.014.
2. Wohlsein, P.; Lehmebeck, A.; Spitzbarth, I.; Algermissen, D.; Baumgärtner, W.; Böer, M.; Kummrow, M.; Haas, L.; Grummer, B. Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts. *Vet. Microbiol.* **2011**, *149*, 456–460, doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.024.
3. Ibrahim, E.S.M.; Kinoh, M.; Matsumura, T.; Kennedy, M.; Allen, G.P.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H. Genetic relatedness and pathogenicity of equine herpesvirus 1 isolated from onager, zebra and gazelle. *Arch. Virol.* **2007**, *152*, 245–255, doi:10.1007/s00705-006-0855-3.
4. Patel, J.R.; Edington, N.; Mumford, J.A. Variation in cellular tropism between isolates of Equine herpesvirus-1 in Foals. *Arch. Virol.* **1982**, *74*, 41–51, doi:10.1007/BF01320781.

5. Kydd, J.H.; Smith, K.C.; Hannant, D.; Livesay, G.J.; Mumford, J.A. Distribution of Equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: Implications for vaccination strategies. *Equine Vet. J.* **1994**, *26*, 466–469, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04051.x.
6. Kydd, J.H.; Smith, K.C.; Hannant, D.; Livesay, G.J.; Mumford, J.A. Distribution of Equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: Implications for cellular immunity. *Equine Vet. J.* **1994**, *26*, 470–473, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04052.x.
7. Edington, N.; Bridges, C.G.; Patel, J.R. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: Equine stroke. *Arch. Virol.* **1986**, *90*, 111–124, doi:10.1007/BF01314149.
8. Edington, N.; Smyth, B.; Griffiths, L. The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) Abortions. *J. Comp. Pathol.* **1991**, *104*, 379–387, doi:10.1016/S0021-9975(08)80148-X.
9. Allen, G.P. Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4. In *Equine Respiratory Diseases*; International Veterinary Information Service: Ithaca, NY, USA.
10. Paillot, R.; Case, R.; Ross, J.; Newton, R.; Nugent, J. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. *TOVSJ* **2008**, *2*, 68–91, doi:10.2174/1874318808002010068.
11. Welch, H.M.; Bridges, C.G.; Lyon, A.M.; Griffiths, L.; Edington, N. Latent equid herpesviruses 1 and 4: Detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.* **1992**, *73*, 261–268, doi:10.1099/0022-1317-73-2-261.
12. Slater, J.D.; Borchers, K.; Thackray, A.M.; Field, H.J. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75*, 2007–2016, doi:10.1099/0022-1317-75-8-2007.
13. Edington, N.; Bridges, C.G.; Huckle, A. Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. *Equine Vet. J.* **1985**, *17*, 369–372, doi:10.1111/j.2042-3306.1985.tb02524.x.
14. Allen, G.P. Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. *Am. J. Vet. Res.* **2006**, *67*, 5.
15. Edington, N.; Welch, H.M.; Griffiths, L. The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Vet. J.* **1994**, *26*, 140–142, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04353.x.
16. Telford, E.A.R.; Watson, M.S.; McBride, K.; Davison, A.J. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **1992**, *189*, 304–316, doi:10.1016/0042-6822(92)90706-U.
17. Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.C.; Mumford, J.A.; Swann, Z.; Newton, J.R.; Bowden, R.J.; Allen, G.P.; Davis-Poynter, N. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *J. Virol.* **2006**, *80*, 4047–4060, doi:10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006.
18. Goodman, L.B.; Loregian, A.; Perkins, G.A.; Nugent, J.; Buckles, E.L.; Mercorelli, B.; Kydd, J.H.; Palù, G.; Smith, K.C.; Osterrieder, N.; et al. A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase Determines Neuropathogenicity. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, doi:10.1371/journal.ppat.0030160.
19. Van de Walle, G.R.; Goupil, R.; Wishon, C.; Damiani, A.; Perkins, G.A.; Osterrieder, N. A Single-Nucleotide Polymorphism in a Herpesvirus DNA Polymerase Is Sufficient to Cause Lethal Neurological Disease. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 20–25, doi:10.1086/599316.
20. Lunn, D.P.; Davis-Poynter, N.; Flaminio, M.J.B.F.; Horohov, D.W.; Osterrieder, K.; Pusterla, N.; Townsend, H.G.G. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.* **2009**, *23*, 450–461, doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x.
21. Pronost, S.; Léon, A.; Legrand, L.; Fortier, C.; Miszczak, F.; Freymuth, F.; Fortier, G. Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Vet. Microbiol.* **2010**, *145*, 329–333, doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.031.
22. Sutton; Garvey; Cullinane; Jourdan; Fortier; Moreau; Foursin; Gryspeerdt; Maisonnier; Marcillaud-Pitel; et al. Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion. *Viruses* **2019**, *11*, 916, doi:10.3390/v11100916.

23. Allen, G.P.; Breathnach, C.C. Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV- 1. *Equine Vet. J.* **2010**, *38*, 252–257, doi:10.2746/042516406776866453.
24. Heldens, J.G.M.; Hannant, D.; Cullinane, A.A.; Prendergast, M.J.; Mumford, J.A.; Nelly, M.; Kydd, J.H.; Weststrate, M.W.; van den Hoven, R. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine* **2001**, *19*, 4307–4317, doi:10.1016/S0264-410X(01)00131-1.
25. Goodman, L.; Wagner, B.; Flaminio, M.; Sussman, K.; Metzger, S.; Holland, R.; Osterrieder, N. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Vaccine* **2006**, *24*, 3636–3645, doi:10.1016/j.vaccine.2006.01.062.
26. Goehring, L.S.; Wagner, B.; Bigbie, R.; Hussey, S.B.; Rao, S.; Morley, P.S.; Lunn, D.P. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine* **2010**, *28*, 5203–5211, doi:10.1016/j.vaccine.2010.05.065.
27. Thieulent, C.J.; Hue, E.S.; Fortier, C.I.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Fortier, G.D.; Pitel, P.-H.; Vidalain, P.-O.; et al. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology* **2019**, *526*, 105–116, doi:10.1016/j.virol.2018.10.013.
28. Garre, B.; Vandermeulen, K.; Nugent, J.; Neyts, J.; Croubels, S.; Debacker, P.; Nauwynck, H. In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. *Vet. Microbiol.* **2007**, *122*, 43–51, doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.004.
29. Garré, B.; Shebany, K.; Gryspeerdt, A.; Baert, K.; van der Meulen, K.; Nauwynck, H.; Deprez, P.; De Backer, P.; Croubels, S. Pharmacokinetics of Acyclovir after Intravenous Infusion of Acyclovir and after Oral Administration of Acyclovir and Its Prodrug Valacyclovir in Healthy Adult Horses. *AAC* **2007**, *51*, 4308–4314, doi:10.1128/AAC.00116-07.
30. Maxwell, L.K.; Bentz, B.G.; Bourne, D.W.A.; Erkert, R.S. Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2008**, *31*, 312–320, doi:10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x.
31. Paillet, R.; Sutton, G.; Thieulent, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Pronost, S. New EHV-1 variant identified. *Vet. Rec.* **2020**, *186*, 573, doi:10.1136/vr.m1441.
32. Diallo, I.S.; Hewitson, G.; Wright, L.; Rodwell, B.J.; Corney, B.G. Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **2006**, *131*, 92–98, doi:10.1016/j.jviromet.2005.07.010.
33. Pronost, S.; Legrand, L.; Pitel, P.-H.; Wegge, B.; Lissens, J.; Freymuth, F.; Richard, E.; Fortier, G. Outbreak of Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy in France: A Clinical and Molecular Investigation: Outbreak of EHV-1 myeloencephalopathy. *Transbound. Emerg. Dis.* **2012**, *59*, 256–263, doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01263.x.
34. Allen, G.P. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Diagnosis of Neuropathogenic Strains of Equine Herpesvirus-1. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2007**, *19*, 69–72, doi:10.1177/104063870701900110.
35. Hall, T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
36. Leigh, J.W.; Bryant, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* **2015**, *6*, 1110–1116, doi:10.1111/2041-210X.12410.
37. Garvey, M.; Lyons, R.; Hector, R.; Walsh, C.; Arkins, S.; Cullinane, A. Molecular Characterisation of Equine Herpesvirus 1 Isolates from Cases of Abortion, Respiratory and Neurological Disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens* **2019**, *8*, 7, doi:10.3390/pathogens8010007.
38. Huson, D.H.; Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* **2006**, *23*, 254–267, doi:10.1093/molbev/msj030.
39. Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 845–858, doi:10.1038/nprot.2015.053.

40. Hue, E.; Richard, E.; Fortier, C.; Fortier, G.; Paillot, R.; Raue, R.; Pronost, S. Equine PBMC Cytokines Profile after In Vitro α - and γ -EHV Infection: Efficacy of a Parapoxvirus Ovis Based-Immunomodulator Treatment. *Vaccines* **2017**, *5*, 28, doi:10.3390/vaccines5030028.
41. Ramakrishnan, M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *WJV* **2016**, *5*, 85, doi:10.5501/wjv.v5.i2.85.
42. Fang, Y.; Ye, P.; Wang, X.; Xu, X.; Reisen, W. Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *J. Virol. Methods* **2011**, *173*, 251–258, doi:10.1016/j.jviromet.2011.02.013.
43. OIE World Organization for Animal Health. Available online: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (accessed on 30 August 2020).
44. Garrett, D.; Montesso, F.; Fougerolle, S.; Lopez-Alvarez, M.R.; Birand, I.; De Bock, M.; Huang, C.M.; Legrand, L.; Pronost, S.; Paillot, R. Refinement of the equine influenza model in the natural host: A meta-analysis to determine the benefits of individual nebulisation for experimental infection and vaccine evaluation in the face of decreased strain pathogenicity. *Vet. Microbiol.* **2017**, *211*, 150–159, doi:10.1016/j.vetmic.2017.10.010.
45. PFIE Infectiology of Farm, Model and Wild Animals Facility. Available online https://www6.val-de-loire.inra.fr/pfie_eng/ (accessed on October 2020)
46. Paillot, R.; Prowse, L.; Donald, C.; Medcalf, E.; Montesso, F.; Bryant, N.; Watson, J.; Jeggo, M.; Elton, D.; Newton, R.; et al. Efficacy of a whole inactivated EI vaccine against a recent EIV outbreak isolate and comparative detection of virus shedding. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2010**, *136*, 272–283, doi:10.1016/j.vetimm.2010.03.019.
47. Elion, G.B. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J. Antimicrob. Chemother.* **1983**, *12*, 9–17, doi:10.1093/jac/12.suppl_B.9.
48. Matthews, T.; Boehme, R. Antiviral Activity and Mechanism of Action of Ganciclovir. *Clin. Infect. Dis.* **1988**, *10*, S490–S494, doi:10.1093/clinids/10.Supplement_3.S490.
49. Sheaff, R.; Ilsley, D.; Kuchta, R. Mechanism of DNA polymerase α .inhibition by aphidicolin. *Biochemistry* **1991**, *30*, 8590–8597, doi:10.1021/bi00099a014.
50. StatGraphics Plus. Available online: <https://www.statgraphics.com/> (accessed on 30 August 2020).
51. Bryant, N.A.; Wilkie, G.S.; Russell, C.A.; Compston, L.; Grafham, D.; Clissold, L.; McLay, K.; Medcalf, L.; Newton, R.; Davison, A.J.; et al. Genetic diversity of equine herpesvirus 1 isolated from neurological, abortigenic and respiratory disease outbreaks. *Transbound Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 817–832, doi:10.1111/tbed.12809.
52. Dimock, W.; Edwards, P. Is there a filterable virus of abortion in mares. *Bull. Ky. Agric. Exp. Stn.* **1933**, *333*, 291–301.
53. Gryspeerdt, A.C.; Vandekerckhove, A.P.; Garré, B.; Barbé, F.; Van de Walle, G.R.; Nauwynck, H.J. Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses. *Vet. Microbiol.* **2010**, *142*, 242–253, doi:10.1016/j.vetmic.2009.10.015.
54. Wellington, J.E.; Love, D.N.; Whalley, J.M. Evidence for involvement of equine herpesvirus 1 glycoprotein B in cell-cell fusion. *Arch. Virol.* **1996**, *141*, 167–175, doi:10.1007/BF01718598.
55. Poelaert, K.C.K.; Van Cleemput, J.; Laval, K.; Favoreel, H.W.; Couck, L.; Van den Broeck, W.; Azab, W.; Nauwynck, H.J. Equine Herpesvirus 1 Bridles T Lymphocytes to Reach Its Target Organs. *J. Virol.* **2019**, *93*, (7) e02098-18, doi:10.1128/JVI.02098-18.
56. Laval, K.; Van Cleemput, J.; Poelaert, K.C.; Brown, I.K.; Nauwynck, H.J. Replication of neurovirulent equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in CD172a+ monocytic cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *50*, 58–62, doi:10.1016/j.cimid.2016.11.006.
57. Perkins, G.A.; Goodman, L.B.; Tsujimura, K.; Van de Walle, G.R.; Kim, S.G.; Dubovi, E.J.; Osterrieder, N. Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984–2007). *Vet. Microbiol.* **2009**, *139*, 375–378, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.033.
58. Vissani, M.A.; Becerra, M.L.; Olguín Perglione, C.; Tordoya, M.S.; Miño, S.; Barrandeguy, M. Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Vet. Microbiol.* **2009**, *139*, 361–364, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.025.

59. Fritsche, A.-K.; Borchers, K. Detection of neuropathogenic strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. *Vet. Microbiol.* **2011**, *147*, 176–180, doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.014.
60. Pusterla, N.; Hatch, K.; Crossley, B.; Wademan, C.; Barnum, S.; Flynn, K. Equine herpesvirus-1 genotype did not significantly affect clinical signs and disease outcome in 65 horses diagnosed with equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy. *Vet. J.* **2020**, *255*, 105407, doi:10.1016/j.tvjl.2019.105407.
61. Pronost, S.; Cook, R.F.; Fortier, G.; Timoney, P.J.; Balasuriya, U.B.R. Relationship between equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy and viral genotype: EHV-1, genotype and EHM. *Equine Vet. J.* **2010**, *42*, 672–674, doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00307.x.
62. Shiraki, K. Antiviral Drugs Against Alphaherpesvirus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1045*, 103–122, doi:10.1007/978-981-10-7230-7_6.
63. Baranovskiy, A.G.; Babayeva, N.D.; Suwa, Y.; Gu, J.; Pavlov, Y.I.; Tahirov, T.H. Structural basis for inhibition of DNA replication by aphidicolin. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 14013–14021, doi:10.1093/nar/gku1209.
64. Bucknall, R.A.; Moores, H.; Simms, R.; Hesp, B. Antiviral Effects of Aphidicolin, a New Antibiotic Produced by *Cephalosporium aphidicola*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1973**, *4*, 294–298, doi:10.1128/AAC.4.3.294.
65. Michaelis, M.; Langer, K.; Vogel, J.-U.; Kreuter, J.; Rabenau, H.; Doerr, H.-W.; Cinatl, J. In vitro Antiviral Activity of Aphidicolin and its Derivates. *Arzneimittelforschung* **2011**, *52*, 393–399, doi:10.1055/s-0031-1299904.
66. Larder, B.A.; Darby, G. Susceptibility to other antiherpes drugs of pathogenic variants of herpes simplex virus selected for resistance to acyclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *29*, 894–898, doi:10.1128/AAC.29.5.894.
67. Zarrouk, K.; Piret, J.; Boivin, G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Res.* **2017**, *234*, 177–192, doi:10.1016/j.virusres.2017.01.019.
68. Liu, S.; Knafels, J.D.; Chang, J.S.; Waszak, G.A.; Baldwin, E.T.; Deibel, M.R.; Thomsen, D.R.; Homa, F.L.; Wells, P.A.; Tory, M.C.; et al. Crystal Structure of the Herpes Simplex Virus 1 DNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18193–18200, doi:10.1074/jbc.M602414200.
69. Berdis, A.J. Inhibiting DNA Polymerases as a Therapeutic Intervention against Cancer. *Front. Mol. Biosci.* **2017**, *4*, 78, doi:10.3389/fmolb.2017.00078.
70. Thieulent, C.; Hue, E.S.; Sutton, G.; Fortier, C.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Paillet, R.; Vidalain, P.-O.; et al. Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: Efficacy of decitabine and valganciclovir alone or in combination. *Antivir. Res.* **2020**, *183*, 104931, doi:10.1016/j.antiviral.2020.104931.
71. Kasem, S.; Yu, M.H.H.; Yamada, S.; Kodaira, A.; Matsumura, T.; Tsujimura, K.; Madbouly, H.; Yamaguchi, T.; Ohya, K.; Fukushi, H. The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* **2010**, *400*, 259–270, doi:10.1016/j.virol.2010.02.012.
72. Pearson, A.; Coen, D.M. Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *JVI* **2002**, *76*, 10821–10828, doi:10.1128/JVI.76.21.10821-10828.2002.
73. Leiva-Torres, G.A.; Rochette, P.A.; Pearson, A. Differential importance of highly conserved residues in UL24 for herpes simplex virus 1 replication in vivo and reactivation. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 1109–1116, doi:10.1099/vir.0.017921-0.
74. Jacobson, J.G.; Martin, S.L.; Coen, D.M. A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture. *J. Virol.* **1989**, *63*, 1839–1843, doi:10.1128/JVI.63.4.1839-1843.1989.
75. Sanabria-Solano, C.; Gonzalez, C.E.; Richeroux, N.; Bertrand, L.; Dridi, S.; Griffiths, A.; Langelier, Y.; Pearson, A. Regulation of viral gene expression by the herpes simplex virus 1 UL24 protein (HSV-1 UL24 inhibits accumulation of viral transcripts). *Virology* **2016**, *495*, 148–160, doi:10.1016/j.virol.2016.05.006.
76. Dridi, S.; Richeroux, N.; Gonzalez Suarez, C.E.; Vanharen, M.; Sanabria-Solano, C.; Pearson, A. A Mutation in the UL24 Gene Abolishes Expression of the Newly Identified UL24.5 Protein of Herpes Simplex Virus 1 and Leads to an Increase in Pathogenicity in Mice. *J. Virol.* **2018**, *92*, (20) e00671-18, doi:10.1128/JVI.00671-18.

77. Hussey, G.; Goehring, L.S.; Lunn, D.P.; Hussey, S.B.; Huang, T.; Osterrieder, N.; Powell, C.; Hand, J.; Holz, C.; Slater, J. Experimental infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces chorioretinal lesions. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 118, doi:10.1186/1297-9716-44-118.
78. Goehring, L.S.; van Maanen, C.; Berendsen, M.; Cullinane, A.; de Groot, R.J.; Rottier, P.J.M.; Wesselingh, J.J.C.M.; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M. Experimental infection with neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) in adult horses. *Vet. J.* **2010**, *186*, 180–187, doi:10.1016/j.tvjl.2009.08.007.
79. Allen, G.P. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *Am. J. Vet. Res.* **2008**, *69*, 1595–1600, doi:10.2460/ajvr.69.12.1595.
80. Smith, K.; Whitwell, K.; Mumford, J.; Hannant, D.; Blunden, A.; Tearle, J. Virulence of the V592 Isolate of Equid Herpesvirus-1 in Ponies. *J. Comp. Pathol.* **2000**, *122*, 288–297, doi:10.1053/jcpa.1999.0373.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Table S1 ORF30 position 2254 typing using the three different probes (A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ and C₂₂₅₄) in order to check the probe C₂₂₅₄ specificity. Samples isolated from premises P are indicated in bold. ND= not determined. 1/6

Sample identification	Year of collection	Nature	A ₂₂₅₄	G ₂₂₅₄	C ₂₂₅₄
Sample 1	2016	Blood	Positive	ND	ND
Sample 2	2016	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 3	2016	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 4	2016	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 5	2016	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 6	2016	Placenta	ND	ND	ND
Sample 7	2016	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 8	2016	Placenta	Positive	ND	ND
Sample 9	2016	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 10	2016	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 11	2016	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 12	2016	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 13	2016	Spinal Cord	Positive	ND	ND
Sample 14	2016	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 15	2016	Cerebro Spinal Fluid	ND	Positive	ND
Sample 16	2016	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 17	2016	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 18	2016	Blood	ND	Positive	ND
Sample 19	2017	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 20	2017	Tracheal wash	ND	ND	ND
Sample 21	2017	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 22	2017	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 23	2017	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 24	2017	Nasal Swab	ND	Positive	ND

Supplementary Table S1 ORF30 position 2254 typing using the three different probes (A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ and C₂₂₅₄) in order to check the probe C₂₂₅₄ specificity. Samples isolated from premises P are indicated in bold. ND= not determined. 2/6

Sample identification	Year of collection	Nature	A ₂₂₅₄	G ₂₂₅₄	C ₂₂₅₄
Sample 25	2017	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 26	2017	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 27	2017	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 28	2017	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 29	2017	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 30	2017	Cerebro Spinal Fluid	ND	ND	ND
Sample 31	2017	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 32	2017	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 33	2017	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 34	2017	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 35	2017	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 36	2017	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 37	2017	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 38	2017	Blood	ND	Positive	ND
Sample 39	2017	Liver + Lung	ND	Positive	ND
Sample 40	2017	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 41	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 42	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 43	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 44	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 45	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 46	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 47	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 48	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 49	2018	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 50	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 51	2018	Blood	Positive	ND	ND
Sample 52	2018	Blood	Positive	ND	ND
Sample 53	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 54	2018	Blood	ND	Positive	ND
Sample 55	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 56	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 57	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 58	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 59	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 60	2018	Liver	Positive	ND	ND
Sample 61	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 62	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND

Supplementary Table S1 ORF30 position 2254 typing using the three different probes (A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ and C₂₂₅₄) in order to check the probe C₂₂₅₄ specificity. Samples isolated from premises P are indicated in bold. ND= not determined. 3/6

Sample identification	Year of collection	Nature	A ₂₂₅₄	G ₂₂₅₄	C ₂₂₅₄
Sample 63	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 64	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 65	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 66 (Horse 1)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 67 (Horse 2)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 68 (Horse 3)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 69 (Horse 4)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 70	2018	Liver + Lung	ND	ND	ND
Sample 71	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 72	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 73 (Horse 5)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 74 (Horse 6)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 75	2018	Placenta	Positive	ND	ND
Sample 76	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 77	2018	Brain + Spinal cord	ND	Positive	ND
Sample 78	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 79	2018	Blood	ND	Positive	ND
Sample 80 (Horse 7)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 81	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 82	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 83	2018	Blood	ND	Positive	ND
Sample 84	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 85	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 86	2018	Blood	ND	Positive	ND
Sample 87	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 88	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 89	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 90 (Horse 8)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive

Supplementary Table S1 ORF30 position 2254 typing using the three different probes (A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ and C₂₂₅₄) in order to check the probe C₂₂₅₄ specificity. Samples isolated from premises P are indicated in bold. ND= not determined. 4/6

Sample identification	Year of collection	Nature	A ₂₂₅₄	G ₂₂₅₄	C ₂₂₅₄
Sample 91 (Horse 9)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 92 (Horse 10)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 93 (Horse 11)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 94 (Horse 12)	2018	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 95 (Horse 13)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 96 (Horse 14)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 97 (Horse 15)	2018	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 98 (Horse 16)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 99 (Horse 17)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 100 (Horse 18)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 101 (Horse 19)	2018	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 102 (Horse 20)	2018	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 103 (Horse 21)	2018	Nasal Swab	ND	ND	Positive
Sample 104	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 105	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 106	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 107	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 108	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 109	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 110	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 111	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 112	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 113	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 114	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 115	2018	Liver + Lung	Positive	ND	ND

Supplementary Table S1 ORF30 position 2254 typing using the three different probes (A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ and C₂₂₅₄) in order to check the probe C₂₂₅₄ specificity. Samples isolated from premises P are indicated in bold. ND= not determined. 5/6

Sample identification	Year of collection	Nature	A₂₂₅₄	G₂₂₅₄	C₂₂₅₄
Sample 116	2018	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 117	2018	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 118	2018	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 119	2019	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 120	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 121	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 122	2019	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 123	2019	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 124	2019	Placenta	ND	Positive	ND
Sample 125	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 126	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 127	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 128	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 129	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 130	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 131	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 132	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 133	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 134	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 135	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 136	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 137	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 138	2019	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 139	2019	Liver + Lung	Positive	ND	ND
Sample 140	2019	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 141	2019	Placenta	ND	Positive	ND
Sample 142	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 143	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 144	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 145	2019	Cerebro Spinal Fluid	ND	Positive	ND
Sample 146	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 147	2019	Spinal Cord	ND	Positive	ND
Sample 148	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND

Supplementary Table S1 ORF30 position 2254 typing using the three different probes (A_{2254} , G_{2254} and C_{2254}) in order to check the probe C_{2254} specificity. Samples isolated from premises P are indicated in bold. ND= not determined. 6/6

Sample identification	Year of collection	Nature	A_{2254}	G_{2254}	C_{2254}
Sample 149	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 150	2019	Liver + Lung	ND	Positive	ND
Sample 151	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 152	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 153	2019	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 154	2019	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 155	2019	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 156	2019	Nasal Swab	Positive	ND	ND
Sample 157	2020	Nasal Swab	ND	Positive	ND
Sample 158	2020	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 159	2020	Nasal Swab	ND	ND	ND
Sample 160	2020	Nasal Swab	ND	Positive	ND

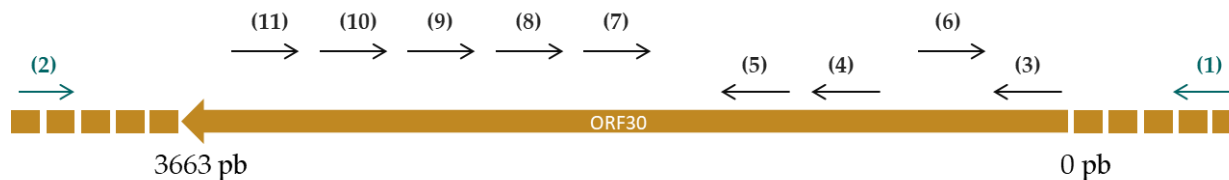
Supplementary Table S2 PCR 1, 2, 4 and 5 primers and probes sequences, thermoprofiles and mixtures.

PCR	Primers and probe(s)	Sequence	Thermoprofile	Mixture for 1 sample
PCR 1	EHV1-F	5'-CATGTCAACGCACTCCCA-3'	95°C during 10 minutes, 45 cycles x {95°C during 15 seconds, 62°C during 1 minute}. Thermocycler: QuantStudio™ 12K Flex Real-time PCR System.	2,5µL DNA extract + 12.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix + 1.25 µL of each primer (20µM) + 1.5µL probe (depending on titration) + nuclease free water to complete to 25µL.
	EHV1-R	5'-GGGTCGGGCGTTTCTGT-3'		
	EHV1-Probe	5'-FAM-CCCTACGCTGCTCC-MGB-NFQ-3'		
PCR 2	GaF	5'-CCACCCTGGCGCTCG-3'	95°C during 10 minutes, 55 cycles x {95°C during 15 seconds, 65°C during 1 minute}. Thermocycler: QuantStudio™ 12K Flex Real-time PCR System.	2,5µL DNA extract + 12.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix + 0,6 µL of each primer (20µM) + 0,5 µL each probe (depending on titration) + nuclease free water to complete to 25µL.
	GaR	5'-AGCCAGTCGCGCAGCAAGATG-3'		
	A ₂₂₅₄	5'-VIC-CATCCGTCAACTACTC-MGB-NFQ-3'		
	G ₂₂₅₄	5'-FAM-TCCGTCGACTACTC-MGB-NFQ-3'		
PCR 4	GaF	5'-CCACCCTGGCGCTCG-3'	98°C during 30 seconds, 40 cycles x { 98°C during 15 seconds, 61°C during 20 seconds, 72°C during 30 seconds} and 72°C during 7 minutes. Thermocycler: Vériti™.	5µL extract + 10µL of 5X HF Buffer + 1µL 10mM dNTP + 0.5µL of each primer (20µM), 0,5µL Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µL) + Rnase free water to complete to 50µL.
	GaR	5'-AGCCAGTCGCGCAGCAAGATG-3'		
PCR 5	GaR	5'-AGCCAGTCGCGCAGCAAGATG-3'	96°C during 1 minute + 25 cycles x{96°C during 10 seconds + 50°C during 5 seconds } + 60°C during 4 minutes. Thermocycler: Biorad T100™.	1µL Big Dye Terminator v3.1 + 1,5 Sequencing Buffer + 1,6 Reverse Primer (20µM)+ 4,9 RNase free water.

Supplementary Table and Figure S3 complete ORF30 sequencing primers (A) and their distribution on ORF30 (B).

A

APrimer name	Sequence	Assay
EHV-1.ORF30-PCR-F (1)	GAACGTGCGAGTGCTGTTTT	PCR
EHV-1.ORF30.PCR.RC (2)	TGTGAAGGTCTGTTTCGACGG	PCR
ORF30.F600 (3)	GGGTTTTGGGCGGTACCGCGC	Sequencing
ORF30-F1300 (4)	CAGCAGCTCGCGCGTCGCCCAACG	Sequencing
ORF30-F1550 (5)	CAGTCGCGCAGCAGATGCCAGCAG	Sequencing
ORF30-AS800 (6)	CTTGGACGTGCGCGAGTTCG	Sequencing
ORF30-AS1660 (7)	CATTATCCAGGCCCATACCTC	Sequencing
ORF30-R1900 (8)	GTGTGGGACATCGCCACGAAC	Sequencing
ORF30-R1-450 (9)	GGACGTGACCACGCGGCTGTTG	Sequencing
EHV-1-ORF30-PCR-R1 (10)	GTAGAGACTTCGGAGAGCGC	Sequencing
ORF30-R-700 (11)	GCCTCCGG GGTGCTGGCCTCG	Sequencing



B

Supplementary Table S4 PCR results, viral load and ORF30 position 2254 subtype on the 14 nasal swabs collected on Premises P. ND = not determined.

Horse	Diallo PCR	Viral Load (copies/mL)	2254 subtype
Horse 1	Positive	9,84E+02	C ₂₂₅₄
Horse 2	Positive	1,61E+05	C ₂₂₅₄
Horse 3	Positive	4,41E+03	C ₂₂₅₄
Horse 4	Positive	2,51E+02	C ₂₂₅₄
Horse 5	Positive	1,36E+01	C ₂₂₅₄
Horse 6	Positive	4,27E+04	C ₂₂₅₄
Horse 7	Positive	4,82E+02	C ₂₂₅₄
Horse 8	Positive	2,99E+01	C ₂₂₅₄
Horse 9	Positive	2,36E+03	C ₂₂₅₄
Horse 10	Positive	6,34E+05	C ₂₂₅₄
Horse 11	Positive	3,40E+04	C ₂₂₅₄
Horse 12	Negative	ND	ND
Horse 13	Positive	8,82E+07	C ₂₂₅₄
Horse 14	Positive	2,88E+05	C ₂₂₅₄
Horse 15	Negative	ND	ND
Horse 16	Positive	2,70E+03	C ₂₂₅₄
Horse 17	Positive	8,80E+04	C ₂₂₅₄
Horse 18	Positive	5,70E+05	C ₂₂₅₄
Horse 19	Positive	6,80E+03	Not confirmed
Horse 20	Negative	ND	ND
Horse 21	Positive	ND	C ₂₂₅₄

Supplementary Table S5 Log₁₀ viral genome copy number mean + S.D at 48 hpi and CIT₅₀ mean + S.D of four EHV-1 strains (FR-56628 (C₂₂₅₄), FR-6815 (A₂₂₅₄), FR-38991 (G₂₂₅₄) and reference strain KyD@VR700™) cultured on EEK cells, using RTCA technology.

	FR-56628 (C ₂₂₅₄)	FR-6815 (A ₂₂₅₄)	FR-38991 (G ₂₂₅₄)	KyD@VR700™
CIT ₅₀	1.11±0.10	1.00±0.06	1.12±0.13	1.00±0.05
Log ₁₀ viral genome copy number	8.99±0.46	9.21±0.20	9.14±0.18	9.04±0.07

Supplementary Figure S6 ORF30 nucleotide alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052) 1/5.

```

AY665713 Ab4      1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----
MT968035 FR-56628 ATGGCGGCGCGCGAACAGGCCAACTCCGTTTCGCAGGAGCGGGTTTTTTAATCCGTTTATTGGCAAGAGG
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      70-----80-----90-----100-----110-----120-----130-----
MT968035 FR-56628 CCATTTTTCAGGCCGGGAAGCGGGCAGACCGCGGAGACAGAGCGCCCAAGCCCCCAACTCGTACT
AY464052 V592      .....A.....

AY665713 Ab4      140-----150-----160-----170-----180-----190-----200-----
MT968035 FR-56628 GCACAGAGGTGGGTAGCTTTAAGTTTATAGCTCCAAGATGCCTCGATGAAGAAGCCCCCGCAGCAGCG
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      210-----220-----230-----240-----250-----260-----270-----
MT968035 FR-56628 ACGCGGTGTACACGTGGGCACCTTGGAGCGCCACCCAAAGTGTACTGCGATGGCTCAGAGTACGACGTG
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      280-----290-----300-----310-----320-----330-----340-----
MT968035 FR-56628 CTGAAC TTGCCTCCGAGGTTGCTGGCCTCGCAGATTTCGGGTTTGGAAAGCGCCAGGATTTTCGGGGCG
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      350-----360-----370-----380-----390-----400-----410-----
MT968035 FR-56628 ATGGATTCAACCCAGATTTGAGAGATTTACCGTGTACGACATAGTAGAGACTTCGGAGAGCGCCTCACA
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      420-----430-----440-----450-----460-----470-----480-----
MT968035 FR-56628 CGATGACCCATCCAGGTTTGCTGAGCTATCCCGCCAAGCGGCTCTGTGGTAACACTGCTGGGAATGAGC
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      490-----500-----510-----520-----530-----540-----550-----
MT968035 FR-56628 GAGTGTGGAAGCGAGTCGCGGTTTACGCTATGGTGTGCGCCATTATTTTACATGGCAAAGCGGAGG
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      560-----570-----580-----590-----600-----610-----620-----
MT968035 FR-56628 TGGATAGCGCTTGTGGAATAACCACCGAGGCAGAACTCGTGCAGCAATGGTGGACTGCGCGCACAGCTC
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      630-----640-----650-----660-----670-----680-----690-----
MT968035 FR-56628 GGCTTTGAGCGCGGCCCTGGGAAATGGCAACGGCGGCAAACAGAGCGGCGGCGAGCGGGGGATGGTGG
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      700-----710-----720-----730-----740-----750-----760-----
MT968035 FR-56628 GGCGGAAAGCACGTGTCTGCGGACTGCTTCAAAGTGGAGACCGTGTGCCACACGACGCTGTACTACTTTG
AY464052 V592      .....

```


Supplementary Figure S6: ORF30 nucleotide alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052) 2/5.

```

770-----780-----790-----800-----810-----820-----830-----
AY665713 Ab4      GATCTAAGCCAGCTCTCTACTATAGAGTATCTGCCTCCAGCAGCCGCTGGGAGGGTTCACTGCGACAA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

840-----850-----860-----870-----880-----890-----900-----
AY665713 Ab4      CTTTCACCCGGAGATTACAAAATTCGAGGGGAGCGTGGACGTGACCACGCGCTGTGTGGACAATGAA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

910-----920-----930-----940-----950-----960-----970-----
AY665713 Ab4      AATTTTACCAGTTTCGGGTGGTACCGCTGCGACCCGGCACCCACGGAGAGCGTGTCAACTTCGCCCCG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....T.....

980-----990-----1000-----1010-----1020-----1030-----1040-----
AY665713 Ab4      TTGAGCGACACGTCACCTCAAGCGACGTGGAGATTAAGTGTACTCCCGATAACCTGGAGCCGATACCAGA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1050-----1060-----1070-----1080-----1090-----1100-----1110-----
AY665713 Ab4      CGAGGCTGCCTGGCCCGACTATAAGCTCATGTGCTTTGATATAGAGTGTAAAGCTGGAACGGGTAACGAA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1120-----1130-----1140-----1150-----1160-----1170-----1180-----
AY665713 Ab4      ATGGCGTTCACAGTGGCAACTAACCAAGAGGACCTGGTCATCCAGATCTCCTGTCTGCTGACTCGCTTG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1190-----1200-----1210-----1220-----1230-----1240-----1250-----
AY665713 Ab4      CTACTCAGAACCGAACACACCTGTGTTTTCCCTCGGGTCATGCGATATCTCTGAGGAATACTCGTT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1260-----1270-----1280-----1290-----1300-----1310-----1320-----
AY665713 Ab4      TGCATGCGTCCAGCGCGGAGCCAGACCGGTTTGGAGTTTGACAGCGAGTACGAGCTGCTGGTT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1330-----1340-----1350-----1360-----1370-----1380-----1390-----
AY665713 Ab4      GCCTTCTGACCTTCTCAAGCAGTACTCTCCCGAGTTCGCCACCGGCTACAACATCGTTAATTTTGACT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1400-----1410-----1420-----1430-----1440-----1450-----1460-----
AY665713 Ab4      GGGCGTACATAGTTAACAAGGTAACGTCGGTGTATAACATCAAGCTGGACGGGTACGGCAAGTTCAACAA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1470-----1480-----1490-----1500-----1510-----1520-----1530-----
AY665713 Ab4      AGGGGGCTGTTTTAAGGTGTGGGACATCGCCACGAACCATTTTCAGAAGAAGAGCAAGGTGAAAATCAAT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

```

Supplementary Figure S6: ORF30 nucleotide alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052) 3/5.

```

1540-----1550-----1560-----1570-----1580-----1590-----1600-----
AY665713 Ab4      GGCCTGATATCTCTAGACATGTATTCTGTGGCGACGGAAAAGCTAAAGCTACCCAGCTACAAACTCGACG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1610-----1620-----1630-----1640-----1650-----1660-----1670-----
AY665713 Ab4      CGGTCTGTGGGAGACGTCCTCGGCGAGCATAAGATAGACCTTCCCTATAAAGAAATACCCCTCTATTACGC
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1680-----1690-----1700-----1710-----1720-----1730-----1740-----
AY665713 Ab4      GGGAGGGCCTGACCGGAGGGGCGTAATAGGAGAGTATTGTATCCAGGACTCTAGGCTGGTGGCAAGCTG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1750-----1760-----1770-----1780-----1790-----1800-----1810-----
AY665713 Ab4      TTTTTTAAGTACCTCCCCCATCTGGAACATATCGGCGGTGGCCAAACTCGCCCGTATCACCTAACGCGGG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1820-----1830-----1840-----1850-----1860-----1870-----1880-----
AY665713 Ab4      TAATTTTGTACGGTTCAGCAAATTCGCGTGTACACGTGCTTGCTGAAACTCGCCCGCAGAGAAATTTTCAT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1890-----1900-----1910-----1920-----1930-----1940-----1950-----
AY665713 Ab4      TTTGCCAGACAACAGACGCCGGTTTGACAGTTCAGGCAGACGCCCGGTTCAGAGACTTCGGAGTTGGCTATG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

1960-----1970-----1980-----1990-----2000-----2010-----2020-----
AY665713 Ab4      GATAGCCAAAGCCACGCCCTTCGACAGTACAGACGAACCCGACGGTGTGGACGGTACCCCGGACGCCGACG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

2030-----2040-----2050-----2060-----2070-----2080-----2090-----
AY665713 Ab4      GATCTGGCGCTACTTCTGAAAACGGAGGCGGGAAGCCCGCGCTCGGGAGGGCCGTGGGCTACCAGGGAGC
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

2100-----2110-----2120-----2130-----2140-----2150-----2160-----
AY665713 Ab4      AAAGGTTCTAGACCCCGTATCCGGCTTTCATGTGGACCCCGTGGTGTGTTGACTTCGCTAGCTTATAC
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

2170-----2180-----2190-----2200-----2210-----2220-----2230-----
AY665713 Ab4      CCAAGCATTATCCAGGCCATAACCTCTGTTTCACCACCCTGGCGCTCGATGAAGTGGATCTGGCCGGGC
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

2240-----2250-----2260-----2270-----2280-----2290-----2300-----
AY665713 Ab4      TTCAACCATCCGTCGACTACTCGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAGTTATTTTTTGTCCACGCCCATAT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

```

Supplementary Figure S6: ORF30 nucleotide alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052) 4/5.

```

                2310-----2320-----2330-----2340-----2350-----2360-----2370-----
AY665713 Ab4    TCGCGAAAGCCTGCTTGGCATCTTGCTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGGGCGCGAATC
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

                2380-----2390-----2400-----2410-----2420-----2430-----2440-----
AY665713 Ab4    CCCACCAGCACCCCGAGGAGGCAGTTTACTAGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAGGTGATATGCAACT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

                2450-----2460-----2470-----2480-----2490-----2500-----2510-----
AY665713 Ab4    CGGTTTACGGATTACAGGGGGTGGCAAACGGCCTGTTGCCGTGTCTGAGGATAGCGCTACCGTTACCAC
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

                2520-----2530-----2540-----2550-----2560-----2570-----2580-----
AY665713 Ab4    GATAGGACGCGACATGCTCCTCAAGACCGAGATTACGTTCACTCTCGTTGGGCGACGCGGAGCTGCTG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

                2590-----2600-----2610-----2620-----2630-----2640-----2650-----
AY665713 Ab4    GAGGACAATTTTCCAGGGGCTATAGGTTTCCGAAACCACAAGCCTTACTCCGTCAGGGTTATCTACGGAG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

                2660-----2670-----2680-----2690-----2700-----2710-----2720-----
AY665713 Ab4    ACACCGACTCCGTGTTTATCAAGTTTGTGGGCTGACGTACGAGGGGTATCGGAGCTGGGGGATGCTAT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

                2730-----2740-----2750-----2760-----2770-----2780-----2790-----
AY665713 Ab4    GTCGCGTCAGATTTACAGCGACCTCTTTAGAGCGCCCATCAAACCTGGAGTGTGAGAAGACCTTTCAGCGA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

                2800-----2810-----2820-----2830-----2840-----2850-----2860-----
AY665713 Ab4    CTGCTGCTGATCACCAAGAAGAAGTACATAGGTGTCATAAACGGGGGAAGATGCTCATGAAGGGGTCG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

                2870-----2880-----2890-----2900-----2910-----2920-----2930-----
AY665713 Ab4    ACCTGGTCCGCAAAAATAACTGCTCTTTCATAAACTTGTACGCGGACATCTGGTAGATCTTTTGTGTGA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

                2940-----2950-----2960-----2970-----2980-----2990-----3000-----
AY665713 Ab4    CGACGAGGATGTGGCCACGGCGGCAGCAGAGGTGACAGACGTGCCTCCCGCAGAATGGGTGGGGCGCCCG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....A.....A.....

                3010-----3020-----3030-----3040-----3050-----3060-----3070-----
AY665713 Ab4    CTACCGAGCGGCTTTGACAAGTTTGGGCGAGTGTGGTAGAGGCGTACAACCGTATCACTGCCCCCAACT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

```

Supplementary Figure S6 ORF30 nucleotide alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052) 5/5.

```

3080-----3090-----3100-----3110-----3120-----3130-----3140-----
AY665713 Ab4      TGGACGTGCGCGAGTTTCGTTATGACTGCTGAGCTGAGCCGCTCACCCGAATCGTATACCAACAAGCGCCT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

3150-----3160-----3170-----3180-----3190-----3200-----3210-----
AY665713 Ab4      GCCGCACCTCACCGTCTACTTTAAGCTCGCCATGAGGAATGAAGAACTGCCCAGCGTAAAAGAGAGAATT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

3220-----3230-----3240-----3250-----3260-----3270-----3280-----
AY665713 Ab4      CCGTATGTGATAGTTGCGCAGACCGAGGCCGCGGAACGCGAAGCGGGTGTAGTAACTCAATGCGCGGTA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

3290-----3300-----3310-----3320-----3330-----3340-----3350-----
AY665713 Ab4      CCGCCCAAACCCCGTGGTAACCAAGACCGCACGCCCCCAACCTAAACGCAAACCTGCTGGTTTCCGACCT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

3360-----3370-----3380-----3390-----3400-----3410-----3420-----
AY665713 Ab4      CGCCGAAGACCCGACCTATGTTTCCGAGAATGACGTACCGCTAAACACAGACTACTATTTCTCCACCTG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

3430-----3440-----3450-----3460-----3470-----3480-----3490-----
AY665713 Ab4      TTGGGTACCATAAGCGTGACCTTTAAGGCTCTATTCGGAATGATGTGAGAAACAACAGAAAATCTTTTAA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

3500-----3510-----3520-----3530-----3540-----3550-----3560-----
AY665713 Ab4      AGCGGTTTATTCCGAAACCCCCACAAAGACCCCCACGAAAACCCAGGCACTGCTTGAGCGCGCCGGCTT
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

3570-----3580-----3590-----3600-----3610-----3620-----3630-----
AY665713 Ab4      TGAAAAGCTGACGCCCTTTACACCGGAGGAAGAAAGTCGTGCAATACTGCATACAGTTTTTTGTACTCTA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

3640-----3650-----3660
AY665713 Ab4      GAAGCAGCTCCCATCAAAGCTGA
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

```

Supplementary Figure S7: ORF30 amino acid alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052) (Part 1).

```

1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----
AY665713 Ab4      MAAREQANSVRRSGFFNPFIGKRPFFRPGSGQTAETERPRPPQHSYCTEVGSFKFIAPRCLDDEEAPADQ
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

70-----80-----90-----100-----110-----120-----130-----
AY665713 Ab4      RRGVHVGTLERPPKVYCDGSEYDVLNLFASGGCWPRRIRVWNGQDFRGGDFNPRFERFHVYDIVETSESAS
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

140-----150-----160-----170-----180-----190-----200-----
AY665713 Ab4      HDDPSRFAELSRPSGSVVTLGMSCEGKRVAVHVYGVVRHYFYMAKAEVDSACGITTEAELVRAMVDCAHS
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

210-----220-----230-----240-----250-----260-----270-----
AY665713 Ab4      SALSAAALGNNGGKQSGGSGGWWGKHKVSAADCFKVETVCHTTLYYFGSKPALYRVSASSSRLGGFICD
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

280-----290-----300-----310-----320-----330-----340-----
AY665713 Ab4      NFHPEITKFEGSVDVTRLLLDNENFTSFGWYRLRPGTHGERVQLRPVERHVTSSDVEINCTPDNLEPIP
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

350-----360-----370-----380-----390-----400-----410-----
AY665713 Ab4      DEAAWPDYKLMCFDIECKAGTGNEMAFPVATNQEDLVIQISCLLYSLATQNHETLLFLGSCDISEEYS
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

420-----430-----440-----450-----460-----470-----480-----
AY665713 Ab4      FACVQRGEPRTVLEFDSEYELLVAFLLTFLKQYSPEFATGYNIVNFDWAYIVNKVTSVYNIKLDGYGKFN
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

490-----500-----510-----520-----530-----540-----550-----
AY665713 Ab4      KGGLFKVWDIATNHFQKSKVKINGLISLDMYSVATEKCLKLPSYKLDVAVGDVLGEHKIDLPYKEIPSY
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

560-----570-----580-----590-----600-----610-----620-----
AY665713 Ab4      AGGPDRRGVIGEYCIQDSRLVGKLFKYLPHLELSAVAKLARITLTRVIFDGGQIRVYTCLLKLARERNF
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

630-----640-----650-----660-----670-----680-----690-----
AY665713 Ab4      ILPDNRFRFDSQADAASETSELAMDSQSHAFDSTDEPDGVDGTPDAAGSGATSENGGKPGVGRAVGYQG
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

700-----710-----720-----730-----740-----750-----760-----
AY665713 Ab4      AKVLDPVSGFHVDPVVVDFASLYPSIIQAHNLCFTTLALDEVDLAGLQPSVDYSTFEVGDQKLVFVHAH
MT968035 FR-56628 .....
AY464052 V592    .....

```

Supplementary Figure S7: ORF30 amino acid alignment of the EHV-1 strains Ab4 (AY665713), FR-56628 (MT968035) and V592 (AY464052) (Part2).

```

AY665713 Ab4      770-----780-----790-----800-----810-----820-----830-----
MT968035 FR-56628 IRESLLGILLRDWLMAMRKAVRARIPSTPPEEAVLLDKQSSAIKVICNSVYGFTGVANGLLPCLRIAATVT
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      840-----850-----860-----870-----880-----890-----900-----
MT968035 FR-56628 TIGRDMLLKTRDYVHSRWATRELLEDNFPGAIGFRNHKPYSVRVIYGDTSVFIKRVGLTYEGVSELGDA
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      910-----920-----930-----940-----950-----960-----970-----
MT968035 FR-56628 MSRQISADLFRAPIKLECEKTFQRLLLIITKKKYIGVINGGKMLMGVDLVRKNNCSFINLYARHLVDLLL
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      980-----990-----1000-----1010-----1020-----1030-----1040-----
MT968035 FR-56628 YDEDVATAAAEVDVPPAEWVGRPLPSGFDFKFRVLEAYNRITAPNLDVREFVMTAELSRSPESYTNKR
AY464052 V592      .....K.....
                        .....K.....

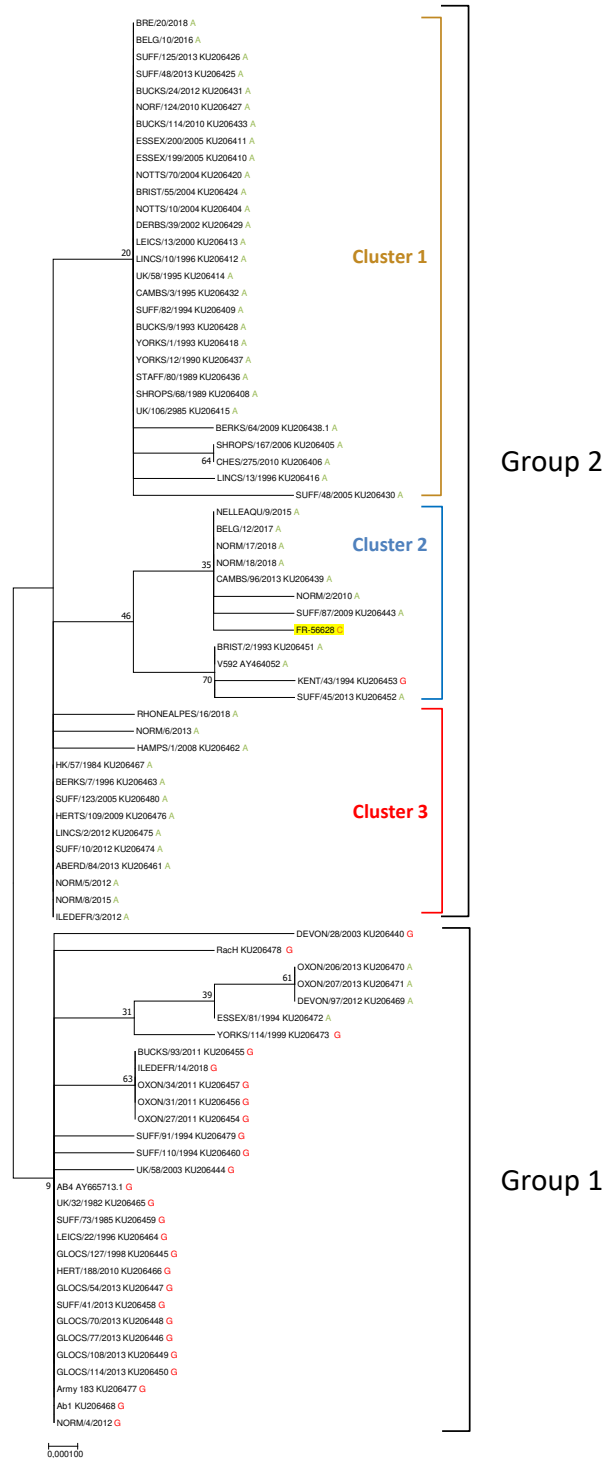
AY665713 Ab4      1050-----1060-----1070-----1080-----1090-----1100-----1110-----
MT968035 FR-56628 LPHLTVYFKLAMRNEELPSVKERIPYVIVAQTEAAEREAGVVNSMRGTAQNPVVTKTARPPKPKLLVSD
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      1120-----1130-----1140-----1150-----1160-----1170-----1180-----
MT968035 FR-56628 LAEDPTYVSENDVPLNTDYYFSHLLGTISVTFKALFGNDVRTENLLKRFIPETPHKTPTKTQALLERAG
AY464052 V592      .....

AY665713 Ab4      1190-----1200-----1210-----
MT968035 FR-56628 FEKLTPTTPEEESRRILHTVFTLEAAPHQS
AY464052 V592      .....

```

Supplementary Figure S8: Maximum Likelihood Tree based on Tamura-Nei model and built using ORF30 sequences of Ab4 and V592 reference strains, 67 EHV-1 strains previously described (Bryant *et al.* 2018), 14 EHV-1 strains from France and Belgium (Sutton *et al.* 2019) and the EHV-1 strain FR-56628 (highlighted in yellow). The ORF30 2254 nucleotide is annotated.



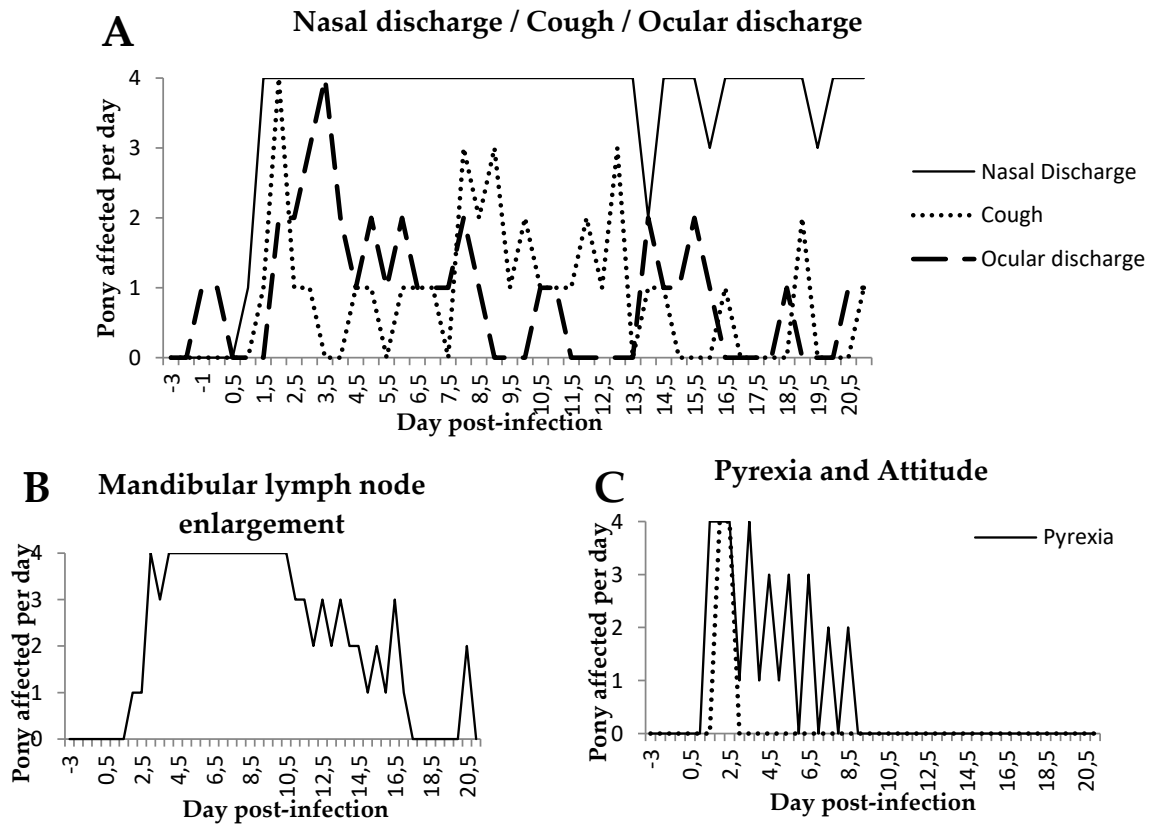
Supplementary Table S9: EHV-1 strain FR-56628 MLST amino acid sequence compared to EHV-1 reference strains Ab4 and V592 (A) and to U_L clade 10 EHV-1 strains (B).

A

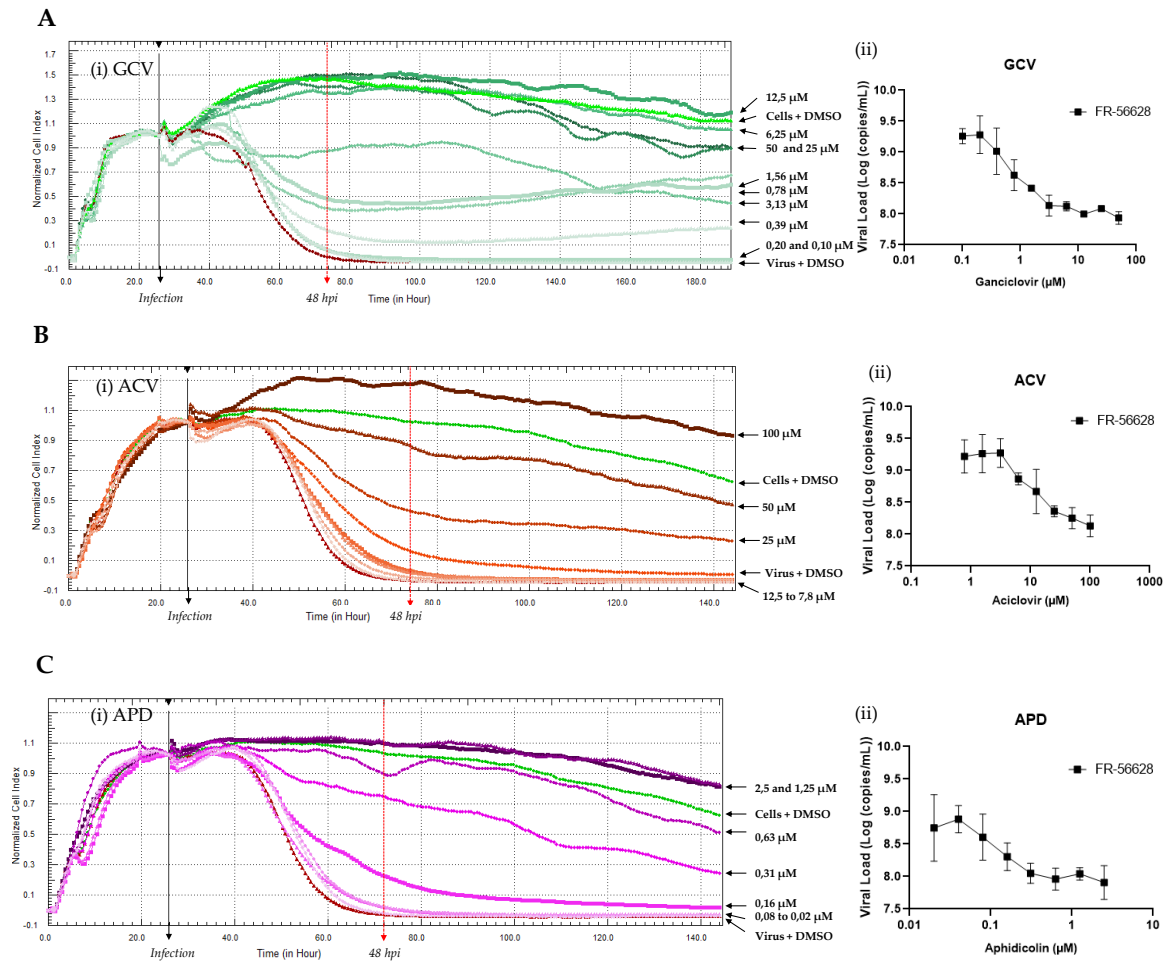
Strain	U _L Clade	2	5	8	11	11	13	13	13	13	13	13	14	14	14	15	22	29	30
		59	114	114	189	235	305	405	460	492	493	499	618-20	628	692	166	430	12	752
Ab4	1	G	G	D	Q	R	S	A	A	E	T	A	---	R	S	D	S	T	D
FR-56628	10	D	V	D	Q	R	L	A	T	E	T	A	PSR	R	S	N	S	T	H
V592	9	D	V	N	K	R	L	A	T	E	T	A	PSR	R	S	N	P	K	N

Strain	30	31	32	33	33	34	36	37	39	40	42	45	46	50	52	57	73	76
	990	90	42	15	976	66	47	265	440	196	1275	427	140	367	386	804	122	128
Ab4	E	N	S	N	N	D	S	A	S	R	K	E	F	P	A	K	A	F
FR-56628	K	S	S	H	D	D	S	V	S	R	K	G	S	P	V	R	A	S
V592	K	S	L	H	D	G	R	V	L	H	R	G	S	S	V	R	V	S

Supplementary Figure S10: Number of horses experimenting nasal discharge/cough/ocular discharge (A), mandibular lymph node enlargement (B) and pyrexia/attitude (C).



Supplementary Figure S11: Antiviral analysis of the effect of (A) GCV, (B) ACV and (C) APD using (i) impedancemetry measurement, (ii) viral load quantification.



Supplementary Figure S12: Amino Acid in ORF30 position 752 (or equivalent region) of 18 Herpesviruses (A). Conserved amino acids on a 106 bp region of 18 herpesviruses DNA polymerase gene are highlighted in shades of blue (when 9/18 or more herpesviruses contained the same amino acid). Aspartic acid in position 752 or equivalent are highlighted in red, and variants are highlighted in yellow (B).

A

Herpesviruses	DNA polymerase sequence accession number	752 amino acid position or equivalent	
Human Herpesviruses (HHV)			
α	<i>Human Simplex Virus 1 (HHV-1)</i>	NC_001806	D
	<i>Human simplex virus 2 (HHV-2)</i>	NC_001798	D
	<i>Varicello – Zoster Virus (HHV-3)</i>	NC_001348	D
β	<i>Human betaherpesvirus 6A</i>	NC_001664	D
	<i>Human betaherpesvirus 6B</i>	NC_000898	D
	<i>Human betaherpesvirus 7</i>	NC_001716	D
γ	<i>Human gammaherpesvirus 4</i>	NC_007605	D
Equid Herpesviruses (EHV)			
α	<i>Equid alphaherpesvirus 1</i>	AY665713 (Ab4)	D
		AY464052 (V592)	N
		FR-56628	H
	<i>Equid alphaherpesvirus 3</i>	NC_024771	D
	<i>Equid alphaherpesvirus 4</i>	NC_001844	D
	<i>Equid alphaherpesvirus 8</i>	MF431614	D
	<i>Equid alphaherpesvirus 9</i>	NC_011644	D
γ	<i>Equid alphaherpesvirus 2</i>	NC_001650	D
	<i>Equid alphaherpesvirus 5</i>	NC_026421	D
	<i>Equid alphaherpesvirus 7</i>	NC_043061	D
Bovine Herpesvirus (BoHV)			
α	<i>Bovine alphaherpesvirus 1</i>	NC_001847	D

B

	860.....870.....880.....890.....900.....910.....920.....930.....940.....950.....960....
HSV-1 (α)	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--ADAV ⁸⁸⁰ HEAGK ⁸⁹⁰ YLEI ⁹⁰⁰ EVG ⁹¹⁰ GRR ⁹²⁰ LFVKAH ⁹³⁰ VRESLL ⁹⁴⁰ SLLRD ⁹⁵⁰ WLAMR ⁹⁶⁰ QI ⁹⁷⁰ RSR ⁹⁸⁰ IP ⁹⁹⁰ Q ¹⁰⁰⁰ SSPE-EAVLLD ¹⁰¹⁰ KQQA ¹⁰²⁰ AIK ¹⁰³⁰ IV ¹⁰⁴⁰ CNSV ¹⁰⁵⁰
HSV-2 (α)	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--PEAV ⁸⁸⁰ HEADR ⁸⁹⁰ YLEI ⁹⁰⁰ EVG ⁹¹⁰ GRR ⁹²⁰ LFVKAH ⁹³⁰ VRESLL ⁹⁴⁰ SLLRD ⁹⁵⁰ WLAMR ⁹⁶⁰ QI ⁹⁷⁰ RSR ⁹⁸⁰ IP ⁹⁹⁰ Q ¹⁰⁰⁰ SSPE-EAVLLD ¹⁰¹⁰ KQQA ¹⁰²⁰ AIK ¹⁰³⁰ IV ¹⁰⁴⁰ CNSV ¹⁰⁵⁰
HHV-3 (α)	VLDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLN--FETVK ⁸⁸⁰ R ⁸⁹⁰ LN ⁹⁰⁰ S--S ⁹¹⁰ Y ⁹²⁰ ANT ⁹³⁰ TV ⁹⁴⁰ GKRL ⁹⁵⁰ FFVRS ⁹⁶⁰ NSVRESLL ⁹⁷⁰ GVL ⁹⁸⁰ LKDWL ⁹⁹⁰ AMR ¹⁰⁰⁰ KAI ¹⁰¹⁰ RAR ¹⁰²⁰ IP ¹⁰³⁰ Q ¹⁰⁴⁰ SSD-EAVLLD ¹⁰⁵⁰ KQQA ¹⁰⁶⁰ AIK ¹⁰⁷⁰ IV ¹⁰⁸⁰ CNSV ¹⁰⁹⁰
HHV-6A (β)	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--ERQI ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ SES--LIL ⁹⁰⁰ VKL ⁹¹⁰ DE ⁹²⁰ TH ⁹³⁰ EV ⁹⁴⁰ PCIRE ⁹⁵⁰ SV ⁹⁶⁰ ASL ⁹⁷⁰ LKDWL ⁹⁸⁰ AK ⁹⁹⁰ RE ¹⁰⁰⁰ KK ¹⁰¹⁰ EMQ ¹⁰²⁰ NCSD ¹⁰³⁰ PMM ¹⁰⁴⁰ KLL ¹⁰⁵⁰ LDK ¹⁰⁶⁰ Q ¹⁰⁷⁰ L ¹⁰⁸⁰ AI ¹⁰⁹⁰ KT ¹¹⁰⁰ CNSV ¹¹¹⁰
HHV-6B (β)	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--ERQI ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ SES--LIL ⁹⁰⁰ VKL ⁹¹⁰ DE ⁹²⁰ TH ⁹³⁰ EV ⁹⁴⁰ PCIRE ⁹⁵⁰ SV ⁹⁶⁰ ASL ⁹⁷⁰ LKDWL ⁹⁸⁰ AK ⁹⁹⁰ RE ¹⁰⁰⁰ KK ¹⁰¹⁰ EMQ ¹⁰²⁰ NCSD ¹⁰³⁰ PMM ¹⁰⁴⁰ KLL ¹⁰⁵⁰ LDK ¹⁰⁶⁰ Q ¹⁰⁷⁰ L ¹⁰⁸⁰ AI ¹⁰⁹⁰ KT ¹¹⁰⁰ CNSV ¹¹¹⁰
HHV-7 (β)	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--ENAVI ⁸⁸⁰ GL ⁸⁹⁰ HAD--LIL ⁹⁰⁰ VH ⁹¹⁰ LP ⁹²⁰ VT ⁹³⁰ HR ⁹⁴⁰ V ⁹⁵⁰ KT ⁹⁶⁰ VRESI ⁹⁷⁰ ASL ⁹⁸⁰ LK ⁹⁹⁰ KK ¹⁰⁰⁰ L ¹⁰¹⁰ DK ¹⁰²⁰ RE ¹⁰³⁰ KK ¹⁰⁴⁰ MQ ¹⁰⁵⁰ KMC ¹⁰⁶⁰ N ¹⁰⁷⁰ PN ¹⁰⁸⁰ V ¹⁰⁹⁰ MEM ¹¹⁰⁰ LDK ¹¹¹⁰ Q ¹¹²⁰ L ¹¹³⁰ AI ¹¹⁴⁰ KT ¹¹⁵⁰ CNSV ¹¹⁶⁰
HHV-4 (γ)	VVDFAS ⁸⁶⁰ LYPSIIQAHNLCY ⁸⁷⁰ STMIT ⁸⁸⁰ PG ⁸⁹⁰ E ⁹⁰⁰ H ⁹¹⁰ RL ⁹²⁰ AG ⁹³⁰ IR ⁹⁴⁰ GE ⁹⁵⁰ YES ⁹⁶⁰ RL ⁹⁷⁰ TGG ⁹⁸⁰ VY ⁹⁹⁰ FF ¹⁰⁰⁰ V ¹⁰¹⁰ K ¹⁰²⁰ VH ¹⁰³⁰ SE ¹⁰⁴⁰ ASL ¹⁰⁵⁰ LTS ¹⁰⁶⁰ W ¹⁰⁷⁰ LAK ¹⁰⁸⁰ KK ¹⁰⁹⁰ IK ¹¹⁰⁰ KL ¹¹¹⁰ LA ¹¹²⁰ AC ¹¹³⁰ ED ¹¹⁴⁰ PR ¹¹⁵⁰ QRTI ¹¹⁶⁰ LDK ¹¹⁷⁰ Q ¹¹⁸⁰ L ¹¹⁹⁰ AI ¹²⁰⁰ R ¹²¹⁰ CT ¹²²⁰ CA ¹²³⁰ V ¹²⁴⁰
EHV-1 (α) Ab4	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--EVDL ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ L ⁹⁰⁰ Q ⁹¹⁰ SV ⁹²⁰ YS ⁹³⁰ TFE ⁹⁴⁰ V ⁹⁵⁰ GD ⁹⁶⁰ Q ⁹⁷⁰ RL ⁹⁸⁰ FF ⁹⁹⁰ V ¹⁰⁰⁰ HA ¹⁰¹⁰ IRE ¹⁰²⁰ SL ¹⁰³⁰ L ¹⁰⁴⁰ G ¹⁰⁵⁰ IL ¹⁰⁶⁰ LRD ¹⁰⁷⁰ WL ¹⁰⁸⁰ AMR ¹⁰⁹⁰ KAV ¹¹⁰⁰ RARI ¹¹¹⁰ PT ¹¹²⁰ STPE-EAVLLD ¹¹³⁰ KQQA ¹¹⁴⁰ AIK ¹¹⁵⁰ IV ¹¹⁶⁰ CNSV ¹¹⁷⁰
EHV-1 V592	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--EVDL ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ L ⁹⁰⁰ Q ⁹¹⁰ SV ⁹²⁰ NS ⁹³⁰ TFE ⁹⁴⁰ V ⁹⁵⁰ GD ⁹⁶⁰ Q ⁹⁷⁰ RL ⁹⁸⁰ FF ⁹⁹⁰ V ¹⁰⁰⁰ HA ¹⁰¹⁰ IRE ¹⁰²⁰ SL ¹⁰³⁰ L ¹⁰⁴⁰ G ¹⁰⁵⁰ IL ¹⁰⁶⁰ LRD ¹⁰⁷⁰ WL ¹⁰⁸⁰ AMR ¹⁰⁹⁰ KAV ¹¹⁰⁰ RARI ¹¹¹⁰ PT ¹¹²⁰ STPE-EAVLLD ¹¹³⁰ KQQA ¹¹⁴⁰ AIK ¹¹⁵⁰ IV ¹¹⁶⁰ CNSV ¹¹⁷⁰
EHV-1 FR-56628	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--EVDL ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ L ⁹⁰⁰ Q ⁹¹⁰ SV ⁹²⁰ NS ⁹³⁰ TFE ⁹⁴⁰ V ⁹⁵⁰ GD ⁹⁶⁰ Q ⁹⁷⁰ RL ⁹⁸⁰ FF ⁹⁹⁰ V ¹⁰⁰⁰ HA ¹⁰¹⁰ IRE ¹⁰²⁰ SL ¹⁰³⁰ L ¹⁰⁴⁰ G ¹⁰⁵⁰ IL ¹⁰⁶⁰ LRD ¹⁰⁷⁰ WL ¹⁰⁸⁰ AMR ¹⁰⁹⁰ KAV ¹¹⁰⁰ RARI ¹¹¹⁰ PT ¹¹²⁰ STPE-EAVLLD ¹¹³⁰ KQQA ¹¹⁴⁰ AIK ¹¹⁵⁰ IV ¹¹⁶⁰ CNSV ¹¹⁷⁰
EHV-3 (α)	VLDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--AADV ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ IR ⁹⁰⁰ GE ⁹¹⁰ YS ⁹²⁰ VD ⁹³⁰ GG ⁹⁴⁰ RL ⁹⁵⁰ CH ⁹⁶⁰ SVRESLL ⁹⁷⁰ GIL ⁹⁸⁰ LRD ⁹⁹⁰ WL ¹⁰⁰⁰ AMR ¹⁰¹⁰ KAV ¹⁰²⁰ RARI ¹⁰³⁰ PT ¹⁰⁴⁰ STPE-EAVLLD ¹⁰⁵⁰ KQQA ¹⁰⁶⁰ AIK ¹⁰⁷⁰ IV ¹⁰⁸⁰ CNSV ¹⁰⁹⁰
EHV-4 (α)	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--EVDL ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ L ⁹⁰⁰ Q ⁹¹⁰ CV ⁹²⁰ YS ⁹³⁰ TFE ⁹⁴⁰ V ⁹⁵⁰ GD ⁹⁶⁰ Q ⁹⁷⁰ RL ⁹⁸⁰ FF ⁹⁹⁰ V ¹⁰⁰⁰ HA ¹⁰¹⁰ IRE ¹⁰²⁰ SL ¹⁰³⁰ L ¹⁰⁴⁰ G ¹⁰⁵⁰ IL ¹⁰⁶⁰ LRD ¹⁰⁷⁰ WL ¹⁰⁸⁰ AMR ¹⁰⁹⁰ KAV ¹¹⁰⁰ RARI ¹¹¹⁰ PT ¹¹²⁰ STPE-EAVLLD ¹¹³⁰ KQQA ¹¹⁴⁰ AIK ¹¹⁵⁰ IV ¹¹⁶⁰ CNSV ¹¹⁷⁰
EHV-8 (α)	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--EVDL ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ L ⁹⁰⁰ Q ⁹¹⁰ SV ⁹²⁰ YS ⁹³⁰ TFE ⁹⁴⁰ V ⁹⁵⁰ GD ⁹⁶⁰ Q ⁹⁷⁰ RL ⁹⁸⁰ FF ⁹⁹⁰ V ¹⁰⁰⁰ HA ¹⁰¹⁰ IRE ¹⁰²⁰ SL ¹⁰³⁰ L ¹⁰⁴⁰ G ¹⁰⁵⁰ IL ¹⁰⁶⁰ LRD ¹⁰⁷⁰ WL ¹⁰⁸⁰ AMR ¹⁰⁹⁰ KAV ¹¹⁰⁰ RARI ¹¹¹⁰ PT ¹¹²⁰ STPE-EAVLLD ¹¹³⁰ KQQA ¹¹⁴⁰ AIK ¹¹⁵⁰ IV ¹¹⁶⁰ CNSV ¹¹⁷⁰
EHV-9 (α)	VFDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--EVDL ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ L ⁹⁰⁰ Q ⁹¹⁰ SV ⁹²⁰ YS ⁹³⁰ TFE ⁹⁴⁰ V ⁹⁵⁰ GD ⁹⁶⁰ Q ⁹⁷⁰ RL ⁹⁸⁰ FF ⁹⁹⁰ V ¹⁰⁰⁰ HA ¹⁰¹⁰ IRE ¹⁰²⁰ SL ¹⁰³⁰ L ¹⁰⁴⁰ G ¹⁰⁵⁰ IL ¹⁰⁶⁰ LRD ¹⁰⁷⁰ WL ¹⁰⁸⁰ AMR ¹⁰⁹⁰ KAV ¹¹⁰⁰ RARI ¹¹¹⁰ PT ¹¹²⁰ STPE-EAVLLD ¹¹³⁰ KQQA ¹¹⁴⁰ AIK ¹¹⁵⁰ IV ¹¹⁶⁰ CNSV ¹¹⁷⁰
EHV-2 (γ)	VVDFAS ⁸⁶⁰ LYPTIIQAHNLCY ⁸⁷⁰ STMIP ⁸⁸⁰ GD ⁸⁹⁰ QL ⁹⁰⁰ YL ⁹¹⁰ HP ⁹²⁰ LAG ⁹³⁰ GG--DYE ⁹⁴⁰ DF ⁹⁵⁰ EL ⁹⁶⁰ SSG ⁹⁷⁰ AV ⁹⁸⁰ EV ⁹⁹⁰ KK ¹⁰⁰⁰ KAV ¹⁰¹⁰ SL ¹⁰²⁰ AT ¹⁰³⁰ L ¹⁰⁴⁰ LN ¹⁰⁵⁰ V ¹⁰⁶⁰ L ¹⁰⁷⁰ AK ¹⁰⁸⁰ KK ¹⁰⁹⁰ I ¹¹⁰⁰ RE ¹¹¹⁰ LA ¹¹²⁰ VSD ¹¹³⁰ E ¹¹⁴⁰ AV ¹¹⁵⁰ RTI ¹¹⁶⁰ LDK ¹¹⁷⁰ Q ¹¹⁸⁰ L ¹¹⁹⁰ AI ¹²⁰⁰ K ¹²¹⁰ IV ¹²²⁰ CA ¹²³⁰ V ¹²⁴⁰
EHV-5 (γ)	VVDFAS ⁸⁶⁰ LYPTIIQAHNLCY ⁸⁷⁰ STMIP ⁸⁸⁰ GD ⁸⁹⁰ QL ⁹⁰⁰ YL ⁹¹⁰ HP ⁹²⁰ LAG ⁹³⁰ GG--DYE ⁹⁴⁰ DF ⁹⁵⁰ EL ⁹⁶⁰ SSG ⁹⁷⁰ AV ⁹⁸⁰ EV ⁹⁹⁰ KK ¹⁰⁰⁰ KAV ¹⁰¹⁰ SL ¹⁰²⁰ AT ¹⁰³⁰ L ¹⁰⁴⁰ LN ¹⁰⁵⁰ V ¹⁰⁶⁰ L ¹⁰⁷⁰ AK ¹⁰⁸⁰ KK ¹⁰⁹⁰ I ¹¹⁰⁰ RE ¹¹¹⁰ LA ¹¹²⁰ VSD ¹¹³⁰ E ¹¹⁴⁰ AV ¹¹⁵⁰ RTI ¹¹⁶⁰ LDK ¹¹⁷⁰ Q ¹¹⁸⁰ L ¹¹⁹⁰ AI ¹²⁰⁰ K ¹²¹⁰ IV ¹²²⁰ CA ¹²³⁰ V ¹²⁴⁰
EHV-7 (γ)	VVDFAS ⁸⁶⁰ LYPTIIQAHNLCY ⁸⁷⁰ STMIP ⁸⁸⁰ GD ⁸⁹⁰ QL ⁹⁰⁰ YL ⁹¹⁰ HP ⁹²⁰ LAG ⁹³⁰ GG--DYE ⁹⁴⁰ DF ⁹⁵⁰ EL ⁹⁶⁰ SSG ⁹⁷⁰ AV ⁹⁸⁰ EV ⁹⁹⁰ KK ¹⁰⁰⁰ KAV ¹⁰¹⁰ SL ¹⁰²⁰ AT ¹⁰³⁰ L ¹⁰⁴⁰ LN ¹⁰⁵⁰ V ¹⁰⁶⁰ L ¹⁰⁷⁰ AK ¹⁰⁸⁰ KK ¹⁰⁹⁰ I ¹¹⁰⁰ RE ¹¹¹⁰ LA ¹¹²⁰ VSD ¹¹³⁰ E ¹¹⁴⁰ AV ¹¹⁵⁰ RTI ¹¹⁶⁰ LDK ¹¹⁷⁰ Q ¹¹⁸⁰ L ¹¹⁹⁰ AI ¹²⁰⁰ K ¹²¹⁰ IV ¹²²⁰ CA ¹²³⁰ V ¹²⁴⁰
BoHV-1 (α)	VLDFA ⁸⁶⁰ SLYPSIIQAHNLCFSTI ⁸⁷⁰ SLR--EAV ⁸⁸⁰ AG ⁸⁹⁰ IR ⁹⁰⁰ GE ⁹¹⁰ YS ⁹²⁰ VD ⁹³⁰ GG ⁹⁴⁰ RL ⁹⁵⁰ CH ⁹⁶⁰ SVRESLL ⁹⁷⁰ GIL ⁹⁸⁰ LRD ⁹⁹⁰ WL ¹⁰⁰⁰ AMR ¹⁰¹⁰ KAV ¹⁰²⁰ RARI ¹⁰³⁰ PT ¹⁰⁴⁰ AAPE-EAVLLD ¹⁰⁵⁰ KQQA ¹⁰⁶⁰ AIK ¹⁰⁷⁰ IV ¹⁰⁸⁰ CNSV ¹⁰⁹⁰

Discussion

Cette étude rapporte la découverte d'une souche d'EHV-1 portant un troisième génotype en position 2 254 de l'ORF30 : le génotype C₂₂₅₄ induisant un changement d'acide aminé H₇₅₂. Cette souche, isolée en 2018 sur un unique site en France, a été à l'origine de signes cliniques respiratoires chez 82 chevaux. Parmi ces 82 chevaux, deux ont également montré des signes neurologiques conduisant à l'euthanasie de l'un d'entre eux. A la suite de cette découverte, une nouvelle PCR a été mise au point pour pouvoir, en complément du système PCR développé par Allen *et al.* (2007), discriminer les trois profils A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ et C₂₂₅₄ (Allen 2007). Ce nouveau système PCR nous a permis de rechercher cette mutation C₂₂₅₄ chez d'autres souches collectées entre 2016 et 2020, sans succès. L'absence de détection de cette nouvelle souche C₂₂₅₄/H₇₅₂ depuis 2018 pourrait s'expliquer par une grande restriction des mouvements des chevaux sur le site de son isolement. Par ailleurs, en l'absence d'activité de reproduction sur ce site, il n'est pas possible de connaître l'effet de cette nouvelle souche sur des juments gestantes. Il est également intéressant de noter que l'épisode infectieux impliquant cette souche s'est produit lors de la crise sanitaire survenue en 2018, au cours de laquelle un grand nombre de cas d'EHV-1 et d'EHV-4 ont été reportés, et impliquant un très grands nombre d'échantillonnages. Il n'est pas exclu qu'une telle souche ait échappé aux mailles du filet lors des échantillonnages moins fréquents des années précédant et suivant cette crise de 2018. Enfin, le statut immunitaire des chevaux avant l'épisode infectieux causé par cette souche n'est pas connu, malgré le rapport d'une vaccination fréquente (tous les six mois). L'isolement de ce variant met en lumière l'importance de la surveillance par les laboratoires experts des souches et de l'émergence sur le terrain comme le spécifie la norme AFNOR U47-600. Il est ainsi désormais important de procéder au typage des trois variants A₂₂₅₄, G₂₂₅₄ et C₂₂₅₄, lors de l'isolement de nouvelles souches sur le terrain.

L'isolement de la souche à partir d'écouvillons n'a pas été aussi concluant que par co-culture avec des PBMCs infectés. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence d'interféron- α au niveau des sécrétions nasales, comme l'ont décrit Gryspeerdt *et al.* en 2010 (Gryspeerdt *et al.* 2010). Un test de séroneutralisation à partir d'écouvillons nasaux n'a pas montré de neutralisation contre la souche de référence KyD (VR700TM, ATCC®) écartant, à priori et dans ce contexte, la piste d'anticorps présents localement et empêchant la culture *in vitro*, comme cela a pu être observé dans de précédentes études (Wimer *et al.* 2018; Perkins *et al.* 2019). La culture de la souche *in vitro*, lorsqu'elle a été concluante, a permis l'observation

d'effets cytopathiques typiques de l'EHV-1 avec la formation de *syncytia* (Wellington, Love and Whalley 1996). Cette nouvelle souche, identifiée FR-56628, pose la question de l'effet de la mutation en position 2 254 de l'ORF30 sur son activité.

La comparaison des séquences protéiques de l'ADN polymérase de plusieurs herpesvirus, incluant les neuf herpesvirus des équidés connus (EHV-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9), montre une très grande conservation du résidu D (acide aspartique) en position 752 ou équivalente chez les *Herpesviridae*. Ce constat avait initialement été réalisé par Nugent *et al.* (2006). Ces auteurs ont alors suggéré que les souches d'EHV-1 D₇₅₂ (G₂₂₅₄) étaient des souches ancestrales à partir desquelles les souches N₇₅₂ (A₂₂₅₄) auraient évolué (Nugent *et al.* 2006). Rejoignant cette idée, des études portant sur le mécanisme infectieux des deux profils de souches (A₂₂₅₄/N₇₅₂ et G₂₂₅₄/D₇₅₂) ont mis en évidence une capacité des souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) isolées lors d'avortements, à infecter de manière équivalente les cellules monocytaires CD172a+ et les lymphocytes T, alors que des souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) isolées lors de cas d'avortement semblaient infecter en plus grande proportion les cellules monocytaires CD172a+ que les lymphocytes T (Gryspeerd *et al.* 2010; Vandekerckhove *et al.* 2010). Comme mentionné précédemment, ces études ainsi que d'autres études menées sur la cinétique de répllication des deux types de souches (A₂₂₅₄/N₇₅₂ et G₂₂₅₄/D₇₅₂), ont permis d'émettre l'hypothèse d'une co-évolution des souches A₂₂₅₄ (N₇₅₂) avec le système immunitaire à partir des souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂), aboutissant à une meilleure stratégie d'évasion de l'immunité (Gryspeerd *et al.* 2010; Laval *et al.* 2017; Poelaert *et al.* 2019b). Toujours en accord avec cette hypothèse, nous pourrions suggérer, d'après les résultats de notre étude, que les souches FR-56628 et KENT/43/1994, seules souches respectivement C₂₂₅₄ (H₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂) du groupe 2 et cluster 2 de l'analyse phylogénique basée sur l'ORF30, sont deux souches ayant co-évolué de souches (A₂₂₅₄) N₇₅₂, très majoritairement représentées dans ce cluster. Il est également intéressant de noter qu'à notre connaissance, l'EHV-1 est le seul herpesvirus des équidés connu présentant une telle variation de résidu (D₇₅₂/N₇₅₂/H₇₅₂) en position 752 de l'ADN polymérase. Concernant l'association génotype/pathotype chez l'EHV-1 proposée par Nugent *et al.* (2006), elle a rapidement été appuyée par Perkins *et al.* (2009) au travers d'une étude statistique sur 176 souches d'EHV-1 montrant à nouveau une forte corrélation bien que non exclusive du génotype G₂₂₅₄ (D₇₅₂) à la forme nerveuse de la maladie, et du génotype A₂₂₅₄ (N₇₅₂) à la forme abortive. Malgré le constat que 24% des isolats issus de formes nerveuses arboraient le génotype A₂₂₅₄ (N₇₅₂), les auteurs ont pu montrer que la probabilité qu'une forme nerveuse soit associée à une souche de type G₂₂₅₄

(D₇₅₂) est 162 fois supérieure à celle qu'elle soit associée à une souche de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) (Nugent *et al.* 2006; Perkins *et al.* 2009: 200). La découverte d'un troisième génotype C₂₂₅₄ (H₇₅₂) chez l'EHV-1 possiblement responsable de signes cliniques neurologiques, complexifie la compréhension de cette association génotype/pathotype déjà identifiée comme non-exclusive lors de récentes études (Vissani *et al.* 2009; Pronost *et al.* 2010b; Fritsche and Borchers 2011; Stasiak *et al.* 2015; Garvey *et al.* 2019; Pusterla *et al.* 2020). Par ailleurs, chez les herpesvirus des équidés, les formes nerveuses n'ont été décrites à notre connaissance qu'en présence d'EHV-1, d'EHV-8 et d'EHV-9 malgré la grande conservation du résidu D₇₅₂ chez l'ensemble des EHV. Cette observation est en accord avec l'hypothèse déjà émise que cette mutation n'est pas le seul facteur impliqué dans la neurovirulence des souches, et que d'autres paramètres incluant l'environnement (qualité de l'air, stress, entraînement, etc.), le statut immunitaire ou physiologique de l'hôte, pourraient intervenir dans l'issue clinique de l'infection par une souche d'EHV-1 chez le cheval (pour revue, Allen 2002; Lunn *et al.* 2009: 20; Pronost *et al.* 2010a; Zarski *et al.* 2021).

Trois molécules antivirales, le ganciclovir, l'aciclovir et l'aphidicoline, ciblant l'ADN polymérase, ont été testées non seulement contre la nouvelle souche FR-56628 (C₂₂₅₄/H₂₂₅₄) mais également contre deux autres souches isolées sur le terrain FR-6815 et FR-38991 portant respectivement les mutations A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂). Le ganciclovir et l'aciclovir sont des analogues de déoxyguanosine agissant comme des substrats nucléotidiques compétiteurs incorporés par l'ADN polymérase (Elion 1983; Matthews and Boehme 1988). Cette incorporation dans le brin en synthèse ne peut se faire qu'après leur phosphorylation par la thymidine kinase (TK) virale puis la TK cellulaire. Dans le cas de l'aciclovir, son incorporation arrête la synthèse du brin d'ADN en cours, alors que dans le cas du ganciclovir, l'arrêt de la synthèse du brin d'ADN n'intervient qu'après l'incorporation de plusieurs nucléotides (pour revue, Shiraki 2018). L'aphidicoline, quant à elle, est un diterpène tétracyclique capable d'inhiber l'activité des ADN polymérases de famille B, à laquelle l'ADN polymérase de l'EHV-1 appartient (Baranovskiy *et al.* 2014). Cette molécule agit en entrant en compétition avec les déoxynucléosides triphosphates (dNTPs) au niveau du site de liaison de l'ADN polymérase. La sensibilité des variants N₇₅₂ (A₂₂₅₄) et D₇₅₂ (G₂₂₅₄) à l'aphidicoline a été étudiée lors de deux études menées par des collaborateurs d'un même groupe scientifique. Comme mentionné précédemment, Goodman *et al.* (2007) et Van de Walle *et al.* (2009), ont en effet montré une sensibilité accrue de mutants ou révertants N₇₅₂ (A₂₂₅₄) de souches d'EHV-1 à l'aphidicoline par rapport aux mutants ou révertant D₇₅₂ (G₂₂₅₄)

de ces mêmes souches (Goodman *et al.* 2007; Van de Walle *et al.* 2009). La structure de l'ADN polymérase n'a encore pas été décrite chez l'EHV-1, mais par analogie avec celle de l'HSV-1, la position D₇₅₂ chez l'EHV-1 est homologue de la position D₇₅₁ chez l'HSV-1. Cet acide aminé se trouve au niveau du domaine de la paume de l'ADN polymérase de l'HSV-1, qui est proche de la région fixant les dNTPs (située dans le domaine des doigts). Après liaison aux dNTPs, la molécule change de conformation permettant l'incorporation de ces dNTPs dans le brin d'ADN en synthèse (Liu *et al.* 2006; pour revue, Berdis 2017; pour revue, Zarrouk, Piret and Boivin 2017). L'aphidicoline pourrait modifier l'interaction entre les domaines de la paume et des doigts comme il l'a été suggéré chez la polymérase α humaine (Baranovskiy *et al.* 2014). La question du rôle de la mutation en position 752 de la séquence protéique de l'ADN polymérase (localisée dans le domaine de la paume) dans l'interaction des deux domaines et dans leur réaction à l'aphidicoline se pose également. Dans cette étude, l'aphidicoline et le ganciclovir ont montré une bonne efficacité *in vitro* contre les trois souches testées (FR-56628, FR-6815 et FR-38991), alors que de plus fortes concentrations d'aciclovir ont été requises pour inhiber la réplication des trois souches. Sachant que le ganciclovir et l'aciclovir requièrent tous deux la TK virale pour leur première phosphorylation, la faible efficacité de l'aciclovir ne peut être associée à une résistance par la TK virale comme il a déjà été décrit, puisque l'efficacité du ganciclovir reste optimale (Topalis *et al.* 2018). Les modélisations 3D des souches de référence Ab4 (G₂₂₅₄/D₇₅₂), V592 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) et de la souche FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂), basées sur le modèle de l'ADN polymérase de l'HSV-1, ne prédisent pas d'effet d'un changement d'acide aminé en position 752 sur la structure de la protéine. Cela laisse supposer que la fonction de la protéine ne serait pas altérée. Par ailleurs, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence une différence d'efficacité *in vitro* du ganciclovir ou de l'aphidicoline selon le profil en position 2 254/752 des souches (pas de différence significative d'EC₅₀ entre les souches FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) et FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂), et entre les souches FR-56628(C₂₂₅₄/H₇₅₂) et FR-38991(G₂₂₅₄/D₇₅₂)). Seule la mesure de l'impédance a montré une sensibilité accrue de la souche FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) à l'aphidicoline en comparaison à la souche FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂). Ce dernier résultat n'a cependant pas été confirmé par l'analyse qPCR. Bien qu'une bonne corrélation entre les méthodes d'analyse par impédance et par qPCR ait été montrée (Thieulent *et al.* 2020a, 2020b), cette différence entre les deux types d'analyses peut s'expliquer par le fait qu'elles mesurent des paramètres différents. De la même manière, l'aciclovir a montré des différences d'efficacité contre les trois souches qui n'ont pas été reproduites par les deux méthodes. L'analyse de l'ORF30 de la souche FR-56628, a montré que le gène de l'ADN

polymérase de toutes les souches étudiées présentait différents points de variations impliquant parfois des changements d'acides aminés. Il est possible que les souches FR-38991 (G₂₂₅₄/D₇₅₂) et FR-6815 (A₂₂₅₄/N₇₅₂), au même titre que la souche FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂), présentent également ce type de variation non silencieuse impactant potentiellement la conformation de l'ADN polymérase. C'est sur ce point que notre analyse antivirale diffère de celles réalisées par Goodman *et al.* (2007), et Van de Walle *et al.* (2009) où des mutants et révertants en position 752 de deux souches (Ab4 et NY03) ont été construits pour les études. Ce point pourrait expliquer les différences de résultats entre notre étude et les deux études mentionnées précédemment (Goodman *et al.* 2007; Van de Walle *et al.* 2009).

La comparaison de la séquence complète de l'ORF30 de la souche FR-56628 avec 83 autres souches a permis de montrer qu'en plus de la mutation en position 2 254, elle présentait jusqu'à 3 autres points de mutation avec les souches du cluster 2 dans le groupe 2. Par ailleurs, ce cluster est principalement représenté par des souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂), à l'exception d'une souche G₂₂₅₄ (D₇₅₂) et de la souche FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂). L'intégralité des autres souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) étant groupée dans le groupe phylogénique 1, il pourrait être suggéré que l'unique souche G₂₂₅₄ (D₇₅₂) ainsi que la souche FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) présentes dans le groupe 2, cluster 2 soient le fruit d'un retour de certaines souches A₂₂₅₄ aux génotypes respectifs G₂₂₅₄ (D₇₅₂) et C₂₂₅₄ (H₇₅₂). En ce qui concerne la classification par la MLSTaa, elle a permis de positionner la souche d'EHV-1 FR-56628 au sein du clade U_L 10 aux cotés de cinq autres souches d'EHV-1 (toutes également classées dans le cluster 2 du groupe 2 de l'analyse phylogénique basée sur l'ORF30). La séquence concaténée d'acides aminés obtenue par MLSTaa de la souche d'EHV-1 FR-56628 ne la distingue des souches du clade U_L 10 que par l'acide aminé en position 752. Par ailleurs, l'analyse de la séquence nucléotidique obtenue par MLSTnt montre un double profil au niveau de l'ORF37. Ces résultats suggèrent que deux variants de la souche FR-56628 ont été isolés à partir d'un même cheval (cheval 13). L'ORF37 est également un gène conservé chez les alphaherpèsvirus et code pour un gène homologue du gène UL24 connu chez l'HSV-1 (Telford *et al.* 1992). Contrairement à l'ORF30, le produit de l'ORF37 n'est pas essentiel à la croissance *in vitro* du virus sur cellules (Pearson and Coen 2002; Kasem *et al.* 2010). Chez l'HSV-1, il a été montré que le gène UL24 joue un rôle dans la pathogénicité des souches, et affecte la réplication *in vitro* et *in vivo*, ainsi que la réactivation après latence (Jacobson, Martin and Coen 1989; Leiva-Torres, Rochette and Pearson 2010). Plusieurs fonctions ont été attribuées à cette protéine telles que la régulation de l'expression des gènes viraux, la dispersion des protéines cellulaires

dans le noyau ou encore la distribution des glycoprotéines dans le cytoplasme (Sanabria-Solano *et al.* 2016; Dridi *et al.* 2018). Le produit de l'ORF37 a également été identifié comme nécessaire à la pathogénicité de l'EHV-1 chez la souris (Kasem *et al.* 2010). Par ailleurs, chez l'HSV-1, plusieurs sites d'initiation de la transcription ont été identifiés pour l'UL24. Il semble cependant que tous les codons ATG de l'ORF37 soient dans le même cadre de lecture, la conséquence de cette mutation silencieuse découverte par MLSTnt restant inconnue. Il est difficile de dater l'apparition de cette mutation qui n'a pas été retrouvée au niveau de l'isolat provenant d'un second cheval (cheval 10). Les deux variants identifiés chez un même cheval (cheval 13) pourraient en effet être le résultat d'une mutation survenue après infection du cheval 13, ou bien d'une co-infection après un contact physique avec d'autres chevaux porteurs de l'un ou l'autre des variants.

L'infection expérimentale sur quatre poneys Welsh de 10 mois avec la souche d'EHV-1 FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) a induit des signes cliniques caractéristiques d'une infection par l'EHV-1 chez tous les poneys à partir du Jour 1 post-infection. Aucun des chevaux n'a manifesté de signes neurologiques, mais cette forme de maladie reste difficile à reproduire lors d'expérimentations animales (Edington, Bridges and Patel 1986; Allen 2008; Goehring *et al.* 2010; Hussey *et al.* 2013). L'apparition rapide des signes cliniques, de l'excrétion nasale et de la virémie constituent néanmoins des résultats typiques de ceux décrits lors de précédentes infections expérimentales impliquant les souches d'EHV-1 V592 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) et Ab4 (G₂₂₅₄/D₇₅₂), à des doses infectieuses légèrement inférieures à celle des études précédentes (respectivement 10^{5.5} TCID₅₀ and 10^{6.6} TCID₅₀), ou similaires (respectivement 10^{7.5}, 10^{7.6} TCID₅₀ par exemple) (Edington, Bridges and Patel 1986; Kydd *et al.* 1994; Smith *et al.* 2000; Goehring *et al.* 2010).

Pour conclure, cette étude décrit l'isolement d'une nouvelle souche FR-56628 portant un troisième profil génétique en position 2 254 de l'ORF30 (C₂₂₅₄/H₇₅₂). Cette souche isolée en 2018 et ayant affecté un grand nombre d'animaux malgré une vaccination régulière, n'a plus été détectée depuis 2018. La pathogénicité de la souche a pu être confirmée lors d'une infection expérimentale, durant laquelle une installation rapide des signes cliniques a pu être observée suivie d'une excrétion virale et d'une virémie cellulaire. L'impact de cette mutation sur sa sensibilité au ganciclovir, à l'aciclovir et à l'aphidicoline est restreint. La caractérisation moléculaire, la modélisation 3D prédictive de l'ADN polymérase ainsi que la

culture *in vitro* n'ont pas permis de montrer un effet majeur de la mutation sur le comportement de la souche.

En plus d'apporter de nouvelles interrogations concernant le rôle du polymorphisme en position 2 254 de l'ORF30 sur la pathogénicité des souches d'EHV-1, cette étude met également en lumière le grand intérêt du suivi des souches sur le terrain afin d'adapter les différents outils d'analyse, notamment moléculaires. Cette importance, qui prend déjà tout son sens avec la détection d'un nouveau génotype (C₂₂₅₄/H₇₅₂) sur un point de mutation particulièrement suivi, sera également montrée au sein du troisième volet de cette Partie A, avec l'étude cette fois de l'EHV-1 aux côtés de deux autres alphaherpèsvirus des équidés génétiquement très proches, l'EHV-8 et l'EHV-9.

A. Etude phylogénique de l’EHV-1 en France et découverte fortuite de deux autres alphaherpèsvirus des équidés

c. *Article 3: Equid alphaherpesviruses 8 and 9: strain isolation in France, molecular characteristics and antiviral assay*

Introduction

La myéloencéphalopathie causée par l’alphaherpèsvirus des équidés 1 a été abordée au sein des deux dernières sous-parties (Chapitre 3 A.a et A.b) comme étant au centre de nombreux questionnements quant aux mécanismes impliqués dans le développement des signes cliniques liés à ce virus. Deux autres alphaherpèsvirus des équidés, l’EHV-8 et l’EHV-9, ont également été décrits causant des formes de maladie similaires à l’EHV-1. L’EHV-8, anciennement connu sous le nom d’AsHV-3 (Asinine alphaherpesvirus 3), a été isolé pour la première fois chez l’âne, considéré comme son hôte naturel (Browning, Ficorilli and Studdert 1988). Les signes cliniques décrits lors d’infections par cet herpèsvirus sont principalement d’ordre respiratoire, mais des signes cliniques liés à une atteinte neurologique ont également été rapportés (Maanen *et al.* 2017; Garvey *et al.* 2018). Des cas d’infections respiratoires mais aussi d’avortements ont été décrits chez le cheval (Liu *et al.* 2012; Garvey *et al.* 2018). L’EHV-9 fut d’abord identifié sous le nom de GaHV-1 (Gazelle alphaherpesvirus 1) après son premier isolement chez une gazelle de Thomson (Fukushi *et al.* 1997). Alors que le zèbre a, depuis, été désigné comme l’hôte naturel de l’EHV-9, ce virus surprend par sa grande capacité à franchir la barrière de l’espèce et infecter plusieurs autres mammifères, équidés ou non (Kasem *et al.* 2008; Schrenzel *et al.* 2008; Donovan *et al.* 2009; Fukushi, Yamaguchi and Yamada 2012; Rebelo *et al.* 2015; Abdelgawad *et al.* 2016; Moeller *et al.* 2018). Par ailleurs, une étude sérologique sur des espèces de la faune sauvage a permis de mettre en évidence une forte prévalence de l’EHV-9 au sein d’une population de rhinocéros africains, les plaçant, eux aussi, sur la liste de potentiels hôtes naturels (Abdelgawad *et al.* 2015). Quoi qu’il en soit, la forme respiratoire et la forme nerveuse de maladie sont principalement décrites, tant lors d’infections naturelles que lors de nombreuses infections expérimentales par l’EHV-9 chez différentes espèces de mammifères, dont le cheval (Narita *et al.* 2000; Taniguchi *et al.* 2000b, 2000a; Yanai *et al.* 2003a, 2003b; Kodama *et al.* 2007; El-Habashi *et al.* 2011; Abas *et al.* 2019; Saleh *et al.* 2020). La forme abortive a également été observée lors d’infections expérimentales par l’EHV-9 chez le rat ou le hamster doré (El-Habashi *et al.* 2014; Abas *et al.* 2020).

Ainsi, à notre connaissance, les seuls alphaherpèsvirus des équidés connus capables de causer des formes nerveuses, sont également capables de franchir la barrière de l'espèce. En effet, comme l'EHV-8 et l'EHV-9, l'EHV-1 a également été rapporté chez d'autres espèces que le cheval, et notamment chez l'âne, la mule, le zèbre, la gazelle, l'onagre, les bovins, l'antilope, les lamas, les alpagas et le cerf, impliquant très souvent des formes nerveuses, mais également des avortements et des formes respiratoires et oculaires (Kinyili and Thorsen 1979; Montali *et al.* 1985; Chowdhury, Kubin and Ludwig 1986; Chowdhury, Ludwig and Buhk 1988; Crandell, Ichimura and Kit 1988; Rebhun *et al.* 1988; Kennedy *et al.* 1996; Blunden *et al.* 1998; Ibrahim *et al.* 2007; Borchers *et al.* 2008; Wohlsein *et al.* 2011; Negussie *et al.* 2015). La récente appellation « zebra-borne equid alphaherpesvirus 1 » (2014) semble distinguer certaines de ces souches isolées chez des hôtes non-naturels de l'EHV-1 de celles d'EHV-1 classiquement rencontrées chez les chevaux domestiques. L'EHV-1 « zebra-borne » présenterait une homologie génétique de 98% avec l'EHV-1 « classique » (Abdelgawad *et al.* 2014; Guo *et al.* 2014; Sakaguchi *et al.* 2017). Bien que les herpèsvirus, et en particuliers les *Herpesviridae*, sont décrits comme très spécifiques de leur hôte avec lequel ils co-évoluent, certains dérogent à la règle comme il l'est suspecté par exemple pour le CeHV-1 (Macacine alphaherpesvirus 1), l'HSV-1 (HHV-1), les BoHV-1 et 2 (Bovine alphaherpesvirus 1 et 2), le CpHV-1 (Caprine alphaherpesvirus 1), le PrV (SuHV-1, Suid alphaherpesvirus 1) chez les *Alphaherpesvirinae*, et le virus Epstein-Barr (HHV-4), l'AHV-1 (Alcelaphine gammaherpesvirus 1) ou l'OHV-2 (Ovine gammaherpesvirus 2) chez les *Gammaherpesvirinae*. La revue de Azab *et al.* (2018) souligne que l'évolution des outils moléculaires et sérologiques permet de mieux mettre en évidence des franchissements de barrière d'espèce des herpèsvirus, notamment dans des populations animales sauvages, plus enclines à être en contact les unes avec les autres que les populations domestiques (pour revue, Azab *et al.* 2018).

A ce jour, davantage d'investigations ont été menées sur le génome et les mécanismes d'infection de l'EHV-1 que sur ceux de l'EHV-8 et de l'EHV-9. Les moyens de lutte contre l'EHV-1 reposent sur la vaccination, qui permet de réduire l'intensité des signes cliniques et les risques d'avortements (Heldens *et al.* 2001; pour revue, Kydd, Townsend and Hannant 2006; Paillot *et al.* 2006; Goodman *et al.* 2012), le diagnostic rapide et la mise en place de mesures sanitaires (Lunn *et al.* 2009; pour revue, Pusterla *et al.* 2009). Aucun traitement antiviral n'est commercialisé à ce jour, mais plusieurs molécules ciblant majoritairement l'ADN polymérase, sont à l'étude (Garre *et al.* 2007; Maxwell *et al.* 2008, 2017; Thieulent *et*

al. 2019, 2020b, 2020a). Pour l'EHV-8 et l'EHV-9, les moyens de lutte sont plus restreints. Il existe peu d'outils de diagnostic décrits permettant leur identification rapide, il n'existe pas de vaccin contre ces virus, et aucune molécule n'est, à notre connaissance, à l'étude contre l'EHV-8 et l'EHV-9. Pourtant, compte tenu des signes cliniques qu'ils peuvent causer, et du spectre d'hôte qu'ils peuvent infecter, l'amélioration des moyens de lutte contre ces virus semble nécessaire, tant pour la protection d'espèces parfois menacées (comme par exemple l'ours polaire) que pour celle de l'espèce équine. En raison de leur proximité génétique, une approche comparée de l'EHV-8 et de l'EHV-9 avec l'EHV-1 sur des aspects déjà étudiés chez l'EHV-1, pourrait permettre d'en apprendre davantage sur ces virus.

D'un point de vue génétique, des premières comparaisons de génomes entre les trois alphaherpèsvirus des équidés 1, 8 et 9 ont permis de mettre en évidence leur forte proximité génétique sans que leur histoire évolutive n'ait pu être élucidée (Abdelgawad *et al.* 2016; Garvey *et al.* 2018). Cette forte proximité, rend parfois difficile l'identification des souches avec les outils moléculaires classiques (la PCR, par exemple), comme le montre une étude menée par Garvey *et al.* (2018) où des souches d'EHV-8 ont initialement été identifiées comme étant des souches d'EHV-1 (Garvey *et al.* 2018).

Nous décrivons donc au travers d'une nouvelle étude, la caractérisation d'une souche d'EHV-8 isolée chez un âne mais également celle d'une souche d'EHV-9 isolée dans un zoo chez un zèbre de Grévy, en comparaison avec la souche d'EHV-1 (C₂₂₅₄) décrite en Partie A.b de ce Chapitre 3. Le contexte clinique de l'épisode infectieux causé par cette souche d'EHV-9 a fait l'objet d'un premier article rédigé par Leclerc *et al.* et actuellement en révision (Annexe 1). Cet épisode infectieux a impliqué sept zèbres de Grévy et induit des signes neurologiques chez trois d'entre eux. Un premier zèbre mâle est mort 48h après l'apparition des premiers signes cliniques. Un traitement au valaciclovir a été administré aux deux autres zèbres gravement atteints (femelle adulte et son zébreau de deux mois, femelle également). Si l'état de la femelle adulte s'est amélioré après 48h de traitement, la jeune femelle est à son tour morte 48h après l'administration du traitement. Des premières investigations moléculaires menées par notre laboratoire ont permis de suspecter la présence d'une souche d'EHV-9 dans un prélèvement issu du premier zèbre mort.

Article en préparation

Sutton G, Normand C, Thieulent C, Fortier C, Hue E, Leclerc A, Mulot B, Goddard N, Nicolau A, Legrand L, Paillot R, Pronost S. **Equid alphaherpesviruses 8 and 9: strain isolation in France, molecular characteristics and antiviral assay** (in preparation).

Equid alphaherpesviruses 8 and 9: strain isolation in France, molecular characteristics and antiviral assay

Gabrielle Sutton^{1,2}, Camille Normand^{1,2}, Côme Thieulent^{1,2}, Christine Fortier^{1,2,3}, Erika Hue^{1,2,3}, Antoine Leclerc⁴, Baptiste Mulot⁴, Nicolas Goddard⁴, Amélie Nicolau⁴, Loïc Legrand^{1,2}, Romain Paillot^{1,2,5}#, Stéphane Pronost^{1,2,3}#.

¹ LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France

² NORMANDIE UNIV, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France

³ Normandie Univ, UNICAEN, ImpedanCELL, 14280 Saint-Contest, France.

⁴ ZooParc de Beauval & Beauval Nature, 41110 Saint-Aignan, France

⁵ School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle, Chelmsford CM1 3RR, United Kingdom

The authors have contributed equally to the work

Abstract: Equid alphaherpesvirus 1 (EHV-1) is endemic in the world horse population. It has also been described in non-natural hosts, mostly wild animals. It primarily causes a respiratory disease, abortion or equine herpes myeloencephalopathy (EHM). Alongside EHV-1, two other equid alphaherpesviruses, EHV-8 and EHV-9 show strong genetic homology, and were also reported to have crossed the species barrier. There is less information available on EHV-8 and EHV-9 than on EHV-1, and consequently less prevention and management tools. In this study, an EHV-8 strain and an EHV-9 strain were compared to an EHV-1 strain, in order to highlight divergences and similarities. The EHV-8 strain was isolated from a donkey sample initially identified as an EHV-1 strain using an EHV-1 PCR assay. 199 EHV samples initially identified as EHV-1 were subsequently screened in order to determine the circulation of EHV-8 in the French horse population between 2002 and 2019. The screening resulted in the identification of four EHV-8 strains. A new pair of primers was designed to improve EHV-8 discrimination from EHV-1. In addition, an EHV-9 strain was isolated from a Grevy's zebra tissue sample taken post-mortem. The ORF30 of both the EHV-8 and the EHV-9 strains isolated in this study were sequenced and compared to the sequence of a recently isolated EHV-1 strain carrying the C₂₂₅₄ (H₇₅₂) genotype. A phylogenetic analysis was carried out and suggested possible recombination events among the equid alphaherpesviruses. All the EHV-8 and EHV-9 strains investigated in this study carried the ORF30 G₂₂₅₄ genotype. Finally, seven antiviral compounds (ganciclovir (GCV), valganciclovir (VGCV), decitabine (DTB), idoxuridine (IDX), pritelivir (BAY), aciclovir (ACV) and aphidicolin (APD)) were tested against three strains: the recently isolated EHV-1 strain (C₂₂₅₄/H₇₅₂), and the newly isolated EHV-8 and EHV-9 strains. Aciclovir was the least effective compound against those three strains. Aphidicolin, ganciclovir and valganciclovir showed a good antiviral effect against the EHV-1 and EHV-8 strains.

1. Introduction

There are nine equid herpesviruses (EHV) classified among the *Herpesviridae* family. Equid herpesviruses 1, 4, 3, 6, 8 and 9 are part of the *Alphaherpesvirinae* subfamily and the *Varicellovirus* genus, while the equid herpesviruses 2, 5 and 7 are part of the *Gammaherpesvirinae* subfamily and the *Rhadinovirus* genus (EHV-2 and EHV-5). EHV-1 is of great interest to equine veterinarians and the scientific community due to its impact on equine health and the horse industry. In horses, EHV-1 can cause a respiratory disease, abortion, stillborn death or a neurological disorder also described as equine herpesvirus myeloencephalopathy (EHM) (going from mild ataxia to complete paralysis). This equid herpesvirus infects mostly horses, but some cases have been reported in wild equids such as domestic donkeys, zebras, onagers but also in non-equids such as antelopes and cattle, gazelles, deers, alpacas and llamas, black bears and guinea pigs [1–12]. In 2006, a non-synonymous mutation in position 2254 of the ORF30 (A₂₂₅₄/N₇₅₂ -G₂₂₅₄/D₇₅₂) was associated with the neuropathogenicity of strains [13]. Conflicting results concerning this genotype/pathotype association [14–17] and the recent report of a third genotype (C₂₂₅₄/H₇₅₂) from horses showing neurological clinical signs [18,19] support the hypothesis that other unknown factors were involved in neuropathogenicity.

Two other equid alphaherpesviruses, EHV-8 and EHV-9, have been described to be genetically close to the EHV-1. EHV-9 was initially identified as Gazelle herpesvirus 1 (GaHV-1) when it was first isolated from a Thomson's Gazelle, in 1997 in Japan [20]. It was later renamed as EHV-9 due to its strong homology with EHV-8 and EHV-1 and also due to a cross-reactivity of EHV-9 neutralising antibodies with EHV-1 [20,21]. It was first suggested that equids and more precisely zebras were EHV-9 natural hosts due to its genetic proximity with other EHV-1 and EHV-9 and its small clinical impact on equids in contrast with a high neurotropism in non-equids [22]. In addition, while zebra were supposed to be potential EHV-9 natural hosts, a serological survey carried out on 428 sera from captive and wild animals revealed a high prevalence of EHV-9 in African rhinoceros, suggesting that this specie also represents a natural reservoir for the virus [23]. However, most reports of natural infections with EHV-9 concern both equid and non-equid species including zebras, as mentioned previously but also onagers, giraffes and even polar bears [22,24–29]. Although there have been no cases of EHV-9 isolated from horses, the experimental infection of two 8 months old horses with an EHV-9 strain isolated from a Thomson's Gazelle induced pyrexia, nasal shedding, viremia, and development of EHV-9 neutralising antibodies, showing the pathogenicity of this virus in horses [30].

EHV-8 is another equid alphaherpesvirus with a genome genetically close to EHV-1 and EHV-9. Also known under the name of Asinine herpesvirus 3 (AsHV3), it was first isolated in 1987 from a donkey causing afebrile rhinitis [31]. Although EHV-8 mainly infects donkeys, it has also crossed the species barrier and has been reported to infect horses. Respiratory signs of disease are mostly reported after EHV-8 infection, although a neurological case has been described in a donkey and abortion cases have been reported in two horses [31–34]. Phylogenetic studies based on the EHV-8 glycoprotein G coding sequence and complete genome sequencing highlighted the presence of conserved regions among alphaherpesviruses but also a strong genetic homology with EHV-1 and EHV-9 both infecting an even wider range of species and inducing neurological clinical signs [31–33]. As explained by Garvey *et al.* in 2018, EHV-8 strong genome homology with EHV-1 makes it difficult to differentiate the two viruses with the usual diagnostic assays. It is therefore not well known whether EHV-8 infects horses sporadically or circulates commonly among the horse population [33].

EHV-1 outbreak management relies on rapid diagnostic and implementation of sanitary measures on the affected premises as soon as possible [14,35]. Prevention of these outbreaks relies on vaccination with either the whole inactivated virus vaccines or the modified live vaccines that are currently commercialised against the EHV-1 and that have been shown to reduce the clinical signs and the abortion rates [36–39]. There is currently no antiviral treatment commercialised for this virus but antiviral molecules mostly targeting DNA polymerase, have been tested *in vitro* and *in vivo* [40–45].

There is little information regarding the diagnostic tools available for EHV-8 and EHV-9 detection. The recent description of EHV-8 misidentified as EHV-1 using an EHV-1 PCR tool on samples taken from horse aborted fetuses highlighted the need in developing more specific tools

[33]. There are also no current commercialised vaccine against EHV-8 and EHV-9, and to our knowledge, there is no information available on the efficacy of antiviral molecules against these two alphaherpesviruses. Regarding the clinical signs they can cause and the host range they can infect, including wild and potentially endangered species in the case of the EHV-9, improvement of the prevention and management tools against these viruses is necessary.

Due to the genetic homology between the three alphaherpesviruses, and considering that there is more information available on the EHV-1 than on the other two viruses, comparison of the three alphaherpesviruses was carried out in this study, in order to highlight divergences and similarities. An EHV-8 strain, first identified as EHV-1 and isolated from a donkey, and an EHV-9 strain isolated from a Grevys' zebra were compared to a recently isolated EHV-1 strain (FR-56628, C₂₂₅₄/H₇₅₂) on different aspects. First, *in vitro* culture of the three strains was compared on a morphological basis. Second, a phylogenetic analysis was carried out on ORF30 sequences encoding the DNA polymerase. This analysis highlighted the misidentification of the EHV-8 strain as EHV-1 and motivated the screening of 199 EHV strains isolated from horses and donkeys and initially identified as EHV-1. This allowed to determine EHV-8 circulation in the French horse and donkey population between 2002 and 2019. Third, seven antiviral molecules, previously identified for their efficacy against EHV-1 strains [44,45], were tested against the three strains and responses were compared.

2. Material and method

2.1. Sample collection

Field samples were collected between 2002 and 2019 by French veterinarians for a diagnostic purpose and archived for further analysis. These samples were respiratory fluids (nasal or nasopharyngeal swabs (n=14), pleural fluids (n=1)), organs from abortion or post-mortem examination (spleen (n=1), placenta (n=1), unidentified organs (n=1), livers and lungs (n=182)) and DNA extract (n=1). Nasal swabs were processed in 4 mL Eagle Minimal Essential medium complemented with 1% antibiotics (Peni-Strepto-Amphotericin, Eurobio, Courtaboeuf, France) or phosphate-buffered saline (PBS) prior to storage at -80°C.

2.2. Cell culture

Immortalised rabbit kidney cells (RK13) were used for virus isolation and maintained using Minimum Essential Medium (MEM) with Earle's salts (Eurobio) complemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Eurobio), 1% L-glutamine (Eurobio) and 1% antibiotics (Peni-Strepto-Amphotericin). Immortalised equine embryonic kidney cells (EEK) were used for the antiviral assay as previously described [44,45]. Briefly, cells were maintained using MEM Alpha (Biowest, Nuaille, France) complemented with 10% FBS, 2% Lactalbumine 50X (Sigma-Aldrich, MO, USA), 1% L-glutamine, 1% Antibiotics and 0.2 % D-glucose 45% (Sigma-Aldrich). Both cell lines were kept in 37°C incubators with 5% CO₂.

2.3. Virus isolation and titration

Equid herpesviruses were isolated from a nasal swab taken from a donkey and from lung tissues taken from a Grevy's zebra post-mortem (Leclerc *et al.* in revision). Nasal swab was processed as described in section 2.1 and 2mL were filtered using 0.45 µM Syringe Filters with Acrylic Housing (VWR, PA, US) and inoculated on semi confluent RK13 cells. After 1h30 adsorption, the culture medium was removed and replaced with new complemented MEM. The EHV-8 strain isolated from this sample was identified in this study as FR-53803. Concerning the lung tissue sample taken from a Grevy's zebra post-mortem, it was grinded manually in a small quantity of MEM complemented with 1% antibiotics. After centrifugation (10 minutes – 300 g), the mixture was filtered using 0.45µM Syringe Filters with Acrylic Housing and inoculated on semi confluent RK13 cells as described above. After 1h30 adsorption, medium replacement steps were also performed as previously described. After cytopathic effect (CPE) detection, two subsequent passages were performed for virus amplification.

The EHV-9 viral strain isolated from this sample was identified in this study as FR-1232. For virus titration, the titer was measured on EEK cells using the Karber method [46]. Briefly, the virus culture suspension was diluted from 10^{-1} to 10^{-9} and inoculated on EEK cells, CPEs were measured after 7 days incubation and titer was calculated. The EHV-1 strains FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) was cultured *in vitro* as described previously [19].

2.4. Real Time Cell Analysis using xCELLigence for antiviral assays

In order to evaluate the effect of seven antiviral compounds listed in Table 1, the impedance of infected EEK cells with the newly isolated strains (FR-53803 (EHV-8) and FR-1232 (EHV-9)) and the EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂), was monitored using xCELLigence Real Time Cell Analysis (RTCA) technology (ACEA, Bioscience, Inc., Agilent, CA, USA) in presence of different concentrations of the antiviral compounds, as previously described [44,45]. Cell cultures were also monitored using IncuCyte® technology (Essen Bioscience, Sartorius, MI, USA) in order to follow the development of CPE for each condition tested. The method was as follows: a background reading was obtained with complemented EMEM in each wells of the E-plate view PET (for RTCA, ACEA Biosciences, Agilent). EMEM was also put in Incucyte plates (Falcon® 96-well Clear Flat Bottom TC-treated Culture Microplate, Corning, NY, USA) without any background reading. For both plates, condensation was limited with PBS between wells. Cells were seeded at a concentration of 1.2×10^4 cells/well and incubated into the RTCA-MP station and IncuCyte after 30 minutes incubation at room temperature. Cell index readings were performed every five minutes for the first 10 hours and every 10 minutes after 10 hours. After 24 hours incubation, medium was removed and replaced. Cells were treated with 2 fold dilution of antiviral compounds and infected with the newly isolated strains (multiplicity of infection (MOI) = 0.05 for the strains FR-1232 and FR-56628, and 0.03 for the strain FR-53803. Antiviral molecules were previously diluted at 20mM in dimethyl sulfoxide (DMSO), negative controls were mock infected cells and mock infected cells with 0.5 % DMSO. Positive controls were infected cells with or without 0.5 % DMSO. The quality of the RTCA experiment was evaluated by calculating the Z'factor at 96 hours post infection (hpi) as described by Thieulent *et al.* 2019 and half maximal effective concentration (EC₅₀) was calculated [43]. Experiments were repeated in triplicates against the EHV strains FR-53803 (EHV-8) and FR-56628 (EHV-1 C₂₂₅₄/H₇₅₂) and in quadruplicates against the EHV-9 strain FR-1232.

Table 1 Antiviral molecules tested against the newly isolated EHV-8 and EHV-9 strains, FR-53803 and FR-1232, respectively, and the EHV-1 strain FR-56628.

Antiviral molecule name	Abbreviation	Empirical formula	DNA polymerase inhibitor	Initial concentration	Final concentration	Dilution fold
Ganciclovir	GCV	C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄	Nucleoside analogue	50 µM	0.10 µM	2
Valganciclovir	VGCV	C ₁₄ H ₂₂ N ₆ O ₅	Nucleoside analogue	50 µM	0.10 µM	2
Decitabine	DTB	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₄	Nucleoside analogue	50 µM	0.10 µM	2
Idoxuridine	IDX	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₅	Nucleoside analogue	50 µM	0.39 µM	2
Pritelivir	BAY	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃ S ₂	Helicase-primase complex inhibitor	50 µM	0.39 µM	2
Aciclovir	ACV	C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃	Nucleoside analogue	100µM	0.78 µM	2
Aphidicolin	ADP	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	Nucleoside-binding site homology	2.5µM	0.02 µM	2

2.5. Nucleic acid extraction

Virus nucleic acids were extracted from 140µL of biological fluid or 14 µL of culture supernatant using QIAamp® Viral RNA extraction kits (Qiagen, Germany) and from 30 mg of organ using QIAamp® DNA extraction kits (Qiagen, Germany). Nucleic acids were eluted in 50 µL to 80 µL of buffer for biological fluids, in 50µL for culture supernatants and 200 µL for organs.

2.6. PCR Assays

Three different Polymerase Chain Reaction (PCR) assays were performed during this study depending on the purpose of the investigation.

Consensus PCR (PCR1.1 and PCR1.2): Van Devanter (1996) nested PCR assay was used for the detection of mammalian herpesviruses with the final amplification of a 134 bp region on DNA polymerase gene (ORF30) [47]. Sequencing was required for the identification of the herpesvirus detected. All details are summarised in Supplementary Table S1.

EHV-1 detection PCR (PCR2): Diallo *et al.* (2006) PCR assay targeting a 63 bp fragment of EHV-1 glycoprotein B gene was performed [48,49]. TaqMan Universal Master Mix was used for this PCR and all details are summarised in Supplementary Table S1.

A/G₂₂₅₄ typing PCR (PCR 3): Allen *et al.* (2007) real time PCR assay was performed for the ORF30 A/G₂₂₅₄ typing [50]. TaqMan Universal Master Mix (ThermoFisher Scientific) was also used for this PCR and all details are summarised in Supplementary Table S1.

For conventional PCR assays, amplified fragments were detected by agarose electrophoresis (1% agarose), stained with 0,7mg/mL ethidium bromide (Eurobio) and revealed with 312 nm UV radiations using the E-Box CX5 imaging system (Vilber Lourmat; VWR, France). The size of the fragments was evaluated using a 100bp molecular-weight size (SimplyLoad™ DNA ladders (100bp), Lonza, Bâle, Switzerland).

2.7. Sequencing

Sanger sequencing was performed for both PCR1 amplicons and complete ORF30 sequencing. PCR1 amplicons were sequenced using PCR1.2 primer TGV 5'-TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNCGNGT-3' and Big Dye Terminator Sequencing Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), following manufacturer's recommendations. Sequenced amplicons were purified using ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit (Zymo Research, CA, USA) and sequence electrophoresis was performed on 3500 Series Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific). ORF30 was sequenced using Abdelgawad *et al.* (2016) and Sutton *et al.* (2019) primers [24,48]. PCR1 fragments and ORF30 sequence were then analysed in Basic Local Analysis Sequence Tool (BLAST) [51]. Sequences were also compared in BioEdit version 7.0.5.3 (Tom Hall, Carlsbad, CA, US) [52] to EHV reference sequences (EHV-1 Ab4, EHV-1 V592, EHV-8 Wh). A reticulated Network was built using the NeighborNet algorithm in Splitstree4, integrating the ORF30 sequences of the newly isolated strains but also different alphaherpesvirus strains referenced on GenBank [53]. All the accession numbers of the referenced strains used in this study are indicated in Supplementary Table S2.

2.8. Primer design and new PCR assay for the discrimination of EHV-8

A new PCR (PCR4) assay was designed to discriminate EHV-8 strains from EHV-1. Primer design was performed using Primer3 Input online software [54]. Newly designed primers were tested using Phusion Hot Start II DNA polymerase as described in Supplementary Figure S1.

2.9. Statistical analysis

For the antiviral assay results, statistical analysis was performed on StatGraphics® Centurion XVI Version 16.1.12 for windows (StatPoint Technologies, Inc, Warrenton, VA, USA) [55]. EC₅₀ were

compared using a Tukey's multiple comparison test. Data were considered significant for P value <0.05.

3. Results

3.1. Virus isolation and identification

In December 2016, post-mortem samples were collected from a Grevy's Zebra that died after displaying respiratory and neurological signs of disease (Leclerc *et al.*, in revision). The nested PCR1.1 and 1.2 were performed on DNA extracted from lung tissues. Amplicons were sequenced and a 181 bp sequence from the final amplicon showed 99.45 % homology with eight EHV-9 strains (KX101096, KX101095, KX101094, KX101093, KX101092, AP010838, AB439722, EU717146) and five EHV-1 strains (KX101098, KC924787, KF644580, KF644575, JQ692312). All EHV-1 strains showing homology with the 181 bp sequence had been isolated from wild species (*Equus quagga burchelli*, *Equus hemionus onager*, *Gazella thomsoni*, *Ursus maritimus*) with the exception of the EHV-1 strain KC924787 isolated from a horse. Virus isolation was performed from the same lung sample after adsorption on RK13 cells monolayer. The first CPE was observed after four days of culture (Figure 1A).

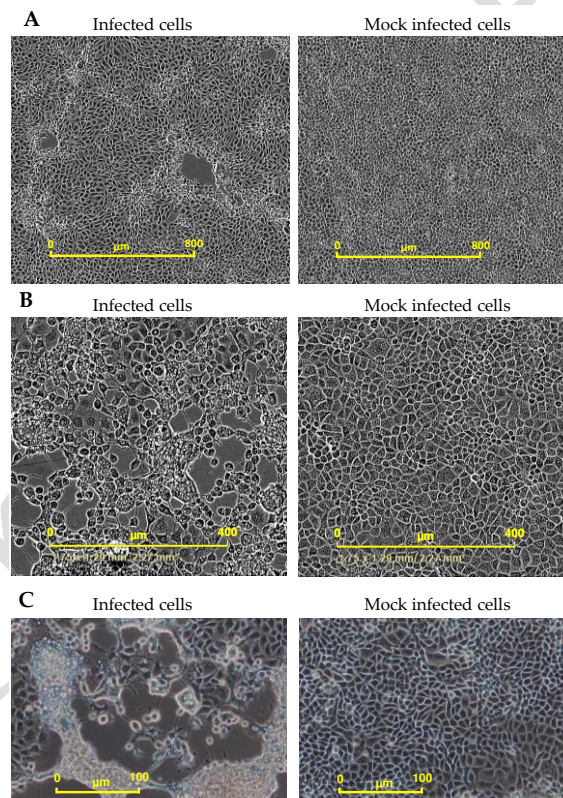


Figure 1 (A) Cytopathic effect (CPE) on RK13 observed 6 days after co-culture with a filtered mixture of lung tissue taken from a Grevy's Zebra (left) in comparison with mock infected cells (right). Microscope lens: x4. Scale bar: 800 μ m. (B) CPE observed on RK13 three days after co-culture with a nasal swab extract taken from a donkey (left) in comparison with mock infected cells (right). Microscope lens: x10. Scale bar: 400 μ m. (C) CPE on RK13 cells monolayer 120 hpi with the EHV-1 strain FR-56628 (left) in comparison with mock infected cells (right). Microscope lens: x20. Scale bar: 100 μ m.

Independently, a nasal swab taken from a donkey in 2018 tested positive for EHV-1 using PCR2. It was then identified as EHV-8, as revealed by ORF30 sequencing in section 3.2. No clinical information was available concerning this sample. In order to isolate the virus, the sample was adsorbed on RK13 cells monolayer. After 48 hours of culture, a CPE could be observed and kept developing as illustrated in Figure 1B.

Both the CPE of the EHV-1 strains described above were compared to CPE observed on RK13 cells monolayer 120 hpi with the EHV-1 strain FR-56628 (Figure 1C). The three different strains showed typical EHV CPE (e.g syncytium formation).

3.2. ORF30 sequencing

Following the isolation of the two strains, ORF30 was sequenced from the culture supernatant of both the zebra and the donkey EHV-1 strains.

Only partial sequence was obtained from the sample isolated from the Grevy's zebra (2183/3663bp) but complete ORF30 could be sequenced from its culture supernatant (3663bp). Both sequences were identical on the 2183 bp portion they had in common. BLAST analysis of this complete sequence showed from 99.43 to 99.95 % homology with five EHV-9 strains referenced in GenBank (KX101092, KX101094, AP010838, KX101093, KX101096), from 99.22 to 95.33 % homology with four EHV-8 strains (MF431612, MF431614, MF431611, JQ343919), from 94.70 to 99.89 % homology with numerous EHV-1 strains also referenced in GenBank, and 94.73 % homology with the EHV-1 strain FR-56628. The only EHV-1 strain showing 99.89 % homology in this analysis was isolated from a zebra (KC924786). Based on these results, it is very likely that the strain isolated from a Grevy's zebra lung in this study is an EHV-9 strain. This strain was identified as FR-1232 (see complete alignment in supplementary Figure S3).

Concerning the sample isolated from a donkey, BLAST analysis of the sequence showed from 99.51 to 99.86 % homology with six EHV-8 strains referenced on GenBank (MF431612, MF431611, MF431613, MF431614, JQ343919, KF434388), from 94.75 to 95.25 % homology with five EHV-9 strains (KX101092, KX101094, AP010838, KX101093, KX101096), from 92.96 to 95.20 % homology with numerous EHV-1 strains, and 92.92 % homology with the EHV-1 strain FR-56628. The only EHV-1 strain showing 95.20 % homology in this analysis was also the strain KC924786 isolated from a zebra. Based on these results, it is very likely that the strain isolated from a donkey nasal swab in this study is an EHV-8 strain. This strain was identified as FR-53803 (see complete alignment in supplementary Figures S3 and S4). After examination of the ORF30 sequencing primers originally designed for EHV-1 sequencing and used for this strain, 5 out of 9 primers showed from 1 to 3 mismatches with the strain sequence (data not shown).

These sequencing results also showed that both the strain FR-53803 (EHV-8) and the strain FR-1232 (EHV-9) carried a guanine in position 2254 of the ORF30 (G₂₂₅₄). Mutations between the two strains, and the EHV-1 strains Ab4 (G₂₂₅₄/D₇₅₂), V592 (A₂₂₅₄/N₇₅₂) and FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂), are shown in the supplementary Figures S3 and S4, nucleotide and amino acid sequences, respectively).

A reticulated NeighborNet splits graph was built using ORF30 sequence of 18 EHV-1, 7 EHV-8 and 6 EHV-9 strains including the two newly isolated strains (EHV-9 strain FR-1232 and EHV-8 strain FR-53803), and the recently isolated EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂), in order to visualise the proximity of the strains included in the analysis (see Figure 2). In addition, an EHV-4 reference strain was added to root the network, and, as some recombination events EHV-1 and EHV-4 strains have been reported, an EHV-3 strain was also used to root the network.

Least square analysis showed a fit of the data with the predicted NeighborNet algorithm of 99.67 %. In addition, the presence of boxes suggests some conflicts in the data. This indicates that the different genetic data do not follow a linear tree-like evolution, and could imply some horizontal genetic processes such as recombination. The genetic proximity of the EHV-1, EHV-8 and EHV-9 strains when compared to the two EHV-4 and EHV-3 strains is also visible in this network. Two EHV-1 strains (T-616 and T-529 10/84) isolated from a Grevy's Zebra and a Persian onager, respectively, clustered separately from the other EHV-1 strains. Another EHV-1 strain (Ca-Lung, KC924786) isolated from a zebra was classified among the EHV-9 strains.

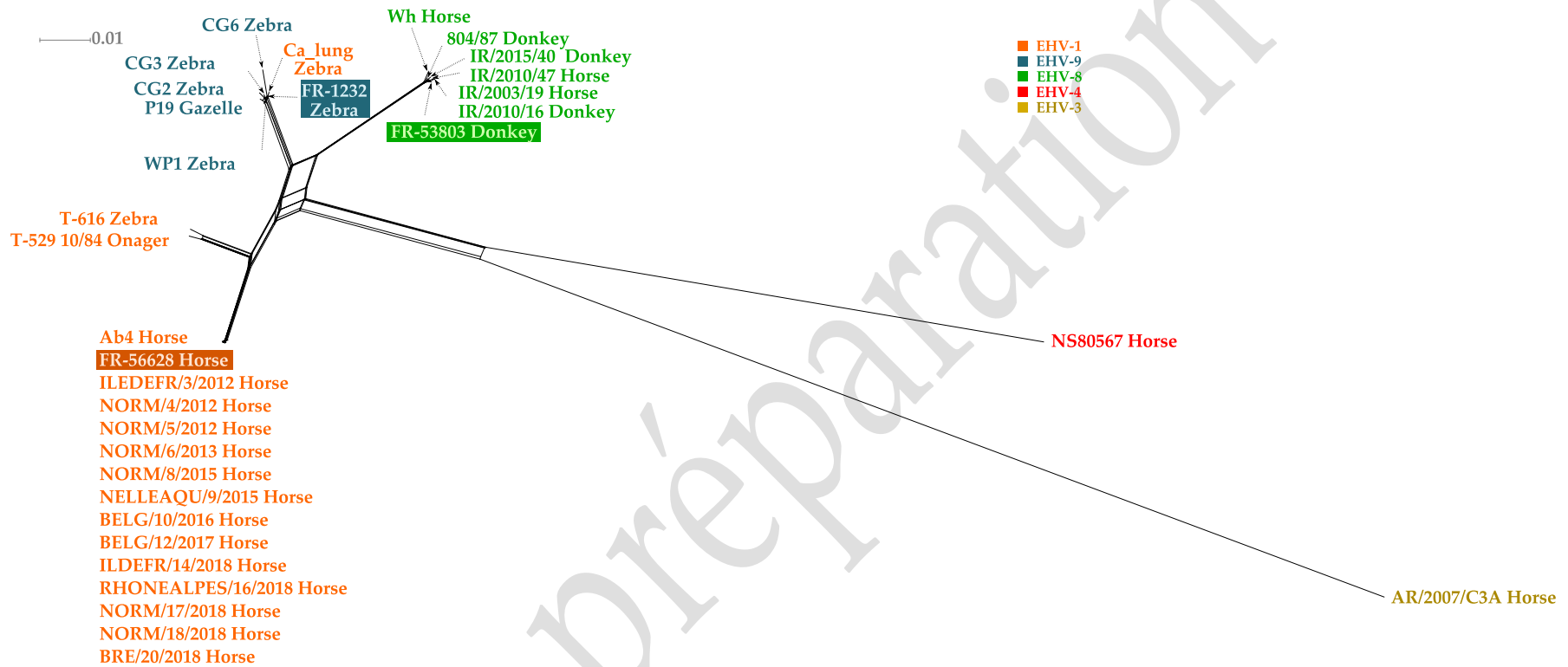


Figure 2 Reticulated phylogenetic network obtained using Splitstree4 NeighborNet algorithm. A 99.67 % fit was obtained with the least square analysis. EHV-1, EHV-9, EHV-8, EHV-4 and EHV-3 strains are indicated in orange, blue, green, red and yellow, respectively.

3.3. EHV-8 identification

As described in section 3.1, the EHV-8 strain FR-53803 was first labelled as an EHV-1 strain using PCR2. As a consequence, 199 samples collected from 2002 to 2019 and tested positive for EHV-1 using PCR2 were amplified using the nested PCR1 (PCR1.1 and PCR1.2). Amplicons were then sequenced in order to screen eventual misidentifications (see supplementary Table S5 and Figure S6). Although PCR1 amplicon size can range from 215 to 315 bp [47], samples were sequenced only using TGV primer and 134 bp sequences were obtained. Among the 199 samples, 19 could either not be sequenced (poor sample quality and possible cross contamination) or were identified as EHV-2 (1 sample, taken from a donkey). Incomplete sequences were obtained from four samples (81 to 132 bp). 176/180 sequences (including the four incomplete sequences) showed 100% homology with the EHV-1 reference strains Ab4 (AY665713) and V592 (AY464052). Among those 176 samples, only one had been taken from a donkey. Four out of 180 of these 134 bp sequences, all from samples taken from donkeys (Samples 24, 135, 140 and 165, see supplementary Figure S6) showed 97.01 % to 99.25 % homology with the EHV-8 strain Wh. These sequences only showed 91.79 % to 94.03 % homology with EHV-1 reference strains Ab4 and V592. Although these homology rates were obtained on a 134 bp sequence, we could suggest that these four strains were more likely to be EHV-8 strains than EHV-1 strains. The four strains were typed for the ORF30 genotype in position 2254 using PCR3. The nucleotide G₂₂₅₄ was identified for all of them despite possible mismatches with the forward primer, as shown in supplementary figure S7, with the alignment of two EHV-1 reference strains (Ab4 and V592) and five EHV-8 reference strains (Wh, EHV-8/IR/2015/40, EHV-8/IR/2010/16, EHV-8/IR/2010/47, EHV-8/IR/2003/19) with PCR3 primer and probes. After including the 134 bp ORF30 sequence of the strain FR-53803, the homology between the five EHV-8 strains was found to range from 91.79 % to 100 %. No EHV-9 strain was identified in this screening.

3.4. PCR design for the discrimination of EHV-8 strain from EHV-1 strains

Sequence alignment of the PCR2 primers and probe with the glycoprotein B gene of the EHV-1 reference strains Ab4 (AY665713) and V592 (AY464052), the EHV-9 reference strain P19 (NC_011644) and five EHV-8 referenced strains (JQ343919, MF431614, MF431613, MF431612, MF431611) showed that all EHV-1 and EHV-8 sequences were identical, when compared to the primers sequences (see Figure 3). This explains why PCR2, originally used for EHV-1 identification, did not discriminate EHV-8 and EHV-1. The EHV-9 reference strain also included in the analysis showed one mismatch with PCR2 forward primer and two mismatches with the probe.

As a consequence, a new PCR assay was designed to discriminate EHV-8 strains from EHV-1 strains. Seventeen ORFs (ORF2, 3, 6, 10, 16, 33, 39, 52, 62, 63, 65, 67, 70, 72, 73, 74 and 76) were investigated and led to the design of the following couple of primers on ORF62: ORF62-For 5'-CCCATTCCGCCGTCATTCAAGG-3' and ORF62-Rev 5'-GAGGACCCAAAGTCTCGTCAA-3'. Both forward and reverse primers presented 6 mutations with the EHV-1 strains Ab4, V592 and 66 other EHV-1 strains isolated in UK [56], but no mutations with any of the referenced EHV-8 strains (Wh, EHV-8/IR/2015/40, EHV-8/IR/2010/16, EHV-8/IR/2010/47, EHV-8/IR/2003/19) (data not shown). Specificity tests were performed using three EHV-8 strains (including the newly isolated strain FR-53803, sample 24 and sample 135) and eleven EHV-1 strains. The expected size of the fragment was 139 bp. A fragment was observed on the migration gel between 100 and 200 bp for the three EHV-8 strains tested but not for the EHV-1 strains, suggesting that the primers amplified properly the 139 bp EHV-8 fragments (Figure 3).

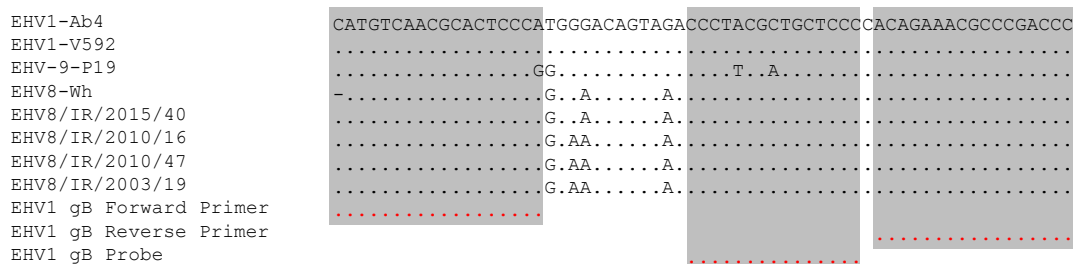
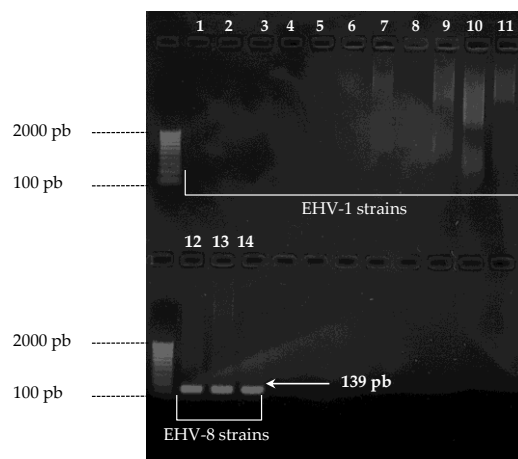
A

B


Figure 3 (A) Nucleotide sequence alignment of two EHV-1 reference strains (Ab4 and V592) and five EHV-8 strains (Wh, EHV-8/IR/2015/40, EHV-8/IR/2010/16, EHV-8/IR/2010/47, EHV-8/IR/2003/19) with Diallo *et al.* 2006 primers and probe targeting gB. Primers and probe sequences are noted in red and corresponding alignments are highlighted in grey. **(B)** Nucleic acid electrophoresis gel revealing the amplified fragments obtained using the newly designed primers ORF62-For and Rev. Amplicons from EHV-1 strains were migrated in wells 1 to 11 and amplicons from EHV-8 strains were migrated in wells 12 to 14. The expected size of amplicons was 139 bp. The 100 bp molecular weight markers are indicated at the beginning of each migration line.

3.5. Antiviral assays

Seven antiviral compounds (ganciclovir (GCV), valganciclovir (VGCV), decitabine (DTB), idoxuridine (IDX), pritelivir (BAY), aciclovir (ACV) and aphidicolin (APD)), were tested against the two newly isolated EHV strains FR-53803 (EHV-8) and FR-1232 (EHV-9) when cultured on EEK cell line, but also against an the recently isolated EHV-1 strain FR-56628 carrying the mutation C₂₂₅₄ (H₇₅₂). EC₅₀ means and standard deviation (S.D.) shown in Table 2 highlight the differences of efficacy of the different compounds against the different strains, but also the low reproducibility of the effects observed from one replicate to another concerning the EHV-9 strain (high S.D.s). Most of the compounds showed a reproducible effect against the EHV-8 strain FR-53803, with the exception of decitabine and idoxuridine. The EC₅₀ of compounds against the EHV-8 strain FR-53803 showed that aphidicolin was more efficient than the other compounds ($p < 0.05$) against this strain, but not when compared to ganciclovir and idoxuridine ($p = 0.060217$ and $p = 0.090187$, respectively). This molecule also showed the best efficacy against the EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) ($p < 0.05$). Aciclovir showed a low efficacy against all the EHV strains tested.

There were no significant differences of efficacy against the three EHV strains, with the exception of aciclovir which seemed to be even less effective (EC₅₀ >100 μM) against the EHV-8 strain FR-53803 than against the other two strains FR1232 (EHV-9) and FR-56628 (EHV-1, C₂₂₅₄/H₇₅₂) (EC₅₀=16.33 μM ± 14.44 and 30.32 μM ± 3.89, respectively). The important standard deviation of the EC₅₀ values obtained

against the EHV-9 strain FR-1232 make it difficult to compare it with both the EHV-1 strain FR-56628 and the EHV-8 strain FR-53803.

Table 2 Antiviral molecules tested against the newly isolated EHV-8 strain (FR-53803), the newly isolated EHV-9 strain FR-1232 and the EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂). EC₅₀ (μM) values were obtained by RTCA on EEK cells. GCV= ganciclovir, VGCV= valganciclovir, DTB= decitabine, IDX= idoxuridine, BAY= pritelivir, ACV= acyclovir, APD= aphidicolin.

	GCV	VGCV	DTB	IDX	BAY	ACV	APD
FR-53803 (EHV-8)	1.03 ± 0.28	1.21 ± 0.19	16.26 ± 6.54	3.66 ± 2.45	5.56 ± 1.76	>100	0.50 ± 0.22
FR-1232 (EHV-9)	0.74 ± 0.56	1,33 ± 1.06	8.39 ± 8.06	6.75 ± 4.16	4.05 ± 3.28	16.33±14.44	1.20 ± 0.73
FR-56628 (EHV-1)	1.29 ±0.69	2.03 ±0.78	13.77 ±5.87	5.96 ±0.88	3.34 ±0.36	30.32 ±3.89	0.14 ±0.07

4. Discussion

In this study, two equid alphaherpesviruses were characterised and compared to a new EHV-1 variant recently isolated from a horse population presenting respiratory and neurological clinical signs and carrying the C₂₂₅₄ genotype (ORF30) [18,19]. A first virus (FR-1232) was isolated from a Grevy's Zebra and ORF30 nested PCR identified it as an EHV-9 strain. Another virus (FR-53803) was isolated from a donkey and was first identified as EHV-1 using the Diallo *et al.* (2006) PCR method [49]. ORF30 sequencing revealed a much stronger homology with EHV-8 reference strains than with EHV-1 reference strains. Incorrect identification of two EHV-8 strains from aborted fetuses as EHV-1 strains had already been described previously by Garvey *et al.* (2018) [33]. This highlights the complexity in the development of new discriminating PCR tools when it comes to such genetically close viruses. This misidentification motivated the screening of 199 EHV-1 positive samples among which four strains showed strong homology with the EHV-8 reference strain Wh. These strains, which had all been isolated from donkeys, were consequently identified as EHV-8 strains. Among the 199 samples, no EHV-9 strain was identified. An explanation could be that Diallo *et al.* (2006) PCR assay does not amplify EHV-9 strains, as suggested by the few mismatches observed *in silico* between the EHV-9 reference strain P19 gB gene sequence and the forward primer and the probe. Another more likely explanation is that the 199 samples were taken from horses and donkeys. To our knowledge, although the EHV-9 has a broad host range, there are no reports of EHV-9 natural infections in horses or donkeys and on the prevalence of the virus in these equids. Finally, among the 176/199 confirmed EHV-1 strains, one had been isolated from a donkey. This illustrates the previously described characteristic of these alphaherpesviruses to cross the species barrier. Besides, as there had already been some reports of EHV-8 strains isolated from horses, surveillance of this equid alphaherpesvirus in horse samples may be an interesting perspective [32,33]. These results, alongside with the recent isolation of a new EHV-1 C₂₂₅₄ variant which could not be detected using the Allen *et al.* (2007) PCR method, highlight the potential misidentification of strains, or the risk of missing strains. Even though the emergence of new variants is less frequent with DNA viruses when compared to RNA viruses, efficient detection tools remain crucial for a thorough surveillance. As for the EHV-1 new variant (C₂₂₅₄), which motivated the design of a new probe for the identification of C₂₂₅₄ strains, a new pair of primers was designed and allowed the specific discrimination of 3/3 EHV-8 strains.

The heterogeneity between the strains FR-1232 (EHV-9), FR-53803 (EHV-8), FR-56628 (EHV-1, C₂₂₅₄/H₇₅₂) and the EHV-1 reference strains Ab4 and V592 was shown with ORF30 sequence alignment. This heterogeneity was also illustrated in a reticulated phylogenetic network in which EHV-1, EHV-8 and EHV-9 strains were grouped separately. On the other hand EHV-1, 8 and 9 strains formed a cluster that was distinct from the other equid alphaherpesviruses EHV-3 and EHV-4. Three EHV-1

strains, two isolated from zebras and one from an onager, clustered separately from other EHV-1 strains. Among them, the EHV-1 strain (Ca-Lung KC924786) even clustered alongside all the EHV-9 strains included in the analysis, which suggests a possible misidentification of this strain as an EHV-1. This diversity among EHV-1 strains either isolated from natural or non-natural hosts had already been highlighted by Abdelgawad *et al.* (2016) and Garvey *et al.* (2018) while all EHV-8 and EHV-9 strains clustered independently from their host [24,33]. In a study carried out by Kolb *et al.* (2017) on whole genome sequences of varicelloviruses, divergence between EHV-1 and EHV-9 seemed greater than between EHV-1 and EHV-8, in contrast with results obtained in the present study on ORF30 sequences [57]. This highlights the limits of phylogenetic analysis based on single ORF sequences. However, in the present study, the network analysis also suggested some possible recombination events between the different equid alphaherpesvirus strains. This phenomenon has already been explored by Kolb *et al.* (2017) in the *Varicellovirus* genus in which the equid alphaherpesviruses are classified [57]. In this study, recombination was highlighted in ungulate herpesviruses of the *Varicellovirus* genus using different tools such as phylogenetic network, G+C content, codon usage and Pairwise Homoplasy Index (PHI) analysis. Recombination events could be explained by some co-infection events combined with the alphaherpesviruses characteristic to establish latency in neurons [12]. This is what is suggested in a study reporting the isolation of a zebra-borne EHV-1 in a polar bear carrying a probable recombinant EHV-1 and EHV-9 ORF30 sequence [58]. Guo *et al.* (2014) however could not find any evidences of recombination in this sequence using similar algorithms [59]. Concerning the ORF30 polymorphism in position 2254, it is interesting to note that both the strains FR-1232 (EHV-9) and FR-53803 (EHV-8) carried the ORF30 mutation G₂₂₅₄ (D₇₅₂). While some mismatches could be observed in the alignment of Allen *et al.* (2007) forward primer with two EHV-1 and five EHV-8 referenced strains, the genotype G₂₂₅₄ could still be detected for the four other EHV-8 strains identified in this study using the authors PCR. This non-synonymous mutation (A2254G/N752D) has been under the light since it was associated in 2006 with EHV-1 neuropathogenicity [13]. Some studies since discussed this association, including the discovery of a third genotype C₂₂₅₄ (H₇₅₂) [15–17,19,48,60–62]. However, the G₂₂₅₄/D₇₅₂ genotype is conserved among mammal herpesviruses, and could be the ancestral genotype [13]. To our knowledge, only the ancestral genotype has been reported in EHV-9 and EHV-8 strains [29,33].

Finally, the *in vitro* antiviral assay showed that one of the most effective compounds against the EHV-8 strain FR-53803 and the EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) was aphidicolin. While Goodman *et al.* (2007) observed an *in vitro* difference of sensitivity between two D/N₇₅₂ EHV-1 mutants toward aphidicolin, no significant differences of efficacy were observed *in vitro* against three different EHV-1 strains carrying the A/G and C₂₂₅₄ mutation [19,63]. No difference of efficacy could be observed against the EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) and the EHV-8 strain FR-53803 (G₂₂₅₄/D₇₅₂). However, a difference could be observed between those two strains, aciclovir being more effective against the EHV-1 strain FR-56628 (EC₅₀ >20µM) than against the EHV-8 strain FR-53803 (EC₅₀ >100µM). Besides, aciclovir was the least effective compound against both the EHV-1 and the EHV-8 strain. Ganciclovir and valganciclovir showed a good and similar efficacy against the EHV-8 strain when compared to the EHV-1 strain. These are promising results especially since Thieulent *et al.* demonstrated, during an experimental challenge, that treatment with valganciclovir could significantly reduce the clinical score induced by the EHV-1 strain FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) (Thieulent *et al.* unpublished data). The low reproducibility of antiviral investigations against the EHV-9 strain FR-1232 made it difficult to drive statistical analysis and conclusions. This low reproducibility could be due to the model used. Although it was previously developed and validated for *in vitro* antiviral assays against the EHV-1, it may not be appropriate for the EHV-9 [44,45]. Testing another model with different EHV-9 strains would be an interesting perspective. However, as all the compounds tested, except for pritelivir, were either deoxynucleoside analogs or deoxynucleotides competitor, changes in the DNA polymerase may also have affected its interaction with the different molecules and explain differences of sensitivity, or unstable responses as observed with the EHV-9 strain FR-1232. As mentioned previously, Kolb *et al.* (2017) showed on whole genome analysis that the EHV-8 was less divergent from the EHV-1 than was

the EHV-9 [57]. It could be suggested that the diverging responses of the strains FR-53803 (EHV-8) and FR-1232 (EHV-9) to antiviral molecules also reflect their genetic divergence. This assay was, to our knowledge, the first *in vitro* antiviral investigation against an EHV-8 and an EHV-9 strain.

5. Conclusion

In this study, two equid herpesvirus strains were isolated, one (EHV-8; FR-53803) from a nasal swab taken from a donkey and first identified as EHV-1 with a conventional PCR tool, and one (EHV-9; FR-1232), from a lung tissue sample taken from a Grevys' zebra in a zoo. Considering the potential of these viruses to cross the species barrier and to infect endangered species, in the case of the EHV-9, this work shows the importance of monitoring the effectiveness of diagnostic tools. Antiviral assay performed *in vitro* with several molecules previously described as effective against EHV-1 showed for the first time the interest in studying these molecules against EHV-8 and EHV-9, as potential candidates for antiviral treatment for these viruses.

Supplementary Material: Table S1: PCR 1, 2 and 3 primers and probes sequences, thermoprofiles and mixtures; Table S2: Identification and accession numbers of the strains used for sequence alignments or phylogenic analysis; Figure S3: ORF30 nucleotide alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 the EHV-1 strain FR-56628 and the two EHV-1 reference strains Ab4 and V592; Figure S4: ORF30 amino acid alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 with the EHV-1 strain FR-56628 and two EHV-1 reference strains Ab4 and V592; Table S5: Sample information for the screening of EHV-8 strains; Figure S6: Nucleotide alignment of PCR 1 amplicons in comparison with EHV-1 strains Ab4 and V592, and EHV-8 strain Wh; Figure S7: Nucleotide sequence alignment of two EHV-1 reference strains (Ab4 and V592) and five EHV-8 strains (Wh, EHV-8/IR/2015/40, EHV-8/IR/2010/16, EHV-8/IR/2010/47, EHV-8/IR/2003/19) with Allen et al. 2007 primers and probe for ORF30 mutation in position 2254.

Author Contributions: Here are described the contribution of the authors for this research article: conceptualisation, R.P., S.P., and G.S.; investigation, C.N., C.T., C.F., E.H. and G.S.; resources, C.F., E.H. A.L., B. M., N.G., A.N., L.L., writing—original draft preparation, R.P., S.P., C.N. and G.S.; writing—review and editing, R.P., S.P., A.L. and G.S.; supervision, R.P. and S.P.; project administration, R.P. and S.P.; funding acquisition, R.P. and S.P.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: This research was funded by the Fonds Eperon OVERLORD N12-2017, Normandy County Council (17E01598/17EP04324), the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) grant number 2017-008, CENTAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational program 2014-2020.

6. References

1. Negussie, H.; Gizaw, D.; Tessema, T.S.; Nauwynck, H.J. Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy, an Emerging Threat of Working Equids in Ethiopia. *Transbound Emerg Dis* **2015**, *64*, 389–397, doi:10.1111/tbed.12377.
2. Ibrahim, E.S.M.; Kinoh, M.; Matsumura, T.; Kennedy, M.; Allen, G.P.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H. Genetic Relatedness and Pathogenicity of Equine Herpesvirus 1 Isolated from Oner, Zebra and Gazelle. *Arch Virol* **2007**, *152*, 245–255, doi:10.1007/s00705-006-0855-3.
3. Montali, R.J.; Allen, G.P.; Bryans, J.T.; Phillips, L.G.; Bush, M. Equine Herpesvirus Type 1 Abortion in an Oner and Suspected Herpesvirus Myelitis in a Zebra. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1985**, *187*, 1248–1249.
4. Blunden, A.S.; Smith, K.C.; Whitwell, K.E.; Dunn, K.A. Systemic Infection by Equid Herpesvirus-1 in a Grevy's Zebra Stallion (*Equus Grevyi*) with Particular Reference to Genital Pathology. *J Comp Pathol* **1998**, *119*, 485–493, doi:10.1016/s0021-9975(98)80043-1.
5. Wohlsein, P.; Lehmbecker, A.; Spitzbarth, I.; Algermissen, D.; Baumgärtner, W.; Böer, M.; Kummrow, M.; Haas, L.; Grummer, B. Fatal Epizootic Equine Herpesvirus 1 Infections in New and Unnatural Hosts. *Veterinary Microbiology* **2011**, *149*, 456–460, doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.024.

6. Chowdhury, S.I.; Ludwig, H.; Buhk, H.-J. Molecular Biological Characterization of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Isolates from Ruminant Hosts. *Virus Research* **1988**, *11*, 127–139, doi:10.1016/0168-1702(88)90038-X.
7. Chowdhury, S.I.; Kubin, G.; Ludwig, H. Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Induced Abortions and Paralysis in a Lipizzaner Stud: A Contribution to the Classification of Equine Herpesviruses. *Archives of Virology* **1986**, *90*, 273–288, doi:10.1007/BF01317376.
8. Crandell, R.A.; Ichimura, H.; Kit, S. Isolation and Comparative Restriction Endonuclease DNA Fingerprinting of Equine Herpesvirus-1 from Cattle. *Am J Vet Res* **1988**, *49*, 1807–1813.
9. Kennedy, M.A.; Ramsay, E.; Diderrich, V.; Richman, L.; Allen, G.P.; Potgieter, L.N.D. Encephalitis Associated with a Variant of Equine Herpesvirus 1 in a Thomson's Gazelle (*Gazella Thomsoni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **1996**, *27*, 533–538.
10. Kinyili, J.H.; Thorsen, J. Antigenic Comparisons between Herpesviruses Isolated from Fallow Deer in Alberta and the Viruses of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Equine Rhinopneumonitis and DN-599, a Non-IBR Bovine Herpesvirus. *Journal of Wildlife Diseases* **1979**, *15*, 339–341, doi:10.7589/0090-3558-15.2.339.
11. Rebhun, W.C.; Jenkins, D.H.; Riis, R.C.; Dill, S.G.; Dubovi, E.J.; Torres, A. An Epizootic of Blindness and Encephalitis Associated with a Herpesvirus Indistinguishable from Equine Herpesvirus I in a Herd of Alpacas and Llamas. *J Am Vet Med Assoc* **1988**, *192*, 953–956.
12. Borchers, K.; Lieckfeldt, D.; Ludwig, A.; Fukushi, H.; Allen, G.; Fyumagwa, R.; Hoare, R. Detection of Equid Herpesvirus 9 DNA in the Trigeminal Ganglia of a Burchell's Zebra from the Serengeti Ecosystem. *J Vet Med Sci* **2008**, *70*, 1377–1381, doi:10.1292/jvms.70.1377.
13. Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.C.; Mumford, J.A.; Swann, Z.; Newton, J.R.; Bowden, R.J.; Allen, G.P.; Davis-Poynter, N. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *J Virol* **2006**, *80*, 4047–4060, doi:10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006.
14. Lunn, D.P.; Davis-Poynter, N.; Flaminio, M.J.B.F.; Horohov, D.W.; Osterrieder, K.; Pusterla, N.; Townsend, H.G.G. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **2009**, *23*, 450–461, doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x.
15. Pusterla, N.; Hatch, K.; Crossley, B.; Wademan, C.; Barnum, S.; Flynn, K. Equine Herpesvirus-1 Genotype Did Not Significantly Affect Clinical Signs and Disease Outcome in 65 Horses Diagnosed with Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy. *The Veterinary Journal* **2020**, *255*, 105407, doi:10.1016/j.tvjl.2019.105407.
16. Pronost, S.; Léon, A.; Legrand, L.; Fortier, C.; Miszczak, F.; Freymuth, F.; Fortier, G. Neuropathogenic and Non-Neuropathogenic Variants of Equine Herpesvirus 1 in France. *Veterinary Microbiology* **2010**, *145*, 329–333, doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.031.
17. Perkins, G.A.; Goodman, L.B.; Tsujimura, K.; Van de Walle, G.R.; Kim, S.G.; Dubovi, E.J.; Osterrieder, N. Investigation of the Prevalence of Neurologic Equine Herpes Virus Type 1 (EHV-1) in a 23-Year Retrospective Analysis (1984–2007). *Veterinary Microbiology* **2009**, *139*, 375–378, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.033.
18. Paillot, R.; Sutton, G.; Thieulent, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Pronost, S. New EHV-1 Variant Identified. *Veterinary Record* **2020**, *186*, 573.1-573, doi:10.1136/vr.m1441.
19. Sutton, G.; Thieulent, C.; Fortier, C.; Hue, E.S.; Marcillaud-Pitel, C.; Pléau, A.; Deslis, A.; Guitton, E.; Paillot, R.; Pronost, S. Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C2254/H752 Strain in French Horses Showing No Major Impact on the Strain Behaviour. *Viruses* **2020**, *12*, 1160, doi:10.3390/v12101160.
20. Fukushi, H.; Tomita, T.; Taniguchi, A.; Ochiai, Y.; Kirisawa, R.; Matsumura, T.; Yanai, T.; Masegi, T.; Yamaguchi, T.; Hirai, K. Gazelle Herpesvirus 1: A New Neurotropic Herpesvirus Immunologically Related to Equine Herpesvirus 1. *Virology* **1997**, *227*, 34–44, doi:10.1006/viro.1996.8296.
21. Yanai, T.; Sakai, T.; Fukushi, H.; Hirai, K.; Narita, M.; Sakai, H.; Masegi, T. Neuropathological Study of Gazelle Herpesvirus 1 (Equine Herpesvirus 9) Infection in Thomson's Gazelles (*Gazella Thomsoni*). *Journal of Comparative Pathology* **1998**, *119*, 159–168, doi:10.1016/S0021-9975(98)80060-1.
22. Schrenzel, M.D.; Tucker, T.A.; Donovan, T.A.; Busch, M.D.M.; Wise, A.G.; Maes, R.K.; Kiupel, M. New Hosts for Equine Herpesvirus 9. *Emerg Infect Dis* **2008**, *14*, 1616–1619, doi:10.3201/eid1410.080703.
23. Abdelgawad, A.; Hermes, R.; Damiani, A.; Lamglait, B.; Czirják, G.Á.; East, M.; Aschenborn, O.; Wenker, C.; Kasem, S.; Osterrieder, N.; et al. Comprehensive Serology Based on a Peptide ELISA to Assess the

- Prevalence of Closely Related Equine Herpesviruses in Zoo and Wild Animals. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0138370.
24. Abdelgawad, A.; Damiani, A.; Ho, S.Y.W.; Strauss, G.; Szentiks, C.A.; East, M.L.; Osterrieder, N.; Greenwood, A.D. Zebra Alphaherpesviruses (EHV-1 and EHV-9): Genetic Diversity, Latency and Co-Infections. *Viruses* **2016**, *8*, doi:10.3390/v8090262.
 25. Donovan, T.A.; Schrenzel, M.D.; Tucker, T.; Pessier, A.P.; Bicknese, B.; Busch, M.D.M.; Wise, A.G.; Maes, R.; Kiupel, M.; McKnight, C.; et al. Meningoencephalitis in a Polar Bear Caused by Equine Herpesvirus 9 (EHV-9). *Veterinary Pathology* **2009**, *46*, 1138–1143, doi:10.1354/vp.09-VP-0007-D-CR.
 26. Fukushi, H.; Yamaguchi, T.; Yamada, S. Complete Genome Sequence of Equine Herpesvirus Type 9. *J Virol* **2012**, *86*, 13822, doi:10.1128/JVI.02607-12.
 27. Kasem, S.; Yamada, S.; Kiupel, M.; Woodruff, M.; Ohya, K.; Fukushi, H. Equine Herpesvirus Type 9 in Giraffe with Encephalitis. *Emerg Infect Dis* **2008**, *14*, 1948–1949, doi:10.3201/eid1412.080801.
 28. Moeller, R.B.; Crossley, B.; Pipkin, A.; Li, Y.; Balasuriya, U.B.R. Systemic Equid Alphaherpesvirus 9 in a Grant's Zebra. *J VET Diagn Invest* **2018**, *30*, 580–583, doi:10.1177/1040638718767722.
 29. Rebelo, A.R.; Carman, S.; Shapiro, J.; van Dreumel, T.; Hazlett, M.; Nagy, É. Equid Herpesvirus 9 (EHV-9) Isolates from Zebras in Ontario, Canada, 1989 to 2007. *Can J Vet Res* **2015**, *79*, 155–159.
 30. Taniguchi, A.; Fukushi, H.; Matsumura, T.; Yanai, T.; Masegi, T.; Hirai, K. Pathogenicity of a New Neurotropic Equine Herpesvirus 9 (Gazelle Herpesvirus 1) in Horses. *Journal of Veterinary Medical Science* **2000**, *62*, 215–218, doi:10.1292/jvms.62.215.
 31. Browning, G.F.; Ficorilli, N.; Studdert, M.J. Asinine Herpesvirus Genomes: Comparison with Those of the Equine Herpesviruses. *Archives of Virology* **1988**, *101*, 183–190, doi:10.1007/BF01310999.
 32. Liu, C.; Guo, W.; Lu, G.; Xiang, W.; Wang, X. Complete Genomic Sequence of an Equine Herpesvirus Type 8 Wh Strain Isolated from China. *Journal of Virology* **2012**, *86*, 5407–5407, doi:10.1128/JVI.00445-12.
 33. Garvey, M.; Suárez, N.M.; Kerr, K.; Hector, R.; Moloney-Quinn, L.; Arkins, S.; Davison, A.J.; Cullinane, A. Equid Herpesvirus 8: Complete Genome Sequence and Association with Abortion in Mares. *PLOS ONE* **2018**, *13*, e0192301, doi:10.1371/journal.pone.0192301.
 34. Cuxson, J.L.; Hartley, C.A.; Ficorilli, N.P.; Symes, S.J.; Devlin, J.M.; Gilkerson, J.R. Comparing the Genetic Diversity of ORF30 of Australian Isolates of 3 Equid Alphaherpesviruses. *Veterinary Microbiology* **2014**, *169*, 50–57, doi:10.1016/j.vetmic.2013.12.007.
 35. Pusterla, N.; David Wilson, W.; Madigan, J.E.; Ferraro, G.L. Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy: A Review of Recent Developments. *The Veterinary Journal* **2009**, *180*, 279–289, doi:10.1016/j.tvjl.2008.08.004.
 36. Paillot, R.; Ellis, S.; Daly, J.; Audonnet, J.; Minke, J.; Davispoynter, N.; Hannant, D.; Kydd, J. Characterisation of CTL and IFN- γ Synthesis in Ponies Following Vaccination with a NYVAC-Based Construct Coding for EHV-1 Immediate Early Gene, Followed by Challenge Infection. *Vaccine* **2006**, *24*, 1490–1500, doi:10.1016/j.vaccine.2005.10.019.
 37. Kydd, J.H.; Townsend, H.G.G.; Hannant, D. The Equine Immune Response to Equine Herpesvirus-1: The Virus and Its Vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2006**, *111*, 15–30, doi:10.1016/j.vetimm.2006.01.005.
 38. Goodman, L.B.; Wimer, C.; Dubovi, E.J.; Gold, C.; Wagner, B. Immunological Correlates of Vaccination and Infection for Equine Herpesvirus 1. *Clin. Vaccine Immunol.* **2012**, *19*, 235–241, doi:10.1128/CVI.05522-11.
 39. Heldens, J.G.M.; Hannant, D.; Cullinane, A.A.; Prendergast, M.J.; Mumford, J.A.; Nelly, M.; Kydd, J.H.; Weststrate, M.W.; van den Hoven, R. Clinical and Virological Evaluation of the Efficacy of an Inactivated EHV1 and EHV4 Whole Virus Vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/Challenge Experiments in Foals and Pregnant Mares. *Vaccine* **2001**, *19*, 4307–4317, doi:10.1016/S0264-410X(01)00131-1.
 40. Garre, B.; Vandermeulen, K.; Nugent, J.; Neyts, J.; Croubels, S.; Debacker, P.; Nauwynck, H. In Vitro Susceptibility of Six Isolates of Equine Herpesvirus 1 to Acyclovir, Ganciclovir, Cidofovir, Adefovir, PMEDAP and Foscarnet. *Veterinary Microbiology* **2007**, *122*, 43–51, doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.004.
 41. Maxwell, L.K.; Bentz, B.G.; Bourne, D.W.A.; Erkert, R.S. Pharmacokinetics of Valacyclovir in the Adult Horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **2008**, *31*, 312–320, doi:10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x.
 42. Maxwell, L.K.; Bentz, B.G.; Gilliam, L.L.; Ritchey, J.W.; Pusterla, N.; Eberle, R.; Holbrook, T.C.; McFarlane, D.; Rezabek, G.B.; Meinkoth, J.; et al. Efficacy of the Early Administration of Valacyclovir Hydrochloride for

- the Treatment of Neuropathogenic Equine Herpesvirus Type-1 Infection in Horses. *American Journal of Veterinary Research* **2017**, *78*, 1126–1139, doi:10.2460/ajvr.78.10.1126.
43. Thieulent, C.J.; Hue, E.S.; Fortier, C.I.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Fortier, G.D.; Pitel, P.-H.; Vidalain, P.-O.; et al. Screening and Evaluation of Antiviral Compounds against Equid Alpha-Herpesviruses Using an Impedance-Based Cellular Assay. *Virology* **2019**, *526*, 105–116, doi:10.1016/j.virol.2018.10.013.
 44. Thieulent, C.; Hue, E.S.; Sutton, G.; Fortier, C.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Paillot, R.; Vidalain, P.-O.; et al. Identification of Antiviral Compounds against Equid Herpesvirus-1 Using Real-Time Cell Assay Screening: Efficacy of Decitabine and Valganciclovir Alone or in Combination. *Antiviral Research* **2020**, *183*, 104931, doi:10.1016/j.antiviral.2020.104931.
 45. Thieulent, C.; Fortier, C.; Munier-Lehmann, H.; Suzanne, P.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Hans, A.; Paillot, R.; Vidalain, P.-O.; Pronost, S.; et al. Screening of Potential Antiviral Molecules against Equid Herpesvirus-1 Using Cellular Impedance Measurement: Dataset of 2,891 Compounds. *Data Brief* **2020**, *33*, 106492, doi:10.1016/j.dib.2020.106492.
 46. Ramakrishnan, M.A. Determination of 50% Endpoint Titer Using a Simple Formula. *WJV* **2016**, *5*, 85, doi:10.5501/wjv.v5.i2.85.
 47. VanDevanter, D.R.; Warren, P.; Bennett, L.; Schultz, E.R.; Coulter, S.; Garber, R.L.; Rose, T.M. Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR. *J Clin Microbiol* **1996**, *34*, 1666–1671, doi:10.1128/JCM.34.7.1666-1671.1996.
 48. Sutton, G.; Garvey, M.; Cullinane, A.; Jourdan, M.; Fortier, C.; Moreau, P.; Foursin, M.; Gryspeerdt, A.C.; Maisonnier; Marcillaud-Pitel, C.; et al. Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion. *Viruses* **2019**, *11*, 916, doi:10.3390/v11100916.
 49. Diallo, I.S.; Hewitson, G.; Wright, L.; Rodwell, B.J.; Corney, B.G. Detection of Equine Herpesvirus Type 1 Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Virological Methods* **2006**, *131*, 92–98, doi:10.1016/j.jviromet.2005.07.010.
 50. Allen, G.P. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Diagnosis of Neuropathogenic Strains of Equine Herpesvirus-1. *J VET Diagn Invest* **2007**, *19*, 69–72, doi:10.1177/104063870701900110.
 51. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **1990**, *215*, 403–410, doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
 52. Hall, T. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **1999**, 95–98.
 53. Huson, D.H.; Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* **2006**, *23*, 254–267, doi:10.1093/molbev/msj030.
 54. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3--New Capabilities and Interfaces. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, e115, doi:10.1093/nar/gks596.
 55. StatGraphics Plus. Available online: <https://www.statgraphics.com/> (accessed on 30 August 2020).
 56. Bryant, N.A.; Wilkie, G.S.; Russell, C.A.; Compston, L.; Grafham, D.; Clissold, L.; McLay, K.; Medcalf, L.; Newton, R.; Davison, A.J.; et al. Genetic Diversity of Equine Herpesvirus 1 Isolated from Neurological, Abortigenic and Respiratory Disease Outbreaks. *Transbound Emerg Dis* **2018**, *65*, 817–832, doi:10.1111/tbed.12809.
 57. Kolb, A.W.; Lewin, A.C.; Moeller Trane, R.; McLellan, G.J.; Brandt, C.R. Phylogenetic and Recombination Analysis of the Herpesvirus Genus Varicellovirus. *BMC Genomics* **2017**, *18*, doi:10.1186/s12864-017-4283-4.
 58. Greenwood, A.D.; Tsangaras, K.; Ho, S.Y.W.; Szentiks, C.A.; Nikolin, V.M.; Ma, G.; Damiani, A.; East, M.L.; Lawrenz, A.; Hofer, H.; et al. A Potentially Fatal Mix of Herpes in Zoos. *Current Biology* **2012**, *22*, 1727–1731, doi:10.1016/j.cub.2012.07.035.
 59. Guo, X.; Izume, S.; Okada, A.; Ohya, K.; Kimura, T.; Fukushi, H. Full Genome Sequences of Zebra-Borne Equine Herpesvirus Type 1 Isolated from Zebra, Onager and Thomson's Gazelle. *J Vet Med Sci* **2014**, *76*, 1309–1312, doi:10.1292/jvms.14-0183.
 60. Vissani, M.A.; Becerra, M.L.; Olgún Perglione, C.; Tordoya, M.S.; Miño, S.; Barrandeguy, M. Neuropathogenic and Non-Neuropathogenic Genotypes of Equid Herpesvirus Type 1 in Argentina. *Veterinary Microbiology* **2009**, *139*, 361–364, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.025.

61. Fritsche, A.-K.; Borchers, K. Detection of Neuropathogenic Strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) Associated with Abortions in Germany. *Veterinary Microbiology* **2011**, *147*, 176–180, doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.014.
62. Pronost, S.; Cook, R.F.; Fortier, G.; Timoney, P.J.; Balasuriya, U.B.R. Relationship between Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy and Viral Genotype: EHV-1, Genotype and EHM. *Equine Veterinary Journal* **2010**, *42*, 672–674, doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00307.x.
63. Goodman, L.B.; Loregian, A.; Perkins, G.A.; Nugent, J.; Buckles, E.L.; Mercorelli, B.; Kydd, J.H.; Palù, G.; Smith, K.C.; Osterrieder, N.; et al. A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase Determines Neuropathogenicity. *PLoS Pathog* **2007**, *3*, doi:10.1371/journal.ppat.0030160.

En préparation

Supplementary Table S1 PCR 1, 2 and 3 primers and probes sequences, thermoprofiles and mixtures.

PCR	Primers and probe(s)	Sequence	Thermoprofile	Mixture for 1 sample
PCR 1.1 (VanDevanter <i>et al.</i> 1996)	DFA	5'-GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC-3'	95°C during 1 minutes, 45 cycles x	2.5 µL DNA extract + 5 µL Taq Ozyme reaction buffer 5X + 0.125 µL Taq'Ozyme HS + 0.5 µL of each primer (20 µM) + nuclease free water to complete to 25 µL.
	ILK	5'-TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA-3'	(95°C during 15 seconds, 46°C during 30 seconds,	
	KG1	5'-GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT-3'	72°C during 45 seconds), 72°C during 5 minutes.	
PCR 1.2 (VanDevanter <i>et al.</i> 1996)	TGV	5'-TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNNGGNT-3'	Thermocycler: Veriti™ 96-Well Thermal Cycler	
	IYG	5'-CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT-3'		
PCR 2 (Diallo <i>et al.</i> 2006)	EHV1-F	5'-CATGTCAACGCACTCCCA-3'	95°C during 10 minutes, 45 cycles x	2.5 µL DNA extract + 12.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix + 1.25 µL of each primer (20 µM) + 1.5 µL probe (depending on titration) + nuclease free water to complete to 25 µL.
	EHV1-R	5'-GGGTCGGGCGTTTCTGT-3'	(95°C during 15 seconds, 62°C during 1 minute).	
	EHV1-Probe	5'-FAM-CCCTACGCTGCTCC-MGB-NFQ-3'	Thermocycler: QuantStudio™ 12K Flex Real-time PCR System.	
PCR 3 (Allen <i>et al.</i> 2007)	GaF	5'-CCACCTGGCGCTCG-3'	95°C during 10 minutes, 55 cycles x	2.5 µL DNA extract + 12.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix + 0.6 µL of each primer (20µM) + 0.5 µL each probe (depending on titration) + nuclease free water to complete to 25 µL.
	GaR	5'-AGCCAGTCGCGCAGCAAGATG-3'	(95°C during 15 seconds, 65°C during 1 minute).	
	A2254	5'-VIC-CATCCGTCAACTACTC-MGB-NFQ-3'	Thermocycler: QuantStudio™ 12K Flex Real-time PCR System.	
	G2254	5'-FAM-TCCGTCGACTACTC-MGB-NFQ-3'		
PCR4 (current study)	ORF62-For	5'-CCCATTGCGCGTCATTCAAGG-3'	98°C during 30 seconds, 35 cycles x	5 µL DNA extract + 10 µL 5X Phusion HF Buffer + 1 µL dNTPs + 0,5 µL of each primer (20µM) + 0,5 µL Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL) + nuclease free water to complete to 50 µL.
	ORF62-Rev	5'-GAGGACCCAAAGTCTCGTCAA-3'	(98°C during 10 seconds, 61°C during 30 seconds, 72°C during 1 minute), 72°C during 7 minutes.	
			Thermocycler: Veriti™ 96-Well Thermal Cycler	

Supplementary Table S2 Identification and accession numbers of the strains used for sequence alignments or phylogenetic analysis.

EHV	Strain Identification	Accession number
EHV-1	Ab4	AY665713
EHV-1	V592	AY464052
EHV-1	Ca-Lung	KC924786
EHV-1	T-529 10/84	KF644580
EHV-1	T-616	KF644574
EHV-1	ILEDEFR/3/2012	MN688618
EHV-1	NORM/4/2012	MN688619
EHV-1	NORM/5/2012	MN688620
EHV-1	NORM/6/2013	MN688621
EHV-1	NORM/8/2015	MN688622
EHV-1	NELLAQU/9/2015	MN688623
EHV-1	BELG/10/2016	MN688624
EHV-1	BELG/12/2017	MN688625
EHV-1	ILDEFR/14/2018	MN688626
EHV-1	RHONEALPES/16/2018	MN688627
EHV-1	NORM/17/2018/	MN688628
EHV-1	NORM/18/2018	MN688629
EHV-1	BRE/20/2018	MN688630
EHV-1	FR56628	MT968035
EHV-9	P19	AP010838
EHV-9	WP1	KX101092
EHV-9	CG2	KX101093
EHV-9	CG3	KX101094
EHV-9	CG6	KX101096
EHV-8	EHV-8/IR/2003/19	MF431611
EHV-8	EHV-8/IR/2010/47	MF431612
EHV-8	EHV-8/IR/2010/16	MF431613
EHV-8	EHV-8/IR/2015/40	MF431614
EHV-8	804/87	KF434388
EHV-8	Wh	JQ343919
EHV-4	NS80567	NC001844
EHV-3	AR/2007/C3A	NC024771

Supplementary Figure S3 ORF30 nucleotide alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 the EHV-1 strain FR-56628 and the two EHV-1 reference strains Ab4 and V592 - 1/6.

```

1           10           20           30           40           50           60           70
Ab4 AY665713 ATGGCGGCGCGCGAACAGGCCAACTCCGTTTCGCAGGAGCGGGTTTTTTAATCCGTTTATTGGCAAGAGGCCATTTTTCA
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....G..A.....
FR-53803 .....G.....

80           90           100          110          120          130          140          150
Ab4 AY665713 GGCCGGGAAGCGGGCAGACC GCGGAGACAGAGCGCCCAAGGCCCCCAACACTCGTACTGCACAGAGGTGGGTAGCTTT
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....A.....
FR-1232 .....T..C....A..A..T.....C.....C.A.....T.....
FR-53803 .....A.....A.....A.....C.....C.....G.....

160          170          180          190          200          210          220          230
Ab4 AY665713 AAGTTTATAGCTCCAAGATGCCTCGATGAAGAAGCCCCCGCCGACCGACGCGGTGTACACGTGGGCACCTTGGAGCG
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....G..C.....G.....
FR-53803 .....G..C.....G.....T.....A.....

240          250          260          270          280          290          300          310
Ab4 AY665713 CCCACCCAAAGTGTACTGCGATGGCTCAGAGTACGACGTGCTGAACCTTTGCTCCGGAGGTTGCTGGCTCGCAGGATTC
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....A..A.....G.....G.T...T.....C.....
FR-53803 .....A.....G.....A..G.T.....A...A

320          330          340          350          360          370          380          390
Ab4 AY665713 GGGTTTGAACGGCCAGGATTTTCGGGGCGATGGATTCAACCCAGATTTGAGAGATTCACGTGTACGACATAGTAGAG
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....A.....
FR-53803 .....T.....A.....T.....

400          410          420          430          440          450          460          470
Ab4 AY665713 ACTTCGGAGAGCGCCTCACACGATGACCCATCCAGGTTTGTCTGAGCTATCCCGCCCAAGCGGGTCTGTGGTAACTGCT
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....A.....G.T.....AC.....G.....G.....T..A..
FR-53803 .....T.....G.T.....AC...C..A.....A.....T..A..

480          490          500          510          520          530          540          550
Ab4 AY665713 GGGAATGAGCGAGTGTGGAAGCGAGTCGCGGTTCACGTCTATGGTGTGCGCCATTATTTTTACATGGCAAAGGGCGGAG
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....G.....C.....A..C.....A.....
FR-53803 .....T.....G.....C..T.....A..C.....A.....

560          570          580          590          600          610          620          630
Ab4 AY665713 TGGATAGCGCTTGTGGAATAACCACCGAGGCAGAACCTCGTGC GCGCAATGGTGGACTGCGCGCACAGCTCGGCTTTGAGC
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....C.....G.....T.T..G.....C.....A.....A.....
FR-53803 .....A..C.....C.....C.....A.....C.....AA.....A.....

```

Supplementary Figure S3 ORF30 nucleotide alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 the EHV-1 strain FR-56628 and the two EHV-1 reference strains Ab4 and V592 - 2/6.

	640	650	660	670	680	690	700	710
Ab4 AY665713	GCGGCCCTGGGAAATGGCAACGGCGGCAAACAGAGCGGCGGAGCGGCGGGGGATGGTGGGGCGGAAAGCACGCTGTCTGC							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232T.....A.....T.....							
FR-53803T.....T.....							
	720	730	740	750	760	770	780	790
Ab4 AY665713	GGACTGCTTCAAAGTGGAGACCGTGTGCCACACGACGCTGTACTACTTTGGATCTAAGCCAGCTCTACTATAGAGTAT							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232T.....							
FR-53803T.....C.....T.....							
	800	810	820	830	840	850	860	870
Ab4 AY665713	CTGCCTCCAGCAGCCGCTGGGAGGGTTCATCTGCGACAACCTTTCACCCGAGATTACAAAATTCGAGGGGAGCGTGGAC							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232C.....							
FR-53803C.....T.....T.....T.....A.....							
	880	890	900	910	920	930	940	950
Ab4 AY665713	GTGACCACGCGGCTGTTGTTGGACAATGAAAATTTTACCAGTTTCGGGTGGTACCGCCTGCGACCCGGCACCCACGGAGA							
V592 AY464052T.....							
FR-56628 MT968035							
FR-1232A.....G.....							
FR-53803G.....A.....							
	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030
Ab4 AY665713	GCGTGTCAACTTCGCCCCGTTGAGCGACAGTCACTCAAGCGACGTGGAGATTAAGTGTACTCCCGATAACCTGGAGC							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232T.....G.....TA.....T.....C.....C.....A.....A.....							
FR-53803T.....G.....A.....T.....C.....T.....T.....A.....C.....A.....A.....							
	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110
Ab4 AY665713	CGATACCAGACGAGGCTGCCTGGCCCCGACTATAAGCTCATGTGCTTTGATATAGAGTGTAAAGCTGGAACGGGTAACGAA							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232C.....C.....A.....G.....C.....G.....							
FR-53803C.....G.....T.....G.....							
	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
Ab4 AY665713	ATGGCGTTCAGTGGCAACTAACCAAGAGGACCTGGTCATCCAGATCTCCTGTCTGCTGTACTCGCTTGCTACTCAGAA							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232T.....C.....T.....G.....							
FR-53803A.....T.....C.....T.....T.....G.....							
	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270
Ab4 AY665713	CCACGAACACACCCTGCTGTTTCCCTCGGGTCATGCGATATCTCTGAGGAATACTCGTTTGCATGCGTCCAGCGGGCG							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232	A.....A.....G.....G.....A.....T.....A.....A.....T.....							
FR-53803	A.....T.....A.....T.....G.....G.....T.....A.....A.....T.....							

Supplementary Figure S3 ORF30 nucleotide alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 the EHV-1 strain FR-56628 and the two EHV-1 reference strains Ab4 and V592 - 3/6.

```

1280      1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350
Ab4 AY665713  AGCCCAGACCGACGGTTTTGGAGTTTGACAGCGAGTACGAGCTGCTGGTTGCCTTCCTGACCTTTCTCAAGCAGTACTCT
V592 AY464052  .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232      .....G.....A.....T.....A.....
FR-53803     .....G.....A.....C.....T.....

1360      1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430
Ab4 AY665713  CCCGAGTTCGCCACCGGCTACAACATCGTTAATTTTGACTGGGCGTACATAGTTAACAAGGTAACGTCGGTGTATAACAT
V592 AY464052  .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232      .....G.....
FR-53803     .....G.....T.....T.....A.....

1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510
Ab4 AY665713  CAAGCTGGACGGGTACGGCAAGTTCAACAAAGGGGGCTGTTTAAGGTGTGGGACATCGCCACGAACCATTTTCAGAAGA
V592 AY464052  .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232      .....C.....C.....C.....A.....
FR-53803     .....A.....C.....A.....C.....A.....

1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590
Ab4 AY665713  AGAGCAAGGTGAAAATCAATGGCCTGATATCTCTAGACATGTATTCTGTGGCGACGGAAAAGCTAAAGCTACCCAGCTAC
V592 AY464052  .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232      .....G.....C.....G.....C.....
FR-53803     .....G.....C.....T.....G.....C.....T.....

1600      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670
Ab4 AY665713  AAACTCGACGCGGTCGTGGGAGACGTCTCGGCGAGCATAAGATAGACCTTCCCTATAAAGAAATACCCCTCTATTACGG
V592 AY464052  .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232      .....A.....T.....G.....
FR-53803     .....A.....T.....T.....T.....T.....G.....

1680      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750
Ab4 AY665713  GGGAGGGCCTGACCGGAGGGCGTAATAGGAGAGTATTGTATCCAGGACTCTAGGCTGGTGGGCAAGCTGTTTTTAAGT
V592 AY464052  .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232      T..T.....C.....G.....C.....A.....
FR-53803     T..C.....C.....C.....C.....A.....T.....

1760      1770      1780      1790      1800      1810      1820      1830
Ab4 AY665713  ACCTCCCCATCTGGAACATATCGGCGGTGGCCAACTCGCCCGTATCACCTAACGCGGGTAATTTTGACGGTCAGCAA
V592 AY464052  .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232      .....C.....A..TT.G.....G.....
FR-53803     .....A..A.....A..T.....G.....

1840      1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910
Ab4 AY665713  ATTTCGCGTGACACGTTGCTGAAACTCGCCCGGAGAGAAATTTTCATTTTGCCAGACAACAGACGCCGGTTTGACAG
V592 AY464052  .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232      .....A..C.....C.....G.....
FR-53803     .....G.....C..A..C.....C.....G.....

```

Supplementary Figure S3 ORF30 nucleotide alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 the EHV-1 strain FR-56628 and the two EHV-1 reference strains Ab4 and V592 - 4/6.

	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990
Ab4 AY665713	TCAGGCAGACGCCGCGTCAGAGACTTCGGAGTTGGCTATGGATAGCCAAAGCCACGCCCTCGACAGTACAGACGAACCCG							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232	..A.....C..A....C...C...C.....A..AC.....A							
FR-53803	..A.....T...T....AGT...T...GC...C.....G.....A.....A..AC.....							
	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070
Ab4 AY665713	ACGGTGTGGACGGTACCCCGGACGCCGAGGATCTGGCGCTACTTCTGAAAACGGAGGCGGGAAGCCCGGCGTCGGGAGG							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232	.T.....A...TAA.....A.C....G.T...GG...G....T.....A.....C...A...							
FR-53803A.....A.....C.A...G.T.ATGG...G....T.....A.....C...A...							
	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150
Ab4 AY665713	GCCGTGGGCTACCAGGGAGCAAAGTTCTAGACCCCGTATCCGGCTTTCATGTGGACCCCGTGGTTGTGTTTGACTTCGC							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232G.....							
FR-53803T.....G.....A.....T.....							
	2160	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230
Ab4 AY665713	TAGCTTATACCCAAGCATTATCCAGGCCCATACCTCTGTTTCACCACCCCTGGCGCTCGATGAAGTGGATCTGGCCGGGC							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232C.....							
FR-53803C.....T..A.....A.....T.....							
	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310
Ab4 AY665713	TTCAACCATCCGTCGACTACTCGACGTTTCGAGGTGGGTGACCAAAAGTTATTTTTTGTCCACGCCCATATTTCGCGAAAGC							
V592 AY464052A.....							
FR-56628 MT968035C.....							
FR-1232							
FR-53803A..A..T.....T...G.....							
	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390
Ab4 AY665713	CTGCTTGGCATCTTGCTGCGCGACTGGCTGGCCATGCGAAAGGCGGTGAGGGCGGAATCCCCACCAGCACCCCGAGGA							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232T.C..C.....G.....G.....							
FR-53803A.....T.C..C.....G.....G.....							
	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470
Ab4 AY665713	GGCAGTTTTACTAGATAAGCAGCAGTCTGCGATTAAAGGTGATATGCAACTCGGTTACGGATTACGGGGGTGGCAAACG							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232C.....C..C.....							
FR-53803A.....C.....C..C.....							
	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550
Ab4 AY665713	GCCTGTTGCCGTGCTGAGGATAGCGGCTACCGTTACCACGATAGGACGCGACATGCTCCTCAAGACCCGAGATTACGTT							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232							
FR-53803T.....T.....							

Supplementary Figure S3 ORF30 nucleotide alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 the EHV-1 strain FR-56628 and the two EHV-1 reference strains Ab4 and V592 - 5/6.

	2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620	2630
Ab4 AY665713	CACTCTCGTTGGGCGACGCGGAGCTGCTGGAGGACAATTTCCAGGGGCTATAGGTTCCGAAACCACAAGCCTTACTC							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232C.....C..C.....							
FR-53803C..CC.T...C..A.....							
	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710
Ab4 AY665713	CGTCAGGGTTATCTACGGAGACACCGACTCCGTGTTTATCAAGTTTGTGGGCCTGACGTACGAGGGGGTATCGGAGCTGG							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232							
FR-53803A.....T.....							
	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790
Ab4 AY665713	GGGATGCTATGTCGCGTCAGATTTTCAGCGGACCTCTTTAGAGCGCCCATCAAAGTGGAGTGTGAGAAGACCTTTCAGCGA							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232	.A...A.....A.....G.....C.....C..C							
FR-53803	.A...A.....A.....A.....C.....							
	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870
Ab4 AY665713	CTGCTGCTGATCACCAAGAAGAAGTACATAGGTGTCATAAACGGGGGAAGATGCTCATGAAGGGGGTCGACCTGGTCCG							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232A.....T.....T.....A...A.....							
FR-53803	T.....A.....T.....A...A.....							
	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950
Ab4 AY665713	CAAAAATAACTGCTCTTTCATAAACTTGACGCGGACATCTGGTAGATCTTTTGTGTACGACGAGGATGTGGCCACGG							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232	...G.....G.....C.....G.....							
FR-53803	T..G.....G.....C.....G...T.....A.....							
	2960	2970	2980	2990	3000	3010	3020	3030
Ab4 AY665713	CGGCAGCAGAGGTGACAGACGTGCCTCCCGCAGAATGGGTGGGGCGCCGCTACCGAGCGGCTTTGACAAGTTTGGGCGA							
V592 AY464052A.....							
FR-56628 MT968035A.....							
FR-1232	...C.....T...G.....T...G..T.....							
FR-53803	...C.....T.....TT...G.....T..A..G.....							
	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110
Ab4 AY665713	GTGCTGGTAGAGGCGTACAACCGTATCACTGCCCCCAACTTGGACGTGCGCGAGTTCGTTATGACTGCTGAGCTGAGCCG							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232T.....A.....G...G.....							
FR-53803T.....A.....G...G.....A.....							
	3120	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190
Ab4 AY665713	CTCACCGAATCGTATACCAACAAGCGCCTGCCGCACCTCACCGTCTACTTTAAGCTCGCCATGAGGAATGAAGAACTGC							
V592 AY464052							
FR-56628 MT968035							
FR-1232	...G..T.....T.....							
FR-53803A.....T.....							

Supplementary Figure S3 ORF30 nucleotide alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 the EHV-1 strain FR-56628 and the two EHV-1 reference strains Ab4 and V592 - 6/6.

```

3200      3210      3220      3230      3240      3250      3260      3270
Ab4 AY665713 CCAGCGTAAAAGAGAGAATTCCGTATGTGATAGTTGCGCAGACCCGAGGCCGCGGAACGCGAAGCGGGTGTAGTAAACTCA
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....
FR-53803 .....A.....A.....A.....A.....

3280      3290      3300      3310      3320      3330      3340      3350
Ab4 AY665713 ATGCGCGGTACCGCCAAAACCCCGTGGTAACCAAGACCGCACGCCCCCAACCTAAACGCAAAGTGGTTTCCGACCT
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....C.....CC.....
FR-53803 .....T.....C.....CC.....AA.....A.....

3360      3370      3380      3390      3400      3410      3420      3430
Ab4 AY665713 CGCCGAAGACCCGACCTATGTTTCCGAGAATGACGTACCGCTAAACACAGACTACTATTTCTCCACCTGTTGGGTACCA
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....C.....T.....
FR-53803 .....A..G.....A.....C.....T.....

3440      3450      3460      3470      3480      3490      3500      3510
Ab4 AY665713 TAAGCGTGACCTTTAAGGCTCTATTTCGGAAATGATGTGAGAACACAGAAAATCTTTTAAAGCGGTTTATTCCGGAAACC
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....T.....G.....
FR-53803 .....C.....G.....

3520      3530      3540      3550      3560      3570      3580      3590
Ab4 AY665713 CCCACACAAGACCCCCACGAAAACCCAGGCACTGCTTGAGCGCGCCGGCTTTGAAAAGCTGACGCCCTTTACACCGGAGGA
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....T.....A.....G.....C.....
FR-53803 .....A.....T.....G.....T.....G.....A..C.....

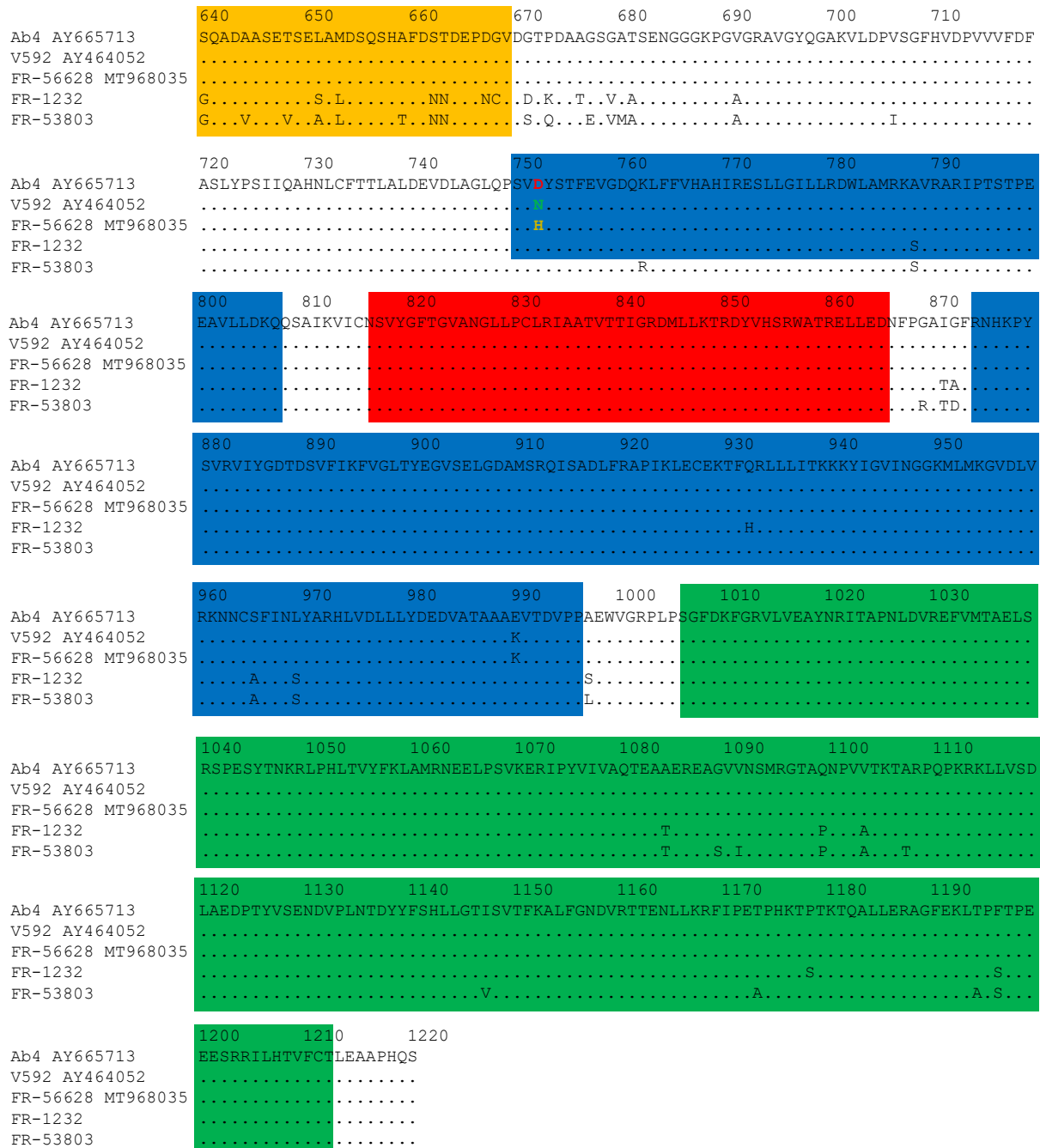
3600      3610      3620      3630      3640      3650      3660
Ab4 AY665713 AGAAAGTCGTGGAATACTGCATACAGTTTTTTGTACTCTAGAAGCAGCTCCCCATCAAAGCTGA
V592 AY464052 .....
FR-56628 MT968035 .....
FR-1232 .....
FR-53803 .....

```

Supplementary Figure S4 ORF30 amino acid alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 with the EHV-1 strain FR-56628 and two EHV-1 reference strains Ab4 and V592 – Predictive ORF30 amino acid sequence structure based on HSV-1 DNA polymerase structure is highlighted as follows: Pre-NH₂ domain in yellow, NH₂ domain in orange, 3'-5' exonuclease domain in pink, Palm domain in blue, Fingers domain in red and Thumb domain in green - 1/2.

	1	10	20	30	40	50	60	70	
Ab4 AY665713	MAAREQANSVRRSGFFNFPIGKRPFRRPGSGQTAETERPRPPQHSYCTEVGVSFKFIAPRCLDEEAPADQRRGVHVGTL								
V592 AY464052								
FR-56628 MT968035								
FR-1232S.....S.....K.....								
FR-53803S.....Y.....								
	80	90	100	110	120	130	140	150	
Ab4 AY665713	RPPKVYCDGSEYDVLNFASGGCWPRRIRVWNGQDFRGGFNPRPFERFHVYDIVETSESASHDDPSRFAELSRPSGVSVVT								
V592 AY464052								
FR-56628 MT968035								
FR-1232T.....D.A.C.....A.....								
FR-53803T.....D.TA.....Y.....A.....								
	160	170	180	190	200	210	220	230	
Ab4 AY665713	LGMSECGKRVAHVHYGVRHYFYMAKAEVDSACGITTEAELVRAMVDCAHSSALSAAALGNNGGKQSGGSGGWWGKHKVS								
V592 AY464052								
FR-56628 MT968035								
FR-1232S.....N..N.....								
FR-53803N..N.....								
	240	250	260	270	280	290	300	310	
Ab4 AY665713	ADCFKQVETVCHTTLLYYFGSKPALYYRVSASSRLGGFICDNFHEITKFEKGSVDVTTTRLLLDNENFTSFGWYRLRPGTHG								
V592 AY464052								
FR-56628 MT968035								
FR-1232								
FR-53803								
	320	330	340	350	360	370	380	390	
Ab4 AY665713	ERVQLRPVERHVTSSDVEINCTPDNLEPIPDEAAWPDYKLMCFDIECKAGTGNEMAFPVATNQEDLVIQISCLLYSLATQ								
V592 AY464052								
FR-56628 MT968035								
FR-1232D.....								
FR-53803								
	400	410	420	430	440	450	460	470	
Ab4 AY665713	NHEHTLLFSLGSCDISEEYSFACVQRGEPRPTVLEFDSEYELLVAFLLFLKQYSPEFATGYNIVNFDWAYIVNKVTSVYN								
V592 AY464052								
FR-56628 MT968035								
FR-1232	K.....T.....								
FR-53803	K.....T.....								
	480	490	500	510	520	530	540	550	
Ab4 AY665713	IKLDGYGKFNKGGLFKVWDIATNHFQKSKVKINGLISLDMYSVATEKLEKLPYKLDVAVGVDLGEHKIDLPYKEIPSY								
V592 AY464052								
FR-56628 MT968035								
FR-1232								
FR-53803								
	560	570	580	590	600	610	620	630	
Ab4 AY665713	AGGPDRRGVIGEYCIQDSRLVGKLFKYLPHLELSAVAKLARITLTRVIFDGQQIRVYTCLLKLARERNFILPDNRRRFD								
V592 AY464052								
FR-56628 MT968035								
FR-1232								
FR-53803								

Supplementary Figure S4 ORF30 amino acid alignment of the newly isolated strains FR-1232 and FR-53803 with the EHV-1 strain FR-56628 and two EHV-1 reference strains Ab4 and V592 – Predictive ORF30 amino acid sequence structure based on HSV-1 DNA polymerase structure is highlighted as follows: Pre-NH₂ domain in yellow, NH₂ domain in orange, 3'-5' exonuclease domain in pink, Palm domain in blue, Fingers domain in red and Thumb domain in green - 2/2.



Supplementary Table S5 Sample information for the screening of EHV-8 strains. EHV-8 strains are underlined. N.D = not determined - 1/5.

Sample ID	Sample Type	EHV identified	Host
Sample 1	Lung	EHV-1	Horse
Sample 2	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 3	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 4	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 5	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 6	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 7	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 8	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 9	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 10	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 11	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 12	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 13	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 14	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 15	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 16	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 17	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 18	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 19	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 20	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 21	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 22	Pleural fluid	EHV-1	Horse
Sample 23	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 24	Liver + Lung	<u>EHV-8</u>	Donkey
Sample 25	Placenta	EHV-1	Donkey
Sample 26	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 27	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 28	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 29	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 30	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 31	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 32	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 33	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 34	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 35	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 36	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 37	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 38	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 39	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 40	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 41	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 42	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 43	Liver + Lung	EHV-1	Horse

Supplementary Table S5 Sample information for the screening of EHV-8 strains. EHV-8 strains are underlined. N.D = not determined - 2/5.

Sample ID	Sample Type	EHV identified	Host
Sample 44	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 45	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 46	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 47	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 48	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 49	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 50	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 51	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 52	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 53	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 54	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 55	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 56	Nasal Swab	N.D.	Horse
Sample 57	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 58	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 59	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 60	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 61	Liver	EHV-1	Horse
Sample 62	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 63	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 64	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 65	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 66	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 67	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 68	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 69	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 70	Organs	EHV-1	Horse
Sample 71	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 72	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 73	Nasal Swab	EHV-1	Horse
Sample 74	Nasal Swab	N.D.	Horse
Sample 75	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 76	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 77	Liver	EHV-1	Horse
Sample 78	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 79	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 80	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 81	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 82	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 83	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 84	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 85	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 86	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 87	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 88	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 89	Liver + Lung	EHV-1	Horse

Supplementary Table S5 Sample information for the screening of EHV-8 strains. EHV-8 strains are underlined. N.D = not determined - 3/5.

Sample ID	Sample Type	EHV identified	Host
Sample 90	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 91	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 92	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 93	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 94	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 95	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 96	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 97	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 98	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 99	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 100	Lung	EHV-1	Horse
Sample 101	Spleen	EHV-1	Horse
Sample 102	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 103	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 104	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 105	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 106	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 107	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 108	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 109	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 110	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 111	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 112	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 113	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 114	Liver	EHV-1	Horse
Sample 115	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 116	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 117	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 118	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 119	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 120	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 121	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 122	Nasal Swab	EHV-1	Horse
Sample 123	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 124	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 125	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 126	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 127	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 128	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 129	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 130	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 131	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 132	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 133	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 134	Nasal Swab	EHV-1	Horse
Sample 135	Nasal Swab	<u>EHV-8</u>	Donkey

Supplementary Table S5 Sample information for the screening of EHV-8 strains. EHV-8 strains are underlined. N.D = not determined - 4/5.

Sample ID	Sample Type	EHV identified	Host
Sample 136	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 137	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 138	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 139	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 140	Nasal Swab	<u>EHV-8</u>	Donkey
Sample 141	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 142	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 143	Liver	EHV-1	Horse
Sample 144	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 145	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 146	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 147	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 148	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 149	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 150	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 151	Liver	EHV-1	Horse
Sample 152	Nasal Swab	EHV-1	Horse
Sample 153	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 154	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 155	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 156	Nasal Swab	EHV-1	Horse
Sample 157	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 158	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 159	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 160	Liver + Lung	N.D.	Horse
Sample 161	Nasal Swab	EHV-1	Horse
Sample 162	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 163	Liver + Lung	EHV-1	Horse
Sample 164	Nasal Swab	N.D.	Horse
Sample 165	Nasal Swab	<u>EHV-8</u>	Donkey
Sample 166	DNA	EHV-2	Donkey
Sample 167	Lung	EHV-1	Horse
Sample 168	Nasal Swab	N.D.	Horse
Sample 169	Lung	EHV-1	Horse
Sample 170	Lung	EHV-1	Horse
Sample 171	Lung	EHV-1	Horse
Sample 172	Lung	EHV-1	Horse
Sample 173	Lung	N.D.	Horse
Sample 174	Lung	EHV-1	Horse
Sample 175	Lung	EHV-1	Horse
Sample 176	Lung	EHV-1	Horse
Sample 177	Lung	EHV-1	Horse
Sample 178	Lung	EHV-1	Horse

Supplementary Table S5 Sample information for the screening of EHV-8 strains. EHV-8 strains are underlined. N.D = not determined - 5/5.

Sample ID	Sample Type	EHV identified	Host
Sample 179	Lung	EHV-1	Horse
Sample 180	Lung	EHV-1	Horse
Sample 181	Lung	EHV-1	Horse
Sample 182	Lung	EHV-1	Horse
Sample 183	Lung	EHV-1	Horse
Sample 184	Lung	EHV-1	Horse
Sample 185	Lung	EHV-1	Horse
Sample 186	Lung	EHV-1	Horse
Sample 187	Lung	N.D.	Horse
Sample 188	Lung	EHV-1	Horse
Sample 189	Lung	EHV-1	Horse
Sample 190	Lung	EHV-1	Horse
Sample 191	Lung	EHV-1	Horse
Sample 192	Lung	EHV-1	Horse
Sample 193	Lung	EHV-1	Horse
Sample 194	Lung	EHV-1	Horse
Sample 195	Lung	EHV-1	Horse
Sample 196	Lung	EHV-1	Horse
Sample 197	Lung	EHV-1	Horse
Sample 198	Lung	EHV-1	Horse
Sample 199	Lung	EHV-1	Horse
Sample 200	Lung	EHV-1	Horse

Supplementary Figure S6 Nucleotide alignment of PCR 1 amplicons in comparison with EHV-1 strains Ab4 and V592, and EHV-8 strain Wh - 1/4.

```
AY665713 Ab4  ACGATAGGACGCGACATGCTCCTCAAGACCCGAGATTACGTTCACTCTCGTTGGGCGACGCGAGCTGCTGGAGGACAATTTCCAGGGCTATAGGTTCCGAAACCACAAGCCTTACTCCGTCAGGGTTAT
AY464052 V592  .....
EHV-8 Wh      .....T.....T.....C..CC.T...C..A...A.....
Sample 1      .....
Sample 2      .....
Sample 3      .....
Sample 4      .....
Sample 5      .....
Sample 6      .....
Sample 7      .....
Sample 8      .....
Sample 9      .....
Sample 10     .....
Sample 11     .....
Sample 12     .....
Sample 13     .....
Sample 14     .....
Sample 15     .....
Sample 16     .....
Sample 17     .....
Sample 18     .....
Sample 19     .....
Sample 20     .....
Sample 21     .....
Sample 22     .....
Sample 23     -----
Sample 24     .....T.....T.....C..CC.T...C..A...A.....
Sample 25     -----
Sample 26     .....
Sample 27     .....
Sample 28     .....
Sample 29     .....
Sample 30     .....
Sample 31     .....
Sample 32     .....
Sample 33     .....
Sample 34     .....
Sample 35     .....
Sample 36     .....
Sample 37     .....
Sample 38     .....
Sample 39     .....
Sample 40     .....
Sample 41     .....
Sample 42     .....
Sample 43     .....
Sample 44     .....
Sample 45     .....
Sample 46     .....
Sample 47     .....
Sample 48     .....
Sample 49     .....
Sample 50     .....
```

Supplementary Figure S6 Nucleotide alignment of PCR 1 amplicons in comparison with EHV-1 strains Ab4 and V592, and EHV-8 strain Wh - 2/4.

```

AY665713 Ab4 ACGATAGGACGCGACATGCTCCTCAAGACCCGAGATTACTTCACTCTCGTTGGGCGACGCGAGCTGCTGGAGGACAATTTCCAGGGGCTATAGGTTTCCGAAACCACAAGCCTTACTCCGTCAGGGTTAT
AY464052 V592 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
EHV-8 Wh .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 51 .....
Sample 52 .....
Sample 53 .....
Sample 54 .....
Sample 55 .....
Sample 56 .....--.....-.....
Sample 57 .....
Sample 58 .....
Sample 59 .....
Sample 60 .....
Sample 61 .....
Sample 62 .....
Sample 63 .....
Sample 64 .....
Sample 65 .....
Sample 66 .....
Sample 67 .....
Sample 68 .....
Sample 69 .....
Sample 70 .....
Sample 71 .....
Sample 72 .....
Sample 73 .....
Sample 74 No sequence
Sample 75 .....
Sample 76 .....
Sample 77 .....
Sample 78 .....
Sample 79 .....
Sample 80 No sequence
Sample 81 .....
Sample 82 .....
Sample 83 .....
Sample 84 No sequence
Sample 85 .....
Sample 86 No sequence
Sample 87 .....
Sample 88 .....
Sample 89 .....
Sample 90 No sequence
Sample 91 .....
Sample 92 .....
Sample 93 .....
Sample 94 .....
Sample 95 .....
Sample 96 .....
Sample 97 .....
Sample 98 .....
Sample 99 .....
Sample 100 .....

```


Supplementary Figure S6 Nucleotide alignment of PCR 1 amplicons in comparison with EHV-1 strains Ab4 and V592, and EHV-8 strain Wh - 3/4.

```
AY665713 Ab4 ACGATAGGACGCGACATGCTCCTCAAGACCCGAGATTACGTTCACTCTCGTTGGGCGACGCGGAGCTGCTGGAGGACAATTTCCAGGGCTATAGGTTTCCGAAACCACAAGCCTTACTCCGTCAGGGTTAT
AY464052 V592 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
EHV-8 Wh .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 101 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 102 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 103 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 104 No sequence
Sample 105 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 106 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 107 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 108 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 109 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 110 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 111 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 112 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 113 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 114 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 115 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 116 No sequence
Sample 117 No sequence
Sample 118 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 119 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 120 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 121 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 122 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 123 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 124 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 125 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 126 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 127 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 128 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 129 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 130 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 131 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 132 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 133 No sequence
Sample 134 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 135 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 136 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 137 No sequence
Sample 138 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 139 No sequence
Sample 140 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 141 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 142 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 143 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 144 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 145 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 146 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 147 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 148 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 149 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
Sample 150 .....T.....T.....C..CC.T...C..A....A.....
```

Supplementary Figure S6 Nucleotide alignment of PCR 1 amplicons in comparison with EHV-1 strains Ab4 and V592, and EHV-8 strain Wh - 4/4.

```
AY665713 Ab4 ACGATAGGACGCGACATGCTCCTCAAGACCCGAGATTACGTTCACTCTCGTTGGGCGACGCGAGCTGCTGGAGGACAATTTCCAGGGGCTATAGGTT-TCCGAAACCACAAGCCTTACTCCGTCAGGGTTAT
AY464052 V592 .....
EHV-8 Wh .....T.....T.....C..CC.T....C..A..-..A.....
Sample 151 .....
Sample 152 .....
Sample 153 .....
Sample 154 .....
Sample 155 No sequence
Sample 156 .....
Sample 157 .....
Sample 158 .....
Sample 159 .....
Sample 160 No sequence
Sample 161 .....
Sample 162 .....
Sample 163 .....
Sample 164 No sequence
Sample 165 .....T.....T.....C..CC.T....C..A..-.....
Sample 166 T.C.GG.C.G...-.....GGAG-.ACT..A..---.C.-.ATAGAGG...T...C.C...GG....CA...-..A..GGGCA...GG---.GGAGT.CGC..C.G.TG.CAGT.---T.A...C..
Sample 167 .....
Sample 168 No sequence
Sample 169 .....
Sample 170 .....
Sample 171 .....
Sample 172 .....
Sample 173 No sequence
Sample 174 .....
Sample 175 .....
Sample 176 .....
Sample 177 .....
Sample 178 .....
Sample 179 .....
Sample 180 .....
Sample 181 .....
Sample 182 .....
Sample 183 .....
Sample 184 .....
Sample 185 .....
Sample 186 .....
Sample 187 No sequence
Sample 188 .....
Sample 189 .....
Sample 190 .....
Sample 191 .....
Sample 192 .....
Sample 193 .....
Sample 194 .....
Sample 195 .....
Sample 196 .....
Sample 197 .....
Sample 198 .....
Sample 199 .....
```

Supplementary Figure S7 Nucleotide sequence alignment of two EHV-1 reference strains (Ab4 and V592) and five EHV-8 strains (Wh, EHV-8/IR/2015/40, EHV-8/IR/2010/16, EHV-8/IR/2010/47, EHV-8/IR/2003/19) with Allen *et al.* 2007 primers and probe for ORF30 mutation in position 2254. Primers and probe sequences are noted in red and corresponding alignments are highlighted in grey.



En préparation

Discussion

Cette étude a permis la caractérisation de deux souches d'alphaherpèsvirus (EHV-8 et EHV-9) ainsi que leur comparaison avec la souche d'EHV-1 décrite précédemment (Chapitre 3 A.b) et portant le génotype C₂₂₅₄/H₇₅₂. Cette souche a été isolée en France lors d'un épisode infectieux affectant des chevaux qui ont, pour certains, développé des signes neurologiques (Paillot *et al.* 2020; Sutton *et al.* 2020). Une première souche d'alphaherpèsvirus a été isolée chez un zèbre de Grévy et a été identifiée comme étant une souche d'EHV-9 (FR-1232) sur la base du séquençage de l'ORF30. Une seconde souche d'alphaherpèsvirus a été isolée chez un âne. Initialement identifiée comme étant une souche d'EHV-1 par l'outil de PCR en temps réel développé en 2006 par Diallo *et al.* (Diallo *et al.* 2006), le séquençage de l'ORF30 a montré une plus forte homologie de séquence avec des souches référencées d'EHV-8 qu'avec des souches référencées d'EHV-1. Ce phénomène avait déjà été rapporté par Garvey *et al.* (2018) chez deux souches d'EHV-8 isolées à partir d'avortons de juments et initialement identifiées comme souches d'EHV-1 (Garvey *et al.* 2018). Cette souche d'EHV-8 (FR-53803) a par ailleurs montré des mésappariements sur cinq des neuf amorces utilisées pour le séquençage complet de l'ORF30 et initialement désignées pour l'EHV-1, sans pour autant que cela ne gêne le séquençage. Ces différentes observations illustrent la complexité du développement d'outils discriminants dans ce cas d'alphaherpèsvirus génétiquement proches. L'analyse par séquençage (fragment de 134 pb de l'ADN polymérase) de 199 échantillons identifiés par PCR comme positifs pour l'EHV-1, a permis d'identifier quatre souches isolées chez des ânes montrant une forte homologie avec la souche de référence Wh et de les identifier comme souches d'EHV-8. En incluant l'échantillon ayant permis l'isolement de la souche FR-53803, 7 des échantillons de cette étude ont été prélevés chez des ânes. Ainsi, 71,42 % (5/7) des alphaherpèsvirus identifiés chez les ânes de cette étude étaient des EHV-8. Une étude complémentaire pourrait s'intéresser à la recherche de souches latentes d'EHV-8 au sein de plusieurs populations d'ânes et de chevaux, ou encore à la recherche d'anticorps neutralisants spécifiques de l'EHV-8 afin d'estimer la prévalence de ce virus chez ces équidés. L'EHV-8 ayant déjà été décrit comme franchissant la barrière de l'espèce (Liu *et al.* 2012; Garvey *et al.* 2018), une telle recherche permettrait également de mieux mesurer le danger que ce virus pourrait représenter pour les espèces équines partageant les mêmes pâturages que les ânes, comme c'est le cas pour les chevaux. Le franchissement de la barrière de l'espèce par l'EHV-1 a également été mis en lumière dans cette étude, puisque que parmi les 199 échantillons analysés, une souche d'EHV-1 a été isolée chez un âne. Aucun EHV-9

n'a été identifié dans cette recherche, ce qui pourrait s'expliquer par une absence d'amplification de l'EHV-9 par le système PCR développé par Diallo *et al.* (2006), comme suggéré *in silico* par les polymorphismes observés entre la séquence du gène de la gB de la souche de référence EHV-9 P19 et ce système PCR (amorce sens et sonde). Cela pourrait aussi s'expliquer par le fait que les 199 échantillons testés étaient issus de chevaux ou d'ânes. Malgré le large spectre d'hôte de l'EHV-9, des infections naturelles n'ont, à notre connaissance, pas encore été rapportées chez l'âne et le cheval. Son absence parmi des échantillons issus d'âne et de chevaux ne serait donc pas surprenante.

Ces résultats ainsi que l'isolement récent d'une souche d'EHV-1 portant le génotype C₂₂₅₄ (H₇₅₂) non ciblé par la PCR de typage développée par Georges Allen en 2007 (Allen 2007), soulignent l'importance de la surveillance des souches sur le terrain. Bien que l'apparition de nouveaux variants soit moins fréquente chez les virus à ADN que chez les virus à ARN, leur surveillance repose sur l'amélioration continue des outils permettant leur détection. Alors que le développement d'une nouvelle sonde a permis de typer avec succès la souche récemment isolée d'EHV-1 portant le génotype C₂₂₅₄ (H₇₅₂) dans le cadre de ces travaux de thèse, le design de nouvelles amorces a permis de discriminer avec succès 3/3 souches d'EHV-8.

L'alignement des séquences de l'ORF30 des souches FR-1232 (EHV-9), FR-53803 (EHV-8), FR-56628 (EHV-1, C₂₂₅₄/H₇₅₂) et des souches d'EHV-1 de référence Ab4 et V592, a permis de montrer l'hétérogénéité de ces alphaherpèsvirus sur ce gène. La structure de l'ADN polymérase de l'EHV-1 étant considérée comme proche de celle de l'HSV-1, les domaines structuraux de cette dernière ont été reportés sur la séquence protéique des différents alphaherpèsvirus étudiés. Les différences en acides aminés étaient observables dans tous les domaines à l'exception du domaine des doigts, et étaient particulièrement concentrés au niveau des domaines Pre-NH₂, NH₂, de la paume et du pouce. L'hétérogénéité des souches a également été mise en lumière par l'analyse phylogénique. Le réseau phylogénique réticulé construit à partir des séquences de l'ORF30 a montré que les souches d'EHV-1, d'EHV-8 et d'EHV-9 se classaient distinctement les unes par rapport aux autres, mais semblaient phylogéniquement plus proches entre-elles que des souches d'EHV-4 et d'EHV-3 incluses dans l'analyse. Il est intéressant de noter qu'à l'inverse d'une étude menée par Kolb *et al.* (2017) sur le génome complet des *Varicellovirus*, les séquences de l'ORF30 montrent une plus grande proximité entre l'EHV-1 et l'EHV-9 qu'entre l'EHV-1 et l'EHV-8 (Kolb *et al.*

2017). Trois souches d'EHV-1 isolées soit chez des zèbres (T-616 et Ca-Lung KC924786) ou chez un onagre (T-529 10/84) se sont distinguées des autres souches d'EHV-1 isolées chez des chevaux. La souche Ca-Lung (KC924786) s'est d'ailleurs positionnée aux côtés des souches d'EHV-9 analysées dans cette étude. Cette diversité de souches d'EHV-1 selon leur isolement chez un hôte naturel ou non-naturel, a déjà été mise en évidence par Abdelgawad *et al.* (2016) et Garvey *et al.* (2018), alors que les souches d'EHV-8 et EHV-9 semblent pour leur part se regrouper indépendamment de leur hôte (Abdelgawad *et al.* 2016; Garvey *et al.* 2018). La construction du réseau phylogénique a également suggéré de possibles événements de recombinaison entre les différents alphaherpèsvirus. Ces phénomènes de recombinaison ont déjà été suggérés au travers d'une étude menée sur le génome complet des *Varicellovirus*, au sein desquels sont classés les alphaherpèsvirus des équidés (Kolb *et al.* 2017). Plusieurs outils incluant la construction d'arbres phylogéniques (selon la méthode de maximum de vraisemblance), de réseaux phylogéniques, l'étude du contenu G+C et du biais d'usage des codons, et l'analyse statistique « Pairwise Homoplasy Index » (PHI) ont permis aux auteurs de soumettre une possible recombinaison chez les varicellovirus des ongulés. Les co-infections ainsi que la caractéristique commune des alphaherpèsvirus à établir leur latence dans les neurones sont deux paramètres favorables à la recombinaison (Borchers *et al.* 2008). Allant dans ce sens, un événement de recombinaison entre l'EHV-1 et l'EHV-9 a initialement été suspecté par Greenwood *et al.* (2012) chez une souche d'EHV-1 de type « zebra borne » sur la base de la séquence de l'ORF30. Il n'a cependant pas été confirmé par Guo *et al.* (2014) (Greenwood *et al.* 2012; Guo *et al.* 2014). Abdelgawad *et al.* (2016) ont pu mettre en évidence des phénomènes de co-infection par l'EHV-1 et l'EHV-9 chez des zèbres en captivité, une condition qui pourrait être propice à la recombinaison (Abdelgawad *et al.* 2016). En ce qui concerne la mutation en position 2 254 de l'ORF30, les deux souches FR-1232 (EHV-9) et FR-53803 (EHV-8) isolées dans cette étude sont de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂). Ce génotype, qualifié d'ancestral par Nugent *et al.* (2006) de par sa grande conservation parmi les herpèsvirus de mammifères, est d'ailleurs le seul génotype identifié à ce jour chez ces deux types d'alphaherpèsvirus neurotropes contrairement à l'EHV-1 pour lequel trois génotypes ont pu être identifiés, soit le génotype, A₂₂₅₄ (N₇₅₂), le génotype G₂₂₅₄ (D₇₅₂) et plus récemment le génotype C₂₂₅₄ (H₇₅₂) (Nugent *et al.* 2006; Paillot *et al.* 2020; Sutton *et al.* 2020).

Pour finir, l'analyse *in vitro* de sept molécules antivirales (ganciclovir (GCV), valganciclovir (VGCV), décitabine (DTB), idoxuridine (IDX), pritélivir (BAY), aciclovir

(ACV) et aphidicoline (APD)) a été réalisée contre les souches FR-1232 (EHV-9), FR-53803 (EHV-8) et la souche FR-56628 (EHV-1, C₂₂₅₄/H₇₅₂) décrite précédemment (Chapitre 3, partie A.b). La majorité de ces molécules ciblent l'ADN polymérase. Une mauvaise reproductibilité des résultats obtenus contre la souche d'EHV-9 FR-1232 a été observée pour les sept molécules antivirales et a rendu difficile l'analyse statistique et l'interprétation des résultats obtenus. Cette difficulté rencontrée pourrait s'expliquer par le modèle utilisé. Ce modèle sur cellules EEK a été mis au point et validé pour l'EHV-1 (Thieulent *et al.* 2020a, 2020b). Si la souche FR-1232 (EHV-9) semble se répliquer sur les cellules EEK, le modèle tel qu'il a été mis au point n'est peut-être pas adapté à une mesure optimale de l'efficacité de molécules antivirales contre cet alphaherpèsvirus. Des tests préliminaires sur cellules E.Derm et non décrits dans cette étude, n'ont pas permis de mener à bien l'étude de molécules antivirales contre les souches FR-1232 et FR-53803 appuyant cette hypothèse en lien avec le modèle cellulaire. Par ailleurs, sachant que toutes les molécules testées ciblent l'ADN polymérase, à l'exception du pritélivir, il pourrait être suggéré que les différences observées sur la séquence protéique de l'ORF30 de la souche d'EHV-9 FR-1232 en comparaison avec l'EHV-1 notamment, aient contribué à une différence de réponse de la souche. Cependant, une telle variabilité a aussi pu être observée sur la séquence protéique de l'ORF30 de la souche d'EHV-8 FR-53803, sans que cela ne contraigne les tests antiviraux réalisés sur cette souche. Si les séquences d'ORF30 avaient montré dans notre étude une plus grande divergence entre les souches d'EHV-1 et d'EHV-8 qu'entre celles d'EHV-1 et d'EHV-9, rappelons que sur génome complet, Kolb *et al.* (2017) ont montré l'inverse. Ceci pourrait suggérer que la similarité des réponses *in vitro* des souches d'EHV-1 et d'EHV-8 aux molécules antivirales soit le reflet de leur plus grande proximité génétique.

L'aphidicoline, déjà identifiée comme particulièrement efficace contre l'EHV-1 par Thieulent *et al.* (2020) ainsi que lors de la caractérisation de la souche FR-56628 (Chapitre 3 A.b), s'est également montrée très efficace contre l'EHV-8 (Sutton *et al.* 2020; Thieulent *et al.* 2020a, 2020b). Elle semble également montrer une bonne efficacité contre l'EHV-9. L'effet de l'aphidicoline sur les souches d'EHV-1 selon leur génotype en position 2254 avait fait l'objet de deux études dans lesquelles les mutants et révertants N/D₇₅₂ de deux souches d'EHV-1 avaient répondu différemment à l'aphidicoline (Goodman *et al.* 2007; Van de Walle *et al.* 2009). Lors de la caractérisation de la souche FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂, Chapitre 3 A.b), aucune différence significative de sensibilité à l'aphidicoline n'avait été observée entre cette souche et deux autres souches de profil A₂₂₅₄/N₇₅₂ et G₂₂₅₄/D₇₅₂ (Sutton *et al.* 2020; Thieulent

et al. 2020a, 2020b). Seule les réponses des souches FR-53803 (EHV-8) et FR-56628 (EHV-1, C₂₂₅₄/H₇₅₂) ont pu être comparées dans cette nouvelle étude et n'ont pas montré de différence significative. L'aciclovir s'est avéré être le composé le moins efficace contre les souches d'EHV-1 (EC₅₀ > 20µM) et d'EHV-8 (EC₅₀ > 100µM). Le ganciclovir et le valganciclovir, qui sont deux molécules parmi les plus efficaces contre l'EHV-1, (Thieulent *et al.* 2020a, 2020b) ont également montré de faibles EC₅₀ contre les souches FR-53803 (EHV-8) et FR-56628 (EHV-1, C₂₂₅₄/H₇₅₂) sans différence significative entre les deux souches. Même si les valeurs obtenues pour la souche FR-1232 (EHV-9) n'ont pas été incluses dans l'analyse statistique, il semble que cette dernière a, elle aussi, relativement bien répondu aux deux molécules. Ces données sont encourageantes dans la mesure où le valganciclovir, qui est la prodrogue du ganciclovir, est considéré comme un candidat thérapeutique contre l'EHV-1. Une étude expérimentale a d'ailleurs été menée par Thieulent *et al.* (soumis à la publication) au cours de laquelle 8 poneys ont été infectés par la souche FR-56628 (C₂₂₅₄/H₇₅₂) puis traités ou non avec le valganciclovir. Cette étude expérimentale a permis de montrer une réduction des signes cliniques induits par la souche d'EHV-1 dans le groupe de poneys traités. La bonne réponse *in vitro* de l'EHV-8 et à priori de l'EHV-9 à cette molécule laisse supposer que le valganciclovir pourrait aussi être un candidat thérapeutique lors d'infections par ces deux virus. Cette étude est, à notre connaissance, la première investiguant l'effet *in vitro* de sept molécules antivirales contre deux souches d'EHV-8 et d'EHV-9 en comparaison à une souche d'EHV-1, ces premiers résultats devront donc être confirmés sur d'autres souches isolées sur le terrain.

Ce premier chapitre, porté sur l'analyse moléculaire de souches d'EHV-1 mais également d'alphaherpèsvirus des équidés proches de ce virus, a permis à la manière d'une enquête de terrain de mieux connaître le profil génétique des souches circulant en France. Ce profil génétique a pu être étudié à l'aide de trois outils montrant des intérêts et des limites différents. Aux détours de cette enquête, trois souches ont attiré notre attention et ont été davantage caractérisées. Si l'ensemble des études présentées dans ce chapitre a grandement illustré l'intérêt du suivi et de la caractérisation des souches sur le terrain, un autre suivi est lui aussi primordial et concerne cette fois l'hôte et les moyens de défense dont il dispose pour se protéger. La seconde partie du Chapitre 3 de ce manuscrit portera ainsi sur la mise au point d'une méthode de séroneutralisation en temps-réel qui permettra l'analyse de la production d'anticorps neutralisants spécifiques de l'EHV-1 en réponse à une campagne de vaccination chez trois groupes de chevaux.

B. Amélioration de l'outil de séroneutralisation pour l'analyse de la production d'anticorps neutralisants après infection par l'EHV-1 ou vaccination contre l'EHV-1 et l'EHV-4 (Article 4)

Introduction

Les études présentées précédemment en Parties A.a, A.b et A.c de ce Chapitre 3 ont montré l'intérêt du suivi et de la caractérisation des souches sur le terrain. Ce suivi, en plus de permettre l'amélioration des outils moléculaires de détection, permet également d'apporter de nouveaux éléments concernant les souches et leurs caractéristiques. Il ne peut cependant se faire qu'au moment de l'apparition d'épisodes infectieux et n'est donc pas directement impliqué dans la prévention de ces derniers. En revanche, de manière indirecte, le suivi moléculaire des souches présente un intérêt quant à la vigilance à adopter face à de potentielles réactivations, à la suite d'épisodes abortifs et nerveux notamment. Un autre type de suivi est donc nécessaire pour la prévention de l'apparition d'épisodes infectieux liés à l'EHV-1. Il s'agit du suivi du statut immunitaire des chevaux sur le terrain. Outre l'infection naturelle qu'il est souhaitable d'éviter autant que possible, un moyen préventif répandu permettant de stimuler une immunité spécifique d'un pathogène chez son hôte est la vaccination.

Une des stratégies de l'EHV-1, après avoir infecté les cellules de l'épithélium respiratoire, est d'infecter les PBMCs dans les tissus lymphoïdes de son hôte. Cela permet ensuite sa dissémination au sein de l'organisme de l'hôte par la circulation sanguine (Kydd *et al.* 1994). Cette stratégie lui permet ainsi d'échapper aux anticorps neutralisants produits par la réponse immunitaire humorale induite lors des premiers cycles de réplication au niveau de l'épithélium respiratoire. La neutralisation du virus dépend alors principalement de la réponse immunitaire cellulaire (pour revue, Kydd, Townsend and Hannant 2006). L'efficacité d'un vaccin contre l'EHV-1 repose donc sur sa capacité à stimuler à la fois la réponse immunitaire humorale et la réponse immunitaire cellulaire. Les deux types de vaccins commercialisés de nos jours sont respectivement à base de souches virales inactivées ou de virus vivant modifié (MLV). Les premiers stimulent principalement la réponse immunitaire humorale, alors que les seconds semblent mieux parvenir à stimuler la réponse immunitaire cellulaire sans pour autant qu'aucun de ces deux types de vaccins ne permette une protection complète contre l'installation de la virémie cellulaire suite à une infection par l'EHV-1 (Foote *et al.* 2002; Goodman *et al.* 2006, 2012; pour revue, Rosas *et al.* 2006; Goehring *et al.* 2010; Bannai *et al.*

2019; Attili *et al.* 2020). Une étude menée par Goodman *et al.* (2012) sur 47 chevaux régulièrement vaccinés par le vaccin vivant atténué Rhinomune® (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc) ou non vaccinés a permis d'étudier les différents paramètres de la réponse humorale et de la réponse cellulaire des différents profils de chevaux. Parmi les chevaux vaccinés, 19 avaient préalablement survécu à un fort épisode neurologique. Les conclusions de cette étude ont été multiples. D'une part, en comparaison avec les résultats obtenus par Sobol Hussey *et al.* (2011) pour le même type d'investigation après une infection expérimentale, il semble que le profil des isotypes d'IgG stimulés après une infection naturelle soit plus varié qu'après une infection expérimentale, et que le niveau de réponse de ces isotypes soit plus faible après vaccination (Soboll Hussey *et al.* 2011; Goodman *et al.* 2012). Les auteurs ont également mis en évidence une réponse cellulaire par la voie Th1 (Th1 pour lymphocytes T helper 1, voie impliquant les lymphocytes T CD8+) plus élevée chez les chevaux ayant survécu à l'épisode neurologique montrant l'importance de cette voie dans le contrôle de la virémie cellulaire de l'EHV-1 (Goodman *et al.* 2012).

En termes de signes cliniques, les vaccins commercialisés bien que partiellement efficaces, semblent permettre de diminuer l'intensité et la durée des signes cliniques respiratoires et de réduire le risque d'avortement. C'est ce que montre, par exemple, une étude menée par Heldens *et al.* en 2001 au cours de laquelle 30 poulains sevrés et 9 juments gestantes ont été intégrés dans une campagne de vaccination suivie d'un challenge infectieux. Des groupes contrôles ont été constitués chez les poulains et les juments gestantes. Les poulains, vaccinés ou non, ont ensuite subi un challenge infectieux soit par l'EHV-1 soit par l'EHV-4. Les juments gestantes ont également subi un challenge infectieux mais uniquement par l'EHV-1 avec l'inoculation d'une souche hautement abortive. A l'issue de cette étude, les animaux vaccinés ont montré une atténuation des signes cliniques lors du challenge infectieux et une réduction de l'excrétion virale en charge et en durée en comparaison avec le groupe contrôle infecté également. La souche abortive a par ailleurs montré une incidence moindre sur les juments vaccinées que sur le groupe contrôle (Heldens *et al.* 2001). D'autres études similaires ont permis d'évaluer l'effet de vaccins inactivés commercialisés ou de vaccins vivants atténués commercialisés ou non et de montrer une stimulation de la production d'anticorps neutralisants de courte durée de vie (incluant les IgA muqueux contribuant à limiter l'excrétion virale dans le cas du vaccin vivant Rhinomune®). Elles ont également permis de corréler la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire avec le niveau de protection. Une meilleure réponse aux vaccins inactivés en comparaison aux vaccins vivants

atténués lorsque les chevaux étaient ensuite soumis à des challenges expérimentaux a ainsi été mise en évidence ainsi que l'effet controversé de multiples injections trop rapprochées dans le temps (Ellis *et al.* 1997; Sheoran *et al.* 2000; Breathnach *et al.* 2001; Patel *et al.* 2003a, 2003b; Goodman *et al.* 2006; Holmes *et al.* 2006; Paillot *et al.* 2006; Goehring *et al.* 2010; Bresgen *et al.* 2012; Wagner *et al.* 2015). L'efficacité de ces types de vaccins contre la forme nerveuse de maladie est difficile à étudier. Cela provient notamment du fait que les paramètres impliqués dans l'établissement de la myéloencéphalopathie sont encore mal connus, rendant difficile l'interprétation d'une absence de signes neurologiques à l'issue d'une infection expérimentale. Une étude menée par Goodman *et al.* en 2006 sur 15 chevaux âgés de 3 à 10 ans, a cependant montré une absence de signes neurologiques chez des chevaux vaccinés par un vaccin vivant atténué (Rhinomune ®), en comparaison à des groupes de chevaux vaccinés par un vaccin inactivé (vaccin combiné Fluvac Innovator 6, Fort Dodge) ou non vaccinés, qui ont présentés des signes neurologiques (Goodman *et al.* 2006). Des données issues de cette étude ont permis aux auteurs de suggérer qu'il semblait possible que le vaccin inactivé ait stimulé la voie immunitaire Th2 (lymphocytes T helper 2, voie impliquant les lymphocytes T CD4+ stimulant entre-autre l'immunité humorale) résultant en une production élevée d'anticorps de probable courte durée. A l'inverse, le vaccin vivant atténué aurait plutôt stimulé la réponse immunitaire cellulaire au détriment de la réponse immunitaire humorale, mais de manière bénéfique quant à la protection des chevaux lors du challenge infectieux par une souche au potentiel neurologique. Cet effet bénéfique a pu être démontré par comparaison avec les groupes contrôles ou vaccinés par le vaccin inactivé (Goodman *et al.* 2006). L'équipe de Wagner *et al.* a pour sa part suspecté une absence de stimulation de la voie Th2 par un vaccin inactivé (Calvenza EHV, Equine Rhinopneumonitis Vaccine, Boehringer Ingelheim, Vetmedica, St. Joseph, MO, USA) lors d'une étude menée en 2015, suggérant que cette observation pourrait expliquer la courte durée de l'immunité humorale mise en place à la suite de la vaccination (Wagner *et al.* 2015).

Au sein de l'ensemble de ces études, plusieurs outils ont permis d'étudier différents paramètres de la réponse immunitaire et d'ainsi évaluer les différents acteurs du système immunitaire des individus face à l'EHV-1. Les indicateurs de la réponse humorale sont les anticorps neutralisants et peuvent être mesurés à l'aide d'outils sérologiques. Un indicateur spécifique de la réponse cellulaire induite lors d'une infection par l'EHV-1 est l'activité de lymphocytes cytotoxiques spécifiques de l'EHV-1 sécrétant de l'IFN- γ , lui-même médiateur des réponses immunitaires innée et adaptative (Paillot *et al.* 2006). Parmi les outils

sérologiques d'étude de la réponse immunitaire humorale, la réaction de fixation du complément permet de doser les anticorps neutralisants qui fixent et activent le complément (Thomson *et al.* 1976; pour revue, Kydd, Townsend and Hannant 2006; Bannai *et al.* 2013; pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). Le test ELISA, de son côté, permet d'identifier des anticorps se fixant à un antigène choisi permettant l'étude ciblée du type d'anticorps produits à la suite d'une stimulation immunitaire (pour revue, Kydd, Townsend and Hannant 2006; Andoh *et al.* 2013; pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). Un autre outil, celui de la séroneutralisation, permet cette fois de titrer tous les anticorps neutralisants indistinctement de leur catégorie (Hartley *et al.* 2005; pour revue, Kydd, Townsend and Hannant 2006; pour revue, Balasuriya, Crossley and Timoney 2015). Plusieurs études ont montré une réaction croisée de certains anticorps entre l'EHV-1 et les autres membres des alphaherpèsvirus des équidés (Gutekunst, Malmquist and Becvar 1978; Crabb and Studdert 1990; Fukushi *et al.* 1997; Mahmoud *et al.* 2013). Peu d'informations sont disponibles quant aux antigènes à l'origine de réactions croisées entre ces virus. Il semble toutefois que des antigènes de la gB en fassent partie comme l'ont montré Mahmoud *et al.* en 2013 (Mahmoud *et al.* 2013). Alors que le test ELISA est utile pour cibler des anticorps spécifiques et les différencier des anticorps pouvant réagir de manière croisée avec d'autres virus proches, comme c'est le cas pour l'EHV-1 et l'EHV-4 par exemple, la séroneutralisation présente l'inconvénient de ne pas distinguer les anticorps spécifiques des anticorps réagissant de manière croisée avec d'autre virus (Crabb *et al.* 1995; Lang *et al.* 2013). Ce type de test reste cependant un outil intéressant fréquemment utilisé pour mesurer la réponse immunitaire humorale dans sa globalité et fera l'objet de cette Partie B.

L'étude présentée ici portera dans un premier temps sur l'exploration de nouvelles méthodologies de séroneutralisation en temps réel. Cette séroneutralisation est réalisée grâce à la technologie de suivi de la croissance cellulaire en temps réel qu'est le système xCELLigence® (ACEA, Biosciences, CA, USA). Une seconde partie de ce chapitre portera sur l'analyse, grâce à cet outil, de la réponse humorale de trois groupes de chevaux ayant reçu trois protocoles de vaccination différents. Les protocoles de vaccination suivis sont celui de gestation soit 3 injections aux 5^e, 7^e et 9^e mois de gestation, le protocole de rappel soit une seule injection au 1^e mois de la campagne et le protocole de primo-vaccination soit 3 injections aux 1^{er}, 2nd et 6^e mois de la campagne. Le vaccin administré au cours de cette étude est l'Equip EHV 1,4® (Zoetis, NJ, USA) à base de deux souches virales d'EHV-1 et d'EHV-

4 inactivées. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés sous forme d'un article en préparation et sous forme de résultats complémentaires.

Article

Sutton G, Carnet F, Thieulent C, Hue E, Fortier C, Pléau A, Deslis A, Guitton E, Buisson B, Pronost S, Paillot R. **Development of a neutralising antibody assay using Real Time Cell Analysis for the measurement of Equid herpesvirus 1 an-tibody immune response in horses after experimental infection or field vaccination.** (En preparation pour soumission dans le journal Vaccines).

1 Article

2 Development of a neutralising antibody assay using Real Time 3 Cell Analysis for the measurement of Equid herpesvirus 1 an- 4 tibody immune response in horses after experimental infection 5 or field vaccination.

6 Gabrielle Sutton^{1,2}, Flora Carnet^{1,2}, Côme Thieulent^{1,2}, Erika Hue^{1,2,3}, Christine Fortier^{1,2,3}, Alexis Pléau⁴, Alain De-
7 slis⁴, Edouard Guitton⁴, Barbara Buisson⁵, Stéphane Pronost^{1,2,#}, Romain Paillot^{1,2,6*}.

8 ¹ LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France. gabrielle.sutton@laboratoire-labeo.fr (G.S.), [flo-
9 ra.carnet@laboratoire-labeo.fr](mailto:flora.carnet@laboratoire-labeo.fr) (F.C.), come.thieulent@laboratoire-labeo.fr (C.T.),
10 erika.hue@laboratoire-labeo.fr (E.H.), christine.fortier@laboratoire-labeo.fr (C.F.),
11 stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr (S.P.)

12 ² Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France.

13 ³ Normandie Univ, UNICAEN, ImpedanCELL, 14280 Saint-Contest, France.

14 ⁴ INRAE, UE-1277 Plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE), Centre de Recherche Val de Loire, 37380
15 Nouzilly, France. alexis.pleau@inrae.fr (A.P.), alain.deslis@inrae.fr (A.D.), edouard.guitton@inrae.fr (E.G.)

16 ⁵ SEL EQUIN.VET 27300 Bernay, France. barbara@equin.vet

17 ⁶ School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle,
18 Chelmsford CM1 3RR, UK. romain.paillot@writtle.ac.uk (R.P.)

19 * Correspondence: stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr;

21 **Abstract:** The equine herpesvirus type 1 (EHV-1) is one of the most important horse pathogens,
22 which induces respiratory, neurological and/or ocular diseases, abortion or still-birth. Both hu-
23 moral and cellular immunity are required for efficient protection against infection with this al-
24 pha herpesvirus. In this study, a new real-time neutralising assay (RTNA) using the xCELLigence®
Citation: Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Vaccines* 2021, 9, 26
<https://doi.org/10.3390/xxxxx>
Academic Editor: Firstname Last-
name
Received: date
Accepted: date
Published: date
Publisher's Note: MDPI stays
neutral with regard to jurisdictional
claims in published maps and
institutional affiliations.
25 technology was evaluated for the measurement of EHV-1 neutralising antibodies in horse serums
26 on E.Derm cells. This new assay allowed to determine serum titres inducing 50 % of EHV-1 neu-
27 tralisation (NT50), using a dose response approach based on serial dilutions. NT50 values were
28 determined on 44 serums from four horses experimentally infected with a field EHV-1 strain and
29 taken daily from D+8 to D+18 post-infection. The increase of the EHV-1 NT50 on E.Derm cells was
30 similar to the one observed with the conventional method on RK13 cells. Seroconversion was
31 observed between D+8 and D+18 for all horses with the two methods. The neutralising antibody
32 response to vaccination with a whole inactivated EHV-1 and EHV-4 vaccine was then measured
33 using this assay in three groups of horses receiving different vaccination protocols: horses receiv-
34 ing their primo-vaccination (n=5), or a vaccination boost (n=3) and pregnant mares vaccinated
35 according to a specific immunisation schedule (n=5). The NT50 values obtained from these horses'
36 serums were correlated with titres obtained with the conventional method ($R^2=0.828$). The greatest
37 response to EHV-1 vaccination was measured during the primo-immunisation of naive horses. The
38 RTNA assay described in this study allowed the quantitative determination of EHV-1 neutralising
39 antibody titres for two selected horse populations, with a reduced workload.

40 **Keywords:** neutralising assay; real-time cell analysis; xCELLigence® technology; RTNA, neutral-
41 ising antibody response; vaccination.



42 **Copyright:** © 2021 by the authors
43 Submitted for possible open access
44 publication under the terms and
45 conditions of the Creative Commons
46 Attribution (CC BY) license
47 ([http://creativecommons.org/licenses
48 /by/4.0/](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)).

1. Introduction

The equine herpesviruses 1 (EHVs) is an enveloped double stranded DNA virus classified among the *Herpesviridae* family, the *Alphaherpesvirinae* sub-family and *Varicellovirus* gender. As latent viruses, equine herpesviruses and more precisely EHV-1, 4, 2 and 5 are considered to be endemic to the horse population, after they infect foals during their first months of life [1–4]. Due to the diseases it can cause, EHV-1 is one of the most threatening EHV for the equine health and industry [2].

Clinical signs of disease observed on horses after EHV-1 infection vary from respiratory disorder (nasal discharge, cough, mandibular lymph nodes enlargement and pyrexia), to abortion or neo-natal death and neurological disorders (from mild ataxia, limb weakness, swaying, stumbling to complete paralysis, often requiring euthanasia) [5]. After infecting the epithelium of the upper respiratory tract, the EHV-1 will then be transported to lymphoid tissues where it will infect peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and induce cell-associated viremia. This cell-associated viremia will allow the virus to reach organs such as the uterus, the central nervous system but also the retina and cause abortion, neurological disorder and chorioretinitis respectively [5–7].

Immunity settlement against the EHV-1 is complex due to the multiple strategies herpesviruses developed to escape immunity [5,7,8]. Humoral immunity will play an important role in neutralising the virus before the induction of a cell-associated viremia. The duration of type-specific neutralising antibodies after infection seems variable with reports of neutralising antibody levels against EHV-1 detectable for over a year while complement fixing antibodies are not detectable after three months post-infection [9–12]. Among the neutralising antibodies studied after EHV-1 infection or vaccination, the mucosal IgA are suspected to play an important role in neutralising viral particles locally on respiratory mucosal surface and consequently in reducing viral shedding [13,14]. As reviewed by Kydd *et al.* (2006), these EHV-1 specific IgA are short-lived but their duration seems to increase with repeated exposures to the virus [8]. Cellular immunity, and especially EHV-1 specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) producing the interferon-gamma (IFN- γ), play a major role in the control of the cell-associated viremia [10]. Both types of immunity are essential for an effective neutralisation of the EHV-1. It seems that currently commercialised vaccines, based on inactivated whole viruses or modified live viruses, are not completely effective in stimulating both humoral and cellular immunity. Cellular immunity seems to be more difficult to induce in which case protection against EHV-1 infections relies on humoral immunity [7,8,13,15–19]. However, these different vaccines have been shown to reduce the severity and duration of clinical signs and nasal shedding. Some of them have also been shown to reduce the abortion rate during post-vaccination challenge infection [7,17,18,20]. To our knowledge, only one study could show the protection of a group of horses vaccinated with a commercialised MLV vaccine from neurological disease when compared to a control group and a group of horses vaccinated using an inactivated whole vaccine [18]. However, cases of abortion and neurological outbreaks are still observed in vaccinated horse populations [11,21]. Neutralising antibodies measurement is consequently a precious tool to estimate the neutralising antibody response to a vaccine. Indeed, serological assays allow the measurement of the antibody response, sero-conversion during outbreaks or after vaccination, and duration of the humoral immunity. The most common assays used for this measurement are the complement fixing (CF) reaction, the enzyme-linked immuno-assay (ELISA) and virus neutralisation (VN) assay. Among those three methods, neutralisation assay allows the titration of all neutralising antibodies. The CF reaction assay allows the titration of complement fixing and activating antibodies. The ELISA assay can be designed to target any type of neutralising antibodies [22].

The conventional neutralisation assay against EHV-1, as described by the OIE - World Organisation for Animal Health is a time consuming plaque reduction method that allows serums titration according to the latest neutralising dilution for a defined quantity of EHV-1 on RK13 cells monolayers [23]. Consequently, the titre is linked to the dilution folds. The aim of this study was to use the xCELLigence® real-time cell analysis

99 technology (ACEA Biosciences, CA, USA) to measure the neutralising activity of horse
100 serums against the EHV-1. The xCELLigence® system is a biosensor technology which
101 allows the monitoring of cell growth in real-time. The numerous applications of this la-
102 bel-free technology include cell viability monitoring, investigations on drug effects on
103 different cell lines such as tumours, cytotoxicity assays, screening of antiviral drugs but
104 also real-time neutralisation assays [24–29]. A VN titre determination method using the
105 xCELLigence technology will be described in this study, following Witkowski *et al.*
106 (2010) principle of calculation of the titre inducing 50 % neutralisation (NT₅₀) [29]. This
107 method was first tested using serums from horses experimentally infected with an
108 EHV-1 strain isolated from the field [30], and then validated using serums taken from
109 horses during field EHV-1/4 vaccination. These horses were either foals/horses with no
110 or ancient vaccination history, frequently vaccinated horses or pregnant mares.

111 2. Materials and Methods

112 2.1. Samples

113 Three sets of serums were used in this study. The first set of serums (set #1) com-
114 prised two serums (serum A and serum B) which neutralising antibody titres had pre-
115 viously been determined by the conventional EHV-1 neutralising assay and were re-
116 spectively 1:8 and 1:64.

117 The second set of serums (set #2) was collected from 8 Welsh ponies (aged 10
118 months-old) experimentally infected with a field EHV-1 strain [30,31] for purpose unre-
119 lated to this study. These samples were taken daily from day 8 to day 18 post-infection
120 (pi). Ponies had no previous history of EHV-1 and EHV-4 natural infection and had
121 negative VN titres on D+0 post-experimental infection. All details about the samples are
122 summarised in Supplementary Table 1. Experiments were conducted in accordance with
123 the guidelines of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Coun-
124 cil, in the facilities of the EU-1277 Plateforme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE,
125 INRAE, 2018. Infectiology of farm, model and wild animals facility, [44], Centre Val de
126 Loire, Nouzilly, France). All experimental procedures were approved by the Loire Val-
127 ley ethical review board (CEEA VdL, committee number 19).

128 The third set of serums (set #3) was collected during a field vaccination campaign
129 against the EHV-1/4. This campaign was carried out from September 2018 to September
130 2019 on 13 horses from four different premises including: 1) 5 horses with no or very an-
131 cient history of vaccination against EHV-1/4 (Primo-vaccination group), which received
132 three vaccine injections on the 1st, the 2nd and the 6th month of the campaign, 2) 5 horses
133 with regular vaccination against EHV-1/4 (Boost group) that received one boost vaccina-
134 tion (as part of their normal vaccination schedule) on the first month of the campaign
135 and 3) 3 pregnant mares (Pregnant mares group), which received a vaccination boost on
136 the 5th, 7th and 9th month of pregnancy (corresponding to the 1st, 3rd and 5th month of the
137 vaccination campaign, respectively). Serum samples were taken on the 1st, 2nd, 3rd, 6th, 7th
138 and 8th month from the horses receiving a primo-vaccination; on the 1st, 2nd and 4th
139 month from the regularly vaccinated horses; and every months from the pregnant mares
140 starting from the first vaccine injection (i.e. 5th month of pregnancy) during 6 months. All
141 horses received the whole inactivated virus vaccine Equip® EHV 1,4 (Zoetis, NJ, USA).
142 All details about the samples are summarised in Figure 1 and Supplementary Table 2.
143 This field vaccination campaign was carried out under the informed consent of the
144 horses' owners.
145

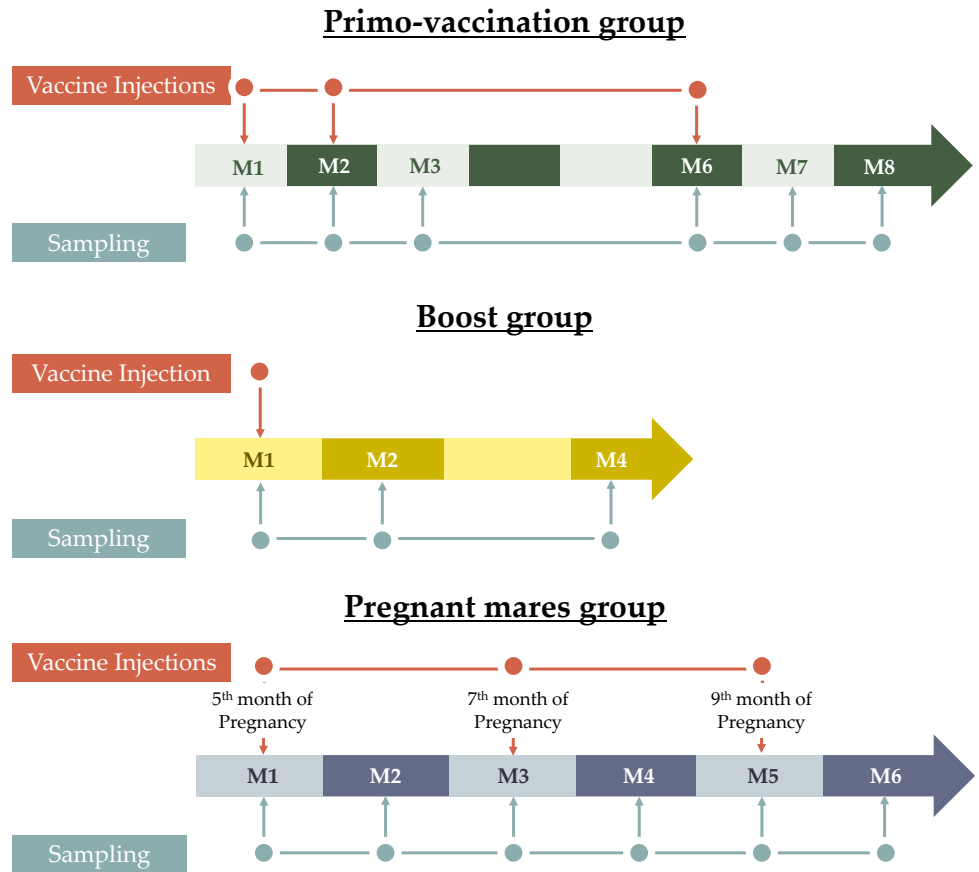


Figure 1 Graphic representation of the vaccination and sampling schedule followed during the field vaccination campaign (Set#3 of serums) for each group of horses (primo-vaccination, boost and pregnant mares).

2.2. Cell culture

Two cell lines were used in this study: RK13 cells (rabbit kidney cells, ATCC®, Molsheim, France) were maintained in Minimum Essential Medium with Earle's salts (MEM CM1MEM10-01, Eurobio, Courtaboeuf, France) complemented with 1 % L-glutamine (CSTGLY00-0U, Eurobio). E.Derm cells (equine dermal fibroblasts, NBL-6, ATCC®, CCL-57™) and were maintained in ATCC® 30-2003 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC®). All media were also complemented with 10 % Fetal Bovine Serum (FBS, CVFSVF00-01, Eurobio) and 1 % antibiotics (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin, Eurobio). Cell growth was observed both using optical microscopy and xCELLigence® technology (ACEA Biosciences, CA, USA).

2.3. Virus culture

The EHV-1 strain KyD VR700™ (ATCC®) was used in this study. The strain was first amplified on RK13 cells and virus titre (3.65×10^7 DECP₅₀/mL) was measured on E.Derm cells using the Karber method.

2.4. Conventional neutralisation assay

A conventional neutralising assay was performed using RK13 cells and the EHV-1 strain KyD VR700™ (ATCC®), following the OIE recommendations [23]. On the first day, 24h prior to infection, RK13 cells were cultured in 96 well plates (2.5×10^4 cells per well, ref 353072, Falcon®, Corning, MA, USA). After 24 hours and before infection, culture medium was removed and replaced with 50 µL of fresh complemented MEM. On the second day, 50 µL of the serums were serially diluted on a 2-fold basis in complemented MEM and incubated (37°C with 0.5 % CO₂) with 50 µL of the EHV-1 strain KyD

VR700TM (100 DECP50 per well). After 1 hour (h) incubation, 100 μ L of the virus+serum mix were incubated on RK13 cells monolayer. All serums dilutions were tested in duplicates. Serums with known titre were used as controls. Cytopathic effects (CPE) in each well were measured at 72 hours post infection (hpi) and neutralising antibody titres were calculated according to the last neutralising dilution as described in Supplementary Table S3.

2.5. Real time neutralisation assay (RTNA)

A neutralisation assay was also performed using Real Time Cell Analysis (RTCA) on the xCELLigence® technology (ACEA Biosciences, CA, USA). This assay was performed using E.Derm cells seeded on two 96 wells plates (1.2×10^4 cells per well) for xCELLigence acquisition. Culture medium was removed and replaced with fresh medium after 24h culture and before infection. On the following day, serums were diluted and incubated during 1h at 37°C with 5 % CO₂ with the EHV-1 strain KyD VR700™, as described previously. The selection of the appropriate virus titre is described in the result section. Cells were then infected with 100 μ L of virus+serum mix and incubated at 37°C with 5 % CO₂. Mock infected cells and cells infected with virus only were used as controls. The titre calculation methods will be described in the result section.

2.6. Statistical analysis

Receiver operating characteristic (ROC) analysis and threshold for the discrimination of area under the curve (AUC) in neutralising and non-neutralising wells were performed on R version 4.0.3 [32].

The serums concentration inducing 50 % of the virus inhibition (IC₅₀) was calculated using GraphPad Prism 8.0.1 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

Neutralising antibody titres of serums from set #2 (field vaccination) were compared in each vaccination protocol group from one sampling point to another using the non-parametric Friedman test on GraphPad Prism 8.0.1 for Windows. As all samples were analysed in duplicates and sometimes triplicates (when replicates were on different plates) with the xCELLigence® technology, all values were included in the statistical test. Groups of data were considered as significantly different for p-value <0.05.

3. Results

3.1. EHV-1 neutralising antibodies: development of a new RTNA

3.1.1. EHV-1 concentration

The appropriate EHV-1 concentration to be used for the neutralising assay was determined on E.Derm cells using serum A and B collected for diagnosis purpose in LABÉO Frank Duncombe (Caen, France) and stored for research investigations. The titres of these samples had previously been determined with the conventional neutralising assay on RK13 cells and were 1:8 for serum A and 1:64 for serum B. The three following concentrations of virus were tested with these samples: 3.65×10^6 (dilution fold 10⁻¹), 3.65×10^5 (dilution fold 10⁻²), and 3.65×10^4 (dilution fold 10⁻³) DECP₅₀/mL.

The serum antibody titre was then qualified according to the cell index curve evolution recorded on the xCELLigence® technology. As previously described, E.Derm cell line index decreased after infection with EHV-1 [27]. A serum dilution preventing this characteristic cell index decrease was qualified as a neutralising dilution and a non-neutralising dilution if no effect was measured.

As shown in Figure 2, the last neutralising dilution of the serums was 1:8 and 1:64 for serum A et B, respectively, when the virus titre was 3.65×10^5 DECP₅₀/mL. When in contact with more (3.65×10^6 DECP₅₀/mL) or less (3.65×10^4 DECP₅₀/mL) viral particles, the neutralising effect of the serum was delayed or advanced, respectively. The appropriate virus titre was determined as 3.65×10^5 DECP₅₀/mL.

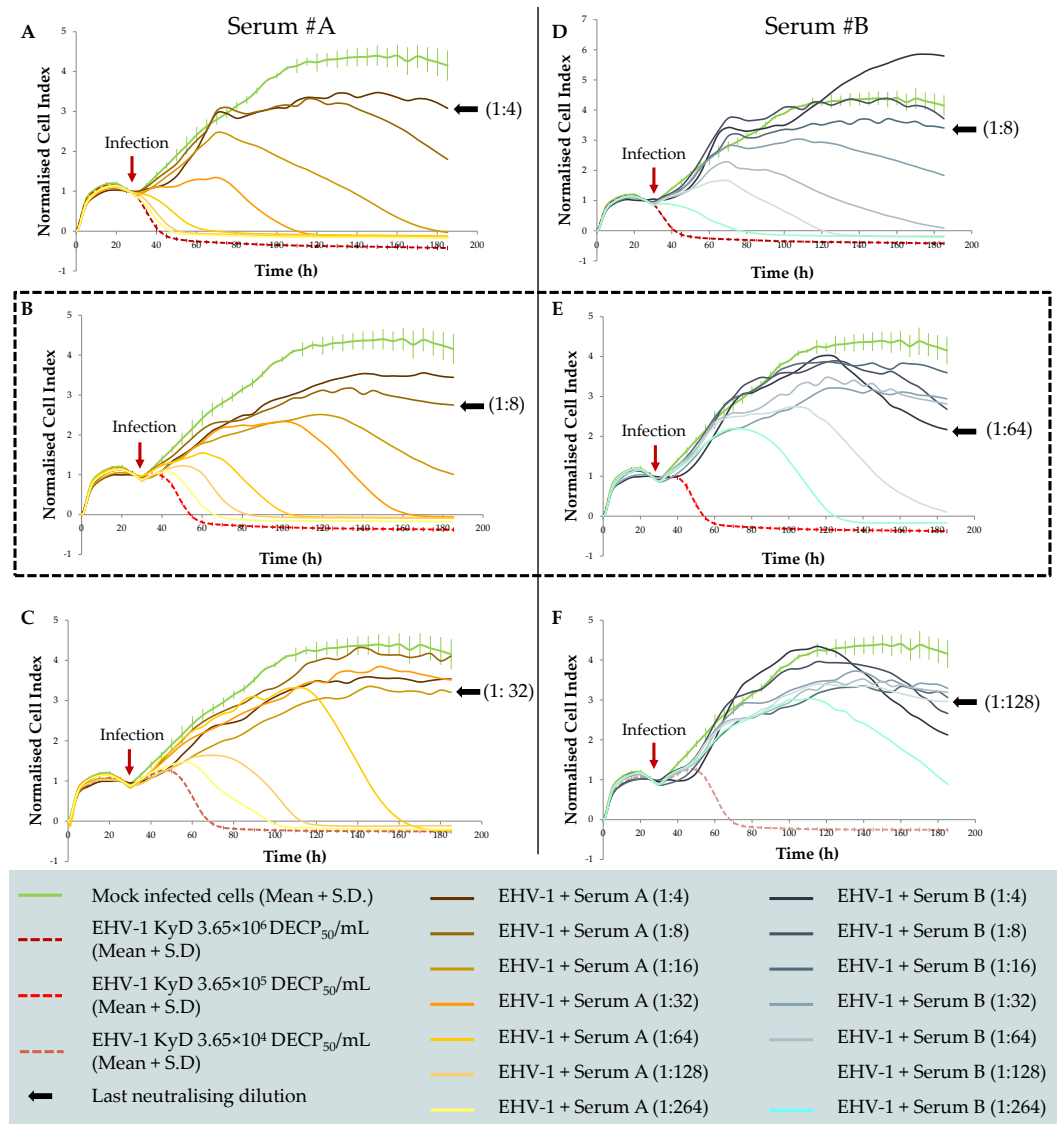


Figure 2 Kinetic patterns of E.Derm cells infected with three EHV-1 concentrations: (A) and (D) 3.65×10⁶ DECP₅₀/mL in the presence of seven dilutions of serum A and serum B, respectively; (B) and (E) 3.65×10⁵ DECP₅₀/mL in the presence of seven dilutions of serum A and serum B, respectively; (C) and (F) 3.65×10⁴ DECP₅₀/mL in the presence of seven dilutions of serum A and serum B, respectively. The time of infection, mock infected cells and infected cells controls both with no serum are visible on each graph. The virus concentration retained is shown in the dotted line box.

3.1.2. Titre calculation – Neutralising titre 50

The calculation method used in this study was based on the dose-response principle. The serum concentration inducing 50 % of the EHV-1 inhibition (IC₅₀) was calculated with serums from the set#2 and from Horses 1 to 4 (collected from D+8 to D+18 post-experimental infection with the EHV-1) diluted from 1:4 to 1:256. This IC₅₀ allowed the determination of a neutralising titre 50 (NT₅₀).

First, the area under the curve (AUC) of each dilution point was determined (AUC_{dilution}) after 140 hours of culture, post-infection (hpi). The percentage of inhibition (inhibition %) for each dilution point was calculated using AUC from mock infected and EHV-1 infected control conditions (AUC_{mi} and AUC_i, respectively), as follows:

$$\text{inhibition\%} = 100 * \left(1 - \frac{(AUC_{\text{dilution}} - AUC_{\text{mi}})}{(AUC_{\text{mi}} - AUC_{\text{i}})} \right)$$

Inhibition percentages and their corresponding serum concentration (1:4 = 0.25) then allowed the determination of the IC₅₀ and the NT₅₀ as illustrated in Figure 3.

$$\text{Model: } Y=100/(1+10^{((\text{LogIC}_{50}-X)*\text{HillSlope}))})$$

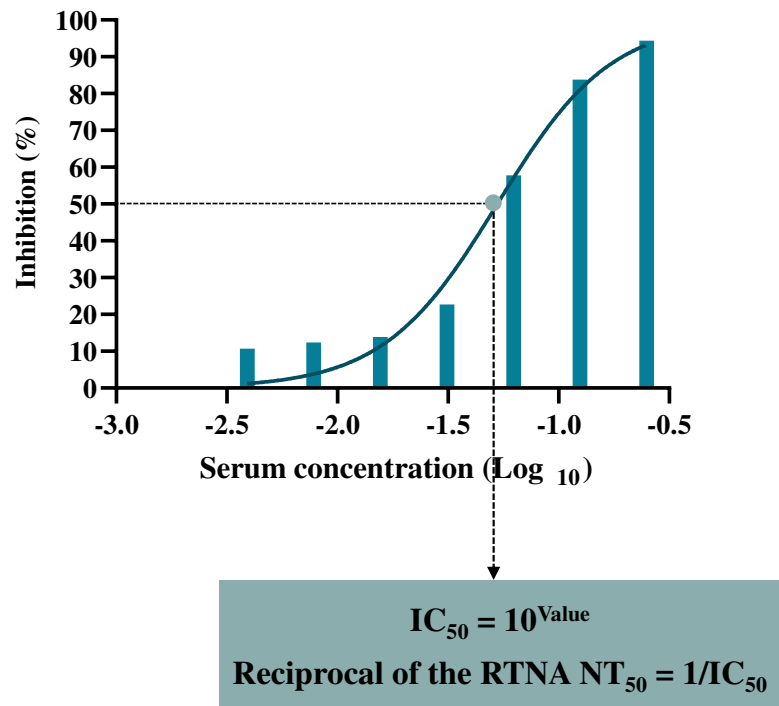
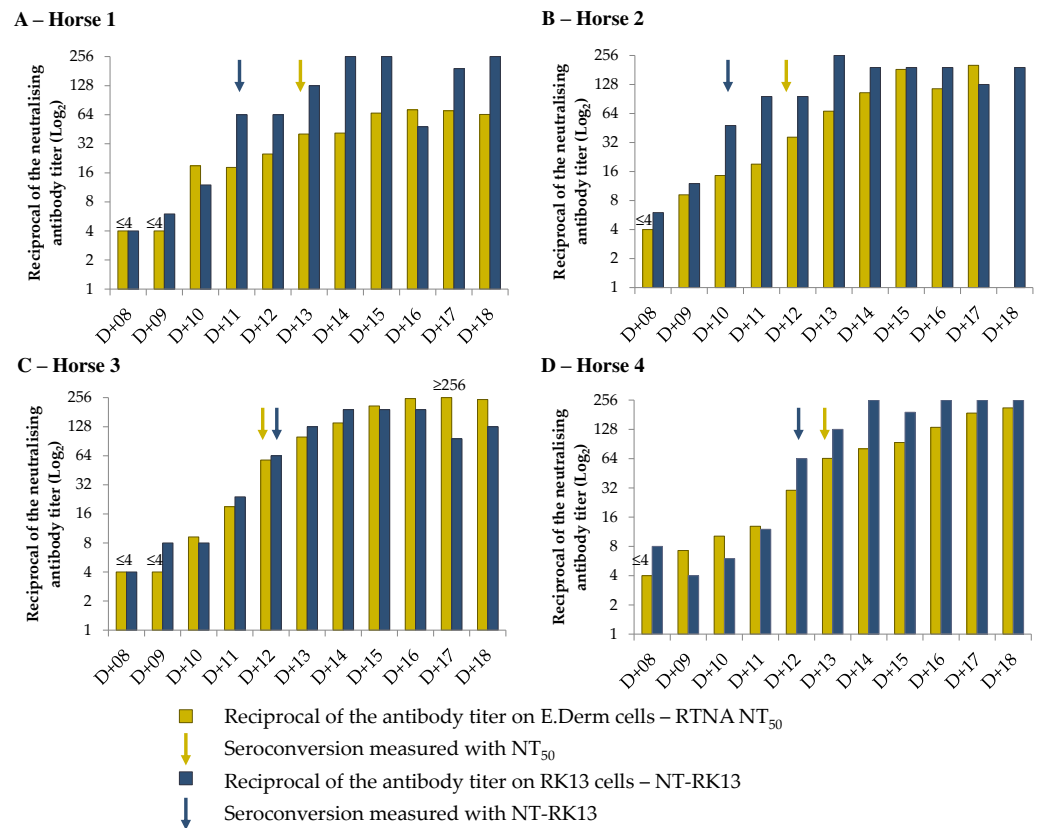


Figure 3 Graphic representation of the determination of the IC_{50} and RTNA NT_{50} of a serum on E.Derm cells infected with the EHV-1. The serum taken from Horse 1 on D+10 post-experimental infection was used for this example.

As all samples were diluted from 1:4 to 1:256, values below 4 (6/44 values, all on days 8 and 9) were reported to 4. Values above 256 (1/44) were reported to 256 (Supplementary Table S4). NT_{50} values were then compared to VN titres obtained with the conventional method on RK13 cells (NT-RK13)

The increase of the NT_{50} obtained by RTNA was similar to the one observed with the conventional neutralisation assay on RK13 cell (NT-RK13) (Figure 4). However, seroconversion, as defined by a four-fold increase ($\Delta\text{Log}_2 > 3$) of the neutralising titre, was observed two days earlier with the NT-RK13 than with NT_{50} for Horses 1 and 2, one day earlier with the NT-RK13 than with the NT_{50} for Horse 4 and on the same day with both methods for Horse 3.



256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

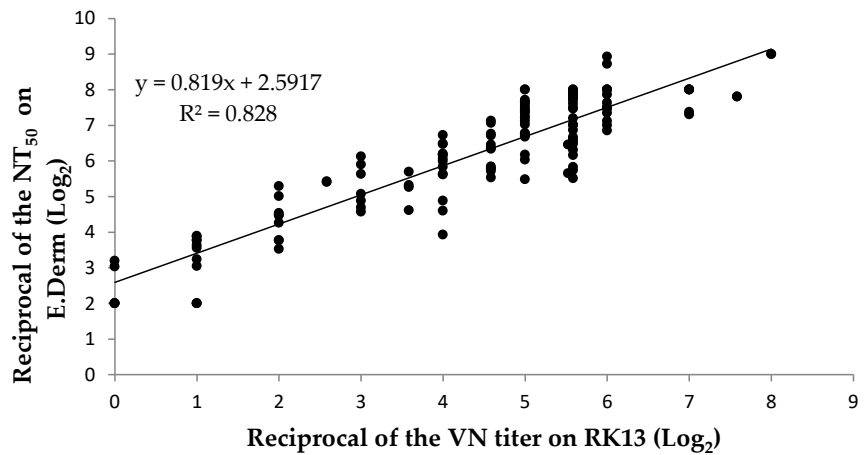
272

273

Figure 4 Reciprocal of the EHV-1 NT₅₀ of serums taken from Horses 1, 2, 3 and 4 (A to D, respectively) from D+8 to D+18 post-experimental infection with EHV-1 calculated on E.Derm cells infected with the EHV-1 (yellow) and compared to the reciprocal of the VN titres obtained on RK13 cells infected with the EHV-1 (NT-RK13, blue). Seroconversion points are indicated with yellow (NT₅₀) and blue (NT-RK13) arrows.

3.1. Evaluation of EHV-1 antibody titres after field vaccination

Serum samples (set#3) were collected from the 13 horses enrolled in the field vaccination campaign (i.e. horses receiving their primo-vaccination, regularly vaccinated horses and pregnant mares). EHV-1 NT₅₀ were determined using the RTNA on E.Derm cells as described previously (Supplementary Tables S5 to S7). Serums were serially diluted from 1:4 to 1:256 or 1:512 for the determination of the NT₅₀. Reciprocal values below 4 were reported to 4 and values above 256 or 512 were reported to 256 or 512. Before analysing the horses' response to vaccination, the NT₅₀ were compared to titres obtained with conventional VN method on RK13 cells. The determination coefficient between the two methods showed a good fit of the data ($R^2=0.828$) (Figure 5). The slope and the axis intercept of the linear regression indicate that NT₅₀ values were higher than values obtained with the conventional method on RK13.



274

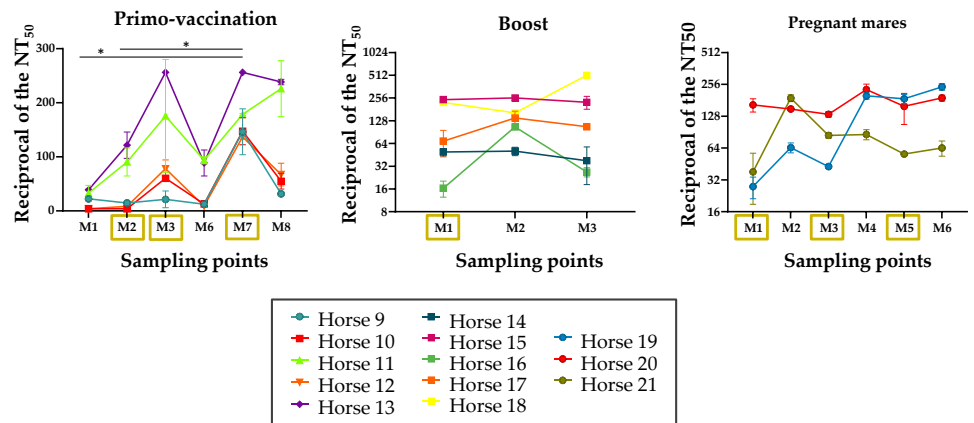
275
276
277
278

Figure 5 Linear regression modelling the relationship between the NT₅₀ on E.Derm cell line of the 63 serums (including replicates, n=138) collected from all vaccinated horses on their respective sampling points, and the corresponding titre obtained with the conventional neutralisation assay on RK13 cell line.

279
280
281
282
283
284
285
286

Neutralising antibody titres were then analysed first comparing sampling points intragroup, and second comparing sampling points for each horse individually.

Analysis of the data from all horses in the Primo-vaccination group, showed a significant increase of the NT₅₀ measured between the first sampling points (M1) and the fifth sampling point (M7, p=0.011), and between the second (M2) and the fifth sampling point (M7, p=0.035, Figure 6). In this group, M7 was collected one month after the third vaccine injection. There was no significant increase or decrease of the NT₅₀ between the different sampling points of the Boost group and the Pregnant mares group.



287
288
289
290
291

Figure 6 Reciprocal of the NT₅₀ obtained for each vaccinated horse on each sampling point (M=month) are plotted according to the vaccination protocol group. Sampling points corresponding to vaccine injection are highlighted in yellow boxes. The non-parametric Friedman test was used to compare values between sampling points within each groups. *p-value <0.05.

292
293
294
295
296
297
298
299

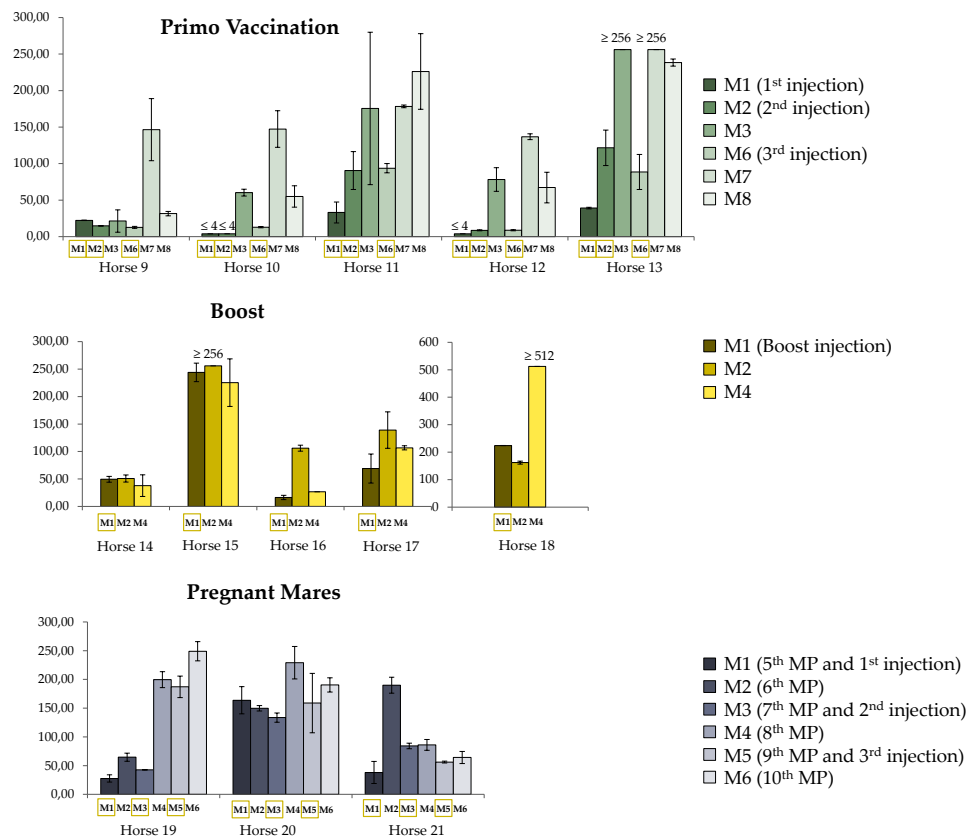
Individual horse neutralising antibody titres for each horse are shown in Figure 7. Only four horses (Horses 9, 10, 12 and 19) showed seroconversion (four-fold increase, $\Delta\log_2 > 3$) during this vaccination campaign.

At an individual level, in the Primo-vaccination group, all horses, which had low antibody titres on M1, showed a response to vaccination. While Horses 10 and 12 showed increased neutralising antibody titres after both second and third immunisation, Horse 9 seroconverted only after the third vaccine injection and showed a marked decrease of the neutralising antibody titre on M8. Horses 11 and 13 showed good neutral-

300 ising antibody response after each injection and showed the highest titres of all the
301 horses of this group.

302 An increase of the neutralising antibody titres after the vaccine injection was ob-
303 served for Horses 16 and 17 from the Boost group. The two horses showing the highest
304 neutralising antibody titres on M1, M2 and M4 were Horse 15 and Horse 18. Horse 15
305 had been tested positive for EHV-4 a few months before the campaign. In addition, both
306 horses had received a pregnancy vaccination protocol (i.e. 3 vaccine injections between
307 the 5th and the 9th month of pregnancy) during the previous breeding season. The Horse
308 18 showed an important increase of the neutralising antibody titre on M4, three months
309 after the injection.

310 In the Pregnant mares group, a low neutralising antibody titre was measured on the
311 first sampling point of the campaign (M1, Reciprocal NT₅₀= 27.67 ± 6.39) for Horse 19
312 which had no history of vaccination against the EHV-1/4. Besides, increased neutralising
313 antibody titres were observed after each vaccination injection for this horse, and sero-
314 conversion was observed between M1 and M6. Horse 20, which had history of vaccina-
315 tion against EHV-1/4 during the previous year, showed high neutralising antibody titre
316 on the first sampling point (Reciprocal NT₅₀=163.70 ± 23.68). An increase of the neutral-
317 ising antibody response was only observed after the second injection for this horse (Re-
318 ciprocal NT₅₀=229.12 ± 28.29). Standard deviation values of titres measured on the last
319 two sampling points make it difficult to evaluate the neutralising antibody response af-
320 ter the third injection for this horse. Finally, in this Pregnant mares group, Horse 21,
321 which had a history of vaccination against EHV-1/4 during the previous year, had low
322 neutralising antibody titres on M1 (Reciprocal NT₅₀= 38.06 ± 19.22) and showed an in-
323 creased neutralising antibody response after the first injection. The neutralising antibody
324 titre decreased on M3 and stayed stable until M6 despite vaccine injection.
325



327

328

329

330

331

332

333

Figure 7 Individual responses to vaccination against EHV1/4 based on the mean values of reciprocal of the NT₅₀ obtained for each vaccinated horse at each sampling point. Standard deviation bars indicate the variation between replicates for each sampling points. Profiles are organised according to the three vaccination groups: Primo-vaccination horses (green histograms), Boost (yellow histograms) and Pregnant mares (blue histograms). Sampling points are indicated for each horse (M=month) and sampling points corresponding to vaccine injection are framed in yellow.

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

4. Discussion

In this study a real-time neutralisation assay (RTNA) was carried out on E.Derm cells for the detection of neutralising antibodies against EHV-1. As described by the OIE –Terrestrial manual, cytotoxicity of serums from frequently vaccinated horses can be encountered on RK13 cells, especially at low dilutions [23]. This issue can be overcome by using E.Derm cells, making the choice of this cell line for the development of a new neutralising antibody assay interesting. Following the OIE recommendations, the conventional neutralising assay on RK13 requires to infect 2.5E+04 RK13 cells with 100 DECP₅₀ [23]. In this study the quantity of EHV-1 required on E.Derm cells to observe the same neutralising effect was 182 times higher. This could suggest that the RK13 cells are more permissive to EHV-1 and maybe multiply faster than the E.Derm cells. The RTNA described in this study allowed the determination of the neutralising antibody titre inducing 50 % of the EHV-1 inhibition (NT₅₀). The same principle had already been described by Witkowski *et al.* in 2010 for the determination of the neutralising activity of different animal species serums against orthopoxvirus [29]. In their study, the authors used the cell index (CI) of different serum dilutions at a defined time post-infection (30 hpi) to determine the NT₅₀. In the present study, area under the curve at 140 hpi was used for the determination of the NT₅₀. This allowed, as for the real-time orthopoxvirus neutralisation assay, a quantitative determination of EHV-1 neutralising antibody titres. NT₅₀ determination takes the plate mock infected cells and infected cells with no serum controls into consideration and therefore the potential cell growth variation from one plate to another. This method was appropriate for monitoring the increase of neutralis-

356 ing antibody titres daily post-infection. Seroconversion was also detected using the
357 RTNA NT₅₀ calculation method, although some delay in its detection could be observed
358 for 3 out of 4 horses (75 %) when compared to the conventional neutralising assay on
359 RK13.

360 The NT₅₀ calculation method was used for application on samples taken from 13
361 horses undergoing a vaccination campaign with three protocols: Primo-vaccination,
362 Boost and Pregnant mares. Statistical analysis of the NT₅₀ of each protocol group al-
363 lowed highlighting a significant increase of the neutralising antibody titres after vac-
364 cination in the Primo-vaccination group. In this group, horses under 2 years old re-
365 sponded weakly to vaccination and showed a decrease of the neutralising antibody lev-
366 els two months after the third injection. Horse 9 was Horse 15's foal, which had been
367 tested positive for EHV-4 during the previous year. Some EHV-4 neutralising antibodies
368 can cross-react with the EHV-1 and could be detected using the RTNA assay described
369 here [33]. However, despite the infection history of its mother during its first months of
370 life, Horse 9 showed low levels of neutralising antibodies. In their study carried out on
371 159 mares and 101 foals vaccinated with the vaccine Duvaxyn® EHV 1,4, (the ancestor of
372 Equip® EHV 1,4) in Australia, Foote *et al.* (2002), Foote *et al.* discussed the case of foals
373 showing weak immune response to vaccination under the age of four months old with
374 the hypothesis that high maternal antibody levels against EHV-4 could inhibit the foals'
375 response to vaccination, as a result of neutralisation of the inactivated vaccine before it
376 could further stimulate the humoral response [34]. However, both the age of Horse 9 (6
377 months old at the beginning of the campaign) and its very low level of initial neutralis-
378 ing antibodies are not in line with this hypothesis. On the other hand, in the same group,
379 horses older than two years old (Horses 11 and 13) showed slightly higher initial neu-
380 tralising antibody levels against EHV-1 and a more important and persistent response to
381 vaccine injections. The probability of previous exposure to EHV-1 was higher for these
382 older horses. Foals' weak immune response to whole inactivated vaccine or subunit vac-
383 cine under the age of five months old has already been described, as reviewed by Paillot
384 *et al.* (2008) and is probably due to an immature immune system [35,36]. As all foals in
385 this study were over 6 months old, and as their immune system is considered to be
386 competent, it can be questioned whether the difference of intensity of their immune re-
387 sponse to vaccination when compared to older horses is due to a lack of stimulation be-
388 fore the vaccination campaign or to the immaturity of some immune parameters such as
389 IgG4, IgG7 for example, as reviewed by Perkins and Wagner in 2015 [37]. Increase levels
390 of intranasal specific EHV-1 IgG4/7 have been reported after challenge infection and are
391 believed to locally protect viral infection [38]. IgG4/7 ratio has been studied in foals from
392 vaccinated mares, in experimentally challenged foals that had received neonatal infec-
393 tion, and in adult horse receiving vaccine candidates, but not, to our knowledge, in foals
394 over 6 months old responding to vaccination [14,15].

395 Both in the Pregnant mares and in the Boost group, horses with high initial anti-
396 body levels showed lower response to vaccination than others, with the exception of
397 Horse 14. Indeed, this horse had low antibody levels all along the campaign despite a
398 history of thorough vaccination against EHV-1/4. In the Boost group, high initial anti-
399 body levels could be attributed to prior exposure to EHV-1/EHV-4 or reactivation, as it
400 was the case with Horse 15, which tested positive for EHV-4 in the year prior to the vac-
401 cination campaign. This would highlight the known lack of specificity of the neutralising
402 assay. However it is also interesting to note that two of these horses with high levels of
403 neutralising antibodies (Horse 15 and Horse 18) had received the pregnancy protocol
404 (i.e. three vaccine injections) during the previous breeding season. Horse 18 antibody
405 levels all along the campaign were also interesting as they increased importantly three
406 months after the vaccine injection. This questions a potential exposure to EHV-1/EHV-4
407 or reactivation during the campaign, more likely after the first injection, although no
408 clinical signs were reported by the veterinarian in charge of the vaccine injection for this
409 horse. Natural infections are known to stimulate both humoral and cellular responses in
410 a better way than vaccination and the live natural virus particles might have been con-

sequent enough to stimulate humoral response despite already high levels of neutralising antibodies. Although this horse was kept in the same premises as Horses 9, 11, 16, 17 and 20, it was moved in other premises at least once during the campaign. However, the configuration of the initial premises and the horse distribution is unknown making it difficult to draw conclusions about potential transmissions.

All pregnant mares responded to vaccination but in different ways. Horse 19 which had a low neutralising antibody titre at the beginning of the campaign responded with three peaks, one after each injection, and had high neutralising antibody titres by the end of the campaign. This horse did not receive EHV vaccination before the campaign and showed a typical immunisation profile. Horse 20 had a high initial level of neutralising antibodies which could either be due to a good persistent protection, although this is not very consistent with the short lasting characteristic of neutralising antibodies specific to EHV-1 and EHV-4, or to a recent EHV-1/EHV-4 exposure or reactivation. However, this horse response to vaccination was only obvious after the second injection although high antibody titres were maintained all along the campaign. A third pregnant mare, Horse 21, showed a response to vaccination only after the first injection. Antibody titres decreased importantly after the third month for this horse. This phenomenon could not be explained with the available information. In their study, Foote *et al.* (2002) showed that only 13.8 to 28.9 % of the mares were described as responders, according to the specific ELISA test used (EHV-1/4 cross-specific anti-gD or EHV-1 specific anti-gG). In addition, 16.4 to 17.7 % of the mares were described as persistently seropositive showing high anti-gD and anti-gG antibody levels during the whole campaign. Although the discrimination criteria applied in Foote *et al.* (2002) study were not applicable in our study, it can be suggested that both Horse 20 and 21 are low responders to vaccination and that Horse 20 could also be a persistent seropositive. Foote *et al.* (2002) also observed that vaccination response was essentially visible in groups of mares having lower means of ELISA absorbance at the time of the initial vaccination [34]. This lack of response in mares with high initial neutralising antibody levels was suggested to be the result of neutralisation of the inactivated vaccine. The same hypothesis was drawn in another study carried out by Attili *et al.* 2020 on 18 mares using the same vaccine [39]. This is consistent with results presented in this study.

5. Conclusions

To conclude, this study showed that real time neutralising assay using the xCELLigence® RTCA technology was consistent for the quantitative measurement of the neutralising antibodies titres against EHV-1 in horse serums. This new assay allowed the analysis of serums of experimentally infected horses, taken daily post-infection for the monitoring of seroconversion, but also the analysis of three categories of serums from horses undergoing a vaccination campaign. The response of these horses to vaccination was explored and consistent with previous studies with similar vaccine technology.

6. Patents

Supplementary Materials: Table S1: Identification, general information and sampling points of horses from the set #2 of serums and included in the methodology part of the study; Supplementary Table S2: Identification, general information, vaccination protocol, sampling points, and history of vaccination/infection of horses from the set #3 of serums and included in the application part of the study. Supplementary Table S3: Serum titre calculation according to the observation of CPEs in each dilution well. Titers were calculated using both duplicates measurements. Boxes in black indicate wells with CPE. Supplementary Table S4: Reciprocal values of the NT50 obtained with RTNA on E.Derm cell line and with conventional neutralisation assay on RK13 cell line, for the Horses 1 to 4 from set#2 of serums. Seroconversion points are underlined. Supplementary Table S5: Means and standard deviation of the reciprocal values of the NT50 from serums taken on five horses (Horses 9 to 13, set#3 of serums) which received the primo vaccination protocol with three injection on the 1st, the 2nd and the 6th month of the campaign (M1, M2, M6). Supplementary Table S6: Means and standard deviation of the reciprocal values of the NT50 from serums taken on five horses (Horses 14 to 18, set#3 of serums) which received a boost vaccine injection on the first

sampling point of the campaign (M1). Supplementary Table S7: Means and standard deviation of the reciprocal values of the NT50 from serums taken on three pregnant mares vaccinated (Horses 19 to 21, set#3 of serums) on their 5th, 7th and 9th months of pregnancy (M1, M3 and M5).

Author Contributions: Conceptualization, S.P. and R.P.; methodology, G.S., S.P., R.P.; investigation, G.S., F.C., C.T., E.H., C.F., ; resources, E.H., C.F., A.P., A.D., E.G., B.B.; writing—original draft preparation, G.S., S.P., R.P.; writing—review and editing, E.H., S.P., R.P., E.H.; supervision, S.P., R.P.; project administration, S.P., R.P.; funding acquisition, S.P., R.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Fonds Eperon OVERLORD N12-2017, Normandy County Council (17E01598/17EP04324), the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) grant number 2017-008, CENTAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational programme 2014–2020.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Nordengrahn, A.; Merza, M.; Ros, C.; Lindholm, A.; Pálfi, V.; Hannant, D.; Belàk, S. Prevalence of Equine Herpesvirus Types 2 and 5 in Horse Populations by Using Type-Specific PCR Assays. *Vet. Res.* **2002**, *33*, 251–259, doi:10.1051/vetres:2002013.
- Patel, J.R.; Heldens, J. Equine Herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – Epidemiology, Disease and Immunoprophylaxis: A Brief Review. *The Veterinary Journal* **2005**, *170*, 14–23, doi:10.1016/j.tvjl.2004.04.018.
- Lunn, D.P.; Davis-Poynter, N.; Flaminio, M.J.B.F.; Horohov, D.W.; Osterrieder, K.; Pusterla, N.; Townsend, H.G.G. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **2009**, *23*, 450–461, doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x.
- Allen, G.P. Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4 (28-Feb-2002). **2002**, *14*.
- Allen, G.; Kydd, J.; Slater, J.; Smith, K. Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In *Infectious Diseases of Lifestock*; Oxford Press (Cape Town), 2004; p. Chapter 76, 829–859.
- Kydd, J.H.; Smith, K.C.; Hannant, D.; Livesay, G.J.; Mumford, J.A. Distribution of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) in Respiratory Tract Associated Lymphoid Tissue: Implications for Cellular Immunity. *Equine Veterinary Journal* **1994**, *26*, 470–473, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04052.x.
- Paillet, R.; Ellis, S.; Daly, J.; Audonnet, J.; Minke, J.; Davispoynter, N.; Hannant, D.; Kydd, J. Characterisation of CTL and IFN- γ Synthesis in Ponies Following Vaccination with a NYVAC-Based Construct Coding for EHV-1 Immediate Early Gene, Followed by Challenge Infection. *Vaccine* **2006**, *24*, 1490–1500, doi:10.1016/j.vaccine.2005.10.019.
- Kydd, J.H.; Townsend, H.G.G.; Hannant, D. The Equine Immune Response to Equine Herpesvirus-1: The Virus and Its Vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2006**, *111*, 15–30, doi:10.1016/j.vetimm.2006.01.005.
- Crabb, B.S.; MacPherson, C.M.; Reubel, G.H.; Browning, G.F.; Studdert, M.J.; Drummer, H.E. A Type-Specific Serological Test to Distinguish Antibodies to Equine Herpesviruses 4 and 1. *Arch Virol* **1995**, *140*, 245–258, doi:10.1007/BF01309860.
- Kydd, J.H.; Watrang, E.; Hannant, D. Pre-Infection Frequencies of Equine Herpesvirus-1 Specific, Cytotoxic T Lymphocytes Correlate with Protection against Abortion Following Experimental Infection of Pregnant Mares. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2003**, *96*, 207–217, doi:10.1016/j.vetimm.2003.08.004.
- Maanen, C.; Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S.; Damen, E.A.; Derksen, A.G.P. Neurological Disease Associated with EHV-1-Infection in a Riding School: Clinical and Virological Characteristics. *Equine Veterinary Journal* **2001**, *33*, 191–196, doi:10.1111/j.2042-3306.2001.tb00600.x.
- Thomson, G.R.; Mumford, J.A.; Campbell, J.; Griffiths, L.; Clapham, P. Serological Detection of Equid Herpesvirus 1 Infections of the Respiratory Tract. *Equine Vet J* **1976**, *8*, 58–65, doi:10.1111/j.2042-3306.1976.tb03291.x.
- Breathnach, C.C.; Yeargan, M.R.; Sheoran, A.S.; Allen, G.P. The Mucosal Humoral Immune Response of the Horse to Infective Challenge and Vaccination with Equine Herpesvirus-1 Antigens. *Equine Veterinary Journal* **2001**, *33*, 651–657, doi:10.2746/042516401776249318.
- Schnabel, C.L.; Babasyan, S.; Rollins, A.; Freer, H.; Wimer, C.L.; Perkins, G.A.; Raza, F.; Osterrieder, N.; Wagner, B. An Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Ab4 Open Reading Frame 2 Deletion Mutant Provides Immunity and Protection from EHV-1 Infection and Disease. *J Virol* **2019**, *93*, doi:10.1128/JVI.01011-19.
- Bresgen, C.; Lämmer, M.; Wagner, B.; Osterrieder, N.; Damiani, A.M. Serological Responses and Clinical Outcome after Vaccination of Mares and Foals with Equine Herpesvirus Type 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) Vaccines. *Vet. Microbiol.* **2012**, *160*, 9–16, doi:10.1016/j.vetmic.2012.04.042.
- Ellis, J.A.; Steeves, E.; Wright, A.K.; Bogdan, J.R.; Davis, W.C.; Kanara, E.W.; Haines, D.M. Cell-Mediated Cytotoxicity of Equine Herpesvirus-Infected Cells by Leukocytes from Young Vaccinated Horses. *Vet Immunol Immunopathol* **1997**, *57*, 201–214, doi:10.1016/s0165-2427(96)05749-2.
- Goodman, L.; Wagner, B.; Flaminio, M.; Sussman, K.; Metzger, S.; Holland, R.; Osterrieder, N. Comparison of the Efficacy of Inactivated Combination and Modified-Live Virus Vaccines against Challenge Infection with Neuropathogenic Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1). *Vaccine* **2006**, *24*, 3636–3645, doi:10.1016/j.vaccine.2006.01.062.

- 523 18. Goodman, L.B.; Wimer, C.; Dubovi, E.J.; Gold, C.; Wagner, B. Immunological Correlates of Vaccination and Infection for
524 Equine Herpesvirus 1. *Clin. Vaccine Immunol.* **2012**, *19*, 235–241, doi:10.1128/CVI.05522-11.
- 525 19. Wagner, B.; Goodman, L.B.; Babasyan, S.; Freer, H.; Torsteinsdóttir, S.; Svansson, V.; Björnsdóttir, S.; Perkins, G.A. Anti-
526 body and Cellular Immune Responses of Naïve Mares to Repeated Vaccination with an Inactivated Equine Herpesvirus
527 Vaccine. *Vaccine* **2015**, *33*, 5588–5597, doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.009.
- 528 20. Heldens, J.G.M.; Hannant, D.; Cullinane, A.A.; Prendergast, M.J.; Mumford, J.A.; Nelly, M.; Kydd, J.H.; Weststrate, M.W.;
529 van den Hoven, R. Clinical and Virological Evaluation of the Efficacy of an Inactivated EHV1 and EHV4 Whole Virus
530 Vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/Challenge Experiments in Foals and Pregnant Mares. *Vaccine* **2001**, *19*, 4307–
531 4317, doi:10.1016/S0264-410X(01)00131-1.
- 532 21. Damiani, A.M.; de Vries, M.; Reimers, G.; Winkler, S.; Osterrieder, N. A Severe Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1)
533 Abortion Outbreak Caused by a Neuropathogenic Strain at a Breeding Farm in Northern Germany. *Veterinary Microbiol-
534 ogy* **2014**, *172*, 555–562, doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.023.
- 535 22. Balasuriya, U.B.R.; Crossley, B.M.; Timoney, P.J. A Review of Traditional and Contemporary Assays for Direct and Indi-
536 rect Detection of *Equid Herpesvirus 1* in Clinical Samples. *J VET Diagn Invest* **2015**, *27*, 673–687,
537 doi:10.1177/1040638715605558.
- 538 23. International Office of Epizootics; Biological Standards Commission *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial
539 Animals: (Mammals, Birds and Bees)*; 2018; ISBN 978-92-95108-18-9.
- 540 24. Dowling, C.M.; Herranz Ors, C.; Kiely, P.A. Using Real-Time Impedance-Based Assays to Monitor the Effects of Fibro-
541 blast-Derived Media on the Adhesion, Proliferation, Migration and Invasion of Colon Cancer Cells. *Biosci Rep* **2014**, *34*,
542 doi:10.1042/BSR20140031.
- 543 25. Fang, Y.; Ye, P.; Wang, X.; Xu, X.; Reisen, W. Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell
544 Electric Impedance Technology. *Journal of Virological Methods* **2011**, *173*, 251–258, doi:10.1016/j.jviromet.2011.02.013.
- 545 26. Pan, T.; Khare, S.; Ackah, F.; Huang, B.; Zhang, W.; Gabos, S.; Jin, C.; Stampfl, M. In Vitro Cytotoxicity Assessment Based
546 on KC(50) with Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Assay. *Comput Biol Chem* **2013**, *47*, 113–120,
547 doi:10.1016/j.compbiolchem.2013.08.008.
- 548 27. Thieulent, C.J.; Hue, E.S.; Fortier, C.I.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Fortier, G.D.; Pitel,
549 P.-H.; Vidalain, P.-O.; et al. Screening and Evaluation of Antiviral Compounds against Equid Alpha-Herpesviruses Using
550 an Impedance-Based Cellular Assay. *Virology* **2019**, *526*, 105–116, doi:10.1016/j.virol.2018.10.013.
- 551 28. Tian, D.; Zhang, W.; He, J.; Liu, Y.; Song, Z.; Zhou, Z.; Zheng, M.; Hu, Y. Novel, Real-Time Cell Analysis for Measuring
552 Viral Cytopathogenesis and the Efficacy of Neutralizing Antibodies to the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *PLoS ONE*
553 **2012**, *7*, e31965, doi:10.1371/journal.pone.0031965.
- 554 29. Witkowski, P.T.; Schuenadel, L.; Wiethaus, J.; Bourquain, D.R.; Kurth, A.; Nitsche, A. Cellular Impedance Measurement
555 as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralization Testing and Evaluation of Antiviral Substances. *Biochem-
556 ical and Biophysical Research Communications* **2010**, *401*, 37–41, doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.003.
- 557 30. Sutton, G.; Thieulent, C.; Fortier, C.; Hue, E.S.; Marcillaud-Pitel, C.; Pléau, A.; Deslis, A.; Guitton, E.; Paillot, R.; Pronost, S.
558 Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C2254/H752
559 Strain in French Horses Showing No Major Impact on the Strain Behaviour. *Viruses* **2020**, *12*, 1160, doi:10.3390/v12101160.
- 560 31. Paillot, R.; Sutton, G.; Thieulent, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Pronost, S. New EHV-1 Variant Identified. *Veterinary Record*
561 **2020**, *186*, 573.1-573, doi:10.1136/vr.m1441.
- 562 32. R Core Team (2020). — European Environment Agency Available online:
563 [https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-
564 2006](https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006) (accessed on 14 February 2021).
- 565 33. Mahmoud, H.Y.A.H.; Andoh, K.; Hattori, S.; Terada, Y.; Noguchi, K.; Shimoda, H.; Maeda, K. Characterization of Gly-
566 coproteins in Equine Herpesvirus-1. *J Vet Med Sci* **2013**, *75*, 1317–1321, doi:10.1292/jvms.13-0168.
- 567 34. Foote, C.E.; Love, D.N.; Gilkerson, J.R.; Whalley, J.M. Serological Responses of Mares and Weanlings Following Vaccina-
568 tion with an Inactivated Whole Virus Equine Herpesvirus 1 and Equine Herpesvirus 4 Vaccine. *Vet Microbiol* **2002**, *88*, 13–
569 25, doi:10.1016/s0378-1135(02)00100-1.
- 570 35. Foote, C.E.; Love, D.N.; Gilkerson, J.R.; Rota, J.; Trevor-Jones, P.; Ruitenber, K.M.; Wellington, J.E.; Whalley, J.M. Serum
571 Antibody Responses to Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein D in Horses, Pregnant Mares and Young Foals. *Veterinary
572 Immunology and Immunopathology* **2005**, *105*, 47–57, doi:10.1016/j.vetimm.2004.12.012.
- 573 36. Paillot, R.; Case, R.; Ross, J.; Newton, R.; Nugent, J. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. *TOVSJ* **2008**, *2*,
574 68–91, doi:10.2174/1874318808002010068.
- 575 37. Perkins, G.A.; Wagner, B. The Development of Equine Immunity: Current Knowledge on Immunology in the Young
576 Horse. *Equine Vet J* **2015**, *47*, 267–274, doi:10.1111/evj.12387.
- 577 38. Perkins, G.; Babasyan, S.; Stout, A.E.; Freer, H.; Rollins, A.; Wimer, C.L.; Wagner, B. Intranasal IgG4/7 Antibody Re-
578 sponses Protect Horses against Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) Infection Including Nasal Virus Shedding and
579 Cell-Associated Viremia. *Virology* **2019**, *531*, 219–232, doi:10.1016/j.virol.2019.03.014.
- 580 39. Attili, A.-R.; Colognato, R.; Preziuso, S.; Moriconi, M.; Valentini, S.; Petrini, S.; De Mia, G.M.; Cuteri, V. Evaluation of
581 Three Different Vaccination Protocols against EHV1/EHV4 Infection in Mares: Double Blind, Randomized Clinical Trial.
582 *Vaccines* **2020**, *8*, 268, doi:10.3390/vaccines8020268

Supplementary Table S1 Identification, general information and sampling points of horses from the set #2 of serums and included in the methodology part of the study.

Identification	Category in the study	Gender	Breed	Age	Sampling point
Horse 1	Experimental infection	Male	Welsh Pony	10 months old	D ¹ +8 to D+18 post-infection
Horse 2	Experimental infection	Male	Welsh Pony	10 months old	D+8 to D+18 post-infection
Horse 3	Experimental infection	Male	Welsh Pony	10 months old	D+8 to D+18 post-infection
Horse 4	Experimental infection	Male	Welsh Pony	10 months old	D+8 to D+18 post-infection
Horse 5	Experimental infection	Male	Welsh Pony	10 months old	D+8 to D+18 post-infection
Horse 6	Experimental infection	Male	Welsh Pony	10 months old	D+8 to D+18 post-infection
Horse 7	Experimental infection	Male	Welsh Pony	10 months old	D+8 to D+18 post-infection
Horse 8	Experimental infection	Male	Welsh Pony	10 months old	D+8 to D+18 post-infection

¹D = day post experimental infection.

Supplementary Table S2 Identification, general information, vaccination protocol, sampling points, and history of vaccination/infection of horses from the set #3 of serums and included in the application part of the study.

Identification	Set of serums in the study	Gender	Breed	Age	Vaccination group	Vaccination protocol	Sampling point	Premises	Vaccination history	Additional information
Horse 9	Vaccination Set#3	Female	Origine constatée	6 months-old	Pri-mo-vaccinated	1 st , 2 nd and 6 th month of the campaign	M1, M2, M3, M6, M7, M8	Premises 2	No previous vaccination	Foal of Horse 13
Horse 10	Vaccination Set#3	Male	Selle Français	5 1/2 months-old	Pri-mo-vaccinated	1 st , 2 nd and 6 th month of the campaign	M1, M2, M3, M6, M7, M8	Premises 1	No previous vaccination	
Horse 11	Vaccination Set#3	Gelding	Selle Français	24 years-old	Pri-mo-vaccinated	1 st , 2 nd and 6 th month of the campaign	M1, M2, M3, M6, M7, M8	Premises 2	Up-to-date EIV vaccination, no or very ancient EHV1,4 vaccination	
Horse 12	Vaccination Set#3	Female	Selle Français	1 1/2 years-old	Pri-mo-vaccinated	1 st , 2 nd and 6 th month of the campaign	M1, M2, M3, M6, M7, M8	Premises 1	Up-to-date EIV vaccination, no EHV1,4 vaccination	
Horse 13	Vaccination Set#3	Female	Connemara	2 1/2 years-old	Pri-mo-vaccinated	1 st , 2 nd and 6 th month of the campaign	M1, M2, M3, M6, M7, M8	Premises 1	Up-to-date EIV vaccination, no EHV1,4 vaccination	
Horse 14	Vaccination Set#3	Stalion	Selle Français	7 years-old	Reboost	1 st month of the campaign	M1, M2, M4	Premises 3	Up-to-date EIV and EHV1,4 vaccination	Vaccinated every year as required for breeding
Horse 15	Vaccination Set#3	Female	KWPN	16 years-old	Reboost	1 st month of the campaign	M1, M2, M4	Premises 4	Received EIV+EHV1,4 pregnancy protocol during the previous breeding season (2017/2018)	Positive EHV-4 PCR test in May 2018
Horse 16	Vaccination Set#3	Female	Selle Français	1 1/2 years -old	Reboost	1 st month of the campaign	M1, M2, M4	Premises 2	Up-to-date EIV and EHV1,4 vaccination	
Horse 17	Vaccination Set#3	Gelding	Selle Français	9 years-old	Reboost	1 st month of the campaign	M1, M2, M4	Premises 2	Up-to-date EIV and EHV1,4 vaccination	
Horse 18	Vaccination Set#3	Mare	Selle Français	16 years-old	Reboost	1 st month of the campaign	M1, M2, M4	Premises 2	Received EIV+EHV1,4 pregnancy protocol during the previous breeding season (2017/2018)	
Horse 19	Vaccination Set#3	Female	Thorough-bred	14 years-old	Pregnant mares	5 th , 7 th and 9 th month of pregnancy	M1 ¹ , M2, M3, M4, M5, M6	Premises 1	Up-to-date EIV ² vaccination, no EHV1,4 ³ vaccination	
Horse 20	Vaccination Set#3	Female	Selle Français	15 years-old	Pregnant mares	5 th , 7 th and 9 th month of pregnancy	M1, M2, M3, M4, M5, M6	Premises 2	Up-to-date EIV and EHV1,4 vaccination	
Horse 21	Vaccination Set#3	Female	Selle Français	18 years-old	Pregnant mares	5 th , 7 th and 9 th month of pregnancy	M1, M2, M3, M4, M5, M6	Premises 1	Up-to-date EIV and EHV1,4 vaccination	

¹M1=Month 1, ²EIV= equine influenza virus, ³EHV1,4= equid herpesvirus 1 and 4.

Supplementary Table S3 Serum titre calculation according to the observation of CPE in each dilution well. Titers were calculated using both duplicates measurements. Boxes in black indicate wells with CPE.

Titer → ↓Dilution	Neg	1:2	1:4	1:6	1:8	1:12	1:16	1:24	1:32	1:48	1:64	1:96	1:128	1:192	>1:256
1:4	Black	Black	Black												
1:8	Black	Black	Black	Black	Black										
1:16	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black								
1:32	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black						
1:64	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black					
1:128	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black			
1:256	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black

Supplementary Table S4 Reciprocal values of the NT₅₀ obtained with RTNA on E.Derm cell line and with conventional neutralisation assay on RK13 cell line, for the Horses 1 to 4 from set#2 of serums. Seroconversion points are underlined.

		D+8	D+9	D+10	D+11	D+12	D+13	D+14	D+15	D+16	D+17	D+18
Horse 1	Reciprocal of the NT ₅₀	4 ¹	4 ¹	18,93	18,22	25,11	<u>40,32</u>	41,25	66,49	71,94	70,32	64,31
	Reciprocal of the NT-RK13	4	6	12	<u>64</u>	64	128	256	256	48	192	256
Horse 2	Reciprocal of the NT ₅₀	4 ¹	9,18	14,56	19,10	<u>36,43</u>	67,80	105,24	183,89	115,83	202,76	ND ³
	Reciprocal of the NT-RK13	6	12	<u>48</u>	96	96	256	192	192	192	128	192
Horse 3	Reciprocal of the NT ₅₀	4	4	9,24	18,99	<u>57,87</u>	100,00	140,21	210,22	250,19	256 ²	244,62
	Reciprocal of the NT-RK13	4	8	8	24	<u>64</u>	128	192	192	192	96	128
Horse 4	Reciprocal of the NT ₅₀	4,00	7,26	10,22	12,91	30,27	<u>64,47</u>	80,84	93,81	134,26	188,39	212,86
	Reciprocal of the NT-RK13	8	4	6	12	<u>64</u>	128	256	192	256	256	256

¹NT₅₀ values below 4 reported to 4, ²NT₅₀ values above 256 reported to 256, ³ND= not determined.

Supplementary Table S5 Means and standard deviation of the reciprocal values of the NT₅₀ from serums taken on five horses (Horses 9 to 13, set#3 of serums) which received the primo vaccination protocol with three injections on the 1st, the 2nd and the 6th month of the campaign (M1, M2, M6). Seroconversion points are underlined.

Primo-vaccinated group		M ¹	M2	M3	M6	M7	M8
Horse 9	NT ₅₀ (Mean)	22,33	14,77	21,44	12,70	<u>146,48</u>	31,56
	S.D. ²	0,26	0,16	15,35	1,34	42,44	3,01
Horse 10	NT ₅₀ (Mean)	4,00 ³	4,00 ³	<u>60,31</u>	12,99	<u>147,37</u>	54,99
	S.D.	NA ⁵	NA	4,62	0,87	25,08	14,66
Horse 11	NT ₅₀ (Mean)	33,09	90,61	175,56	93,72	178,37	226,16 ⁴
	S.D.	14,35	25,95	104,30	6,38	1,78	51,69
Horse 12	NT ₅₀ (Mean)	4,00 ³	8,68	<u>78,24</u>	8,85	<u>136,80</u>	67,27
	S.D.	NA	0,70	16,18	0,80	3,99	20,98
Horse 13	NT ₅₀ (Mean)	39,18	121,70	256,00 ⁴	88,62	256,00 ⁴	238,37
	S.D.	1,03	24,28	NA	24,02	NA	4,90

¹M=Month, ²S.D. = standard deviation, ³includes values below 4 reported to 4, ⁴includes values above 256 reported to 256, ⁵NA= not applicable.

Supplementary Table S6 Means and standard deviation of the reciprocal values of the NT₅₀ from serums taken on five horses (Horses 14 to 18, set#3 of serums) which received a boost vaccine injection on the first sampling point of the campaign (M1). Seroconversion points are underlined.

Reboost group		M ¹	M2	M4
Horse 14	NT ₅₀ (Mean)	49,45	50,81	37,94
	S.D. ²	5,41	6,45	19,66
Horse 15	NT ₅₀ (Mean)	244,09 ³	256,00 ³	225,39 ³
	S.D.	16,84	NA ⁴	43,29
Horse 16	NT ₅₀ (Mean)	16,37	106,13	26,86
	S.D.	3,92	5,46	3,73
Horse 17	NT ₅₀ (Mean)	69,02	138,95	106,70
	S.D.	26,44	33,12	2,54
Horse 18	NT ₅₀ (Mean)	223,94	162,18	512,00 ⁵
	S.D.	0,25	5,48	NA

¹M=Month, ²S.D. = standard deviation, ³includes values above 256 reported to 256, ⁴NA= not applicable, ⁵includes values above 512 reported to 512.

Supplementary Table S7 Means and standard deviation of the reciprocal values of the NT50 from serums taken on three pregnant mares vaccinated (Horses 19 to 21, set#3 of serums) on their 5th, 7th and 9th months of pregnancy (M1, M3 and M5). Seroconversion points are underlined.

Pregnant mares group		M ¹	M2	M3	M4	M5	M6
Horse 19	NT ₅₀ (Mean)	27,67	64,69	42,76	199,55	187,11	<u>249,02</u> ³
	S.D. ²	6,39	7,06	0,45	13,90	18,74	16,67
Horse 20	NT ₅₀ (Mean)	163,70	149,76	133,60	229,12	158,81	190,40
	S.D.	23,68	4,68	8,00	28,29	51,80	12,33
Horse 21	NT ₅₀ (Mean)	38,06	189,99	84,25	86,05	56,15	64,15
	S.D.	19,22	13,92	4,91	9,37	1,58	10,51

¹M=Month, ²S.D. = standard deviation, ³includes values above 256 reported to 256.

Résultats complémentaires

En complément de la méthode présentée dans cet article et basée sur le calcul du NT₅₀ d'un sérum à partir des données xCELLigence®, deux autres méthodes de détermination du titre d'anticorps neutralisants d'un sérum ont été explorées. Pour plus de clarté, la méthode de calcul du NT₅₀ sera identifiée comme la méthode #1, et les deux autres méthodes qui seront ensuite présentées seront identifiées comme les méthodes #2 et #3.

i. Matériel et méthodes

Les méthodes #2 et #3 ont été étudiées dans les mêmes conditions que la méthode #1 présentée précédemment soit par l'infection de cellules E.Derm (1.2×10^4 cellules/puits sur plaques 96 puits) par la souche KyD VR700TM (ATCC® ; $50 \mu\text{L}$; $3,65 \times 10^5$ DECP₅₀/mL) en présence de $50 \mu\text{L}$ des dilutions de sérum à tester. Le sérum A du set #1 de sérums est repris à titre d'exemple. Le set #2 de sérums est utilisé pour la mise au point de ces méthodes. Un récapitulatif des trois méthodes étudiées dans ce chapitre est proposé en Figure 28.

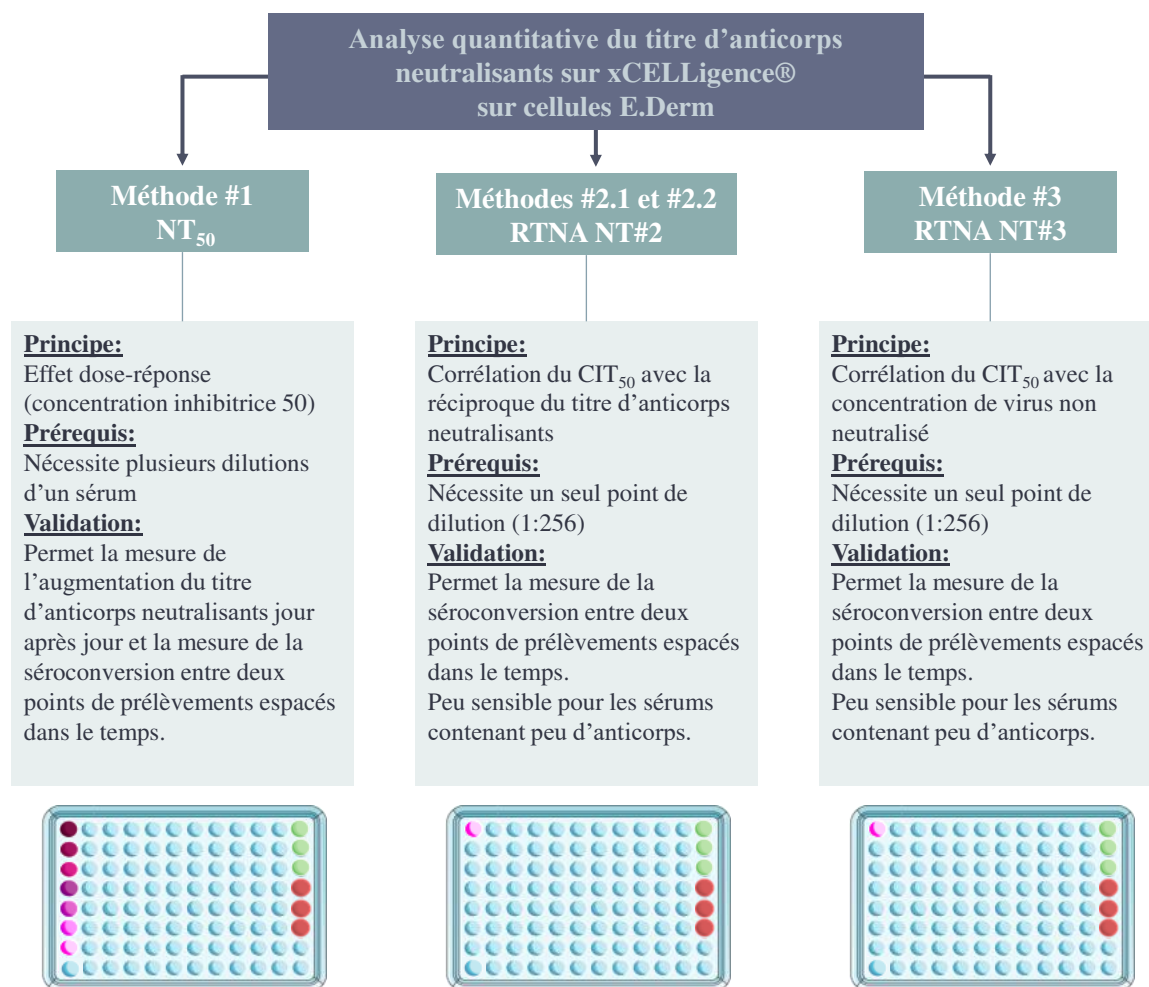


Figure 28 Schéma récapitulatif des trois méthodes explorées dans cette étude pour la détermination du titre d'anticorps neutralisants d'un sérum sur cellules E.Derm infectées par l'EHV-1. Pour chaque méthode le nombre de puits requis pour un sérum est indiqué sur une plaque 96 puits (rose), ainsi que les puits occupés par les contrôles de cellules non infectées et sans sérum (vert) et de cellules infectées sans sérum (rouge).

ii. Résultats

Méthode #2

La méthode #2 de détermination du titre d'anticorps neutralisants est basée sur le temps nécessaire pour que le « cell index » (CI) de cellules infectées en présence d'une dilution de sérum, chute de 50 % (CIT₅₀). Comme le montrent les graphiques en Figure 29, le log de la concentration en DECP₅₀/mL (DECP₅₀=Dose entraînant un effet cytopathique pour 50 % des cellules) d'EHV-1 est corrélé au CIT₅₀ correspondant à cette concentration.

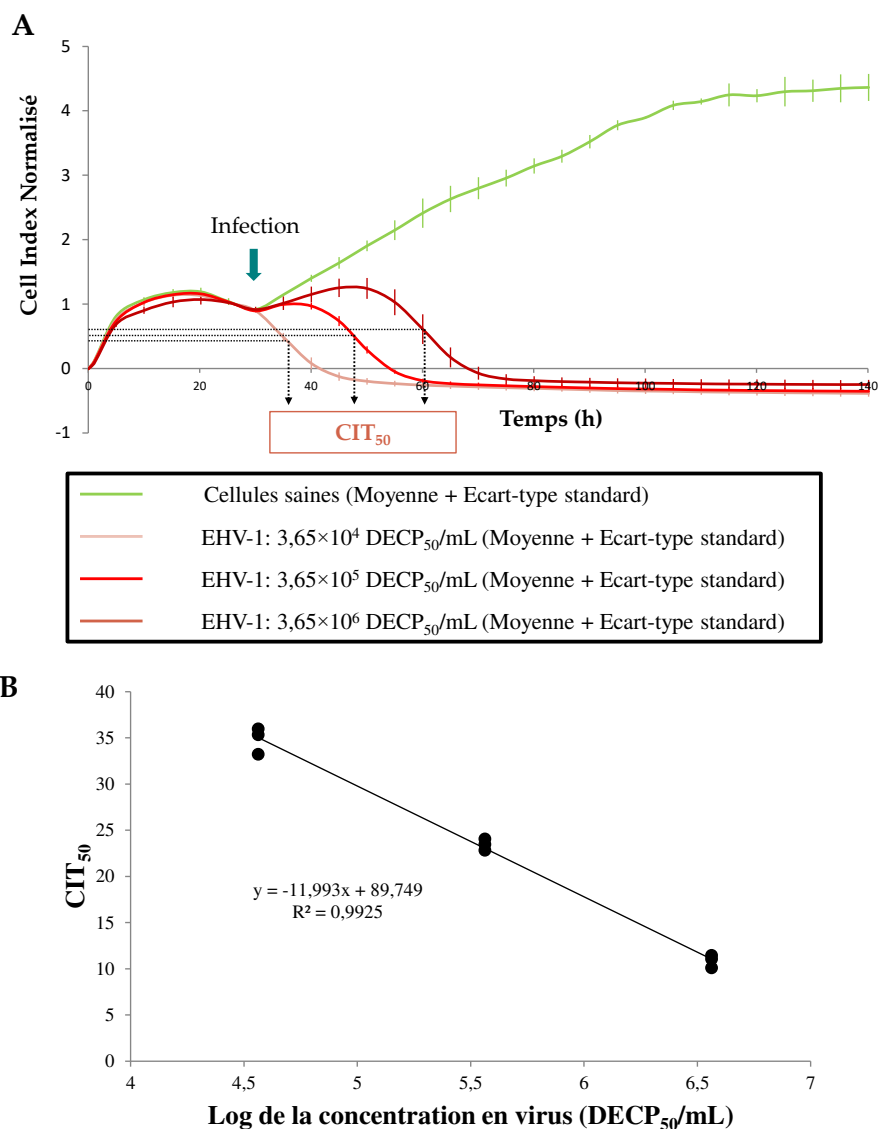


Figure 29 (A) Cinétique des cellules *E.Derm* infectées par trois concentrations d'EHV-1 : $3,65 \times 10^4$, $3,65 \times 10^5$ et $3,65 \times 10^6$ DECP₅₀/mL. (B) Régression linéaire montrant la corrélation du CIT₅₀ de chacune des doses de virus avec le Log₁₀ de leur concentration.

Dans le cas de cellules *E.Derm* infectées par l'EHV-1 et en présence de plusieurs dilutions d'un sérum neutralisant, un effet dose-réponse est également observé comme le montrent les courbes de CI obtenues sur cellules infectées en contact du sérum A, présenté dans l'article en préparation et repris en Figure 30.

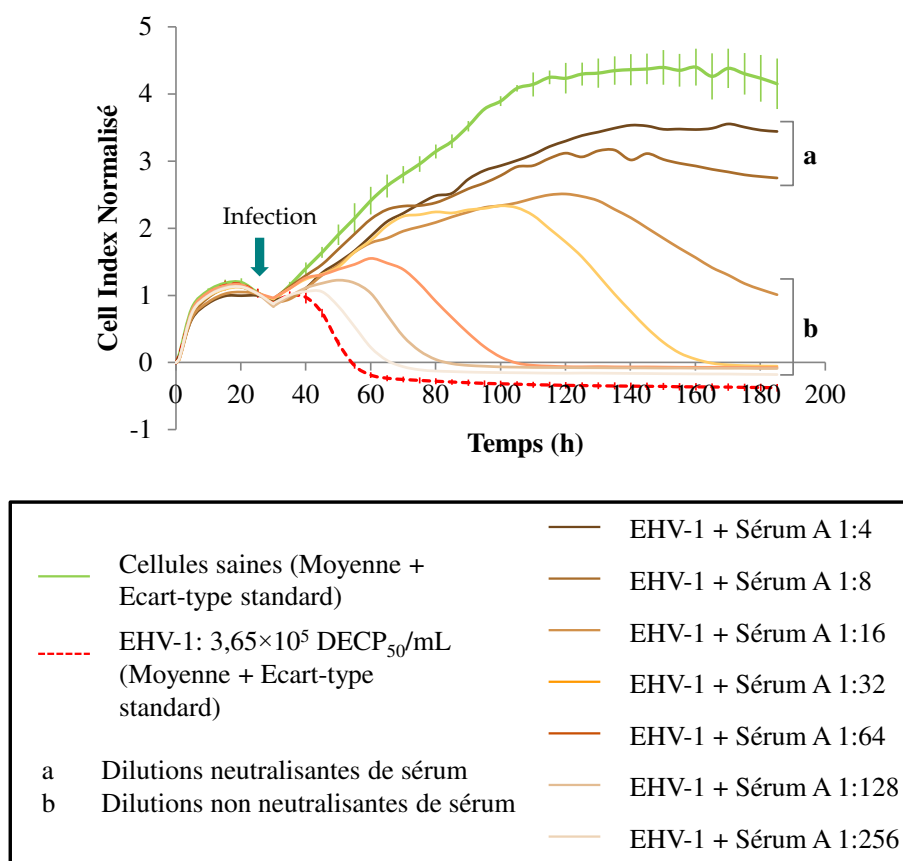


Figure 30 Cinétiques de cellules infectées par l'EHV-1 en présence de sept dilutions du sérum A (1:4 à 1:256). Les dilutions considérées comme neutralisantes et non-neutralisantes dans les conditions expérimentales de cette étude sont indiquées (a, b).

En se basant sur cette observation, l'hypothèse a été émise que le CIT₅₀ obtenu en un point unique de dilution d'un sérum pouvait être corrélé à son titre d'anticorps neutralisants. Le CIT₅₀ nécessite une chute du CI. Un sérum très dilué étant plus susceptible d'entraîner cette chute qu'un sérum peu dilué potentiellement chargé en anticorps, la dilution 1:256 a ainsi été retenue pour tester l'hypothèse énoncée précédemment. Quarante-quatre sérums issus du set #2 de sérums (prélèvements des jours J+8 à J+18 post-infection (pi) des chevaux 1 à 4) ont été testés contre la souche EHV-1 KyD VR700® ($3,65 \times 10^5$ DECP₅₀/mL) en utilisant la technologie xCELLigence®. Ces sérums ont été dilués en série de la dilution 1:4 à la dilution 1:256. Deux approches analytiques ont été étudiées. Une première analyse (méthode #2.1) a été entreprise de la manière suivante :

- 1) Le CIT₅₀ a d'abord été calculé pour la dilution 1:256 de chacun des sérums (CIT₅₀SR) et rapporté au CIT₅₀ de cellules infectées sans sérum (CIT₅₀V). La valeur obtenue a été désignée comme suit : CIT₅₀SR/CIT₅₀V.

- 2) Le titre de chacun des 44 sérums a également été prédit selon la dernière dilution entraînant une évolution croissante ou stable du CI sur E.Derm infectées, comme illustré précédemment en Figure 30.

Les valeurs obtenues sont indiquées dans le Tableau 6. Les valeurs CIT_{50SR}/CIT_{50V} ont ensuite été corrélées à la réciproque du titre prédit à l'aide des courbes de CI. Cette corrélation est illustrée en Figure 31 et a été appuyée par un coefficient de détermination de $R^2=0,8095$.

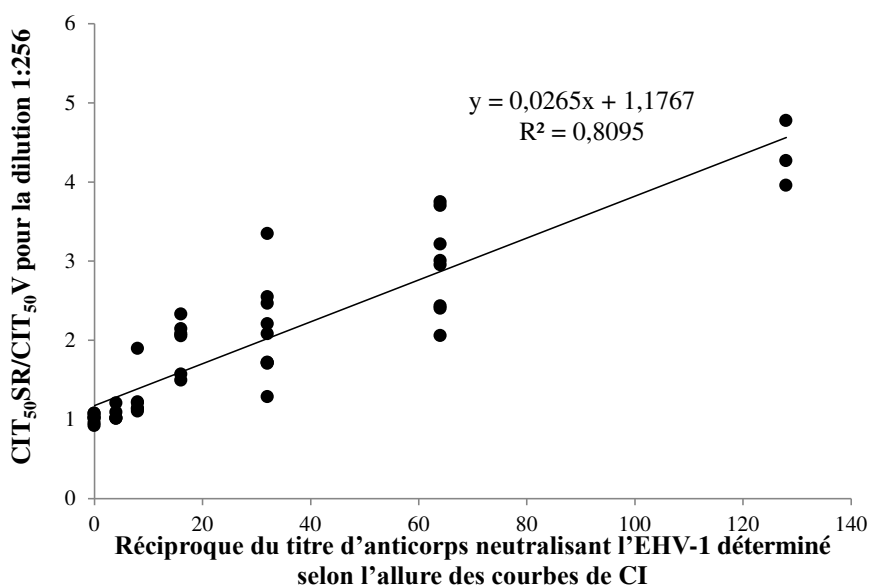


Figure 31 Régression linéaire illustrant la relation entre le CIT_{50SR}/CIT_{50V} de sérums collectés sur les chevaux 1 à 4 du set #2 de sérums des jours J+8 à J+18 post-infection expérimentale, et le titre prédit selon la cinétique des courbes de CI sur la cascade de dilution 1:4 à 1:256 de ces sérums.

Alors que pour cette première approche (méthode #2.1), le titre des sérums a été déterminé selon l'aspect visuel des courbes de CI, une seconde approche (méthode #2.2) plus standardisée et basée sur les aires sous les courbes (« area under the curve » AUC) a également été explorée. L'objectif de cette seconde approche était d'identifier un seuil d'AUC déterminant le caractère neutralisant ou non-neutralisant d'une dilution de sérum. Pour ce faire, les AUCs de l'ensemble des dilutions des 44 sérums étudiés précédemment ont été calculées entre 0 et 140 heures post-infection d'acquisition sur xCELLigence®. La même expérience ayant été réalisée sur plaque 96 puits standard pour la lecture au microscope d'effets cytopathiques (ECPs), les AUCs calculées ont ainsi pu être associées à une absence ou présence d'ECPs. L'analyse statistique de la fonction d'efficacité du récepteur (« receiver

operating characteristic » ; ROC) a permis la détermination d'un seuil d'AUC de 173,54, au-dessus duquel les sérums étaient considérés comme neutralisants et en dessous duquel les sérums étaient considérés comme non-neutralisants, avec cependant un pourcentage de faux-positifs de 0,5% et de faux-négatifs de 13,3%.

Toujours sur la base de la dernière dilution neutralisante, les titres des 44 sérums ont alors été recalculés à l'aide de ce seuil d'AUC à 140 hpi (d'acquisition xCELLigence®) puis de nouveau corrélés au $CIT_{50}SR/CIT_{50}V$ de leur dilution 1:256 (Tableau 6 et Figure 32). Cette fois, le coefficient de détermination ($R^2=0,7221$) s'est montré moins élevé que lors de la première approche. C'est donc la méthode #2.1, basée sur l'allure des courbes xCELLigence®, qui a été conservée pour la suite de l'analyse.

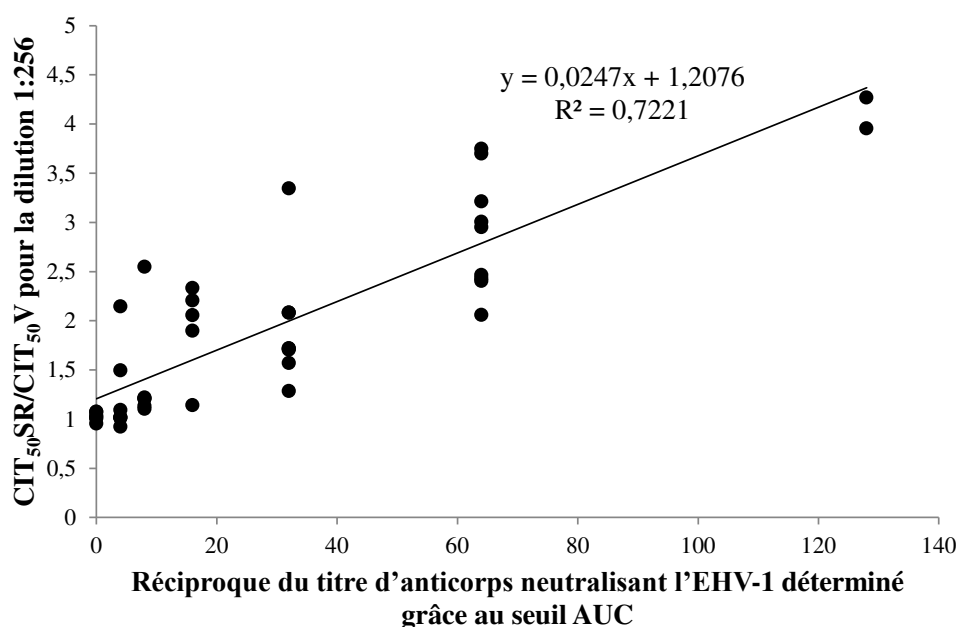


Figure 32 Régression linéaire illustrant la relation entre le $CIT_{50}SR/CIT_{50}V$ de sérums collectés sur les chevaux 1 à 4 du set #2 de sérums des jours J+8 à J+18 post-infection expérimentale, et le titre prédit à partir de la cascade de dilution (1:4 à 1:256) de ces sérums, selon le seuil AUC.

Tableau 6 Récapitulatif des valeurs de $CIT_{50}SR/CIT_{50}V$ et des réciproques des titres d'anticorps neutralisant l'EHV-1 prédits sur E.Derm (selon les courbes de CI ou selon le seuil AUC) pour les sérums des chevaux 1 à 4 du set #2 de sérums prélevés aux jours J+8 et J+18 post-infection expérimentale.

		J ¹ +8	J+9	J+10	J+11	J+12	J+13	J+14	J+15	J+16	J+17	J+18
Cheval 1	Réciproque du titre selon les courbes de CI	0	0	8	8	16	16	16	32	16	16	32
	Réciproque du titre selon le seuil AUC	0	0	8	8	4	4	16	16	16	32	32
	$CIT_{50}SR/CIT_{50}V$	1,008	1,073	1,104	1,212	1,495	2,146	2,056	2,208	2,332	2,082	1,722
Cheval 2	Réciproque du titre selon les courbes de CI	0	4	4	8	8	32	64	64	32	64	64
	Réciproque du titre selon le seuil AUC	0	4	8	8	16	8	64	64	32	64	64
	$CIT_{50}SR/CIT_{50}V$	1,021	1,016	1,206	1,220	1,897	2,550	2,952	3,006	3,346	3,750	3,701
Cheval 3	Réciproque du titre selon les courbes de CI	0	0	4	8	32	32	64	64	128	128	128
	Réciproque du titre selon le seuil AUC	0	0	4	8	32	32	64	64	128	ND ²	128
	$CIT_{50}SR/CIT_{50}V$	1,034	1,077	1,092	1,133	1,286	1,707	2,059	3,214	3,957	4,775	4,269
Cheval 4	Réciproque du titre selon les courbes de CI	0	0	4	4	8	16	32	32	32	64	64
	Réciproque du titre selon le seuil AUC	0	4	4	4	16	32	32	32	64	64	64
	$CIT_{50}SR/CIT_{50}V$	0,955	0,922	1,020	1,013	1,141	1,571	1,719	2,082	2,467	2,432	2,404

¹J = jour post-infection expérimentale

²ND= non déterminé

Afin de tester la validité de cette méthode #2.1, une nouvelle expérimentation sur xCELLigence® consistant, cette fois, à n’infecter les cellules qu’en présence de la dilution 1:256 a été réalisée à nouveau sur les 44 sérums issus des chevaux 1 à 4 utilisés précédemment (set#2), mais également sur les 44 sérums issus des chevaux 5 à 8 (correspondant aux prélèvements des jours J+8 à J+18 post-infection expérimentale de ces chevaux, set#2). La réciproque du titre d’anticorps neutralisants (« real-time neutralising assay » (RTNA) NT#2 pour « neutralising titre » de la méthode #2) a été déterminée selon l’équation (1) suivante, tirée de la corrélation obtenue en Figure 31 (selon méthode #2.1) :

$$(1) \quad \text{Réciproque du NT\#2} = \frac{((\text{CIT50SR} \div \text{CIT50V}) - 1,1767)}{0,0265}$$

Les titres RTNA NT#2 obtenus (en duplicats) ont ensuite été comparés aux titres d’anticorps neutralisants obtenus avec la méthode conventionnelle sur RK13 que nous nommerons NT-RK13 pour plus de clarté. Les valeurs obtenues sont indiquées dans le Tableau 7 et illustrées en Figure 33.

Toutes les valeurs de RTNA NT#2 négatives ou inférieures à 1 mesurées chez certains chevaux entre les jours J+8 et J+11 post-infection expérimentale ont été rapportées à 1 pour faciliter l’analyse selon une échelle logarithmique de base 2. La séroconversion est définie comme une augmentation du titre d’anticorps neutralisants d’un facteur 4, cela se traduit par un $\Delta\text{Log}_2=3$ dans le cas des réciproques de titres de sérums dilués par un facteur 2. Une séroconversion a ainsi pu être observée à la fois avec la méthode conventionnelle (NT-RK13) et la méthode #2 (RTNA NT#2). Les deux méthodes n’ont cependant pas permis de mesurer cette séroconversion au même point de prélèvement. Pour les chevaux 1, 3, 4, 5, 6 et 8, la méthode conventionnelle a permis de mesurer la séroconversion un jour plus tôt que la méthode #2. Pour les chevaux 2 et 7, la méthode conventionnelle a permis de mesurer la séroconversion deux jours plus tôt que la méthode #2.

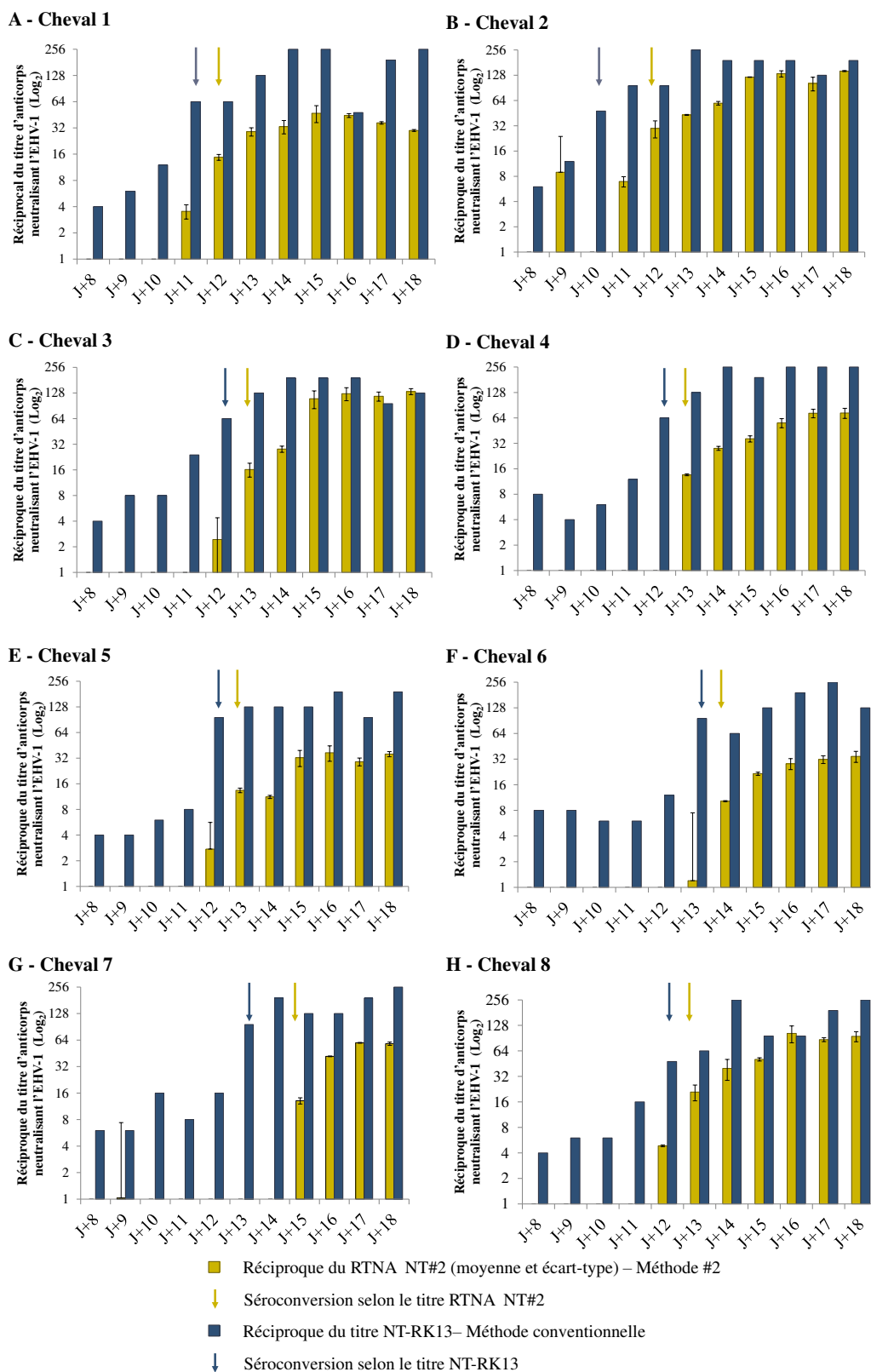


Figure 33 Réciproque des titres d'anticorps neutralisants obtenus avec la méthode #2 sur cellules E.Derm (RTNA NT#2 ; jaune) et avec la méthode conventionnelle sur cellules RK13 (NT-RK13 ; bleu) pour les sérums des chevaux 1 à 8 du set #2 de sérums (respectivement A à H).

Tableau 7 Récapitulatif des réciproques de titres d'anticorps neutralisant l'EHV-1 obtenus avec la méthode #2 sur E.Derm (RTNA NT#2) et la méthode conventionnelle sur RK13 (NT-RK13) pour les sérums des chevaux 1 à 8 du set #2 de sérums prélevés aux jours J+8 et J+18 post-infection expérimentale. L'analyse sur xCELLigence® (RTNA NT#2) a été menée en duplicats, alors que la méthode conventionnelle a été menée en simplicat (lecture en bicupule).

Réciproque du titre d'anticorps neutralisant l'EHV-1			J ¹ +8	J ¹ +9	J ¹ +10	J ¹ +11	J ¹ +12	J ¹ +13	J ¹ +14	J ¹ +15	J ¹ +16	J ¹ +17	J ¹ +18
Cheval 1	RTNA NT#2 (E.Derm)	Moyenne	1 ²	1 ²	1 ²	3,54	14,75	28,97	33,11	47,18	44,47	36,55	29,93
		Ecart-type	ND	ND	ND	0,66	1,14	3,19	5,79	10,38	2,24	1,15	0,77
	NT-RK13	4	6	12	64	64	128	256	256	48	192	256	
Cheval 2	RTNA NT#2 (E.Derm)	Moyenne	1 ²	8,95	1 ²	6,94	29,76	43,10	59,45	121,61	133,45	102,31	143,49
		Ecart-type	ND	14,92	ND	0,98	6,85	0,60	2,96	0,88	11,45	19,09	2,13
	NT-RK13	6	12	48	96	96	256	192	192	192	128	192	
Cheval 3	RTNA NT#2 (E.Derm)	Moyenne	1 ²	1 ²	1 ²	1 ²	2,44	16,18	28,09	109,71	125,82	117,08	133,13
		Ecart-type	ND	ND	ND	ND	1,96	3,01	2,38	25,77	21,71	14,39	10,68
	NT-RK13	4	8	8	24	64	128	192	192	192	96	128	
Cheval 4	RTNA NT#2 (E.Derm)	Moyenne	1 ²	1 ²	1 ²	1 ²	1 ²	13,59	27,95	36,27	55,82	72,64	73,15
		Ecart-type	ND	ND	ND	ND	ND	0,36	1,50	3,06	6,91	8,34	9,90
	NT-RK13	8	4	6	12	64	128	256	192	256	256	256	
Cheval 5	RTNA NT#2 (E.Derm)	Moyenne	1 ²	1 ²	1 ²	1 ²	2,74	13,42	11,24	32,46	37,07	29,05	35,76
		Ecart-type	ND	ND	ND	ND	2,88	0,82	0,47	6,97	7,61	3,09	2,53
	NT-RK13	4	4	6	8	96	128	128	128	128	192	96	192
Cheval 6	RTNA NT#2 (E.Derm)	Moyenne	1 ²	1 ²	1 ²	1 ²	1 ²	1,20	10,27	21,56	28,26	31,73	34,43
		Ecart-type	ND	ND	ND	ND	ND	6,30	0,15	0,92	4,17	3,29	5,08
	NT-RK13	8	8	6	6	12,00	96,00	64,00	128,00	192,00	256,00	128,00	
Cheval 7	RTNA NT#2 (E.Derm)	Moyenne	1 ²	1,03	1 ²	1 ²	1 ²	1 ²	1 ²	13,08	41,74	59,51	60,01
		Ecart-type	ND	6,37	ND	ND	ND	ND	ND	1,04	0,40	0,58	2,58
	NT-RK13	6	6	16	8	16	96	192	128	128	192	256	
Cheval 8	RTNA NT#2 (E.Derm)	Moyenne	1 ²	1 ²	1 ²	1 ²	4,85	20,88	39,71	50,81	102,98	86,88	94,98
		Ecart-type	ND	ND	ND	ND	0,12	4,44	11,01	2,31	23,21	4,53	12,84
	NT-RK13	4	6	6	16	48	64	256	96	96	192	256	

¹J = jour post-infection expérimentale, ²Valeurs négatives ou inférieures à 1 rapportées à 1.

Méthode #3

La troisième méthode explorée pour la détermination du titre d'anticorps neutralisants à partir d'une analyse en temps réel sur xCELLigence®, est elle aussi portée sur le CIT₅₀. Comme mentionné précédemment et illustré en Figure 29, ce CIT₅₀ est corrélé à la concentration de virus infectant les cellules. Un délai de la chute du CI est ainsi observé avec les concentrations décroissantes de virus infectant les cellules. L'hypothèse a donc été émise que dans le cas de cellules infectées en présence d'une dilution de sérum, le délai de chute du CI observé par rapport au contrôle de cellules infectées sans sérum serait corrélé avec le log de la concentration de virus non neutralisé comme illustré en Figure 34.

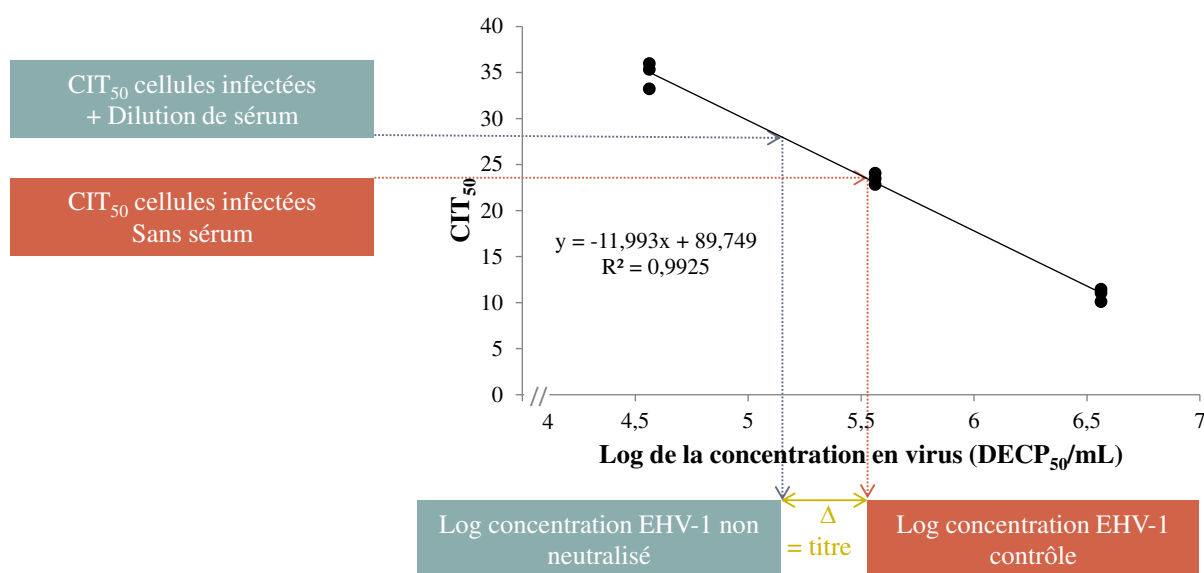


Figure 34 Description figurative du principe de la détermination du titre d'un sérum selon la méthode #3.

Cette hypothèse a été explorée en simplicat sur les sérums des chevaux 1 et 2 du set #2 de sérums, collectés entre les jours J+8 à J+18 post-infection expérimentale. Pour les mêmes motifs que pour la méthode #2, la dilution 1:256 a été choisie pour l'analyse. Par ailleurs, les trois concentrations de virus ($3,65 \times 10^4$ DECP₅₀/mL, $3,65 \times 10^5$ DECP₅₀/mL et $3,65 \times 10^6$ DECP₅₀/mL) ont été incluses dans chacune des plaques 96 puits analysées sur xCELLigence® pour permettre une analyse sur mesure des données.

Dans un premier temps, le log de la concentration de virus non neutralisé a été calculé selon l'équation (2) suivante, basée sur la régression linéaire entre le CIT₅₀ des concentrations de virus déposées et le logarithme de ces concentrations:

$$(2) \log(\text{concentration de virus non neutralisé}) = \frac{(CIT50 - \text{intersection à l'ordonnée})}{\text{pente}}$$

Sur l'exemple de la régression linéaire présentée en Figure 33, cette équation (3) serait alors :

$$(3) \log(\text{concentration de virus non neutralisé}) = \frac{(CIT50 - 89,749)}{-11,993}$$

La différence entre le log de la concentration du virus contrôle et log de la concentration de virus non neutralisé a ensuite été calculée et considérée comme étant le titre des sérums. Ce titre est identifié comme RTNA NT#3 (« neutralising titre » de la méthode #3 obtenu par RTNA). Les valeurs obtenues pour les chevaux 1 et 2 sont indiquées dans le Tableau 8 et illustrées en Figure 35.

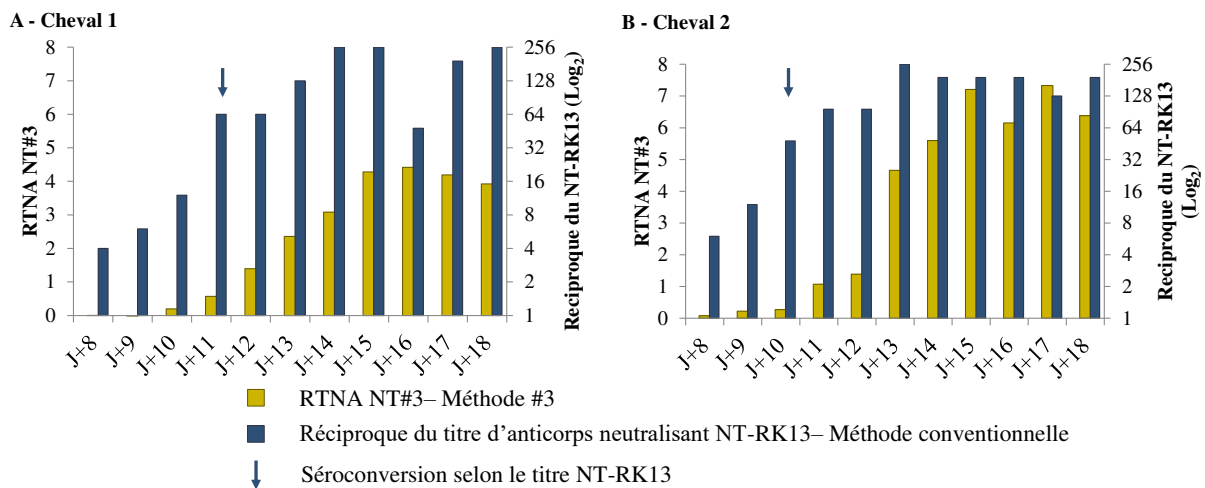


Figure 35 Titres d'anticorps neutralisant l'EHV-1 obtenus avec la méthode #3 sur cellules E.Derm (RTNA NT#3 ; jaune) en comparaison avec la réciproque des titres d'anticorps neutralisants obtenus avec la méthode conventionnelle sur cellules RK13 (NT-RK13 ; bleu) pour les sérums des chevaux 1 et 2 du set#2 de sérums (respectivement A et B).

Comme mentionné précédemment, la séroconversion peut se traduire par un $\Delta\text{Log}_2=3$ dans le cas des réciproques du titre de sérums dilués par un facteur 2. Dans le cas de la méthode #3, le titre n'étant plus défini selon la dernière dilution de sérum neutralisante, il est plus difficile, à ce stade du développement, d'appliquer cette règle. Toutefois, au vu de l'évolution des histogrammes pour chaque cheval, la différence de RTNA NT#3 entre le jour J+8 et le jour J+18 post-infection expérimentale pour les deux chevaux semble corrélée avec celle observée avec le NT-RK13, en particulier pour le Cheval 2. Cependant, il semble que

l'augmentation du RTNA NT#3 soit retardée en comparaison avec celle du NT-RK13. En effet, les NT-RK13 augmentent respectivement dès le jour J+9 pour les deux chevaux 1 et 2 alors que cette augmentation n'est observable respectivement qu'aux jours 10 et 11 pour ces deux mêmes chevaux selon les titres RTNA NT#3.

Les deux méthodes #2 et #3 étudiées ont permis d'observer une augmentation du titre d'anticorps neutralisants entre les jours J+8 et J+18 post-infection expérimentale similaire à celle observée avec la méthode NT-RK13. L'augmentation jour par jour a cependant montré des écarts pour les deux méthodes #2 et #3 en comparaison avec la méthode conventionnelle sur RK13. Ces écarts pourraient s'expliquer par le choix de la dilution d'analyse et seront discutés par la suite.

Tableau 8 Récapitulatif des réciprocques de titres d'anticorps neutralisant l'EHV-1 obtenus avec la méthode #3 sur E.Derm (RTNA NT#3) et la méthode conventionnelle sur RK13 (NT-RK13) pour les sérums des chevaux 1 et 2 du set #2 de sérums prélevés aux jours J+8 et J+18 post-infection expérimentale. Les deux méthodes ont été réalisées en simplicats.

		J+8	J+9	J+10	J+11	J+12	J+13	J+14	J+15	J+16	J+17	J+18
Cheval 1	RTNA NT#3	0,00	-0,01	0,20	0,57	1,39	2,36	3,08	4,28	4,42	4,19	3,92
	Réciproque du titre d'anticorps neutralisants NT-RK13	4	6	12	<u>64</u>	64	128	256	256	48	192	256
Cheval 2	RTNA NT#3	0,08	0,22	0,28	1,07	1,39	4,66	5,60	7,21	6,15	7,33	6,38
	Réciproque du titre d'anticorps neutralisants NT-RK13	6	12	<u>48</u>	96	96	256	192	192	192	128	192

¹J = jour post-infection expérimentale, ²ND= non déterminé.

Discussion

Trois méthodes d'analyse du titre d'anticorps neutralisant l'EHV-1 par « real time neutralising assay » (RTNA) sur cellules E.Derm ont été explorées au sein de cette étude. Le choix de ce modèle cellulaire a été motivé par la description, par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE), d'une cytotoxicité des sérums de chevaux fréquemment vaccinés sur cellules RK13, pouvant être évitée sur cellules E.Derm (International Office of Epizootics and Biological Standards Commission 2018).

La méthode #1, présentée au sein d'un article en préparation, est basée sur le principe de dose-réponse déjà exploré par Witkowski *et al.* (2010) et a permis de calculer un NT₅₀ (titre d'anticorps neutralisant le virus à 50%) (Witkowski *et al.* 2010). Comme pour la séroneutralisation en temps réel de l'orthopoxvirus proposée par Witkowski *et al.* (2010), cette méthode a permis de mesurer de manière quantitative le titre d'anticorps neutralisant l'EHV-1 ainsi que la séroconversion de chevaux infectés expérimentalement par l'EHV-1, entre les jours J+8 et J+18 post-infection. La détermination du NT₅₀ prend en compte les contrôles expérimentaux qui, selon notre observation, peuvent montrer de légères variations d'une expérimentation à l'autre (observation personnelle d'une variation du CIT₅₀ des contrôles de cellules infectées seules ou en présence de sérums au titre connu). Deux autres méthodes (#2 et #3, permettant le calcul respectif des RTNA NT#2 et RNTA NT#3), inspirées des travaux de Fang *et al.* (2011), ont ensuite été présentées en résultats complémentaires et sont basées sur le CIT₅₀ à la dilution 1:256 (temps requis pour que le « cell index » chute de 50% à cette dilution) (Fang *et al.* 2011).

La méthode #2 a été étudiée selon deux approches #2.1 et #2.2, la première corrélant le CIT₅₀ de la dilution 1:256 de sérums avec leur titre déterminé selon la dernière courbe montrant un CI stable, la seconde corrélant ce même CIT₅₀ au titre déterminé selon la dernière dilution neutralisante elle-même déterminée selon un seuil d'aire sous la courbe. Le coefficient de détermination de la première corrélation (#2.1) s'est montré meilleur que celui de la deuxième (#2.2). Cela pourrait s'expliquer par le fait que le seuil d'aire sous la courbe a été déterminé à l'aide de l'observation d'effets cytopathiques dans les mêmes conditions que par RTNA mais sur un modèle de plaques 96 puits différents, les plaques utilisées pour la technologie xCELLigence® n'étant pas optimales pour la lecture d'ECPs au microscope. C'est d'ailleurs ce que suggère le pourcentage de faux-négatifs de 13,3% déterminé à la suite de l'analyse ROC. Bien que les conditions aient été identiques, la séroneutralisation peut

parfois montrer des variations d'une expérimentation à l'autre et pourrait expliquer la différence de corrélation entre la méthode #2.1 et la méthode #2.2. En ce qui concerne la méthode #3, l'inclusion de trois concentrations de virus sur chaque plaque d'expérimentation permet de déterminer un RTNA NT#3 représentatif, comme pour la méthode #1, des conditions d'expérimentation.

Les deux méthodes ont permis d'observer une augmentation du titre d'anticorps neutralisants (RTNA NT#2 et RTNA NT#3) chez des chevaux prélevés entre les jours J+8 et J+18 post-infection expérimentale, détectable aussi par la méthode conventionnelle sur RK13 (NT-RK13). En revanche, cette augmentation a été détectée plus tardivement avec les méthodes #2 et #3 qu'avec la méthode conventionnelle. Une explication probable pourrait se trouver dans le point de dilution d'analyse choisi (1:256). Dans le cas de sérums peu chargés en anticorps neutralisant l'EHV-1, il est possible que ces anticorps soient trop dilués à la concentration 1:256 pour que des variations ne soient détectables. Le choix d'une dilution inférieure à 1:256 impacterait à l'inverse les sérums fortement chargés en anticorps neutralisant l'EHV-1, pour lesquels une chute de CI nécessaire au calcul du CIT₅₀ n'est observable que pour les dilutions tardives. Une autre hypothèse quant au délai de détection de l'augmentation des titres d'anticorps observé entre les méthodes #2 et #3 sur E.Derm et la méthode conventionnelle sur RK13 pourrait se trouver au niveau du modèle cellulaire. Cette hypothèse reste cependant peu probable puisque la concentration d'EHV-1 nécessaire sur E.Derm pour obtenir un effet neutralisant d'un sérum s'est montrée, dans notre étude, 182 fois supérieure à celle nécessaire pour obtenir le même effet avec le même sérum selon les conditions recommandées par l'OIE sur RK13 (International Office of Epizootics and Biological Standards Commission 2018). Cela laisse penser que les cellules RK13 se multiplient plus vite et/ou sont plus permissives que les cellules E.derm. Un petit nombre de particules non neutralisées pourrait alors induire plus d'effet sur RK13 que sur E.Derm et le titre d'un sérum serait alors revu à la baisse sur RK13 en comparaison à la neutralisation sur E.Derm, à l'inverse de nos observations.

Si les 3 méthodes #1, #2 et #3 semblent appropriées pour la mesure de la séroconversion entre des sérums prélevés lors de la phase aiguë de la maladie et la phase de convalescence (ou pour mesurer l'effet de la vaccination avec des prélèvements espacés dans le temps), la méthode #1 semble pour sa part plus appropriée pour mesurer l'évolution des anticorps neutralisants jours après jours. Elle présente cependant l'inconvénient de nécessiter,

comme la méthode conventionnelle, plusieurs points de dilution d'un sérum, à l'inverse des méthodes #2 et #3 qui présentent l'avantage de ne nécessiter qu'un seul point de dilution.

La méthode #1 a ensuite été mise en application pour l'étude de la réponse en anticorps neutralisants de 13 chevaux impliqués dans une campagne de vaccination. Ces 13 chevaux ont été répartis en trois groupes, chacun recevant un protocole de vaccination différent : un groupe de chevaux recevant une primo-vaccination (« Primo-vaccination »), un groupe de chevaux recevant un rappel de vaccination (« Boost ») et un groupe de juments gestantes recevant un protocole adapté (« Pregnant mares »). L'analyse statistique des valeurs de NT_{50} a permis de montrer une augmentation significative du titre d'anticorps neutralisant l'EHV-1 dans le groupe « Primo-vaccination ». Dans ce groupe, les chevaux de plus de 2 ans ont montré des titres en anticorps neutralisants plus élevés et des réponses plus persistentes que chez les chevaux de moins de 2 ans. Cette différence de réponse pourrait s'expliquer d'une part par une probabilité plus grande d'exposition à l'EHV-1 ou l'EHV-4 (dont certains anticorps réagissant de manière croisée avec l'EHV-1) dans les années précédant la campagne pour les chevaux plus âgés que pour les chevaux plus jeunes. Cette hypothèse ne se vérifie pas dans le cas de la jeune pouliche de 6 mois dont la mère (issue du groupe « Boost ») a été testée positive pour l'EHV-4 quelques mois avant l'étude. Cette pouliche a en effet montré un titre d'anticorps neutralisants initial faible et n'a répondu qu'à la troisième injection et de manière non persistante. Cette faible réponse à la vaccination, avec ou sans historique d'infection chez les jeunes chevaux pourrait être en lien avec la maturité du système immunitaire. La faible réponse de poulains de 5 mois à la vaccination par un vaccin inactivé ou sous-unitaire a déjà été décrite comme l'expliquent Paillot *et al.* (2008) dans leur revue et pourrait être liée à un système immunitaire immature (Foote *et al.* 2005; pour revue, Paillot *et al.* 2008). Sachant que les jeunes chevaux de cette étude ont plus de 6 mois et sont considérés comme ayant un système immunitaire mature, on peut se demander si leur faible réponse à la vaccination vient de leur historique vierge de vaccination/infection (ce qui n'est cependant pas le cas de la pouliche mentionnée précédemment), ou d'une immaturité encore mal connue de certains paramètres de leur réponse immunitaire comme le suggèrent Perkins et Wagner dans leur revue publiée en 2015 et mentionnant les IgG4, IgG7 (pour revue, Perkins and Wagner 2015). Des niveaux élevés de ces isotypes, qui pourraient conférer une protection locale lors d'infections par l'EHV-1, ont été mesurés au niveau de la muqueuse intranasale lors d'un challenge infectieux (Perkins *et al.* 2019). Si le *ratio* de ces isotypes a été mesuré chez des poulains de juments vaccinées ou chez des poulains vaccinés quelques jours après la

naissance et infectés expérimentalement après sevrage, ils n'ont pas été étudiés, à notre connaissance chez des poulains en réponse à une vaccination à l'âge de six mois (Bresgen *et al.* 2012; Wagner *et al.* 2017).

Les niveaux initiaux d'anticorps neutralisant l'EHV-1 étaient plus élevés dans le groupe « Boost » et le groupe « Pregnant mares » que dans le groupe « Primo-Vaccination ». Au sein du groupe « Boost », ces niveaux d'anticorps neutralisants étaient cependant hétérogènes, tout comme les réponses à la vaccination. Deux juments (gravides) se sont démarquées du groupe avec un niveau d'anticorps neutralisant élevé dès le début de la campagne (Réciproque du $NT_{50} > 200$). Ce titre élevé pourrait s'expliquer pour une des juments par une exposition à l'EHV-4 quelques mois avant la campagne (résultat PCR EHV-4 positif), mais il est également intéressant de noter que ces deux juments ont reçu un protocole de vaccination de gestation (soit trois injections) durant la saison de reproduction précédant cette étude. Par ailleurs, la seconde jument a montré une augmentation du titre d'anticorps neutralisants trois mois après l'injection de vaccin. Une hypothèse pour expliquer cette importante augmentation pourrait être une exposition à l'EHV-1 ou l'EHV-4 pendant la campagne, plus probablement après l'injection du vaccin. Aucun signe clinique qui aurait pu appuyer cette hypothèse n'a cependant été rapporté par la vétérinaire en charge de la vaccination et des prélèvements. Cette potentielle infection « naturelle » aurait permis une meilleure stimulation de la réponse en anticorps neutralisants que l'injection de vaccin, probablement en raison d'une exposition à une charge antigénique plus importante que lors de la vaccination.

Les réponses en anticorps neutralisants à la vaccination du groupe « Pregnant mares » ont également été hétérogènes selon les profils de chevaux. La seule jument n'ayant pas d'historique de vaccination contre l'EHV-1 et l'EHV-4 a montré une réponse immunitaire similaire à celles observées dans le groupe « Primo-vaccination » bien que le protocole vaccinal diffère, caractérisée par une augmentation du titre en anticorps neutralisants après chaque injection. Les deux autres juments du groupe ont moins bien répondu à la vaccination. L'une présentant un niveau d'anticorps neutralisants relativement élevé tout au long de la campagne, l'autre montrant un niveau faible et n'ayant répondu qu'à la première injection. Une hypothèse pourrait être que ces juments sont de faibles répondeuses à la vaccination, comme il a déjà été décrit mais selon des critères non applicables dans notre étude. En effet, dans leur étude menée en Australie sur 159 juments et 101 poulains vaccinés avec le vaccin

Duvaxyn® EHV 1,4 (l'ancêtre de l'Equip® EHV 1,4), Foote *et al.* (2002) ont montré que selon les tests ELISA utilisés dans l'étude, seules 13.8 à 28.9% des juments étaient considérées comme répondeuses à la vaccination, et 16.4 à 17.7% des juments étaient décrites comme séropositives persistantes toute au long de l'étude (Foote *et al.* 2002). La jument gestante de notre étude ayant montré une faible réponse à la vaccination mais un titre élevé en anticorps neutralisants tout au long de la campagne pourrait alors être une jument séropositive persistante. Par ailleurs, Foote *et al.* ont aussi observé dans leur étude (2002) que les juments répondant le mieux à la vaccination étaient celles montrant un titre en anticorps neutralisants initial faible, avec l'hypothèse qu'un titre initial trop élevé conduirait à la neutralisation des antigènes vaccinaux avant même qu'ils aient pu induire une protection humorale (Foote *et al.* 2002). Cette hypothèse serait également en accord avec les faibles réponses des chevaux du groupe « Boost » lorsque le titre en anticorps neutralisants initial était élevé. La même hypothèse avait d'ailleurs été émise par Attili *et al.* (2020) lors d'une étude conduite sur 18 juments vaccinées avec un vaccin similaire à celui décrit par Foote *et al.* (2002) (Attili *et al.* 2020).

L'étude présentée dans ce chapitre a permis d'explorer un nouvel outil de suivi du niveau de protection conféré par les anticorps neutralisant l'EHV-1. Cet outil, développé sur la technologie xCELLigence® a permis de déterminer de manière quantitative le titre de sérums qualifiés sur cellules E.Derm. Ces titres (NT₅₀) se sont montrés comparables à ceux obtenus avec la méthode de référence sur RK13 et ont permis d'étudier la réponse en anticorps neutralisants de trois groupes de chevaux, chaque groupe ayant reçu un protocole différent. Cette première étude qui fait la preuve de concept pour l'EHV-1 concernant l'outil de RTNA, ouvre la voie à une approche plus quantitative de la réponse en anticorps. Des études complémentaires sont nécessaires en particulier sur un nombre plus important d'échantillons, mais ce travail laisse entrevoir la possibilité d'un suivi plus fin de l'évolution du taux d'anticorps neutralisants suite à la vaccination et pourrait constituer un outil de choix pour les études menées par les industriels du vaccin.

Chapitre 4.

DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES ET
CONCLUSION

A. Discussion générale et perspectives

Si les virus sont présents partout dans ce monde, bien heureusement, tous ne représentent pas nécessairement un danger pour leur hôte. Les herpèsvirus semblent d'ailleurs avoir choisi la voie de la co-évolution avec leur hôte comme le suggère Davison (2002), leur permettant, à la façon d'un pacte de bonne entente, de perdurer en ne causant de dommages à leur hôte qu'occasionnellement, comme par mégarde (pour revue, Davison 2002). Ces virus ont en effet la caractéristique d'alterner entre deux phases, la phase lytique et la phase latente, leur permettant à la fois de subsister au sein de l'organisme de leur hôte tout en assurant leur « descendance » par d'occasionnelles réactivations vers une phase lytique. C'est au cours de la phase lytique qu'ils seront excrétés et donc transmis à de nouveaux individus. Les stratégies d'adaptation de ces virus à leur hôte sont multiples. Cependant, certains herpèsvirus semblent moins adaptés que d'autres causant alors des formes de maladie parfois dramatiques, comme c'est le cas par exemple pour l'EHV-1 (pour revue, Davison 2002). L'impact causé par l'EHV-1 sur la santé des équidés et l'économie équine, mais aussi sur la santé d'autres espèces puisqu'il semble avoir franchi la barrière de l'espèce, est tel qu'une stratégie de lutte est nécessaire pour limiter les dommages. Si l'on apparente l'EHV-1 à l'ennemi de son hôte, la citation suivante de Sun Tzu tirée du traité l'Art de la Guerre « *Qui connaît l'autre et se connaît lui-même, peut livrer cent batailles sans jamais être en péril. Qui ne connaît pas l'autre mais se connaît lui-même, pour chaque victoire, connaîtra une défaite. Qui ne connaît ni l'autre ni lui-même, perdra inéluctablement toutes les batailles.* », pourrait illustrer l'intérêt à la fois du suivi moléculaire des souches sur le terrain mais également celui du suivi du niveau de protection immunitaire des chevaux face au virus. Les études de ce manuscrit se sont appuyées sur ces deux types de suivi, en ce qui concerne l'EHV-1.

L'étude moléculaire de souches d'alphaherpèsvirus collectées en France entre 2009 et 2018 a fait l'objet de la première partie (Partie A) du Chapitre 3 de ce manuscrit (Projet scientifique et méthode). L'étude menée sur 14 souches d'EHV-1 collectées dans différentes régions françaises et sur une période s'étalant sur une dizaine d'années, a permis d'établir un premier état des lieux moléculaire. L'une de ces souches d'EHV-1 a été isolée lors d'un épisode infectieux induisant la forme respiratoire, la forme abortive et la forme neurologique de la maladie au sein d'un même effectif abritant 169 chevaux dans un haras localisé en Normandie. L'évolution sur une durée de 9 mois de l'infection initiée par deux cas neurologiques au sein de ce site a ainsi pu être décrite (Partie A.a). A notre connaissance, il

s'agit d'un des seuls rapports de ce type en France. Il est peu probable qu'un suivi sur une telle durée soit systématiquement mis en place lors d'épisodes infectieux en France, mais également à l'étranger. Ainsi, on peut soupçonner que des liens épidémiologiques entre épisodes infectieux espacés dans le temps passent inaperçus. Certains outils moléculaires pourraient alors s'avérer utiles pour le suivi des souches sur le terrain. Trois outils ont été utilisés pour étudier le génome des 14 souches de l'étude : le typage du polymorphisme en position 2 254 de l'ORF30, le séquençage de l'ORF30 complet et l'outil de MLST mis au point par Garvey *et al.* (2019) (Garvey *et al.* 2019). Si le typage du polymorphisme en position 2 254 de l'ORF30 a permis la découverte de façon fortuite d'un génotype encore non décrit en cette position et impliquant également un changement d'acide aminé (C₂₂₅₄/H₇₅₂), le séquençage de l'ORF30 complet a permis la découverte d'un génome d'EHV-8 à partir d'un prélèvement nasal issu d'un âne et initialement identifié comme EHV-1 (Parties A.b et A.c). Le séquençage de l'ORF30 a aussi permis l'identification d'une souche d'EHV-9 à partir d'un prélèvement de poumon issu d'un zèbre de Grévy (Partie A.c). L'analyse moléculaire de l'ensemble de ces différentes souches d'alphaherpèsvirus d'équidés a permis de mieux les situer au sein de la phylogénie déjà existante de ce groupe de virus, mais a également suscité de nouveaux questionnements qui seront discutés par la suite.

Le typage du polymorphisme a pour sa part été réalisé sur un panel de souches plus important que celui des 14 souches sélectionnées pour l'étude phylogénétique. Sa corrélation avec les données épidémiologiques disponibles n'a pas permis d'établir une corrélation significative entre les souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂) et la manifestation de signes neurologiques. Bien qu'en désaccord avec le constat de Nugent *et al.* en 2006, associant le génotype G₂₂₅₄ (D₇₅₂) au caractère neuropathogène des souches, les résultats du typage ont, en revanche, permis de montrer une association significative de la forme abortive de la maladie avec les souches de profil A₂₂₅₄ (N₇₅₂) (Nugent *et al.* 2006). Ce type de résultats ayant également été décrit depuis 2006, il semble par conséquent moins controversé d'associer les souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) à un caractère abortif, que d'associer les souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) à un caractère neuropathogène (Perkins *et al.* 2009; Pronost *et al.* 2010; Smith *et al.* 2010; Fritsche and Borchers 2011; Damiani *et al.* 2014; Stasiak *et al.* 2015; Garvey *et al.* 2019; Pusterla *et al.* 2020; Stasiak, Dunowska and Rola 2020). Une importante épizootie d'EHV-1 a tout récemment eu lieu à Valence, en Espagne (Février 2021), au cours de laquelle au moins 52 chevaux ont montré des signes neurologiques et 11 sont morts. Le génotype A₂₂₅₄ (N₇₅₂) a été identifié dans notre laboratoire sur toutes les souches issues de prélèvements de chevaux

impliqués dans cette épizootie, renforçant à nouveau l'idée que le seul génotype en position 2 254 de l'ORF30 ne suffit pas à expliquer l'apparition de signes neurologiques, contrairement à ce que laissaient penser les résultats des études de Goodman *et al.* (2007) et Van de Walle *et al.* (2009) menées il y a une quinzaine d'années en laboratoire (Goodman *et al.* 2007; Van de Walle *et al.* 2009).

Si l'association génotype/pathotype de ce polymorphisme suscite bien des questionnements, il en est de même quant à l'histoire évolutive de ces souches. Nugent *et al.* (2006) au cours de leur étude, ont apporté une première réponse montrant la grande conservation du résidu D en position 752 ou équivalente chez de nombreuses espèces de mammifères. Cette observation a conduit les auteurs à suggérer que le génotype D₇₅₂ (G₂₂₅₄) était le génotype ancestral à partir duquel le génotype N₇₅₂ (A₂₂₅₄) aurait évolué. Cette théorie évolutive a été soutenue par d'autres études visant cette fois à investiguer le rôle de ce polymorphisme sur le comportement des souches à une échelle plus en lien avec la physiopathologie. Le but de ces études était alors d'expliquer l'impact du génotype en position 2 254 du gène de l'ADN polymérase sur la nature des signes cliniques causés par l'infection (Gryspeerd *et al.* 2010; Vandekerckhove *et al.* 2010; Wagner *et al.* 2011; Wimer *et al.* 2011; Laval *et al.* 2017; Poelaert *et al.* 2018, 2019a, 2019b). Les résultats issus de ces études suggèrent, eux aussi, une meilleure adaptation des souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) à leur hôte en comparaison aux souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂), se traduisant par une infection plus discrète, notamment au niveau des PBMCs. Cette stratégie permettrait aux souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) de mieux échapper à la réponse immunitaire cellulaire et d'atteindre, sans trop d'encombres, les vaisseaux sanguins irriguant l'utérus pour s'y répliquer plus activement et induire une thrombose et une ischémie à l'origine des signes cliniques caractéristiques de la forme abortive. A l'inverse, les souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂) auraient un mode d'infection plus « explosif » et seraient d'ailleurs plus susceptibles d'être neutralisées avant d'atteindre les vaisseaux sanguins de l'organe cible (Poelaert *et al.* 2018). Quant aux « choix » des organes cibles en question, Katrien Poelaert a émis l'hypothèse, à l'issue de ses travaux de thèse, d'une attraction des cellules immunitaires vers l'utérus gestant sous l'action d'hormones de gestation (Poelaert 2019). Cette hypothèse s'est basée sur de précédents travaux montrant que les hormones sécrétées dans le microenvironnement de l'utérus gestant chez l'humain stimulaient la production de cytokines et chimiokines entraînant le recrutement de cellules immunitaires (Arici *et al.* 1999; He *et al.* 2007; Khan and Ansar Ahmed 2016; Poelaert 2019). Poelaert (2019) suggère alors, en supposant qu'un tel recrutement hormono-dépendant des

cellules immunitaires vers l'utérus se produise également chez les juments gestantes, que ce phénomène jouerait en faveur de souches abortives qui, par leur infection discrète des cellules immunitaires, parviennent mieux à échapper à la réponse immunitaire cellulaire, à l'inverse des souches dites neuropathogènes. Ces dernières, lors d'une infection chez une jument gestante n'atteindraient l'utérus que dans de rares cas, ce qui est en accord avec les données de typages collectées au cours de différentes études. Les souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) sont en effet principalement associées aux formes abortives, avec le rapport moins systématique de souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) isolées lors d'avortements (Lunn *et al.* 2009). Toujours selon cette hypothèse, il est plus difficile d'associer l'un ou l'autre des génotypes A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂) aux formes nerveuses de la maladie, puisque les deux types de souches seraient susceptibles d'atteindre le système nerveux central en l'absence de gestation et de recrutement hormonal vers l'utérus. Lors de l'étude de cas présentée dans le premier article de ce manuscrit (Partie A.a du Chapitre 3), deux juments gestantes ont présenté des signes neurologiques. Alors que la première est morte, la seconde a survécu mais a avorté 9 mois plus tard. Les souches isolées lors des premiers signes cliniques et lors de l'avortement de cette deuxième jument étaient des souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂). En supposant que le stade de gestation des deux juments ait été le même lors de l'apparition des signes nerveux, et bien que les avortements liés à l'EHV-1 sont principalement décrits en fin de gestation, ce cas de figure apporte quelques zones d'ombres aux théories mentionnées précédemment. Pourquoi des juments gestantes ont-elles manifesté une forme nerveuse à la suite d'une infection par l'EHV-1 ? Une étude menée en 1977 par Jackson *et al.* a montré le développement de signes neurologiques chez des juments gestantes infectées par l'EHV-1 de 3 à 9 mois de gestation (Jackson *et al.* 1977). A l'inverse, les juments non gestantes impliquées dans l'étude n'ont pas montré de signe neurologique et les juments à 10 mois ou plus de gestation ont avorté ou dans le cas contraire n'ont pas non plus montré de signe neurologique. Une hypothèse pourrait être que le microenvironnement hormonal autour de l'utérus gestant en début de gestation n'est pas aussi propice au recrutement de cellules immunitaires (infectées) qu'en fin de gestation. L'attraction des cellules immunitaires infectées ne serait alors pas exclusivement dirigée vers l'utérus. La faille de cette hypothèse se trouve dans le groupe de juments non gestantes n'ayant pas développé de signe neurologique. Lors de leur étude, Jackson *et al.* (1977) ont suggéré une possible augmentation des facteurs de coagulation lors de la gestation, comme cela a déjà pu être montré chez les femmes enceintes (pour revue, Brewer and Aubry 1973; Jackson *et al.* 1977). On pourrait alors imaginer le scénario d'un risque accru de thrombose chez les juments gestantes en faveur de la forme nerveuse et de la forme abortive causées par

l'EHV-1. L'issue nerveuse ou abortive dépendrait alors du type de souche (A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂)) et du recrutement massif de cellules immunitaires (infectées ou non) au niveau du microenvironnement de l'utérus, lui-même probablement régulé par le statut hormonal de la jument variable selon le stade de la gestation. Cette hypothèse n'est pas tout à fait soutenue par une étude menée plus tôt par Smith *et al.* en 1996 au cours de laquelle plusieurs juments à plusieurs stades de gestation plus ou moins tardifs ont été infectées par la souche d'EHV-1 Ab4, dans le but de réaliser un examen de l'utérus post-infection (Smith, Mumford and Lakhani 1996). A l'issue de cette étude, les auteurs ont montré des changements vasculaires de l'endomètre moindres mais présents chez les juments en début de gestation en comparaison avec les juments gestantes à un stade plus avancé, ainsi qu'une expression antigénique virale dans les cellules endothéliales plus faible en début de gestation mais présente en comparaison avec des stades plus avancés de la gestation. Les hypothèses émises par les auteurs sont alors tout autres puisqu'en se basant sur les travaux de Weinberg (1984) et Gerber *et al.* (1977), ils évoquent cette fois une légère dépression de la réponse immunitaire cellulaire en lien avec la gestation (Gerber *et al.* 1977; pour revue, Weinberg 1984; Smith, Mumford and Lakhani 1996). Toujours selon ces auteurs, l'incidence de l'infection virale par une souche abortive pourrait alors être influencée par le profil hormonal évoluant selon les stades de la gestation (Smith, Mumford and Lakhani 1996).

C'est dans ce contexte que notre découverte d'un troisième génotype C₂₂₅₄/H₇₅₂ à l'origine de formes nerveuses et respiratoires de la maladie, a ouvert la porte à de nouveaux questionnements (Partie A.b du Chapitre 3). De prime abord, ce nouveau variant semble avoir une cinétique de croissance *in vitro* similaire à d'autres souches d'EHV-1 isolées sur le terrain et de profil A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂). De même, le profil génétique établi lors de la caractérisation de ce variant (Partie A.b du Chapitre 3), a montré peu de variations (ORF30 et MLST) en comparaison à différentes souches principalement européennes incluses dans l'étude de ce manuscrit. Ce profil génétique sera repris plus en détail par la suite. La souche a également montré une réponse *in vitro* à 3 molécules antivirales (aciclovir, ganciclovir et aphidicoline) semblable à deux autres souches isolées sur le terrain de profil A₂₂₅₄ (N₇₅₂, FR-6815) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂, FR-38991). La sensibilité similaire des trois souches à l'aphidicoline présentée en Partie A.b du Chapitre 3 est en contradiction avec deux études menées respectivement par Goodman *et al.* (2007) et Van de Walle *et al.* (2009). Ces deux études ont en effet montré une sensibilité accrue des souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) par rapport à leur mutant G₂₂₅₄ (D₇₅₂) (Goodman *et al.* 2007; Van de Walle *et al.* 2009). Une explication pour

ces résultats divergents pourrait se trouver dans la structure des études. Si les deux études menées par Goodman *et al.* (2007) et Van de Walle *et al.* (2009) ont porté sur des souches mutantes et révertantes, l'étude présentée dans ce manuscrit a pour sa part été menée sur trois souches isolées indépendamment et dont la variabilité génétique ne repose pas uniquement sur le polymorphisme en position 2 254. Les deux approches sont néanmoins complémentaires même si les conclusions quant à la variation de sensibilité de souches d'EHV-1 à l'aphidicoline sont limitées. Enfin, lors d'une infection expérimentale par la souche d'EHV-1 de type C₂₂₅₄ (H₇₅₂), une excrétion virale, l'installation de la virémie ainsi que des signes cliniques caractéristiques d'infection par l'EHV-1 (pyrexie, écoulement nasal, toux, inflammation des glandes submandibulaires, léthargie, perte d'appétit et hypotonie de la queue) ont pu être observés. Au cours de la même infection expérimentale, l'étude *in vivo* de l'efficacité du valganciclovir a pu être réalisée (Thieulent *et al.*, en préparation). Cette étude a permis de montrer une réduction significative de l'intensité des signes cliniques, de l'excrétion virale et de la virémie cellulaire chez les chevaux traités avec le valganciclovir (4/8) pendant les 13 premiers jours du challenge, en comparaison avec les chevaux non traités (4/8). Il serait intéressant, en suivant l'exemple des nombreuses études réalisées sur les souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂) et mentionnées précédemment, d'explorer la dynamique d'infection de cette souche C₂₂₅₄ (H₇₅₂). Cela pourrait impliquer par exemple l'étude de son tropisme cellulaire (et tout particulièrement vis-à-vis des CD172a+ et des lymphocytes T), l'analyse de son potentiel régulateur des différents facteurs de la réponse immunitaire, ou encore l'étude de la réponse de cette souche à l'IFN- α . Concernant ce dernier paramètre, Poelaert *et al.* (2018) ont pu montrer une meilleure résistance des souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) à l'IFN- α appuyant à nouveau l'hypothèse d'une meilleure adaptation de la souche à son hôte, en comparaison avec les souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂) (Poelaert *et al.* 2018).

Le séquençage de l'ORF30 complet réalisé dans les études moléculaires de ce manuscrit, a concerné dans un premier temps, les 14 souches de la première étude (Partie A.a du Chapitre 3), la souche C₂₂₅₄ (H₇₅₂) nouvellement isolée (Partie A.b du Chapitre 3) et deux autres souches isolées sur le terrain (Partie A.c du Chapitre 3) à partir d'un prélèvement d'âne (initialement testé positif pour l'EHV-1 et d'un prélèvement de zèbre (première mise en évidence d'un alphaherpèsvirus chez le zèbre en France). Ces deux dernières souches ont montré une forte homologie de séquence avec l'EHV-8 pour la première et avec l'EHV-9 pour la seconde. L'analyse phylogénétique des séquences d'EHV-1 qui a découlé du

séquençage de l'ORF30 et l'inclusion d'autres souches européennes disponibles sur GenBank, a majoritairement discriminé les souches en deux groupes fortement influencés par le polymorphisme en position 2 254 de l'ORF30. Le lieu de collecte et la date de prélèvement n'ont pas semblé être corrélés avec le classement des souches, à l'exception de cas isolés sur le même site à quelques semaines d'intervalle. De plus, les souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) semblent avoir un plus grand polymorphisme sur l'ensemble de l'ORF30 que les souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂), avec la distinction de trois sous-groupes (clusters). La souche de génotype C₂₂₅₄ (H₇₅₂) nouvellement identifiée s'est classée dans le groupe majoritairement représenté par les souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et plus précisément au sein d'un sous-groupe comportant également une souche G₂₂₅₄ (D₇₅₂) « égarée ». Alors que nous évoquions un peu plus tôt une théorie d'évolution basée sur l'observation de la conservation du résidu D₇₅₂ (ou position équivalente) chez de nombreux herpèsvirus de mammifères, mais aussi selon les modes d'infection des deux types de souches (A₂₂₅₄ (N₇₅₂) et G₂₂₅₄ (D₇₅₂)), la question de l'histoire évolutive de la souche de type C₂₂₅₄ (H₇₅₂) se pose également. Si le positionnement phylogénétique basé sur l'ORF30 de cette souche peut nourrir l'hypothèse d'une évolution à partir d'une souche A₂₂₅₄ (N₇₅₂), encore une fois, l'étude de la dynamique d'infection de cette souche C₂₂₅₄ (H₇₅₂) apporterait probablement de nouvelles pièces au puzzle encore bien incomplet la concernant. De plus, il est également possible que l'unique souche de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂) dans le même sous-groupe phylogénétique (basé sur l'ORF30) soit le fruit d'un retour à ce génotype à partir d'une souche A₂₂₅₄ (N₇₅₂). Cette hypothèse va cependant à l'encontre du principe de la survie du plus apte (inspiré de l'ouvrage « L'Origine des espèces » de Charles Darwin publié en 1859). En effet, les connaissances au sujet des souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) tendent à faire penser qu'elles sont une version plus évoluée et mieux adaptée à leur hôte que les souches de type G₂₂₅₄ (D₇₅₂). Un retour vers un génotype moins adapté paraîtrait ainsi surprenant. Cela questionne l'importance qui a été accordée au polymorphisme en position 2 254 de l'ORF30. Ce polymorphisme n'illustre probablement pas à lui seul l'histoire évolutive des souches. Comme nous le verrons par la suite, la supposition d'une évolution des souches G₂₂₅₄ vers les souches A₂₂₅₄ et C₂₂₅₄, est probablement trop linéaire, car il est fort probable que la diversité génétique des souches d'EHV-1 soit également le fruit d'évènements horizontaux tels que la recombinaison, comme le montrent déjà les réseaux phylogénétiques tracés à partir des séquences de l'ORF30 étudiées dans ce manuscrit. Il est également bon de noter que des souches de type A₂₂₅₄ (N₇₅₂) se positionnent, sur la base de leur gène de l'ADN polymérase, au sein du deuxième groupe principalement représenté par toutes les autres souches G₂₂₅₄ (D₇₅₂) étudiées dans les analyses phylogénétiques de ce manuscrit. Par ailleurs, comme le

souligne Katrien Poelaert à l'issue de sa thèse, les stratégies d'adaptation et de survie des souches d'EHV-1 ne reposent pas sur la seule mutation en position 2 254 du gène de l'ADN polymérase (Poelaert 2019).

Chez les alphaherpèsvirus 8 et 9, seul le génotype G₂₂₅₄ (D₇₅₂) a été décrit (Rebelo *et al.* 2015; Garvey *et al.* 2018; Moeller *et al.* 2018). C'est également le cas des deux souches d'EHV-8 et d'EHV-9 identifiées et décrites en partie A.c du Chapitre 3 de ce manuscrit. Les signes neurologiques et parfois les avortements observés chez les hôtes infectés par ces deux alphaherpèsvirus suggèrent qu'ils sont aussi capable de mettre en place une virémie cellulaire leur permettant d'atteindre les organes cibles (Abdelgawad *et al.* 2016; Garvey *et al.* 2019). Cette virémie a d'ailleurs pu être observée chez des chevaux infectés expérimentalement par l'EHV-9 (Taniguchi *et al.* 2000). La question du tropisme cellulaire de ces alphaherpèsvirus des équidés se pose. La réponse à cette question pourrait apporter une pièce au puzzle encore incomplet de l'histoire évolutive des alphaherpèsvirus des équidés. L'analyse phylogénétique basée sur l'ORF30 n'a pas été réalisée dans le but d'observer la diversité génétique sur ce gène intra-espèce mais plutôt dans le but de les comparer aux autres alphaherpèsvirus des équidés. Alors que la diversité intra-espèce de l'EHV-1 semblait suggérer de possible évènements de recombinaison, il semble également possible que ces phénomènes se produisent inter-espèces comme le suggère le network obtenu par l'analyse des séquences de l'ORF30 d'un panel de souches d'EHV-1, d'EHV-3, d'EHV-4, d'EHV-8 et d'EHV-9 incluant les souches françaises d'EHV-1, d'EHV-8 et d'EHV-9 isolées dans le cadre des études de ce manuscrit. Des études ont déjà pu mettre en évidence des évènements de recombinaison entre alphaherpèsvirus des équidés. C'est le cas par exemple d'une étude menée par Pagamjav *et al.* (2005) et s'intéressant aux souches d'EHV-1 de prototype 1B et 1P (Pagamjav *et al.* 2005). Ces souches avaient été identifiées par leur profils de restriction au début des années 1980 et il avait été constaté que les souches EHV-1.1B étaient majoritairement isolées lors d'avortements, alors que seul le prototype EHV-1.1P était isolé à la fois lors de formes nerveuses et lors d'avortements. Les travaux de Pagamjav *et al.* (2005) ont permis de montrer par « long and accurate polymerase chain reaction » (LA-PCR) et étude du profil de restriction (RFLP) que le prototype 1B était issu de la recombinaison du prototype 1P avec une souche d'EHV-4 au niveau de l'ORF64 codant la protéine IE (ICP4) (Pagamjav *et al.* 2005). Ce site de recombinaison entre l'EHV-1 et l'EHV-4 a également pu être identifié par Bryant *et al.* (2018) qui ont aussi mis en lumière un site de recombinaison entre l'EHV-1 et l'EHV-8 cette fois, au niveau des ORF47_44 et 45 (Bryant *et al.* 2018). Il n'existe pas

beaucoup d'information, à notre connaissance, quant à d'éventuelles recombinaisons avec l'EHV-3 même si elles avaient été suspectées entre l'EHV-1, l'EHV-3 et l'EHV-4 lors d'une étude menée par Staczek *et al.* en 1983 (Staczek, Atherton and O'Callaghan 1983). Enfin, concernant l'EHV-9, lors d'une étude menée en 2012, Greenwood *et al.* ont suspecté une zone de recombinaison entre l'EHV-1 et l'EHV-9 au niveau de l'ORF30 d'une souche d'EHV-1 isolée chez un ours polaire, mais cette suspicion a ensuite été contestée par Guo *et al.* en 2014 (Greenwood *et al.* 2012; Guo *et al.* 2014). Une autre étude menée à plus large échelle par Kolb *et al.* (2017) s'est portée sur l'ensemble des herpèsvirus appartenant au genre des *Varicellovirus*. Cette étude basée sur le génome complet d'un panel de souches, a permis d'étudier les liens inter- et intra-espèces (Kolb *et al.* 2017). L'analyse a été réalisée au travers de la construction d'arbres phylogéniques (selon la méthode de maximum de vraisemblance), de réseaux phylogénétiques, de l'étude du contenu G+C et du biais d'usage des codons, et de l'analyse statistique « Pairwise Homoplasy Index » (PHI). Cela a ainsi permis, dans un premier temps, de mettre en évidence un fractionnement entre les alphaherpèsvirus des ongulés et ceux des non-ongulés. Une grande probabilité de recombinaison au sein de chacun des deux groupes a également été mise en évidence. Les cinq alphaherpèsvirus des équidés inclus dans l'analyse sont ainsi concernés par ces phénomènes de recombinaison.

De ces cinq alphaherpèsvirus des équidés, l'EHV-1, l'EHV-8 et l'EHV-9 semblent être les plus proches selon l'analyse basée sur l'ORF30 proposée dans ce manuscrit. Cette observation est en accord avec d'autres analyses menées par Garvey *et al.* (2018) sur l'ORF30 par exemple ou encore par Kolb *et al.* (2017) sur le génome complet (Kolb *et al.* 2017; Garvey *et al.* 2018). En revanche, dans l'étude menée par Kolb *et al.* (2018), il semble que l'analyse phylogénétique proposée par ces auteurs montre une divergence plus faible entre l'EHV-1 et l'EHV-8 qu'entre l'EHV-1 et l'EHV-9 à l'inverse des résultats présentés dans ce manuscrit (Kolb *et al.* 2017). Cela pourrait s'expliquer par la taille des séquences analysées. Les séquences de l'ORF30 analysées dans ce manuscrit ne représentent en effet qu'une partie du génome (approximativement 2,4%). Ainsi, les différentes analyses phylogénétiques intra- et inter-espèce basées sur les séquences de l'ORF30 des souches françaises d'EHV-1, d'EHV-8 et d'EHV-9 présentées dans ce manuscrit, sont informatives quant à de possibles évènements de recombinaison mais ne sont pas représentatives d'une analyse menée sur le génome complet. Cela nous amène donc au dernier outil utilisé dans ce manuscrit pour l'étude moléculaire de souches d'EHV-1 et qui est l'outil MLST.

L'approche MLST s'est avérée comme étant la plus discriminante des trois outils utilisés, à l'image de l'étude menée par Garvey *et al.* (2019). Cette approche est plus affinée à partir de la séquence concaténée de codons (MLSTnt) qu'à partir de la séquence concaténée des acides aminés (MLSTaa) ciblés par cet outil (Garvey *et al.* 2019). L'une ou l'autre des analyses permet de différencier au moins 10 clades sur les 13 proposés à partir de séquences du génome complet de l'EHV-1 par Bryant *et al.* (2018) (Bryant *et al.* 2018). L'étude de 15 souches françaises (soit les 14 souches initialement sélectionnées ainsi que la souche de type C₂₂₅₄ (H₇₅₂) nouvellement isolée) a permis de les situer dans 7 de ces 10 clades, le clade 10 étant le plus représenté et comportant la souche de type C₂₂₅₄ (H₇₅₂). De nouveau, la distribution des souches au sein des différents clades n'a pas semblé être corrélée au site ou à la date du prélèvement, à l'exception, comme pour l'analyse de l'ORF30, de deux souches isolées sur le même site à quelques semaines d'intervalle. L'étude menée par Garvey *et al.* (2019) sur 272 souches d'EHV-1 isolées lors de 238 épisodes infectieux en Irlande a permis de situer ces souches dans 10 clades (Garvey *et al.* 2019). Il serait intéressant d'élargir l'analyse des souches françaises à un échantillonnage plus grand pour voir si la distribution selon les clades est élargie ou non. Il serait également intéressant d'inclure plus de souches non-européennes dans de futures analyses phylogénétiques. En effet, même si le génome des souches d'EHV-1 ne semble pas influencé par leur localisation géographique, probablement en raison du déplacement international de certains chevaux pour la vente ou des événements sportifs, les souches européennes sont souvent plus largement représentées lors d'études phylogénétiques, ces dernières ayant principalement été menées en Europe (Bryant *et al.* 2018; Garvey *et al.* 2019). Il serait intéressant de voir si l'hétérogénéité des souches s'observe toujours en incluant un plus grand nombre de souches d'EHV-1 d'origines variées. En ce qui concerne les souches étudiées dans ce manuscrit, la construction d'un réseau phylogénétique à partir des séquences concaténées (des codons ou des acides aminés) obtenues par MLST, a permis de prédire de possibles événements de recombinaison intra-espèce. Le même constat avait été établi par Bryant *et al.* en 2018 lors de leur étude sur le génome complet de 101 souches d'EHV-1 dont 75 isolées au Royaume-Uni (Bryant *et al.* 2018). Par ailleurs, l'étude menée par Kolb *et al.* en 2017 sur l'ensemble des *Varicellovirus* s'est également portée sur la recombinaison intra-espèce pour l'EHV-1. A l'aide de plusieurs paramètres mentionnés précédemment, les auteurs ont eux aussi pu montrer une probable recombinaison entre les souches d'EHV-1 choisies pour l'analyse. Il est aussi intéressant de noter qu'en construisant un réseau phylogénétique, les auteurs n'ont distingué que 3 clades, à l'inverse de Bryant *et al.* (2018) qui en ont identifié 13 (Bryant *et al.* 2018). Pour séparer les clades intra-espèce, les

auteurs ont fixé un seuil de divergence de 0,01%. Bryant *et al.* (2018) n'ont a priori pas utilisé de seuil pour séparer les clades, mais ont utilisé en revanche un plus grand nombre de séquences (101 contre 24 dans l'étude de Kolb *et al.* (2017)). Enfin, si l'outil MLST semble se rapprocher au mieux d'une analyse sur génome complet plus laborieuse et plus coûteuse, il présente toutefois ses limites. En effet, l'inclusion dans l'analyse de souches issues de l'étude menée par Bryant *et al.* (2018) présentant un lien épidémiologique a permis de montrer que des variabilités génétiques entre souches peuvent ne pas être perceptibles par MLST au sein d'un même clade alors qu'elles le sont par l'analyse du génome complet. Cela va sous le sens puisque tout l'intérêt de l'outil MLST, bien que construit sur les régions variables du génome, est de ne cibler que des points précis qui ne représentent au final 0,08% du génome. Il n'est donc pas surprenant que sa sensibilité n'égale pas celle d'une analyse sur génome complet. L'approche MLST reste néanmoins intéressante notamment pour les laboratoires plus habitués à pratiquer des PCR et du séquençage Sanger que du séquençage de nouvelle génération (« next generation sequencing », NGS). Une application directe de l'intérêt de l'outil a pu être réalisée lors de la dernière épizootie survenue à Valence en Espagne (février 2021), où nous avons pu donner les premières informations de phylogénie à la filière par cette approche MLST. Le séquençage NGS deviendra probablement plus accessible avec l'évolution des technologies et permettra certainement d'identifier plus rapidement les variations de génome d'une souche à l'autre, ou encore de potentiels ilots de pathogénicité. L'accessibilité de cette technologie pourra peut-être aussi encourager une autre approche qui est l'étude de la réponse transcriptomique de l'hôte lors d'une infection, à l'image d'une étude récente menée par Zarski *et al.* (2021).

Les outils moléculaires utilisés et présentés dans ce manuscrit ont illustré la complexité de l'évolution phylogénétique de l'EHV-1 (à l'image de tous les herpèsvirus probablement) mais également celle de la dynamique d'infection de ce virus. La découverte fortuite d'un nouveau génotype encore non décrit (C₂₂₅₄/H₇₅₂) et d'une souche d'EHV-8 initialement identifiée comme une souche d'EHV-1 met en lumière l'intérêt primordial de ces outils dans le suivi des souches sur le terrain pour une amélioration continue des outils de détection, comme recommandé par les normes AFNOR U47 600, NF EN ISO/IEC 17025 et l'OIE auprès des laboratoires accrédités. Ces outils de détection (principalement PCR), utilisés en premier lieu lors d'un épisode infectieux permettent en effet la mise en place de mesures de lutte adaptées au pathogène identifié. Il serait donc regrettable qu'un diagnostic

soit impacté par une baisse de spécificité des outils de détection, en raison d'une évolution non suivie des souches sur le terrain.

D'autres outils de détection sont cependant moins impactés par l'évolution considérée comme lente des herpèsvirus. Il s'agit des outils sérologiques. Ces outils, n'apportent pas d'information phylogénétique quant aux souches d'EHV-1 circulantes mais apportent plutôt des indications sur le niveau de protection immunitaire des chevaux vis-à-vis de l'EHV-1.

Le meilleur moyen de défense d'un individu face à son ennemi infectieux est son système immunitaire. Le premier levier de ce système est l'immunité innée. Cette immunité non-spécifique est activée lorsqu'un élément du non-soi est détecté. Elle est aussi stimulée par la suite par d'autres mécanismes de l'immunité adaptative, qui constitue un second levier de la réponse immunitaire.

Dans le cas de l'EHV-1 chez le cheval, une des stratégies du virus est d'infecter les cellules immunitaires dont les monocytes (CD172a+), les lymphocytes T (CD8+ et CD4+) et les lymphocytes B, lui permettant ainsi d'être disséminé au sein de l'organisme par la circulation sanguine (Wilsterman *et al.* 2011; Poelaert *et al.* 2019b). Les cellules dendritiques CD172a+ issues de monocytes ont été identifiées comme étant les principales cellules immunitaires assurant le transport de l'EHV-1 du mucus respiratoire vers les tissus profonds, la circulation sanguine et la circulation lymphatique (Zhao *et al.* 2017). Ce piratage des cellules immunitaires à la façon d'un cheval de Troie correspond à la virémie cellulaire. Elle permet alors au virus d'atteindre d'autres organes internes tels que l'utérus et le système nerveux central, comme mentionné précédemment. Cette virémie cellulaire est orchestrée par de nombreuses autres stratégies d'évasion de l'immunité qui complexifient la neutralisation du virus. De manière non exhaustive, ces stratégies sont par exemple la transmission des virions de cellules en cellules, la sous-expression des protéines virales ou des complexes majeurs d'histocompatibilité à la surface des PBMCs, le ralentissement de la réplication durant la virémie cellulaire, ou encore l'interférence dans la régulation de certaines chimiokines au profit du recrutement de monocytes (Favoreel *et al.* 2006; pour revue, van der Meulen *et al.* 2006; Laval, Favoreel and Nauwynck 2015; Zhao *et al.* 2017). Une réponse immunitaire efficace doit à la fois neutraliser le virus lors des premiers cycles de réplication au niveau de l'épithélium respiratoire à l'aide d'anticorps neutralisants spécifiques, mais aussi neutraliser les cellules immunitaires infectées lorsque la virémie cellulaire est en place grâce notamment aux LTc.

De nombreux marqueurs de la réponse immunitaire sont quantifiables et informatifs du niveau de protection d'un individu face à l'EHV-1. Il est ainsi possible de mesurer les anticorps neutralisants dans leur globalité, ou de ne quantifier que les anticorps fixant et activant le complément. Une autre approche consiste à mesurer les anticorps spécifiques d'un antigène précis ou bien encore de mesurer des ratios d'isotypes d'anticorps neutralisants stimulés par une infection/stimulation antigénique (Breathnach *et al.* 2001). Les lymphocytes cytotoxiques spécifiques produisant de l'IFN- γ sont également un bon indicateur de la réponse cellulaire immunitaire induite par l'EHV-1, même si ce type de mesure est pratiqué de manière moins systématique sur le terrain que le dosage d'anticorps neutralisants (Paillot *et al.* 2006). La dernière étude présentée dans ce manuscrit (partie B) s'est portée sur la séroneutralisation. Cet outil est utilisé pour observer d'éventuelles séroconversions chez des individus suspectés d'avoir été exposés à l'EHV-1 ou ayant été exposés à la vaccination.

La méthode de séroneutralisation conventionnelle consiste à exposer plusieurs dilutions d'un sérum en contact d'une dose définie de virus avant de les mettre en culture sur une lignée cellulaire permissive. Lorsque le sérum contient des anticorps neutralisants, la dernière dilution capable de neutraliser le virus (ce qui se traduit par une absence d'effet cytopathique sur le tapis cellulaire permissif au virus) déterminera le titre du sérum. Il s'agit d'une méthode dont les résultats évoluent par paliers de dilution. L'objectif de l'étude était de mettre au point une méthode de séroneutralisation sur l'outil xCELLigence® (ACEA Biosciences, CA, USA) dans le but d'obtenir des titres plus affinés et possiblement un meilleur débit d'analyse. A l'issue de ce développement, réalisé sur une population d'échantillons qualifiés, une collecte d'échantillon a été mise en place pour explorer à l'aide de la nouvelle méthode de séroneutralisation de l'EHV-1 sur xCELLigence®, la production d'anticorps neutralisants chez des chevaux inclus dans une campagne de vaccination.

La technologie xCELLigence® permet le suivi en temps réel de la croissance cellulaire (« real time cell analysis » (RTCA)). La vocation première de cet outil est de mesurer la viabilité cellulaire. Les phases de croissance cellulaire, qui sont la phase d'adhésion, de propagation puis de prolifération sont mesurables grâce au système RTCA (Kho *et al.* 2015). Des phénomènes tels que la cytotoxicité, la sénescence ou encore l'altération de la prolifération sont aussi observables (Ke *et al.* 2011). Cette technologie ne nécessitant pas de marquage a trouvé de nombreuses applications, telles que la mesure de la cytotoxicité *in vitro* de potentielles molécules thérapeutiques par exemple, l'étude d'effecteurs

de la réponse immunitaire sur un tapis cellulaire, le criblage de molécules antivirales, ou encore le dosage d'anticorps neutralisants par séroneutralisation (Witkowski *et al.* 2010; Fang *et al.* 2011; Moodley *et al.* 2011; Tian *et al.* 2012; Pan *et al.* 2013; Dowling, Herranz Ors and Kiely 2014; Thieulent *et al.* 2019, 2020a, 2020b). Le test de séroneutralisation présenté dans ce manuscrit, a été mis au point sur le modèle cellulaire E.Derm infecté par la souche d'EHV-1 de référence KyD (VR700™, ATCC®, Molsheim, France). Plusieurs méthodes ont été testées en s'inspirant des travaux de Fang *et al.* (2011) et de Witkowski *et al.* (2010) (Witkowski *et al.* 2010; Fang *et al.* 2011).

Une première méthode (#1) présentée dans ce manuscrit a permis la détermination quantitative du titre sérique en anticorps neutralisants et a fait l'objet d'un article en préparation. C'est l'effet dose-réponse d'une série de dilutions d'un sérum qui a été mesuré en s'inspirant des travaux de Witkowski *et al.* (2010) mais également de ceux de Thieulent *et al.* (2019). La concentration induisant 50% d'inhibition du virus a ainsi été calculée et désignée sous le terme de « neutralising titre 50 » NT₅₀. Si cette méthode diffère de la séroneutralisation conventionnelle pratiquée dans l'étude et permettant la détermination du titre sérique selon la dernière dilution neutralisant le virus, les valeurs de NT₅₀ obtenues n'en sont pas moins corrélées. La méthode #1 a permis de mesurer la séroconversion de deux des chevaux mentionnés précédemment entre le jour de prélèvement 8 et le jour 18 post-infection expérimentale. Elle a également permis de mesurer quantitativement l'augmentation journalière du titre d'anticorps neutralisants entre le jour 8 et le jour 18 post-infection expérimentale.

Deux autres méthodes (#2 et #3) dont le principe s'est basé sur la corrélation du CIT₅₀ (temps requis pour que le « Cell index » (CI) chute de 50%) avec soit le logarithme de la réciproque du titre présumé, soit le logarithme du titre de virus neutralisé, ont permis de détecter avec succès la séroconversion de chevaux infectés expérimentalement par la souche d'EHV-1 de type C₂₂₅₄ (H₇₅₂) isolée dans les premières études du manuscrit, entre le jour 8 post-infection et le jour 18 post-infection. En revanche, le suivi jour par jour de l'évolution du titre d'anticorps neutralisants n'a pas été aussi concluant puisque le début de l'augmentation de ce titre a été observé plus tardivement qu'avec la méthode de référence pratiquée sur la lignée cellulaire RK13. Une explication proposée pour ce délai pourrait être le choix de la dilution analysée. Pour les deux méthodes, la dilution d'analyse choisie est la dilution 1 :256 dans le but de pouvoir calculer le titre des sérums dont la chute du CI est observée au moins à

cette dilution. Choisir une dilution plus précoce aurait impliqué l'exclusion de l'analyse des sérums au titre d'anticorps neutralisants élevé. Ainsi, si ce choix permet de calculer les titres sériques élevés en anticorps neutralisants, il implique qu'à une telle dilution les variations de titres de sérums peu chargés en anticorps seront imperceptibles. Une telle problématique n'a pas été observée par les auteurs Fang *et al.* (2011) qui ont en revanche mis en évidence une dérive de la corrélation entre le CIT₅₀ et le logarithme de la concentration virale. Cela s'expliquerait par une dynamique de répllication plus lente lorsque les concentrations de virus sont plus faibles et une chute du CI plus différée dans le temps.

La séroneutralisation est une méthode souvent décrite comme sensible mais laborieuse et chronophage. Les axes d'amélioration d'une telle méthode concernent donc le temps requis pour la mettre en œuvre et obtenir des résultats, du débit d'analyse, et de sa sensibilité. En substituant la technologie xCELLigence® à la microscopie, les trois méthodes d'analyse en temps réel présentées dans ce manuscrit ont permis de réduire non pas le délai de résultat mais le temps de main d'œuvre requis pour obtenir ce résultat, grâce à une analyse standardisée. En termes de sensibilité, les méthodes #2 et #3, basées sur le CIT₅₀, n'ont pas permis de détecter la présence d'anticorps neutralisants dans des sérums au titre faible à l'inverse de la méthode la méthode (#1) permettant le calcul du NT₅₀, qui s'est montrée plus pertinente. En termes de débit d'analyse, ce sont en revanche les méthodes #2 et #3 qui ont montré le plus d'intérêt en n'ayant recours qu'à un seul point de dilution. Le calcul des titres par les trois méthodes ne se limitant pas aux paliers de dilution, il paraît possible qu'il soit plus affiné et linéaire que pour la méthode de référence. D'autres variantes de la méthode de séroneutralisation ont été explorées pour en contourner les contraintes techniques. C'est le cas par exemple de la séroneutralisation couplée à l'immunofluorescence. Le principe de la technique consiste à fixer le tapis cellulaire rapidement après infection par le virus préalablement mis en contact avec un sérum neutralisant, pour ensuite détecter par immunofluorescence la quantité de cellules infectées ou non, en comparaison avec les cellules infectées avec le virus non mis en contact avec le sérum. Avec ce type de méthode, le calcul de l'effet dose-réponse permet d'estimer le titre d'anticorps neutralisants. Cette méthode sensible permet de réduire le temps d'analyse considérablement comme c'est le cas par exemple pour un test de microneutralisation de la grippe équine dont le temps d'incubation post-infection a été réduit à 24h (Khurelbaatar *et al.* 2014). Ses déclinaisons sont multiples, en utilisant par exemple des lignées cellulaires exprimant le gène de la β-galactosidase à la suite d'une infection, ou encore en employant des virus répliatifs portant le gène de la « Green Fluorescent Protein » (GFP)

permettant de les localiser par microscopie (Yang *et al.* 2016; Blevins *et al.* 2019). Une autre méthode similaire à cette dernière et qualifiée de « nouvelle génération » est la séroneutralisation de virus pseudotypes. Les virus pseudotypes sont des particules virales non répliquatives portant à leur surface les glycoprotéines et protéines de surface d'un autre virus (pour revue, Bentley, Mather and Temperton 2015). L'incorporation d'un gène rapporteur comme celui de la luciférase dans le matériel génétique de ces virus en font de bons candidats pour la séroneutralisation, comme le montre une étude sur la grippe équine (Scott *et al.* 2012; Kinsley *et al.* 2020). Parmi toutes ces méthodes améliorées de la séroneutralisation, les méthodes sur xCELLigence® présentent l'avantage d'être non invasives et de ne nécessiter aucun marquage. Elles sont par conséquent moins contraignantes à mettre en œuvre.

La méthode de calcul du NT₅₀ sur xCELLigence® (#1) ayant montré des résultats convaincants, elle a été retenue pour l'étude de la production d'anticorps neutralisant chez des chevaux soumis à une campagne de vaccination.

Pour l'EHV-1, les principaux vaccins commercialisés sont constitués de virus inactivés ou de virus vivants atténués. Leur efficacité n'a principalement été étudiée que vis-à-vis des formes respiratoires et abortives (Heldens *et al.* 2001). Une seule étude montre l'effet préventif d'un vaccin vivant atténué sur la forme nerveuse de maladie (Goodman *et al.* 2006). Il semble que la vaccination dans son ensemble donne lieu à une réduction de l'intensité et de la durée des signes cliniques et qu'elle permette la diminution des risques d'avortement. Les vaccins actuels semblent stimuler l'immunité humorale plus efficacement que l'immunité cellulaire (pour revue, Kydd, Townsend and Hannant 2006). Un moyen de mesurer la réponse d'un individu à l'un de ces vaccins est le dosage des anticorps neutralisants.

Dans le cadre de l'étude présentée en Partie B du Chapitre 3 de ce manuscrit, les chevaux ont reçu différents protocoles de vaccination selon qu'il s'agissait de juments gestantes (trois injections aux 5^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} mois de gestation), de chevaux primo vaccinés ou ayant un historique de vaccination très ancien (trois injections au 1^{er}, 2^{ème} et 6^{ème} mois de la campagne) et de chevaux régulièrement vaccinés (une injection le premier mois de la campagne). La vaccination a été réalisée avec le vaccin à base de virus inactivé Equip® EHV 1,4. Les chevaux ont été prélevés à différents stades de la campagne pour suivre l'évolution de leur statut en anticorps neutralisants. De manière générale, les réponses à la vaccination ont été plus importantes dans le groupe de primo-vaccination. Les niveaux de réponses analysés

individuellement se sont montrés variables et ont parfois pu être interprétés selon l'historique des chevaux. C'est le cas par exemple de deux juments n'ayant reçu qu'une injection de rappel et dont le niveau d'anticorps neutralisant initial était bien plus élevé que celui des autres chevaux du même groupe de vaccination. L'une des juments ayant été testée positive pour l'EHV-4 quelque mois plus tôt, il est probable que les anticorps neutralisants dosés comprennent une part d'anticorps réagissant de manière croisée avec l'EHV-4 et l'EHV-1. La réaction croisée de certains anticorps contre les EHV est d'ailleurs une contrainte qui a été rapportée à plusieurs reprises (Fitzpatrick and Studdert 1984; Crabb, Allen and Studdert 1991; Mahmoud *et al.* 2013). Il n'existe pas, à notre connaissance d'étude évaluant la proportion d'anticorps réagissant de manière croisée avec plusieurs herpes virus. Une telle mesure semble d'ailleurs complexe mais pourrait peut-être voir le jour avec la construction de virus pseudotypes qui exprimeraient à leur surface tous les antigènes immunisant de l'EHV-1 à l'exception de ceux induisant une immunisation croisée. Quoi qu'il en soit, si le niveau d'anticorps neutralisant de cette jument naturellement infectée par l'EHV-4 avant l'étude ne repose que sur cette infection, cela impliquerait une portion très importante d'anticorps réagissant de manière croisée. Un autre point commun à ces deux juments au fort titre d'anticorps neutralisants est leur passif de vaccination. Ces juments ont en effet toutes deux reçu le protocole de gestation au cours de la saison de reproduction ayant précédé la campagne de vaccination. Une étude menée par Wagner *et al.* (2015) sur 15 juments n'ayant jamais été exposées à l'EHV-1 et ayant reçu 5 injections d'un vaccin inactivé sur une période de 8 mois, a montré que ces injections multiples n'induisaient pas systématiquement une augmentation de l'immunité (Wagner *et al.* 2015). Dans cette étude, les juments n'étaient pas gestantes. Il est donc difficile de savoir si le protocole de gestation reçu l'année précédente a contribué à l'apparition de leur niveau élevé d'anticorps neutralisants. En ce qui concerne la réponse immunitaire chez les juments gestantes, il n'existe que peu d'information à notre connaissance. Chez la femme tout du moins, les changements immunitaires liés à la grossesse semblent s'expliquer par une interaction entre le système immunitaire de la mère et celui de son fœtus, plutôt que par une immunosuppression. Si certaines voies semblent moins bien répondre notamment en fin de grossesse, d'autres comme la voie Th2 stimulatrice de la voie humorale, semblent au contraire mieux répondre durant les deux derniers trimestres de la grossesse (pour revue, Abu-Raya *et al.* 2020)). Qu'en est-il alors de la production d'anticorps neutralisants chez des juments gestantes en réponse à la vaccination ? Bien que difficile à mettre en place, il pourrait être intéressant d'étudier la longévité des anticorps neutralisants induits par 3 injections d'un vaccin inactivé espacées de 2 mois chez des juments gestantes et

chez des juments non gestantes et éventuellement de les soumettre à nouveau à une injection de rappel l'année suivante pour comparer leur réponse à celle d'un groupe contrôle ne recevant qu'une injection chaque année. En ce qui concerne le groupe de primo-vaccination, les réponses les plus intenses et persistantes ont été observées chez les deux chevaux les plus âgés du groupe. Si la vaccination des poulains n'est pas pertinente avant 5 mois en raison d'un système immunitaire immature, l'acquisition progressive d'une telle maturité, même après cet âge est mal connue comme le soulignent Perkins and Wagner en 2015 (pour revue, Paillot *et al.* 2008; pour revue, Perkins and Wagner 2015). Il pourrait être intéressant de s'intéresser plus en détail aux paramètres de la réponse humorale stimulés en réponse à la vaccination chez des poulains de 6 mois à 1 an, en étudiant le ratio d'isotypes d'IgG par exemple, ou encore les marqueurs de la voie Th2 permettant la stimulation de la production d'anticorps neutralisant.

B. Conclusion

Les différentes études menées au cours de cette thèse ont permis de mettre en application les outils moléculaires les plus couramment utilisés pour l'analyse des souches d'EHV-1, apportant de nouvelles connaissances, et pour l'analyse du niveau de protection conféré par les anticorps neutralisant l'EHV-1. Ces outils ont permis, dans un premier temps, de faire un premier état des lieux des souches circulant en France, mais également de mettre en évidence la complexité des mécanismes d'infection des différents types de souches encore mal connus. La découverte d'un nouveau génotype d'intérêt (C₂₂₅₄) et d'une souche d'EHV-8 initialement identifiée comme souche d'EHV-1 ont également mis en lumière l'intérêt du suivi sur le terrain pour une amélioration continue des outils de détection. Dans ce cas de figure, l'apport de connaissances sur les génomes s'est traduit par une amélioration des outils de détection. Comme ce fut le cas lors de précédentes études, l'étude de deux souches d'alphaherpèsvirus des équidés, EHV-8 et EHV-9, rappelle l'importance de leur surveillance notamment en raison de la menace qu'ils peuvent représenter pour l'espèce équine, après la preuve du franchissement de la barrière de l'espèce. L'intérêt de ce travail est également souligné au moment de la fin de la rédaction de ce document qui correspond à l'émergence d'une crise en Europe dans la filière sport et qui a conduit la Fédération International d'Equitation à interrompre pendant plusieurs semaines les compétitions. La reprise, sera conditionnée à la réalisation de tests PCR démontrant l'absence de particules virales dans les prélèvements naso-pharyngés. Au-delà des simples tests de détection, les tests de

caractérisation phylogénique, couplés aux enquêtes épidémiologiques, aideront à mieux comprendre cette crise.

Cette crise a ravivé les débats sur la vaccination contre l'EHV-1 et l'on perçoit l'intérêt de la deuxième partie de ce travail de thèse. La mise au point d'une nouvelle méthode de séroneutralisation a en effet permis lors d'une étude, une mesure quantitative de la production d'anticorps neutralisants d'une population typiquement retrouvée sur le terrain en réponse à la vaccination par un vaccin à base de virus inactivé. Ces outils de mesure quantitative sont d'un grand intérêt, comme le démontrent les études vaccinales réalisées sur le virus de la grippe équine utilisant le test « single radial hemolysis » (SHR), pour les avantages qu'ils procurent, en particulier avec la reconnaissance de corrélats de protection. Une fois, cette nouvelle méthode validée sur une population plus importante, la recherche de la définition de corrélats de protection constituerait une avancée significative pour la filière équine dans la lutte contre cette maladie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abas, O.; Abdo, W.; Kasem, S.; Alwazzan, A.; Saleh, A.G.; Saleh, I.G.; Fukushi, H.; Yanai, T.; Haridy, M. Time Course-Dependent Study on Equine Herpes Virus 9-Induced Abortion in Syrian Hamsters. *Animals* **2020**, *10*, 1369, doi:10.3390/ani10081369.
- Abas, O.M.; Anwar, S.; Badr, Y.; Abd-Ellatieff, H.; Saleh, A.G.; Nayel, M.; Rahman, A.A.-E.; Fukushi, H.; Yanai, T. Comparative Neuropathogenesis of Equine Herpesvirus 9 and Its Mutant Clone (SP21) Inoculated Intranasally in a Hamster Model. *J Comp Pathol* **2019**, *170*, 91–100, doi:10.1016/j.jcpa.2019.06.002.
- Abdelgawad, A.; Azab, W.; Damiani, A.M.; Baumgartner, K.; Will, H.; Osterrieder, N.; Greenwood, A.D. Zebra-Borne Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Infection in Non-African Captive Mammals. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 102–106, doi:10.1016/j.vetmic.2013.12.011.
- Abdelgawad, A.; Damiani, A.; Ho, S.Y.W.; Strauss, G.; Szentiks, C.A.; East, M.L.; Osterrieder, N.; Greenwood, A.D. Zebra Alpha herpesviruses (EHV-1 and EHV-9): Genetic Diversity, Latency and Co-Infections. *Viruses* **2016**, *8*, doi:10.3390/v8090262.
- Abdelgawad, A.; Hermes, R.; Damiani, A.; Lamglait, B.; Czírják, G.Á.; East, M.; Aschenborn, O.; Wenker, C.; Kasem, S.; Osterrieder, N.; et al. Comprehensive Serology Based on a Peptide ELISA to Assess the Prevalence of Closely Related Equine Herpesviruses in Zoo and Wild Animals. *PLoS ONE* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0138370.
- Abodeely, R.A.; Lawson, L.A.; Randall, C.C. Morphology and Entry of Enveloped and Deenveloped Equine Abortion (Herpes) Virus. *J. Virol.* **1970**, *5*, 513–523, doi:10.1128/JVI.5.4.513-523.1970.
- Abu-Raya, B.; Michalski, C.; Sadarangani, M.; Lavoie, P.M. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy. *Front Immunol* **2020**, *11*, 575197, doi:10.3389/fimmu.2020.575197.
- Agelidis, A.M.; Shukla, D. Cell Entry Mechanisms of HSV: What We Have Learned in Recent Years. *Future Virol.* **2015**, *10*, 1145–1154, doi:10.2217/fvl.15.85.
- Akula, S.M.; Naranatt, P.P.; Walia, N.-S.; Wang, F.-Z.; Fegley, B.; Chandran, B. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Infection of Human Fibroblast Cells Occurs through Endocytosis. *J. Virol.* **2003**, *77*, 7978–7990, doi:10.1128/jvi.77.14.7978-7990.2003.
- Allen, G.; Kydd, J.; Slater, J.; Smith, K. Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In *Infectious Diseases of Lifestock*; Oxford Press (Cape Town), 2004; p. Chapter 76, 829-859.
- Allen, G.; Yeargan, M.; Costa, L.R.; Cross, R. Major Histocompatibility Complex Class I-Restricted Cytotoxic T-Lymphocyte Responses in Horses Infected with Equine Herpesvirus 1. *J. Virol.* **1995**, *69*, 606–612, doi:10.1128/JVI.69.1.606-612.1995.
- Allen, G.P. Antemortem Detection of Latent Infection with Neuropathogenic Strains of Equine Herpesvirus-1 in Horses. **2006**, *67*, 5.
- Allen, G.P. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Diagnosis of Neuropathogenic Strains of Equine Herpesvirus-1. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2007**, *19*, 69–72, doi:10.1177/104063870701900110.
- Allen, G.P. Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4 (28-Feb-2002). **2002**, *14*.
- Allen, G.P. Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4. In *Equine Respiratory Diseases*; International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
- Allen, G.P. Risk Factors for Development of Neurologic Disease after Experimental Exposure to Equine Herpesvirus-1 in Horses. *Am. J. Vet. Res.* **2008**, *69*, 1595–1600, doi:10.2460/ajvr.69.12.1595.
- Allen, G.P.; Coogle, L.D.; Ostlund, E.N.; Yeargan, M.R. Molecular Dissection of Two Major Equine Herpesvirus-1 Glycoprotein Antigens (GB and GC) That Elicit Humoral Immune Responses in the Horses.; 1991; pp. 181–193.

- Allen, G.P.; Yeargan, M.R.; Turtinen, L.W.; Bryans, J.T. A New Field Strain of Equine Abortion Virus (Equine Herpesvirus-1) among Kentucky Horses. *Am. J. Vet. Res.* **1985**, *46*, 138–140.
- Allen, G.P.; Yeargan, M.R.; Turtinen, L.W.; Bryans, J.T.; McCollum, W.H. Molecular Epizootiologic Studies of Equine Herpesvirus-1 Infections by Restriction Endonuclease Fingerprinting of Viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* **1983**, *44*, 263–271.
- Andoh, K.; Takasugi, M.; Mahmoud, H.Y.A.H.; Hattori, S.; Terada, Y.; Noguchi, K.; Shimoda, H.; Bannai, H.; Tsujimura, K.; Matsumura, T.; et al. Identification of a Major Immunogenic Region of Equine Herpesvirus-1 Glycoprotein E and Its Application to Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Vet. Microbiol.* **2013**, *164*, 18–26, doi:10.1016/j.vetmic.2013.01.033.
- Arici, A.; Senturk, L.M.; Seli, E.; Bahtiyar, M.O.; Kim, G. Regulation of Monocyte Chemotactic Protein-1 Expression in Human Endometrial Stromal Cells by Estrogen and Progesterone. *Biol. Reprod.* **1999**, *61*, 85–90, doi:10.1095/biolreprod61.1.85.
- Arii, J.; Goto, H.; Suenaga, T.; Oyama, M.; Kozuka-Hata, H.; Imai, T.; Minowa, A.; Akashi, H.; Arase, H.; Kawaoka, Y.; et al. Non-Muscle Myosin IIA Is a Functional Entry Receptor for Herpes Simplex Virus-1. *Nature* **2010**, *467*, 859–862, doi:10.1038/nature09420.
- Atanasiu, D.; Saw, W.T.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J. Cascade of Events Governing Cell-Cell Fusion Induced by Herpes Simplex Virus Glycoproteins GD, GH/GL, and GB. *J. Virol.* **2010**, *84*, 12292–12299, doi:10.1128/JVI.01700-10.
- Atanasiu, D.; Whitbeck, J.C.; Cairns, T.M.; Reilly, B.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J. Bimolecular Complementation Reveals That Glycoproteins GB and GH/GL of Herpes Simplex Virus Interact with Each Other during Cell Fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 18718–18723, doi:10.1073/pnas.0707452104.
- Ataseven, V.S.; Dağalp, S.B.; Güzel, M.; Başaran, Z.; Tan, M.T.; Geraghty, B. Prevalence of Equine Herpesvirus-1 and Equine Herpesvirus-4 Infections in Equidae Species in Turkey as Determined by ELISA and Multiplex Nested PCR. *Res. Vet. Sci.* **2009**, *86*, 339–344, doi:10.1016/j.rvsc.2008.06.001.
- Attili, A.-R.; Colognato, R.; Preziuso, S.; Moriconi, M.; Valentini, S.; Petrini, S.; De Mia, G.M.; Cuteri, V. Evaluation of Three Different Vaccination Protocols against EHV1/EHV4 Infection in Mares: Double Blind, Randomized Clinical Trial. *Vaccines* **2020**, *8*, 268, doi:10.3390/vaccines8020268.
- Azab, W.; Dayaram, A.; Greenwood, A.D.; Osterrieder, N. How Host Specific Are Herpesviruses? Lessons from Herpesviruses Infecting Wild and Endangered Mammals. *Annu. Rev. Virol.* **2018**, *5*, 53–68, doi:10.1146/annurev-virology-092917-043227.
- Azab, W.; Lehmann, M.J.; Osterrieder, N. Glycoprotein H and A4β1 Integrins Determine the Entry Pathway of Alphaherpesviruses. *J. Virol.* **2013**, *87*, 5937–5948, doi:10.1128/JVI.03522-12.
- Azab, W.; Osterrieder, K. Initial Contact: The First Steps in Herpesvirus Entry. In *Cell Biology of Herpes Viruses*; Osterrieder, K., Ed.; Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology; Springer International Publishing: Cham, 2017; Vol. 223, pp. 1–27 ISBN 978-3-319-53167-0.
- Azab, W.; Osterrieder, N. Glycoproteins D of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) and EHV-4 Determine Cellular Tropism Independently of Integrins. *J. Virol.* **2012**, *86*, 2031–2044, doi:10.1128/JVI.06555-11.
- Azab, W.; Tsujimura, K.; Kato, K.; Arii, J.; Morimoto, T.; Kawaguchi, Y.; Tohya, Y.; Matsumura, T.; Akashi, H. Characterization of a Thymidine Kinase-Deficient Mutant of Equine Herpesvirus 4 and in Vitro Susceptibility of the Virus to Antiviral Agents. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 389–395, doi:10.1016/j.antiviral.2009.11.007.
- Azab, W.; Tsujimura, K.; Maeda, K.; Kobayashi, K.; Mohamed, Y.M.; Kato, K.; Matsumura, T.; Akashi, H. Glycoprotein C of Equine Herpesvirus 4 Plays a Role in Viral Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *Virus Res.* **2010**, *151*, 1–9, doi:10.1016/j.virusres.2010.03.003.
- Azab, W.; Zajic, L.; Osterrieder, N. The Role of Glycoprotein H of Equine Herpesviruses 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) in Cellular Host Range and Integrin Binding. *Vet. Res.* **2012**, *43*, 61, doi:10.1186/1297-9716-43-61.
- Baghi, H.B.; Nauwynck, H.J. Impact of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Infection on the Migration of Monocytic Cells through Equine Nasal Mucosa. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *37*, 321–329, doi:10.1016/j.cimid.2014.09.004.

- Baker, T.S.; Newcomb, W.W.; Booy, F.P.; Brown, J.C.; Steven, A.C. Three-Dimensional Structures of Maturable and Abortive Capsids of Equine Herpesvirus 1 from Cryoelectron Microscopy. *J. Virol.* **1990**, *64*, 563–573, doi:10.1128/JVI.64.2.563-573.1990.
- Balasuriya, U.B.R.; Crossley, B.M.; Timoney, P.J. A Review of Traditional and Contemporary Assays for Direct and Indirect Detection of *Equid Herpesvirus 1* in Clinical Samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2015**, *27*, 673–687, doi:10.1177/1040638715605558.
- Bannai, H.; Nemoto, M.; Tsujimura, K.; Yamanaka, T.; Kondo, T.; Matsumura, T. Improving a Complement-Fixation Test for Equine Herpesvirus Type-1 by Pretreating Sera with Potassium Periodate to Reduce Non-Specific Hemolysis. *J. Equine Sci.* **2013**, *24*, 71–74, doi:10.1294/jes.24.71.
- Bannai, H.; Tsujimura, K.; Kondo, T.; Nemoto, M.; Yamanaka, T.; Sugiura, T.; Maeda, K.; Matsumura, T. Induction of a Th-1-Biased IgG Subclass Response against Equine Herpesvirus Type 1 in Horses Previously Infected with Type 4 Virus. *J. Vet. Med. Sci.* **2011**, *73*, 535–539, doi:10.1292/jvms.10-0456.
- Bannai, H.; Tsujimura, K.; Nemoto, M.; Ohta, M.; Yamanaka, T.; Kokado, H.; Matsumura, T. Epizootiological Investigation of Equine Herpesvirus Type 1 Infection among Japanese Racehorses before and after the Replacement of an Inactivated Vaccine with a Modified Live Vaccine. *BMC Vet Res* **2019**, *15*, 280, doi:10.1186/s12917-019-2036-0.
- Baranovskiy, A.G.; Babayeva, N.D.; Suwa, Y.; Gu, J.; Pavlov, Y.I.; Tahirov, T.H. Structural Basis for Inhibition of DNA Replication by Aphidicolin. *Nucl Acids Res* **2014**, *42*, 14013–14021, doi:10.1093/nar/gku1209.
- Barrandeguy, M. Virological Aspects and Pathogenesis of Natural and Experimental Equid Herpesvirus 3 Infection in Horses, 2010.
- Baumann, R.P.; Yalamanchili, V.R.; O’Callaghan, D.J. Functional Mapping and DNA Sequence of an Equine Herpesvirus 1 Origin of Replication. *J. Virol.* **1989**, *63*, 1275–1283, doi:10.1128/JVI.63.3.1275-1283.1989.
- Baxi, M.K.; Efstathiou, S.; Lawrence, G.; Whalley, J.M.; Slater, J.D.; Field, H.J. The Detection of Latency-Associated Transcripts of Equine Herpesvirus 1 in Ganglionic Neurons. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 3113–3118, doi:10.1099/0022-1317-76-12-3113.
- Bello-Morales, R.; López-Guerrero, J.A. Extracellular Vesicles in Herpes Viral Spread and Immune Evasion. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2572, doi:10.3389/fmicb.2018.02572.
- Bello-Morales, R.; Praena, B.; de la Nuez, C.; Rejas, M.T.; Guerra, M.; Galán-Ganga, M.; Izquierdo, M.; Calvo, V.; Krummenacher, C.; López-Guerrero, J.A. Role of Microvesicles in the Spread of Herpes Simplex Virus 1 in Oligodendrocytic Cells. *J. Virol.* **2018**, *92*, doi:10.1128/JVI.00088-18.
- Bentley, E.M.; Mather, S.T.; Temperton, N.J. The Use of Pseudotypes to Study Viruses, Virus Sero-Epidemiology and Vaccination. *Vaccine* **2015**, *33*, 2955–2962, doi:10.1016/j.vaccine.2015.04.071.
- Bentz, B.G.; Maxwell, L.K.; Erkert, R.S.; Royer, C.M.; Davis, M.S.; MacAllister, C.G.; Clarke, C.R. Pharmacokinetics of Acyclovir after Single Intravenous and Oral Administration to Adult Horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2006**, *20*, 589–594, doi:10.1111/j.1939-1676.2006.tb02901.x.
- Berdis, A.J. Inhibiting DNA Polymerases as a Therapeutic Intervention against Cancer. *Front. Mol. Biosci.* **2017**, *4*, 78, doi:10.3389/fmolb.2017.00078.
- Beswick, T.S.L. The origin and the use of the word herpes. *Med. Hist.* **1962**, *6*, 214–232, doi:10.1017/S002572730002737X.
- Blevins, T.P.; Yu, Y.; Belshe, R.B.; Bellamy, A.R.; Morrison, L.A. Correlation between Herpes Simplex Virus Neutralizing Antibody Titers Determined by ELVIS Cell and Traditional Plaque Reduction Assays. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0214467, doi:10.1371/journal.pone.0214467.
- Blunden, A.S.; Smith, K.C.; Whitwell, K.E.; Dunn, K.A. Systemic Infection by Equid Herpesvirus-1 in a Grevy’s Zebra Stallion (*Equus Grevyi*) with Particular Reference to Genital Pathology. *J. Comp. Pathol.* **1998**, *119*, 485–493, doi:10.1016/s0021-9975(98)80043-1.
- Bonassies, A. Étude de la stabilité de l’herpèsvirus équin de type 1 dans le milieu extérieur en relation avec le contexte météorologique, Faculté de Médecine de Nantes: Nantes, 2019.

- Borchers, K.; Lieckfeldt, D.; Ludwig, A.; Fukushi, H.; Allen, G.; Fyumagwa, R.; Hoare, R. Detection of Equid Herpesvirus 9 DNA in the Trigeminal Ganglia of a Burchell's Zebra from the Serengeti Ecosystem. *J Vet Med Sci* **2008**, *70*, 1377–1381, doi:10.1292/jvms.70.1377.
- Borchers, K.; Slater, J. A Nested PCR for the Detection and Differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods* **1993**, *45*, 331–336, doi:10.1016/0166-0934(93)90117-A.
- Borchers, K.; Thein, R.; Sterner-Kock, A. Pathogenesis of Equine Herpesvirus-Associated Neurological Disease: A Revised Explanation. *Equine Vet. J.* **2006**, *38*, 283–287, doi:10.2746/042516406776866462.
- Borchers, K.; Wolfinger, U.; Lawrenz, B.; Schellenbach, A.; Ludwig, H. Equine Herpesvirus 4 DNA in Trigeminal Ganglia of Naturally Infected Horses Detected by Direct in Situ PCR. *J. Gen. Virol.* **1997**, *78* (Pt 5), 1109–1114, doi:10.1099/0022-1317-78-5-1109.
- Borchers, K.; Wolfinger, U.; Ludwig, H. Latency-Associated Transcripts of Equine Herpesvirus Type 4 in Trigeminal Ganglia of Naturally Infected Horses. *J. Gen. Virol.* **1999**, *80*, 2165–2171, doi:10.1099/0022-1317-80-8-2165.
- Bowles, D.E.; Kim, S.K.; O'Callaghan, D.J. Characterization of the *trans*-Activation Properties of Equine Herpesvirus 1 EICP0 Protein. *J. Virol.* **2000**, *74*, 1200, doi:10.1128/JVI.74.3.1200-1208.2000.
- Boyd, M.R.; Bacon, T.H.; Sutton, D.; Cole, M. Antiherpesvirus Activity of 9-(4-Hydroxy-3-Hydroxy-Methylbut-1-Yl)Guanine (BRL 39123) in Cell Culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 1238–1242, doi:10.1128/AAC.31.8.1238.
- Brandariz-Nuñez, A.; Liu, T.; Du, T.; Evilevitch, A. Pressure-Driven Release of Viral Genome into a Host Nucleus Is a Mechanism Leading to Herpes Infection. *eLife* **2019**, *8*, e47212, doi:10.7554/eLife.47212.
- Breathnach, C.C.; Yeargan, M.R.; Sheoran, A.S.; Allen, G.P. The Mucosal Humoral Immune Response of the Horse to Infective Challenge and Vaccination with Equine Herpesvirus-1 Antigens. *Equine Vet. J.* **2001**, *33*, 651–657, doi:10.2746/042516401776249318.
- Bresgen, C.; Lämmer, M.; Wagner, B.; Osterrieder, N.; Damiani, A.M. Serological Responses and Clinical Outcome after Vaccination of Mares and Foals with Equine Herpesvirus Type 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) Vaccines. *Vet. Microbiol.* **2012**, *160*, 9–16, doi:10.1016/j.vetmic.2012.04.042.
- Brewer, D.W.; Aubry, R.H. The Physiology of Pregnancy: Clinical Pathologic Correlations. 2. *Postgrad Med* **1973**, *53*, 221–226, doi:10.1080/00325481.1973.11713352.
- Brosnahan, M.M.; Al Abri, M.A.; Brooks, S.A.; Antczak, D.F.; Osterrieder, N. Genome-Wide Association Study of Equine Herpesvirus Type 1-Induced Myeloencephalopathy Identifies a Significant Single Nucleotide Polymorphism in a Platelet-Related Gene. *Vet. J. Lond. Engl.* **1997** **2019**, *245*, 49–54, doi:10.1016/j.tvjl.2018.12.013.
- Brown, C.C.; Bloss, L.L. An Epizootic of Malignant Catarrhal Fever in a Large Captive Herd of White-Tailed Deer (*Odocoileus Virginianus*). *J. Wildl. Dis.* **1992**, *28*, 301–305, doi:10.7589/0090-3558-28.2.301.
- Browning, G.F.; Ficorilli, N.; Studdert, M.J. Asinine Herpesvirus Genomes: Comparison with Those of the Equine Herpesviruses. *Arch. Virol.* **1988**, *101*, 183–190, doi:10.1007/BF01310999.
- Bryans, J.T. Serologic Responses of Pregnant Thoroughbred Mares to Vaccination with an Inactivated Equine Herpesvirus 1 Vaccine. *Am. J. Vet. Res.* **1980**, *41*, 1743–1746.
- Bryans, J.T. The Herpesvirus in Disease of the Horse.; Philadelphia, 1968; pp. 119–125.
- Bryant, N.A. Glycoprotein G Isoforms from Some Alphaherpesviruses Function as Broad-Spectrum Chemokine Binding Proteins. *EMBO J.* **2003**, *22*, 833–846, doi:10.1093/emboj/cdg092.
- Bryant, N.A.; Wilkie, G.S.; Russell, C.A.; Compston, L.; Grafham, D.; Clissold, L.; McLay, K.; Medcalf, L.; Newton, R.; Davison, A.J.; et al. Genetic Diversity of Equine Herpesvirus 1 Isolated from Neurological, Abortigenic and Respiratory Disease Outbreaks. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 817–832, doi:10.1111/tbed.12809.
- Bürki, F.; Rossmannith, W.; Nowotny, N.; Pallan, C.; Möstl, K.; Lussy, H. Viraemia and Abortions Are Not Prevented by Two Commercial Equine Herpesvirus-1 Vaccines after Experimental Challenge of Horses. *Vet. Q.* **1990**, *12*, 80–86, doi:10.1080/01652176.1990.9694249.
- Burrell, S.; Deback, C.; Agut, H.; Boutolleau, D. Genotypic Characterization of UL23 Thymidine Kinase and UL30 DNA Polymerase of Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus: Natural

- Polymorphism and Mutations Associated with Resistance to Antivirals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4833–4842, doi:10.1128/AAC.00669-10.
- Burrell, C.J.; Howard, C.R.; Murphy, F.A. Herpesviruses. In *Fenner and White's Medical Virology*; Elsevier, 2017; pp. 237–261 ISBN 978-0-12-375156-0.
- Burrows, R.; Goodridge, D.; Denyer, M.S. Trials of an Inactivated Equid Herpesvirus 1 Vaccine: Challenge with a Subtype 1 Virus. *Vet. Rec.* **1984**, *114*, 369–374, doi:10.1136/vr.114.15.369.
- Callé, A.; Ugrinova, I.; Epstein, A.L.; Bouvet, P.; Diaz, J.-J.; Greco, A. Nucleolin Is Required for an Efficient Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* **2008**, *82*, 4762–4773, doi:10.1128/JVI.00077-08.
- Campbell, M.E.; Palfreyman, J.W.; Preston, C.M. Identification of Herpes Simplex Virus DNA Sequences Which Encode a Trans-Acting Polypeptide Responsible for Stimulation of Immediate Early Transcription. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 1–19, doi:10.1016/0022-2836(84)90427-3.
- Carmichael, R.J.; Whitfield, C.; Maxwell, L.K. Pharmacokinetics of Ganciclovir and Valganciclovir in the Adult Horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2013**, *36*, 441–449, doi:10.1111/jvp.12029.
- Carpenter, D.E.; Misra, V. Sequences of the Bovine Herpesvirus 1 Homologue of Herpes Simplex Virus Type-1 α -Trans-Inducing Factor (UL48). *Gene* **1992**, *119*, 259–263, doi:10.1016/0378-1119(92)90280-3.
- Carvalho, R.; Oliveira, A.M.; Souza, A.M.; Passos, L.M.F.; Martins, A.S. Prevalence of Equine Herpesvirus Type 1 Latency Detected by Polymerase Chain Reaction. *Arch. Virol.* **2000**, *145*, 1773–1787, doi:10.1007/s007050070055.
- Caughman, G.B.; Staczek, J.; O'Callaghan, D.J. Equine Herpesvirus Type 1 Infected Cell Polypeptides: Evidence for Immediate Early/Early/Late Regulation of Viral Gene Expression. *Virology* **1985**, *145*, 49–61, doi:10.1016/0042-6822(85)90200-4.
- Chang, J.T.; Schmid, M.F.; Rixon, F.J.; Chiu, W. Electron Cryotomography Reveals the Portal in the Herpesvirus Capsid. *J. Virol.* **2007**, *81*, 2065–2068, doi:10.1128/JVI.02053-06.
- Chesters, P.M.; Allsop, R.; Purewal, A.; Edington, N. Detection of Latency-Associated Transcripts of Equid Herpesvirus 1 in Equine Leukocytes but Not in Trigeminal Ganglia. *J. VIROL* **1997**, *71*, 7.
- Chowdary, T.K.; Cairns, T.M.; Atanasiu, D.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Heldwein, E.E. Crystal Structure of the Conserved Herpesvirus Fusion Regulator Complex GH–GL. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 882–888, doi:10.1038/nsmb.1837.
- Chowdhury, S.I.; Buhk, H.J.; Ludwig, H.; Hammerschmidt, W. Genomic Termini of Equine Herpesvirus 1. *J. Virol.* **1990**, *64*, 873–880, doi:10.1128/JVI.64.2.873-880.1990.
- Chowdhury, S.I.; Kubin, G.; Ludwig, H. Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Induced Abortions and Paralysis in a Lipizzaner Stud: A Contribution to the Classification of Equine Herpesviruses. *Arch Virol* **1986**, *90*, 273–288, doi:10.1007/BF01317376.
- Chowdhury, S.I.; Ludwig, H.; Buhk, H.-J. Molecular Biological Characterization of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Isolates from Ruminant Hosts. *Virus Res.* **1988**, *11*, 127–139, doi:10.1016/0168-1702(88)90038-X.
- Clercq, E.D. In Search of a Selective Antiviral Chemotherapy. *CLIN MICROBIOL REV* **1997**, *10*, 20.
- Clercq, E.D.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; Maudgal, P.C. A Novel Selective Broad-Spectrum Anti-DNA Virus Agent. *Nature* **1986**, *323*, 464–467, doi:10.1038/323464a0.
- Coen, D.M.; Schaffer, P.A. Antiherpesvirus Drugs: A Promising Spectrum of New Drugs and Drug Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 278–288, doi:10.1038/nrd1065.
- Cohrs, R.; Gilden, D. Alphaherpesvirus Latency. *J. Neurovirol.* **2011**, *17*, 509–511, doi:10.1007/s13365-011-0075-9.
- Colle, C.F.; Clay Flowers, C.; O'Callaghan, D.J. Open Reading Frames Encoding a Protein Kinase, Homolog of Glycoprotein GX of Pseudorabies Virus, and a Novel Glycoprotein Map within the Unique Short Segment of Equine Herpesvirus Type 1. *Virology* **1992**, *188*, 545–557, doi:10.1016/0042-6822(92)90509-N.
- Collins, P. The Spectrum of Antiviral Activities of Acyclovir in Vitro and in Vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* **1983**, *12*, 19–27, doi:10.1093/jac/12.suppl_B.19.

- Connolly, S.A.; Longnecker, R. Residues within the C-Terminal Arm of the Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein B Ectodomain Contribute to Its Refolding during the Fusion Step of Virus Entry. *J. Virol.* **2012**, *86*, 6386–6393, doi:10.1128/JVI.00104-12.
- Coombs, D.K.; Patton, T.; Kohler, A.K.; Soboll, G.; Breathnach, C.; Townsend, H.G.G.; Lunn, D.P. Cytokine Responses to EHV-1 Infection in Immune and Non-Immune Ponies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *111*, 109–116, doi:10.1016/j.vetimm.2006.01.013.
- Copeland, A.M.; Newcomb, W.W.; Brown, J.C. Herpes Simplex Virus Replication: Roles of Viral Proteins and Nucleoporins in Capsid-Nucleus Attachment. *J. Virol.* **2009**, *83*, 1660–1668, doi:10.1128/JVI.01139-08.
- Cornick, J.; Martens, J.; Martens, R.; Crandell, R.; McConnell, S.; Kit, S. Safety and Efficacy of a Thymidine Kinase Negative Equine Herpesvirus-1 Vaccine in Young Horses. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire* **1990**, *54*, 260–266.
- Costa, E.A.; Rosa, R.; Oliveira, T.S.; Assis, A.C.; Paixão, T.A.; Santos, R.L. Molecular Characterization of Neuropathogenic Equine Herpesvirus 1 Brazilian Isolates. *Arq. Bras. Med. Veterinária E Zootec.* **2015**, *67*, 1183–1187, doi:10.1590/1678-4162-7427.
- Crabb, B.S.; Allen, G.P.; Studdert, M.J. Characterization of the Major Glycoproteins of Equine Herpesviruses 4 and 1 and Asinine Herpesvirus 3 Using Monoclonal Antibodies. *J. Gen. Virol.* **1991**, *72* (Pt 9), 2075–2082, doi:10.1099/0022-1317-72-9-2075.
- Crabb, B.S.; MacPherson, C.M.; Reubel, G.H.; Browning, G.F.; Studdert, M.J.; Drummer, H.E. A Type-Specific Serological Test to Distinguish Antibodies to Equine Herpesviruses 4 and 1. *Arch. Virol.* **1995**, *140*, 245–258, doi:10.1007/BF01309860.
- Crabb, B.S.; Studdert, M.J. Comparative Studies of the Proteins of Equine Herpesviruses 4 and 1 and Asinine Herpesvirus 3: Antibody Response of the Natural Hosts. *J. Gen. Virol.* **1990**, *71*, 2033–2041, doi:10.1099/0022-1317-71-9-2033.
- Crabb, B.S.; Studdert, M.J. Epitopes of Glycoprotein G of Equine Herpesviruses 4 and 1 Located near the C Termini Elicit Type-Specific Antibody Responses in the Natural Host. *J. Virol.* **1993**, *67*, 6332.
- Crabb, B.S.; Studdert, M.J. Equine Herpesviruses 4 (Equine Rhinopneumonitis Virus) and 1 (Equine Abortion Virus). *Adv. Virus Res.* **1995**, *45*, 153–190, doi:10.1016/s0065-3527(08)60060-3.
- Crandell, R.A.; Ichimura, H.; Kit, S. Isolation and Comparative Restriction Endonuclease DNA Fingerprinting of Equine Herpesvirus-1 from Cattle. *Am. J. Vet. Res.* **1988**, *49*, 1807–1813.
- Crumpacker, C.S. Mechanism of Action of Foscarnet against Viral Polymerases. *Am. J. Med.* **1992**, *92*, 3S-7S, doi:10.1016/0002-9343(92)90329-a.
- Crumpacker, C.S.; Schnipper, L.E.; Zaia, J.A.; Levin, M.J. Growth Inhibition by Acycloguanosine of Herpesviruses Isolated from Human Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 642–645, doi:10.1128/AAC.15.5.642.
- Csellner, H.; Walker, C.; Wellington, J.E.; McLure, L.E.; Love, D.N.; Whalley, J.M. EHV-1 Glycoprotein D (EHV-1 GD) Is Required for Virus Entry and Cell-Cell Fusion, and an EHV-1 GD Deletion Mutant Induces a Protective Immune Response in Mice. *Arch. Virol.* **2000**, *145*, 2371–2385, doi:10.1007/s007050070027.
- Cullinane, A.A.; Rixon, F.J.; Davison, A.J. Characterization of the Genome of Equine Herpesvirus 1 Subtype 2. *J. Gen. Virol.* **1988**, *69*, 1575–1590, doi:10.1099/0022-1317-69-7-1575.
- Damiani, A.M.; de Vries, M.; Reimers, G.; Winkler, S.; Osterrieder, N. A Severe Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Abortion Outbreak Caused by a Neuropathogenic Strain at a Breeding Farm in Northern Germany. *Vet. Microbiol.* **2014**, *172*, 555–562, doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.023.
- Darlington, R.W.; Randall, C.C. The Nucleic Acid Content of Equine Abortion Virus. *Virology* **1963**, *19*, 322–327, doi:10.1016/0042-6822(63)90071-0.
- Davison, A.J. Evolution of the Herpesviruses. *Vet. Microbiol.* **2002**, *86*, 69–88, doi:10.1016/S0378-1135(01)00492-8.
- Davison, A.J. Herpesvirus Systematics. *Vet. Microbiol.* **2010**, *143*, 52–69, doi:10.1016/j.vetmic.2010.02.014.
- Dayaram, A.; Franz, M.; Schattschneider, A.; Damiani, A.M.; Bischofberger, S.; Osterrieder, N.; Greenwood, A.D. Long Term Stability and Infectivity of Herpesviruses in Water. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/srep46559.

- Dayaram, A.; Seeber, P.; Courtiol, A.; Soilemetzidou, S.; Tsangaras, K.; Franz, M.; McEwen, G.K.; Azab, W.; Kaczensky, P.; Melzheimer, J.; et al. Seasonal Host and Ecological Drivers May Promote Restricted Water as a Viral Vector. *Sci. Total Environ.* **2021**, *773*, 145446, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145446.
- De Clercq, E. Antiviral Drugs in Current Clinical Use. *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115–133, doi:10.1016/j.jcv.2004.02.009.
- De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Barr, P.J.; Jones, A.S.; Walker, R.T. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Deoxyuridine: A Potent and Selective Anti-Herpes Agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 2947–2951, doi:10.1073/pnas.76.6.2947.
- De Clercq, E.; Descamps, J.; Ogata, M.; Shigeta, S. In Vitro Susceptibility of Varicella-Zoster Virus to E-5-(2-Bromovinyl)-2'-Deoxyuridine and Related Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *21*, 33–38, doi:10.1128/AAC.21.1.33.
- De Clercq, E.; Field, H.J. Antiviral Prodrugs - the Development of Successful Prodrug Strategies for Antiviral Chemotherapy. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 1–11, doi:10.1038/sj.bjp.0706446.
- De Clercq, E.; Holý, A. Acyclic Nucleoside Phosphonates: A Key Class of Antiviral Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 928–940, doi:10.1038/nrd1877.
- De Clercq, E.; Li, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29*, 695–747, doi:10.1128/CMR.00102-15.
- de la Fuente, R.; Awan, A.R.; Field, H.J. The Acyclic Nucleoside Analogue Penciclovir Is a Potent Inhibitor of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) in Tissue Culture and in a Murine Model. *Antiviral Res.* **1992**, *18*, 77–89, doi:10.1016/0166-3542(92)90007-r.
- Dennis, D.; Smiley, J.R. Transactivation of a Late Herpes Simplex Virus Promoter. *Mol. Cell. Biol.* **1984**, *4*, 544–551, doi:10.1128/MCB.4.3.544.
- Diallo, I.S.; Hewitson, G.; Wright, L.; Rodwell, B.J.; Corney, B.G. Detection of Equine Herpesvirus Type 1 Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Virol. Methods* **2006**, *131*, 92–98, doi:10.1016/j.jviromet.2005.07.010.
- Dimock, W.; Edwards, P. Is There a Filterable Virus of Abortion in Mares. *Bull Ky. Agric. Exp. Stn.* **1933**, 291–301.
- Dingwell, K.S.; Brunetti, C.R.; Hendricks, R.L.; Tang, Q.; Tang, M.; Rainbow, A.J.; Johnson, D.C. Herpes Simplex Virus Glycoproteins E and I Facilitate Cell-to-Cell Spread in Vivo and across Junctions of Cultured Cells. *J. Virol.* **1994**, *68*, 834–845, doi:10.1128/JVI.68.2.834-845.1994.
- Dingwell, K.S.; Johnson, D.C. The Herpes Simplex Virus GE-GI Complex Facilitates Cell-to-Cell Spread and Binds to Components of Cell Junctions. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8933–8942, doi:10.1128/JVI.72.11.8933-8942.1998.
- Dixon, R.J.; Hartley, W.J.; Hutchins, D.R.; Lephert, E.E.; Feilen, C.; Jones, R.F.; Love, D.N.; Sabine, M.; Wells, A.L. Perinatal Foal Mortality Associated with a Herpesvirus. *Aust. Vet. J.* **1978**, *54*, 103–105, doi:10.1111/j.1751-0813.1978.tb05512.x.
- Dobson, A.T.; Little, B.B.; Scott, L.L. Prevention of Herpes Simplex Virus Infection and Latency by Prophylactic Treatment with Acyclovir in a Weanling Mouse Model. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1998**, *179*, 527–532, doi:10.1016/S0002-9378(98)70390-4.
- Doll, E.R. Immunization against Viral Rhinopneumonitis of Horses with Live Virus Propagated in Hamsters. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1961**, *139*, 1324–1330.
- Doll, E.R.; Bryans, J.T. Immunization of Young Horses against Viral Rhinopneumonitis. *Cornell Vet.* **1963**, *53*, 24–41.
- Donald, J.J. Epidemiology and Diagnosis of Equid Herpesviruses 1 and 4 in Horses in New Zealand, 1998.
- Donovan, T.A.; Schrenzel, M.D.; Tucker, T.; Pessier, A.P.; Bicknese, B.; Busch, M.D.M.; Wise, A.G.; Maes, R.; Kiupel, M.; McKnight, C.; et al. Meningoencephalitis in a Polar Bear Caused by Equine Herpesvirus 9 (EHV-9). *Vet. Pathol.* **2009**, *46*, 1138–1143, doi:10.1354/vp.09-VP-0007-D-CR.
- Dowling, C.M.; Herranz Ors, C.; Kiely, P.A. Using Real-Time Impedance-Based Assays to Monitor the Effects of Fibroblast-Derived Media on the Adhesion, Proliferation, Migration and Invasion of Colon Cancer Cells. *Biosci Rep* **2014**, *34*, doi:10.1042/BSR20140031.
- Dridi, S.; Richerieux, N.; Gonzalez Suarez, C.E.; Vanharen, M.; Sanabria-Solano, C.; Pearson, A. A Mutation in the *UL24* Gene Abolishes Expression of the Newly Identified UL24.5 Protein of

- Herpes Simplex Virus 1 and Leads to an Increase in Pathogenicity in Mice. *J Virol* **2018**, *92*, e00671-18, /jvi/92/20/e00671-18.atom, doi:10.1128/JVI.00671-18.
- Drummer, H.E.; Crabb, B.S.; Studdert, M.J. Equine Herpesvirus-4 Glycoprotein G Is Secreted as a Disulphide-Linked Homodimer and Is Present as Two Homodimeric Species in the Virion. *J. Gen. Virol.* **1998**, *79*, 1205–1213, doi:10.1099/0022-1317-79-5-1205.
- Drummer, H.E.; Reynolds, A.; Studdert, M.J.; MacPherson, C.M.; Crabb, B.S. Application of an Equine Herpesvirus 1 (EHV1) Type-Specific ELISA to the Management of an Outbreak of EHV1 Abortion. *Vet. Rec.* **1995**, *136*, 579–581, doi:10.1136/vr.136.23.579.
- Dunowska, M. A Review of Equid Herpesvirus 1 for the Veterinary Practitioner. Part B: Pathogenesis and Epidemiology. *N. Z. Vet. J.* **2014**, *62*, 179–188, doi:10.1080/00480169.2014.899946.
- Dunuwille, W.M.B.; YousefiMashouf, N.; Balasuriya, U.B.R.; Pusterla, N.; Bailey, E. Genome-wide Association Study for Host Genetic Factors Associated with Equine Herpesvirus Type-1 Induced Myeloencephalopathy. *Equine Vet. J.* **2020**, *52*, 794–798, doi:10.1111/evj.13261.
- Eaglesome, M.D.; Henry, J.N.; McKnight, J.D. Equine Herpesvirus 1 Infection in Mares Vaccinated with a Live-Virus Rhinopneumonitis Vaccine Attenuated in Cell Culture. *Can. Vet. J. Rev. Veterinaire Can.* **1979**, *20*, 145–147.
- Edington, N.; Bridges, C.G. One Way Protection between Equid Herpesvirus 1 and 4 in Vivo. *Res. Vet. Sci.* **1990**, *48*, 235–239, doi:10.1016/S0034-5288(18)30997-4.
- Edington, N.; Bridges, C.G.; Huckle, A. Experimental Reactivation of Equid Herpesvirus 1 (EHV 1) Following the Administration of Corticosteroids. *Equine Vet. J.* **1985**, *17*, 369–372, doi:10.1111/j.2042-3306.1985.tb02524.x.
- Edington, N.; Bridges, C.G.; Patel, J.R. Endothelial Cell Infection and Thrombosis in Paralysis Caused by Equid Herpesvirus-1: Equine Stroke. *Arch. Virol.* **1986**, *90*, 111–124, doi:10.1007/BF01314149.
- Edington, N.; Smyth, B.; Griffiths, L. The Role of Endothelial Cell Infection in the Endometrium, Placenta and Foetus of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) Abortions. *J. Comp. Pathol.* **1991**, *104*, 379–387, doi:10.1016/S0021-9975(08)80148-X.
- Edington, N.; Welch, H.M.; Griffiths, L. The Prevalence of Latent Equid Herpesviruses in the Tissues of 40 Abattoir Horses. *Equine Vet. J.* **1994**, *26*, 140–142, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04353.x.
- El Kasmi, I.; Lippé, R. Herpes Simplex Virus 1 GN Partners with GM to Modulate the Viral Fusion Machinery. *J. Virol.* **2015**, *89*, 2313–2323, doi:10.1128/JVI.03041-14.
- El-Habashi, N.; El-Nahass, E.; Haridy, M.; Nayel, M.; Abdelaziz, A.A.; Fukushi, H.; Kuroda, K.; Sakai, H.; Yanai, T. Pathological Findings in Equine Herpesvirus 9-Induced Abortion in Rats. *J Comp Pathol* **2014**, *151*, 400–409, doi:10.1016/j.jcpa.2014.08.006.
- El-Habashi, N.; Murakami, M.; El-Nahass, E.; Hibi, D.; Sakai, H.; Fukushi, H.; Sasseville, V.; Yanai, T. Study on the Infectivity of Equine Herpesvirus 9 (EHV-9) by Different Routes of Inoculation in Hamsters. *Vet Pathol* **2011**, *48*, 558–564, doi:10.1177/0300985810375053.
- El-Husseini, D.M.; Helmy, N.M.; Tammam, R.H. Application of Gold Nanoparticle-Assisted PCR for Equine Herpesvirus 1 Diagnosis in Field Samples. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 2297–2303, doi:10.1007/s00705-017-3379-0.
- Elion, G.B. The Biochemistry and Mechanism of Action of Acyclovir. *J Antimicrob Chemother* **1983**, *12*, 9–17, doi:10.1093/jac/12.suppl_B.9.
- Elion, G.B.; Furman, P.A.; Fyfe, J.A.; Miranda, P. d.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H.J. Selectivity of Action of an Antiherpetic Agent, 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)Guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5716–5720, doi:10.1073/pnas.74.12.5716.
- Ellis, J.A.; Steeves, E.; Wright, A.K.; Bogdan, J.R.; Davis, W.C.; Kanara, E.W.; Haines, D.M. Cell-Mediated Cytolysis of Equine Herpesvirus-Infected Cells by Leukocytes from Young Vaccinated Horses. *Vet Immunol Immunopathol* **1997**, *57*, 201–214, doi:10.1016/s0165-2427(96)05749-2.
- Engel, G.A.; Jones-Engel, L.; Schillaci, M.A.; Suaryana, K.G.; Putra, A.; Fuentes, A.; Henkel, R. Human Exposure to Herpesvirus B-Seropositive Macaques, Bali, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 789–795, doi:10.3201/eid0808.010467.

- Estell, K.E.; Dawson, D.R.; Magdesian, K.G.; Swain, E.; Laing, S.T.; Siso, S.; Mapes, S.; Pusterla, N. Quantitative Molecular Viral Loads in 7 Horses with Naturally Occurring Equine Herpesvirus-1 Infection. *Equine Vet. J.* **2015**, *47*, 689–693, doi:10.1111/evj.12351.
- Fang, Y.; Ye, P.; Wang, X.; Xu, X.; Reisen, W. Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology. *J Virol Methods* **2011**, *173*, 251–258, doi:10.1016/j.jviromet.2011.02.013.
- Farnsworth, A.; Goldsmith, K.; Johnson, D.C. Herpes Simplex Virus Glycoproteins GD and GE/GI Serve Essential but Redundant Functions during Acquisition of the Virion Envelope in the Cytoplasm. *J. Virol.* **2003**, *77*, 8481–8494, doi:10.1128/jvi.77.15.8481-8494.2003.
- Farnsworth, A.; Wisner, T.W.; Webb, M.; Roller, R.; Cohen, G.; Eisenberg, R.; Johnson, D.C. Herpes Simplex Virus Glycoproteins GB and GH Function in Fusion between the Virion Envelope and the Outer Nuclear Membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 10187–10192, doi:10.1073/pnas.0703790104.
- Favoreel, H.W.; Van Minnebruggen, G.; Van de Walle, G.R.; Ficinska, J.; Nauwynck, H.J. Herpesvirus Interference with Virus-Specific Antibodies: Bridging Antibodies, Internalizing Antibodies, and Hiding from Antibodies. *Vet. Microbiol.* **2006**, *113*, 257–263, doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.003.
- Feierbach, B.; Piccinotti, S.; Bisher, M.; Denk, W.; Enquist, L.W. Alpha-Herpesvirus Infection Induces the Formation of Nuclear Actin Filaments. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, e85, doi:10.1371/journal.ppat.0020085.
- Feilen, C.P.; Walker, S.T.; Studdert, M.J. Equine Herpesvirus Type 3 (Equine Coital Exanthema) in New South Wales. *Aust. Vet. J.* **1979**, *55*, 443–444, doi:10.1111/j.1751-0813.1979.tb05606.x.
- Field, H.J.; Awan, A.R.; de la Fuente, R. Reinfection and Reactivation of Equine Herpesvirus-1 in the Mouse. *Arch. Virol.* **1992**, *123*, 409–419, doi:10.1007/BF01317274.
- Field, H.J.; Thackray, A.M. Early Therapy with Valaciclovir or Famciclovir Reduces But Does Not Abrogate Herpes Simplex Virus Neuronal Latency. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 461–470, doi:10.1080/15257770008033021.
- Fitzpatrick, D.R.; Studdert, M.J. Immunologic Relationships between Equine Herpesvirus Type 1 (Equine Abortion Virus) and Type 4 (Equine Rhinopneumonitis Virus). *Am. J. Vet. Res.* **1984**, *45*, 1947–1952.
- Flowers, C.C.; Flowers, S.P.; Jennings, S.R.; O’Callaghan, D.J. Synthesis and Processing of Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein D. *Virology* **1995**, *208*, 9–18, doi:10.1006/viro.1995.1124.
- Foote, C.E.; Love, D.N.; Gilkerson, J.R.; Rota, J.; Trevor-Jones, P.; Ruitenber, K.M.; Wellington, J.E.; Whalley, J.M. Serum Antibody Responses to Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein D in Horses, Pregnant Mares and Young Foals. *Vet Immunol Immunopathol* **2005**, *105*, 47–57, doi:10.1016/j.vetimm.2004.12.012.
- Foote, C.E.; Love, D.N.; Gilkerson, J.R.; Whalley, J.M. Detection of EHV-1 and EHV-4 DNA in Unweaned Thoroughbred Foals from Vaccinated Mares on a Large Stud Farm. *Equine Vet. J.* **2004**, *36*, 341–345, doi:10.2746/0425164044890634.
- Foote, C.E.; Love, D.N.; Gilkerson, J.R.; Whalley, J.M. Serological Responses of Mares and Weanlings Following Vaccination with an Inactivated Whole Virus Equine Herpesvirus 1 and Equine Herpesvirus 4 Vaccine. *Vet Microbiol* **2002**, *88*, 13–25, doi:10.1016/s0378-1135(02)00100-1.
- Forest, T.; Barnard, S.; Baines, J.D. Active Intranuclear Movement of Herpesvirus Capsids. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 429–431, doi:10.1038/ncb1243.
- Forrester, A.; Farrell, H.; Wilkinson, G.; Kaye, J.; Davis-Poynter, N.; Minson, T. Construction and Properties of a Mutant of Herpes Simplex Virus Type 1 with Glycoprotein H Coding Sequences Deleted. *J. Virol.* **1992**, *66*, 341–348, doi:10.1128/JVI.66.1.341-348.1992.
- Fougerolle; Fortier; Legrand; Jourdan; Marcillaud-Pitel; Pronost; Paillot Success and Limitation of Equine Influenza Vaccination: The First Incursion in a Decade of a Florida Clade 1 Equine Influenza Virus That Shakes Protection Despite High Vaccine Coverage. *Vaccines* **2019**, *7*, 174, doi:10.3390/vaccines7040174.
- Frampton, A.R.; Goins, W.F.; Cohen, J.B.; von Einem, J.; Osterrieder, N.; O’Callaghan, D.J.; Glorioso, J.C. Equine Herpesvirus 1 Utilizes a Novel Herpesvirus Entry Receptor. *J. Virol.* **2005**, *79*, 3169–3173, doi:10.1128/JVI.79.5.3169-3173.2005.

- Frampton, A.R.; Stolz, D.B.; Uchida, H.; Goins, W.F.; Cohen, J.B.; Glorioso, J.C. Equine Herpesvirus 1 Enters Cells by Two Different Pathways, and Infection Requires the Activation of the Cellular Kinase ROCK1. *J. Virol.* **2007**, *81*, 10879–10889, doi:10.1128/JVI.00504-07.
- Frampton, A.R.; Uchida, H.; von Einem, J.; Goins, W.F.; Grandi, P.; Cohen, J.B.; Osterrieder, N.; Glorioso, J.C. Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Utilizes Microtubules, Dynein, and ROCK1 to Productively Infect Cells. *Vet. Microbiol.* **2010**, *141*, 12–21, doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.035.
- Friday, P.A.; Scarratt, W.K.; Elvinger, F.; Timoney, P.J.; Bonda, A. Ataxia and Paresis with Equine Herpesvirus Type 1 Infection in a Herd of Riding School Horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2000**, *14*, 197–201, doi:10.1892/0891-6640(2000)014<0197:aapweh>2.3.co;2.
- Fritsche, A.-K.; Borchers, K. Detection of Neuropathogenic Strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) Associated with Abortions in Germany. *Vet. Microbiol.* **2011**, *147*, 176–180, doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.014.
- Fuchs, W.; Granzow, H.; Klupp, B.G.; Kopp, M.; Mettenleiter, T.C. The UL48 Tegument Protein of Pseudorabies Virus Is Critical for Intracytoplasmic Assembly of Infectious Virions. *J. Virol.* **2002**, *76*, 6729, doi:10.1128/JVI.76.13.6729-6742.2002.
- Fuchs, W.; Klupp, B.G.; Granzow, H.; Osterrieder, N.; Mettenleiter, T.C. The Interacting UL31 and UL34 Gene Products of Pseudorabies Virus Are Involved in Egress from the Host-Cell Nucleus and Represent Components of Primary Enveloped but Not Mature Virions. *J. Virol.* **2002**, *76*, 364–378, doi:10.1128/JVI.76.1.364-378.2002.
- Fukushi, H.; Tomita, T.; Taniguchi, A.; Ochiai, Y.; Kirisawa, R.; Matsumura, T.; Yanai, T.; Masegi, T.; Yamaguchi, T.; Hirai, K. Gazelle Herpesvirus 1: A New Neurotropic Herpesvirus Immunologically Related to Equine Herpesvirus 1. *Virology* **1997**, *227*, 34–44, doi:10.1006/viro.1996.8296.
- Fukushi, H.; Yamaguchi, T.; Yamada, S. Complete Genome Sequence of Equine Herpesvirus Type 9. *J. Virol.* **2012**, *86*, 13822, doi:10.1128/JVI.02607-12.
- Gardiner, D.W.; Lunn, D.P.; Goehring, L.S.; Chiang, Y.-W.; Cook, C.; Osterrieder, N.; McCue, P.; Del Piero, F.; Hussey, S.B.; Hussey, G.S. Strain Impact on Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Abortion Models: Viral Loads in Fetal and Placental Tissues and Foals. *Vaccine* **2012**, *30*, 6564–6572, doi:10.1016/j.vaccine.2012.08.046.
- Garko-Buczynski, K.A.; Smith, R.H.; Kim, S.K.; O’Callaghan, D.J. Complementation of a Replication-Defective Mutant of Equine Herpesvirus Type 1 by a Cell Line Expressing the Immediate-Early Protein. *Virology* **1998**, *248*, 83–94, doi:10.1006/viro.1998.9247.
- Garré, B.; Gryspeerdt, A.; Croubels, S.; De Backer, P.; Nauwynck, H. Evaluation of Orally Administered Valacyclovir in Experimentally EHV1-Infected Ponies. *Vet. Microbiol.* **2009**, *135*, 214–221, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.062.
- Garré, B.; Shebany, K.; Gryspeerdt, A.; Baert, K.; van der Meulen, K.; Nauwynck, H.; Deprez, P.; De Backer, P.; Croubels, S. Pharmacokinetics of Acyclovir after Intravenous Infusion of Acyclovir and after Oral Administration of Acyclovir and Its Prodrug Valacyclovir in Healthy Adult Horses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 4308–4314, doi:10.1128/AAC.00116-07.
- Garre, B.; Vandermeulen, K.; Nugent, J.; Neyts, J.; Croubels, S.; Debacker, P.; Nauwynck, H. In Vitro Susceptibility of Six Isolates of Equine Herpesvirus 1 to Acyclovir, Ganciclovir, Cidofovir, Adefovir, PMEDAP and Foscarnet. *Vet. Microbiol.* **2007**, *122*, 43–51, doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.004.
- Garvey, M.; Lyons, R.; Hector, R.; Walsh, C.; Arkins, S.; Cullinane, A. Molecular Characterisation of Equine Herpesvirus 1 Isolates from Cases of Abortion, Respiratory and Neurological Disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens* **2019**, *8*, 7, doi:10.3390/pathogens8010007.
- Garvey, M.; Suárez, N.M.; Kerr, K.; Hector, R.; Moloney-Quinn, L.; Arkins, S.; Davison, A.J.; Cullinane, A. Equid Herpesvirus 8: Complete Genome Sequence and Association with Abortion in Mares. *PLOS ONE* **2018**, *13*, e0192301, doi:10.1371/journal.pone.0192301.
- Geraghty, R.J.; Krummenacher, C.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Spear, P.G. Entry of Alphaherpesviruses Mediated by Poliovirus Receptor-Related Protein 1 and Poliovirus Receptor. *Science* **1998**, *280*, 1618–1620, doi:10.1126/science.280.5369.1618.

- Gerber, J.D.; Marron, A.E.; Bass, E.P.; Beckenhauer, W.H. Effect of Age and Pregnancy on the Antibody and Cell-Mediated Immune Responses of Horses to Equine Herpesvirus 1. *Can J Comp Med* **1977**, *41*, 471–478.
- Ghanem, Y.M.; Fukushi, H.; Ibrahim, E.S.M.; Ohya, K.; Yamaguchi, T.; Kennedy, M. Molecular Phylogeny of Equine Herpesvirus 1 Isolates from Onager, Zebra and Thomson's Gazelle. *Arch. Virol.* **2008**, *153*, 2297–2302, doi:10.1007/s00705-008-0247-y.
- Gibson, J.S.; O'Neill, T.; Thackray, A.; Hannant, D.; Field, H.J. Serological Responses of Specific Pathogen-Free Foals to Equine Herpesvirus-1: Primary and Secondary Infection, and Reactivation. *Vet. Microbiol.* **1992**, *32*, 199–214, doi:10.1016/0378-1135(92)90145-j.
- Gibson, J.S.; Slater, J.D.; Awan, A.R.; Field, H.J. Pathogenesis of Equine Herpesvirus-1 in Specific Pathogen-Free Foals: Primary and Secondary Infections and Reactivation. *Arch. Virol.* **1992**, *123*, 351–366, doi:10.1007/BF01317269.
- Gibson, J.S.; Slater, J.D.; Field, H.J. The Activity of (S)-1-[(3-Hydroxy-2-Phosphonyl Methoxy) Propyl] Cytosine (HPMPC) against Equine Herpesvirus-1 (EHV-1) in Cell Cultures, Mice and Horses. *Antiviral Res.* **1992**, *19*, 219–232, doi:10.1016/0166-3542(92)90081-f.
- Gilkerson, J.R.; Love, D.N.; Whalley, J.M. A Review Of Equine Herpesvirus Vaccines: From The Traditional To The Experimental. In *AUSTRALIAN EQUINE VETERINARIAN*; 1997; Vol. 15.
- Gilkerson, J.R.; Whalley, J.M.; Drummer, H.E.; Studdert, M.J.; Love, D.N. Epidemiological Studies of Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred Foals: A Review of Studies Conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. *Vet. Microbiol.* **1999**, *68*, 15–25, doi:10.1016/s0378-1135(99)00057-7.
- Gilkerson, J.R.; Whalley, J.M.; Drummer, H.E.; Studdert, M.J.; Love, D.N. Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the Mare and Foal Populations on a Hunter Valley Stud Farm: Are Mares the Source of EHV-1 for Unweaned Foals. *Vet. Microbiol.* **1999**, *68*, 27–34, doi:10.1016/s0378-1135(99)00058-9.
- Girard, A.; Greig, A.S.; Mitchell, D. A Virus Associated with Vulvitis and Balanitis in the Horse-- Preliminary Report. *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. Med. Comp.* **1968**, *32*, 603–604.
- Gleeson, L.J.; Sullivan, N.D.; Studdert, M.J. Equine Herpesviruses: Type 3 as an Abortigenic Agent. *Aust. Vet. J.* **1976**, *52*, 349–354, doi:10.1111/j.1751-0813.1976.tb09485.x.
- Goehring, L.S.; Landolt, G.A.; Morley, P.S. Detection and Management of an Outbreak of Equine Herpesvirus Type 1 Infection and Associated Neurological Disease in a Veterinary Teaching Hospital: EHV-1 Outbreak at CSU. *J. Vet. Intern. Med.* **2010**, *24*, 1176–1183, doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0558.x.
- Goehring, L.S.; van Maanen, C.; Berendsen, M.; Cullinane, A.; de Groot, R.J.; Rottier, P.J.M.; Wesselingh, J.J.C.M.; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M. Experimental Infection with Neuropathogenic Equid Herpesvirus Type 1 (EHV-1) in Adult Horses. *Vet J* **2010**, *186*, 180–187, doi:10.1016/j.tvjl.2009.08.007.
- Goehring, L.S.; Wagner, B.; Bigbie, R.; Hussey, S.B.; Rao, S.; Morley, P.S.; Lunn, D.P. Control of EHV-1 Viremia and Nasal Shedding by Commercial Vaccines. *Vaccine* **2010**, *28*, 5203–5211, doi:10.1016/j.vaccine.2010.05.065.
- Gonzalez-Medina, S.; Newton, J.R. Equine Herpesvirus-1: Dealing Practically but Effectively with an Ever Present Threat. *Equine Vet. J.* **2015**, *47*, 142–144, doi:10.1111/evj.12416.
- Goodman, L.; Wagner, B.; Flaminio, M.; Sussman, K.; Metzger, S.; Holland, R.; Osterrieder, N. Comparison of the Efficacy of Inactivated Combination and Modified-Live Virus Vaccines against Challenge Infection with Neuropathogenic Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1). *Vaccine* **2006**, *24*, 3636–3645, doi:10.1016/j.vaccine.2006.01.062.
- Goodman, L.B.; Loregian, A.; Perkins, G.A.; Nugent, J.; Buckles, E.L.; Mercorelli, B.; Kydd, J.H.; Palù, G.; Smith, K.C.; Osterrieder, N.; et al. A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase Determines Neuropathogenicity. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, doi:10.1371/journal.ppat.0030160.
- Goodman, L.B.; Wimer, C.; Dubovi, E.J.; Gold, C.; Wagner, B. Immunological Correlates of Vaccination and Infection for Equine Herpesvirus 1. *Clin. Vaccine Immunol.* **2012**, *19*, 235–241, doi:10.1128/CVI.05522-11.
- Gorbalenya, A. Phylogeny of Viruses. *Encycl. Virol.* **2008**, 125–129, doi:10.1016/B978-012374410-4.00712-3.

- Gray, W.L.; Baumann, R.P.; Robertson, A.T.; Caughman, G.B.; O'Callaghan, D.J.; Staczek, J. Regulation of Equine Herpesvirus Type 1 Gene Expression: Characterization of Immediate Early, Early, and Late Transcription. *Virology* **1987**, *158*, 79–87, doi:10.1016/0042-6822(87)90240-6.
- Gray, W.L.; Baumann, R.P.; Robertson, A.T.; O'Callaghan, D.J.; Staczek, J. Characterization and Mapping of Equine Herpesvirus Type 1 Immediate Early, Early, and Late Transcripts. *Virus Res.* **1987**, *8*, 233–244, doi:10.1016/0168-1702(87)90018-9.
- Greenwood, A.D.; Tsangaras, K.; Ho, S.Y.W.; Szentiks, C.A.; Nikolin, V.M.; Ma, G.; Damiani, A.; East, M.L.; Lawrenz, A.; Hofer, H.; et al. A Potentially Fatal Mix of Herpes in Zoos. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 1727–1731, doi:10.1016/j.cub.2012.07.035.
- Grimm, K.S.; Klupp, B.G.; Granzow, H.; Muller, F.M.; Fuchs, W.; Mettenleiter, T.C. Analysis of Viral and Cellular Factors Influencing Herpesvirus-Induced Nuclear Envelope Breakdown. *J. Virol.* **2012**, *86*, 6512–6521, doi:10.1128/JVI.00068-12.
- Gruffat, H.; Marchione, R.; Manet, E. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-Initiation Complex Is Key. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.00869.
- Grundy, F.J.; Baumann, R.P.; O'Callaghani, D.J. DNA Sequence and Comparative Analyses of the Equine Herpesvirus Type 1 Immediate Early Gene. *Virology* **1989**, *172*, 223–236, doi:10.1016/0042-6822(89)90124-4.
- Grünewald, K.; Desai, P.; Winkler, D.C.; Heymann, J.B.; Belnap, D.M.; Baumeister, W.; Steven, A.C. Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography. *Science* **2003**, *302*, 1396–1398, doi:10.1126/science.1090284.
- Gryspeerd, A.C.; Vandekerckhove, A.P.; Garré, B.; Barbé, F.; Van de Walle, G.R.; Nauwynck, H.J. Differences in Replication Kinetics and Cell Tropism between Neurovirulent and Non-Neurovirulent EHV1 Strains during the Acute Phase of Infection in Horses. *Vet. Microbiol.* **2010**, *142*, 242–253, doi:10.1016/j.vetmic.2009.10.015.
- Guggemoos, S.; Just, F.T.; Neubauer, A. The Equine Herpesvirus 1 UL20 Product Interacts with Glycoprotein K and Promotes Egress of Mature Particles. *J. Virol.* **2006**, *80*, 95–107, doi:10.1128/JVI.80.1.95-107.2006.
- Gulati, B.R.; Anagha, G.; ICAR- Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, Bareilly, Uttar Pradesh-243122, India; Riyesh, T.; Khurana, S.K.; ICAR-National Research Centre on Equines, Hisar, Haryana-125001, India Emergence of Equine Herpes Virus 1 Myeloencephalopathy: A Brief Review. *J. Exp. Biol. Agric. Sci.* **2016**, *4*, S132–S138, doi:10.18006/2016.4(Spl-4-EHIDZ).S132.S138.
- Guo, X.; Izume, S.; Okada, A.; Ohya, K.; Kimura, T.; Fukushi, H. Full Genome Sequences of Zebra-Borne Equine Herpesvirus Type 1 Isolated from Zebra, Onager and Thomson's Gazelle. *J. Vet. Med. Sci.* **2014**, *76*, 1309–1312, doi:10.1292/jvms.14-0183.
- Gür, S.; Yapici, O. Equine Herpesvirus Type 1 and 4 in Individually Reared Horses in Central and Western Turkey. *Acta Vet. Brno* **2008**, *77*, 609–613, doi:10.2754/avb200877040609.
- Gutekunst, D.E.; Malmquist, W.A.; Becvar, C.S. Antigenic Relatedness of Equine Herpes Virus Types 1 and 3. *Arch Virol* **1978**, *56*, 33–45, doi:10.1007/BF01317281.
- Hall, T. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **1999**, 95–98.
- Hammarsten, O.; Yao, X.; Elias, P. Inhibition of Topoisomerase II by ICRF-193 Prevents Efficient Replication of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* **1996**, *70*, 4523–4529, doi:10.1128/JVI.70.7.4523-4529.1996.
- Han, J.; Chadha, P.; Starkey, J.L.; Wills, J.W. Function of Glycoprotein E of Herpes Simplex Virus Requires Coordinated Assembly of Three Tegument Proteins on Its Cytoplasmic Tail. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 19798–19803, doi:10.1073/pnas.1212900109.
- Hannant, D.; Jessett, D.M.; O'Neill, T.; Dolby, C.A.; Cook, R.F.; Mumford, J.A. Responses of Ponies to Equid Herpesvirus-1 Iscom Vaccination and Challenge with Virus of the Homologous Strain. *Res. Vet. Sci.* **1993**, *54*, 299–305, doi:10.1016/0034-5288(93)90126-Z.
- Härle, P.; Sainz, B.; Carr, D.J.J.; Halford, W.P. The Immediate-Early Protein, ICP0, Is Essential for the Resistance of Herpes Simplex Virus to Interferon- α/β . *Virology* **2002**, *293*, 295–304, doi:10.1006/viro.2001.1280.

- Harless, W.; Pusterla, N. Equine Herpesvirus 1 and 4 Respiratory Disease in the Horse. *Clin. Tech. Equine Pract.* **2006**, *5*, 197–202, doi:10.1053/j.ctep.2006.03.014.
- Hartley, C.A.; Wilks, C.R.; Studdert, M.J.; Gilkerson, J.R. Comparison of Antibody Detection Assays for the Diagnosis of Equine Herpesvirus 1 and 4 Infections in Horses. *Am. J. Vet. Res.* **2005**, *66*, 921–928, doi:10.2460/ajvr.2005.66.921.
- Harty, R.N.; O’Callaghan, D.J. An Early Gene Maps within and Is 3’ Coterminal with the Immediate-Early Gene of Equine Herpesvirus 1. *J. Virol.* **1991**, *65*, 3829–3838, doi:10.1128/JVI.65.7.3829-3838.1991.
- Hasebe, R.; Kimura, T.; Nakamura, K.; Ochiai, K.; Okazaki, K.; Wada, R.; Umemura, T. Differential Susceptibility of Equine and Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells to Equine Herpesvirus 1 Infection. *Arch. Virol.* **2006**, *151*, 775–786, doi:10.1007/s00705-005-0653-3.
- Hasebe, R.; Sasaki, M.; Sawa, H.; Wada, R.; Umemura, T.; Kimura, T. Infectious Entry of Equine Herpesvirus-1 into Host Cells through Different Endocytic Pathways. *Virology* **2009**, *393*, 198–209, doi:10.1016/j.virol.2009.07.032.
- He, Y.-Y.; Du, M.-R.; Guo, P.-F.; He, X.-J.; Zhou, W.-H.; Zhu, X.-Y.; Li, D.-J. Regulation of C-C Motif Chemokine Ligand 2 and Its Receptor in Human Decidual Stromal Cells by Pregnancy-Associated Hormones in Early Gestation. *Hum Reprod* **2007**, *22*, 2733–2742, doi:10.1093/humrep/dem208.
- Heldens, J.G.M.; Hannant, D.; Cullinane, A.A.; Prendergast, M.J.; Mumford, J.A.; Nelly, M.; Kydd, J.H.; Weststrate, M.W.; van den Hoven, R. Clinical and Virological Evaluation of the Efficacy of an Inactivated EHV1 and EHV4 Whole Virus Vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/Challenge Experiments in Foals and Pregnant Mares. *Vaccine* **2001**, *19*, 4307–4317, doi:10.1016/S0264-410X(01)00131-1.
- Heldens, J.G.M.; Kersten, A.J.; Weststrate, M.W.; van den Hoven, R. Vaccinology: Duration of Immunity Induced by an Adjuvanted and Inactivated Equine Influenza, Tetanus and Equine Herpesvirus 1 and 4 Combination Vaccine. *Vet. Q.* **2001**, *23*, 210–217, doi:10.1080/01652176.2001.9695116.
- Helgstrand, E.; Eriksson, B.; Johansson, N.G.; Lannerö, B.; Larsson, A.; Misiorny, A.; Norén, J.O.; Sjöberg, B.; Stenberg, K.; Stening, G.; et al. Trisodium Phosphonoformate, a New Antiviral Compound. *Science* **1978**, *201*, 819–821, doi:10.1126/science.210500.
- Henninger, R.W.; Reed, S.M.; Saville, W.J.; Allen, G.P.; Hass, G.F.; Kohn, C.W.; Sofaly, C. Outbreak of Neurologic Disease Caused by Equine Herpesvirus-1 at a University Equestrian Center. *J. Vet. Intern. Med.* **2007**, *21*, 157–165, doi:10.1111/j.1939-1676.2007.tb02942.x.
- Henry, B.E.; Robinson, R.A.; Dauenhauer, S.A.; Atherton, S.S.; Hayward, G.S.; O’Callaghan, D.J. Structure of the Genome of Equine Herpesvirus Type 1. *Virology* **1981**, *115*, 97–114, doi:10.1016/0042-6822(81)90092-1.
- Hofemeister, H.; O’Hare, P. Nuclear Pore Composition and Gating in Herpes Simplex Virus-Infected Cells. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8392–8399, doi:10.1128/JVI.00951-08.
- Holmes, G.P.; Hilliard, J.K.; Klontz, K.C.; Rupert, A.H.; Schindler, C.M.; Parrish, E.; Griffin, D.G.; Ward, G.S.; Bernstein, N.D.; Bean, T.W. B Virus (Herpesvirus Simiae) Infection in Humans: Epidemiologic Investigation of a Cluster. *Ann. Intern. Med.* **1990**, *112*, 833–839, doi:10.7326/0003-4819-112-11-833.
- Holmes, M.A.; Townsend, H.G.G.; Kohler, A.K.; Hussey, S.; Breathnach, C.; Barnett, C.; Holland, R.; Lunn, D.P. Immune Responses to Commercial Equine Vaccines against Equine Herpesvirus-1, Equine Influenza Virus, Eastern Equine Encephalomyelitis, and Tetanus. *Vet Immunol Immunopathol* **2006**, *111*, 67–80, doi:10.1016/j.vetimm.2006.01.010.
- Holz, C.L.; Sledge, D.G.; Kiupel, M.; Nelli, R.K.; Goehring, L.S.; Soboll Hussey, G. Histopathologic Findings Following Experimental Equine Herpesvirus 1 Infection of Horses. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 59, doi:10.3389/fvets.2019.00059.
- Honess, R.W.; Roizman, B. Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Groups of Viral Proteins 1. *J. Virol.* **1974**, *14*, 8–19, doi:10.1128/JVI.14.1.8-19.1974.
- Hu, Z.; Zhu, C.; Chang, H.; Guo, W.; Liu, D.; Xiang, W.; Wang, X. Development of a Single-Tube Duplex EvaGreen Real-Time PCR for the Detection and Identification of EHV-1 and EHV-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 4179–4186, doi:10.1007/s00253-014-5626-6.

- Huang, T.; Ma, G.; Osterrieder, N. Equine Herpesvirus 1 Multiply Inserted Transmembrane Protein PUL43 Cooperates with PUL56 in Downregulation of Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class I. *J. Virol.* **2015**, *89*, 6251–6263, doi:10.1128/JVI.00032-15.
- Hue, E.; Richard, E.; Fortier, C.; Fortier, G.; Paillot, R.; Raue, R.; Pronost, S. Equine PBMC Cytokines Profile after In Vitro α - and γ -EHV Infection: Efficacy of a Parapoxvirus Ovis Based-Immunomodulator Treatment. *Vaccines* **2017**, *5*, 28, doi:10.3390/vaccines5030028.
- Huffman, J.B.; Newcomb, W.W.; Brown, J.C.; Homa, F.L. Amino Acids 143 to 150 of the Herpes Simplex Virus Type 1 Scaffold Protein Are Required for the Formation of Portal-Containing Capsids. *J. Virol.* **2008**, *82*, 6778–6781, doi:10.1128/JVI.00473-08.
- Hummeler, K.; Davidson, W.L.; Henle, W.; Labocetta, A.C.; Ruch, H.G. Encephalomyelitis Due to Infection with Herpesvirus Simiae (Herpes B Virus); a Report of Two Fatal, Laboratory-Acquired Cases. *N. Engl. J. Med.* **1959**, *261*, 64–68, doi:10.1056/NEJM195907092610203.
- Huson, D.H.; Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol Biol Evol* **2006**, *23*, 254–267, doi:10.1093/molbev/msj030.
- Hussey, G.; Goehring, L.S.; Lunn, D.P.; Hussey, S.B.; Huang, T.; Osterrieder, N.; Powell, C.; Hand, J.; Holz, C.; Slater, J. Experimental Infection with Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Induces Chorioretinal Lesions. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 118, doi:10.1186/1297-9716-44-118.
- Hussey, G.S. Key Determinants in the Pathogenesis of Equine Herpesvirus 1 and 4 Infections. *Vet. Pathol.* **2019**, *56*, 656–659, doi:10.1177/0300985819849498.
- Hussey, G.S.; Landolt, G.A. Equine Alphaherpesviruses. In *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine*; Elsevier, 2015; pp. 158–161 ISBN 978-1-4557-4555-5.
- Hussey, S.B.; Clark, R.; Lunn, K.F.; Breathnach, C.; Soboll, G.; Whalley, J.M.; Lunn, D.P. Detection and Quantification of Equine Herpesvirus-1 Viremia and Nasal Shedding by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2006**, *18*, 335–342, doi:10.1177/104063870601800403.
- Hutt-Fletcher, L.M. Epstein-Barr Virus Entry. *J. Virol.* **2007**, *81*, 7825–7832, doi:10.1128/JVI.00445-07.
- Ibrahim, E.S.M.; Kinoh, M.; Matsumura, T.; Kennedy, M.; Allen, G.P.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H. Genetic Relatedness and Pathogenicity of Equine Herpesvirus 1 Isolated from Onager, Zebra and Gazelle. *Arch. Virol.* **2007**, *152*, 245–255, doi:10.1007/s00705-006-0855-3.
- International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV Available online: <https://ictv.global/taxonomy/>.
- International Office of Epizootics; Biological Standards Commission *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: (Mammals, Birds and Bees)*; 2018; ISBN 978-92-95108-18-9.
- Izume, S.; Kirisawa, R.; Ohya, K.; Ohnuma, A.; Kimura, T.; Omatsu, T.; Katayama, Y.; Mizutani, T.; Fukushi, H. The Full Genome Sequences of 8 Equine Herpesvirus Type 4 Isolates from Horses in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **2017**, *79*, 206–212, doi:10.1292/jvms.16-0506.
- Jackson, T.A.; Osburn, B.I.; Cordy, D.R.; Kendrick, J.W. Equine Herpesvirus 1 Infection of Horses: Studies on the Experimentally Induced Neurologic Disease. *Am. J. Vet. Res.* **1977**, *38*, 709–719.
- Jacob, R.J.; Cohen, D.; Bouchey, D.; Davis, T.; Borchelt, J. Molecular Pathogenesis of Equine Coital Exanthema: Identification of a New Equine Herpesvirus Isolated from Lesions Reminiscent of Coital Exanthema in a Donkey.; University of Kentucky, 1988.
- Jacobson, J.G.; Martin, S.L.; Coen, D.M. A Conserved Open Reading Frame That Overlaps the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Is Important for Viral Growth in Cell Culture. *J. Virol.* **1989**, *63*, 1839–1843, doi:10.1128/JVI.63.4.1839-1843.1989.
- Jainkittivong, A.; Langlais, R.P. Herpes B Virus Infection. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **1998**, *85*, 399–403, doi:10.1016/s1079-2104(98)90064-6.
- Johnson, D.C.; Frame, M.C.; Ligas, M.W.; Cross, A.M.; Stow, N.D. Herpes Simplex Virus Immunoglobulin G Fc Receptor Activity Depends on a Complex of Two Viral Glycoproteins, GE and GI. *J. Virol.* **1988**, *62*, 1347–1354, doi:10.1128/JVI.62.4.1347-1354.1988.
- Johnson, D.C.; Webb, M.; Wisner, T.W.; Brunetti, C. Herpes Simplex Virus GE/GI Sorts Nascent Virions to Epithelial Cell Junctions, Promoting Virus Spread. *J. Virol.* **2001**, *75*, 821–833, doi:10.1128/JVI.75.2.821-833.2001.

- Johnson, K.E.; Knipe, D.M. Herpes Simplex Virus-1 Infection Causes the Secretion of a Type I Interferon-Antagonizing Protein and Inhibits Signaling at or before Jak-1 Activation. *Virology* **2010**, *396*, 21–29, doi:10.1016/j.virol.2009.09.021.
- Jöns, A.; Dijkstra, J.M.; Mettenleiter, T.C. Glycoproteins M and N of Pseudorabies Virus Form a Disulfide-Linked Complex. *J. Virol.* **1998**, *72*, 550–557, doi:10.1128/JVI.72.1.550-557.1998.
- Kaján, G.L.; Doszpoly, A.; Tarján, Z.L.; Vidovszky, M.Z.; Papp, T. Virus–Host Coevolution with a Focus on Animal and Human DNA Viruses. *J. Mol. Evol.* **2020**, *88*, 41–56, doi:10.1007/s00239-019-09913-4.
- Kasem, S.; Yamada, S.; Kiupel, M.; Woodruff, M.; Ohya, K.; Fukushi, H. Equine Herpesvirus Type 9 in Giraffe with Encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1948–1949, doi:10.3201/eid1412.080801.
- Kasem, S.; Yu, M.H.H.; Yamada, S.; Kodaira, A.; Matsumura, T.; Tsujimura, K.; Madbouly, H.; Yamaguchi, T.; Ohya, K.; Fukushi, H. The ORF37 (UL24) Is a Neuropathogenicity Determinant of Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) in the Mouse Encephalitis Model. *Virology* **2010**, *400*, 259–270, doi:10.1016/j.virol.2010.02.012.
- Kaufman, H.E.; Heidelberger, C. Therapeutic Antiviral Action of 5-Trifluoromethyl-2'-Deoxyuridine in Herpes Simplex Keratitis. *Science* **1964**, *145*, 585–586, doi:10.1126/science.145.3632.585.
- Ke, N.; Wang, X.; Xu, X.; Abassi, Y.A. The XCELLigence System for Real-Time and Label-Free Monitoring of Cell Viability. *Methods Mol Biol* **2011**, *740*, 33–43, doi:10.1007/978-1-61779-108-6_6.
- Kennedy, M.A.; Ramsay, E.; Diderrich, V.; Richman, L.; Allen, G.P.; Potgieter, L.N.D. Encephalitis Associated with a Variant of Equine Herpesvirus 1 in a Thomson's Gazelle (*Gazella Thomsoni*). *J. Zoo Wildl. Med.* **1996**, *27*, 533–538.
- Khan, D.; Ansar Ahmed, S. The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **2016**, *6*, doi:10.3389/fimmu.2015.00635.
- Kho, D.; MacDonald, C.; Johnson, R.; Unsworth, C.; O'Carroll, S.; Mez, E.; Angel, C.; Graham, E. Application of XCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors* **2015**, *5*, 199–222, doi:10.3390/bios5020199.
- Khurelbaatar, N.; Krueger, W.S.; Heil, G.L.; Darmaa, B.; Ulziimaa, D.; Tserennorov, D.; Baterdene, A.; Anderson, B.D.; Gray, G.C. Little Evidence of Avian or Equine Influenza Virus Infection among a Cohort of Mongolian Adults with Animal Exposures, 2010–2011. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e85616, doi:10.1371/journal.pone.0085616.
- Kim, S.K.; Bowles, D.E.; O'callaghan, D.J. The Gamma2 Late Glycoprotein K Promoter of Equine Herpesvirus 1 Is Differentially Regulated by the IE and EICP0 Proteins. *Virology* **1999**, *256*, 173–179, doi:10.1006/viro.1999.9608.
- Kimura, T. Decreased Expression of Equine Herpesvirus-1 Early and Late Genes in the Placenta of Naturally Aborted Equine Fetuses. *J. Comp. Pathol.* **2004**, *130*, 41–47, doi:10.1016/S0021-9975(03)00068-9.
- Kinsley, R.; Pronost, S.; De Bock, M.; Temperton, N.; Daly, J.M.; Paillot, R.; Scott, S. Evaluation of a Pseudotyped Virus Neutralisation Test for the Measurement of Equine Influenza Virus-Neutralising Antibody Responses Induced by Vaccination and Infection. *Vaccines (Basel)* **2020**, *8*, doi:10.3390/vaccines8030466.
- Kinyili, J.H.; Thorsen, J. Antigenic Comparisons between Herpesviruses Isolated from Fallow Deer in Alberta and the Viruses of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Equine Rhinopneumonitis and DN-599, a Non-IBR Bovine Herpesvirus. *J. Wildl. Dis.* **1979**, *15*, 339–341, doi:10.7589/0090-3558-15.2.339.
- Kirisawa, R.; Endo, A.; Iwai, H.; Kawakami, Y. Detection and Identification of Equine Herpesvirus-1 and -4 by Polymerase Chain Reaction. *Vet. Microbiol.* **1993**, *36*, 57–67, doi:10.1016/0378-1135(93)90128-T.
- Kirisawa, R.; Ohmori, H.; Iwai, H.; Kawakami, Y. The Genomic Diversity among Equine Herpesvirus-1 Strains Isolated in Japan. *Arch. Virol.* **1993**, *129*, 11–22, doi:10.1007/BF01316881.

- Kodama, A.; Yanai, T.; Yomemaru, K.; Sakai, H.; Masegi, T.; Yamada, S.; Fukushi, H.; Kuraishi, T.; Hattori, S.; Kai, C. Acute Neuropathogenicity with Experimental Infection of Equine Herpesvirus 9 in Common Marmosets (*Callithrix Jacchus*). *J Med Primatol* **2007**, *36*, 335–342, doi:10.1111/j.1600-0684.2007.00220.x.
- Kolb, A.W.; Lewin, A.C.; Moeller Trane, R.; McLellan, G.J.; Brandt, C.R. Phylogenetic and Recombination Analysis of the Herpesvirus Genus Varicellovirus. *BMC Genomics* **2017**, *18*, doi:10.1186/s12864-017-4283-4.
- Komala Sari, T.; Gianopulos, K.A.; Nicola, A.V. Glycoprotein C of Herpes Simplex Virus 1 Shields Glycoprotein B from Antibody Neutralization. *J. Virol.* **2019**, *94*, e01852-19, /jvi/94/5/JVI.01852-19.atom, doi:10.1128/JVI.01852-19.
- Komala Sari, T.; Gianopulos, K.A.; Weed, D.J.; Schneider, S.M.; Pritchard, S.M.; Nicola, A.V. Herpes Simplex Virus Glycoprotein C Regulates Low-PH Entry. *mSphere* **2020**, *5*, e00826-19, /msphere/5/1/mSphere826-19.atom, doi:10.1128/mSphere.00826-19.
- Koppers-Lalic, D.; Reits, E.A.J.; Ressing, M.E.; Lipinska, A.D.; Abele, R.; Koch, J.; Marcondes Rezende, M.; Admiraal, P.; van Leeuwen, D.; Bienkowska-Szewczyk, K.; et al. Varicelloviruses Avoid T Cell Recognition by UL49.5-Mediated Inactivation of the Transporter Associated with Antigen Processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 5144–5149, doi:10.1073/pnas.0501463102.
- Koyano, S.; Mar, E.-C.; Stamey, F.R.; Inoue, N. Glycoproteins M and N of Human Herpesvirus 8 Form a Complex and Inhibit Cell Fusion. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 1485–1491, doi:10.1099/vir.0.18941-0.
- Koyuncu, O.O.; MacGibeny, M.A.; Enquist, L.W. Latent versus Productive Infection: The Alpha Herpesvirus Switch. *Future Virol.* **2018**, *13*, 431–443, doi:10.2217/fvl-2018-0023.
- Kubat, N.J.; Tran, R.K.; McAnany, P.; Bloom, D.C. Specific Histone Tail Modification and Not DNA Methylation Is a Determinant of Herpes Simplex Virus Type 1 Latent Gene Expression. *J. Virol.* **2004**, *78*, 1139–1149, doi:10.1128/jvi.78.3.1139-1149.2004.
- Kukhanova, M.K.; Korovina, A.N.; Kochetkov, S.N. Human Herpes Simplex Virus: Life Cycle and Development of Inhibitors. *Biochem. Mosc.* **2014**, *79*, 1635–1652, doi:10.1134/S0006297914130124.
- Kukreja, A.; Love, D.N.; Whalley, J.M.; Field, H.J. Study of the Protective Immunity of Co-Expressed Glycoprotein H and L of Equine Herpesvirus-1 in a Murine Intranasal Infection Model. *Vet. Microbiol.* **1998**, *60*, 1–11, doi:10.1016/S0378-1135(97)00201-0.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **2016**, *33*, 1870–1874, doi:10.1093/molbev/msw054.
- Kurtz, B.M.; Singletary, L.B.; Kelly, S.D.; Frampton, A.R. Equus Caballus Major Histocompatibility Complex Class I Is an Entry Receptor for Equine Herpesvirus Type 1. *J. Virol.* **2010**, *84*, 9027–9034, doi:10.1128/JVI.00287-10.
- Kydd, J.H.; Hannant, D.; Robinson, R.S.; Bryant, N.; Osterrieder, N. Vaccination of Foals with a Modified Live, Equid Herpesvirus-1 GM Deletion Mutant (RacHΔgM) Confers Partial Protection against Infection. *Vaccine* **2020**, *38*, 388–398, doi:10.1016/j.vaccine.2019.09.106.
- Kydd, J.H.; Smith, K.C.; Hannant, D.; Livesay, G.J.; Mumford, J.A. Distribution of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) in the Respiratory Tract of Ponies: Implications for Vaccination Strategies. *Equine Vet. J.* **1994**, *26*, 466–469, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04051.x.
- Kydd, J.H.; Smith, K.C.; Hannant, D.; Livesay, G.J.; Mumford, J.A. Distribution of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) in Respiratory Tract Associated Lymphoid Tissue: Implications for Cellular Immunity. *Equine Vet. J.* **1994**, *26*, 470–473, doi:10.1111/j.2042-3306.1994.tb04052.x.
- Kydd, J.H.; Townsend, H.G.G.; Hannant, D. The Equine Immune Response to Equine Herpesvirus-1: The Virus and Its Vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *111*, 15–30, doi:10.1016/j.vetimm.2006.01.005.
- Kydd, J.H.; Watrang, E.; Hannant, D. Pre-Infection Frequencies of Equine Herpesvirus-1 Specific, Cytotoxic T Lymphocytes Correlate with Protection against Abortion Following Experimental Infection of Pregnant Mares. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2003**, *96*, 207–217, doi:10.1016/j.vetimm.2003.08.004.

- Lang, A.; de Vries, M.; Feineis, S.; Müller, E.; Osterrieder, N.; Damiani, A.M. Development of a Peptide ELISA for Discrimination between Serological Responses to Equine Herpesvirus Type 1 and 4. *J. Virol. Methods* **2013**, *193*, 667–673, doi:10.1016/j.jviromet.2013.07.044.
- Laquerre, S.; Argnani, R.; Anderson, D.B.; Zucchini, S.; Manservigi, R.; Glorioso, J.C. Heparan Sulfate Proteoglycan Binding by Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoproteins B and C, Which Differ in Their Contributions to Virus Attachment, Penetration, and Cell-to-Cell Spread. *J. Virol.* **1998**, *72*, 6119–6130, doi:10.1128/JVI.72.7.6119-6130.1998.
- Larder, B.A.; Kemp, S.D.; Darby, G. Related Functional Domains in Virus DNA Polymerases. *EMBO J.* **1987**, *6*, 169–175, doi:10.1002/j.1460-2075.1987.tb04735.x.
- Laurent, S.; Esnault, E.; Dambrine, G.; Goudeau, A.; Choudat, D.; Rasschaert, D. Detection of Avian Oncogenic Marek's Disease Herpesvirus DNA in Human Sera. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 233–240, doi:10.1099/0022-1317-82-1-233.
- Laval, K.; Favoreel, H.W.; Nauwynck, H.J. Equine Herpesvirus Type 1 Replication Is Delayed in CD172a+ Monocytic Cells and Controlled by Histone Deacetylases. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 118–130, doi:10.1099/vir.0.067363-0.
- Laval, K.; Favoreel, H.W.; Van Cleemput, J.; Poelaert, K.C.K.; Brown, I.K.; Verhasselt, B.; Nauwynck, H.J. Entry of Equid Herpesvirus 1 into CD172a+ Monocytic Cells. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 733–746, doi:10.1099/jgv.0.000375.
- Laval, K.; Van Cleemput, J.; Poelaert, K.C.; Brown, I.K.; Nauwynck, H.J. Replication of Neurovirulent Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) in CD172a+ Monocytic Cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *50*, 58–62, doi:10.1016/j.cimid.2016.11.006.
- Lawrence, G.L.; Gilkerson, J.; Love, D.N.; Sabine, M.; Whalley, J.M. Rapid, Single-Step Differentiation of Equid Herpesviruses 1 and 4 from Clinical Material Using the Polymerase Chain Reaction and Virus-Specific Primers. *J. Virol. Methods* **1994**, *47*, 59–72, doi:10.1016/0166-0934(94)90066-3.
- LeBlanc, R.A.; Pesnicak, L.; Godleski, M.; Straus, S.E. The Comparative Effects of Famciclovir and Valacyclovir on Herpes Simplex Virus Type 1 Infection, Latency, and Reactivation in Mice. *J. Infect. Dis.* **1999**, *180*, 594–599, doi:10.1086/314962.
- LeBlanc, R.A.; Pesnicak, L.; Godleski, M.; Straus, S.E. Treatment of HSV-1 Infection with Immunoglobulin or Acyclovir: Comparison of Their Effects on Viral Spread, Latency, and Reactivation. *Virology* **1999**, *262*, 230–236, doi:10.1006/viro.1999.9891.
- Lechmann, J.; Schoster, A.; Ernstberger, M.; Fouché, N.; Fraefel, C.; Bachofen, C. A Novel PCR Protocol for Detection and Differentiation of Neuropathogenic and Non-Neuropathogenic Equid Alphaherpesvirus 1. *J. Vet. Diagn. Invest* **2019**, *31*, 696–703, doi:10.1177/1040638719871975.
- Leege, T.; Fuchs, W.; Granzow, H.; Kopp, M.; Klupp, B.G.; Mettenleiter, T.C. Effects of Simultaneous Deletion of PUL11 and Glycoprotein M on Virion Maturation of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* **2009**, *83*, 896–907, doi:10.1128/JVI.01842-08.
- Legrand, L.; Hans, A.; Marcillaud-Pitel, C.; Zientara, S.; Pronost, S. Prévalence des herpès virus équinés en France au cours de l'année 2010. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment.* **2012**, 21–25.
- Leigh, J.W.; Bryant, D. POPART: Full-feature Software for Haplotype Network Construction. *Methods Ecol. Evol.* **2015**, *6*, 1110–1116, doi:10.1111/2041-210X.12410.
- Leiva-Torres, G.A.; Rochette, P.A.; Pearson, A. Differential Importance of Highly Conserved Residues in UL24 for Herpes Simplex Virus 1 Replication in Vivo and Reactivation. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 1109–1116, doi:10.1099/vir.0.017921-0.
- Léon, A.; Fortier, G.; Fortier, C.; Freymuth, F.; Tapprest, J.; Leclercq, R.; Pronost, S. Detection of Equine Herpesviruses in Aborted Foetuses by Consensus PCR. *Vet. Microbiol.* **2008**, *126*, 20–29, doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.019.
- Leutenegger, C.M.; Madigan, J.E.; Mapes, S.; Thao, M.; Estrada, M.; Pusterla, N. Detection of EHV-1 Neuropathogenic Strains Using Real-Time PCR in the Neural Tissue of Horses with Myeloencephalopathy. *Vet. Rec.* **2008**, *162*, 688–689, doi:10.1136/vr.162.21.688.
- Lewis, J.B.; Thompson, Y.G.; Caughman, G.B. Transcriptional Control of the Equine Herpesvirus 1 Immediate Early Gene. *Virology* **1993**, *197*, 788–792, doi:10.1006/viro.1993.1658.

- Lian, K.; Zhang, M.; Zhou, L.; Song, Y.; Wang, G.; Wang, S. First Report of a Pseudorabies-Virus-Infected Wolf (*Canis Lupus*) in China. *Arch. Virol.* **2020**, *165*, 459–462, doi:10.1007/s00705-019-04502-8.
- Liang, X.; Chow, B.; Raggo, C.; Babiuk, L.A. Bovine Herpesvirus 1 UL49.5 Homolog Gene Encodes a Novel Viral Envelope Protein That Forms a Disulfide-Linked Complex with a Second Virion Structural Protein. *J. Virol.* **1996**, *70*, 1448–1454, doi:10.1128/JVI.70.3.1448-1454.1996.
- Little, P.B.; Thorsen, J. Disseminated Necrotizing Myeloencephalitis: A Herpes-Associated Neurological Disease of Horses. *Vet. Pathol.* **1976**, *13*, 161–171, doi:10.1177/030098587601300301.
- Liu, C.; Guo, W.; Lu, G.; Xiang, W.; Wang, X. Complete Genomic Sequence of an Equine Herpesvirus Type 8 Wh Strain Isolated from China. *J. Virol.* **2012**, *86*, 5407–5407, doi:10.1128/JVI.00445-12.
- Longnecker, R.; Chatterjee, S.; Whitley, R.J.; Roizman, B. Identification of a Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein Gene within a Gene Cluster Dispensable for Growth in Cell Culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 4303–4307, doi:10.1073/pnas.84.12.4303.
- Loret, S.; Guay, G.; Lippé, R. Comprehensive Characterization of Extracellular Herpes Simplex Virus Type 1 Virions. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8605–8618, doi:10.1128/JVI.00904-08.
- Luczkowiak, J.; Álvarez, M.; Sebastián-Martín, A.; Menéndez-Arias, L. DNA-Dependent DNA Polymerases as Drug Targets in Herpesviruses and Poxviruses. In *Viral Polymerases*; Elsevier, 2019; pp. 95–134 ISBN 978-0-12-815422-9.
- Lunn, D.P.; Davis-Poynter, N.; Flaminio, M.J.B.F.; Horohov, D.W.; Osterrieder, K.; Pusterla, N.; Townsend, H.G.G. Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.* **2009**, *23*, 450–461, doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x.
- Lv, Y.; Zhou, S.; Gao, S.; Deng, H. Remodeling of Host Membranes during Herpesvirus Assembly and Egress. *Protein Cell* **2019**, *10*, 315–326, doi:10.1007/s13238-018-0577-9.
- Ma, G.; Feineis, S.; Osterrieder, N.; Van de Walle, G.R. Identification and Characterization of Equine Herpesvirus Type 1 PUL56 and Its Role in Virus-Induced Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I. *J. Virol.* **2012**, *86*, 3554–3563, doi:10.1128/JVI.06994-11.
- Ma, G.; Lu, C.; Osterrieder, N. Residue 752 in DNA Polymerase of Equine Herpesvirus Type 1 Is Non-Essential for Virus Growth in Vitro. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 1817–1822, doi:10.1099/vir.0.018036-0.
- Maanen, C.; Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S.; Damen, E.A.; Derksen, A.G.P. Neurological Disease Associated with EHV-1-Infection in a Riding School: Clinical and Virological Characteristics. *Equine Vet. J.* **2010**, *33*, 191–196, doi:10.1111/j.2042-3306.2001.tb00600.x.
- Maanen, K. van; Zaag, E. van der; Buter, R.; Wollenberg, L. van den; van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.S. Asinine Herpesvirus-3 (Equine Herpesvirus-8)-Associated Neurological Disease in a Donkey. *Vet. Rec. Case Rep.* **2017**, *5*, e000498, doi:10.1136/vetreccr-2017-000498.
- Mach, M.; Kropff, B.; Dal Monte, P.; Britt, W. Complex Formation by Human Cytomegalovirus Glycoproteins M (GpUL100) and N (GpUL73). *J. Virol.* **2000**, *74*, 11881–11892, doi:10.1128/jvi.74.24.11881-11892.2000.
- Machtiger, N.A.; Pancake, B.A.; Eberle, R.; Courtney, R.J.; Tevethia, S.S.; Schaffer, P.A. Herpes Simplex Virus Glycoproteins: Isolation of Mutants Resistant to Immune Cytolysis. *J. Virol.* **1980**, *34*, 336–346, doi:10.1128/JVI.34.2.336-346.1980.
- Maeda, F.; Arii, J.; Hirohata, Y.; Maruzuru, Y.; Koyanagi, N.; Kato, A.; Kawaguchi, Y. Herpes Simplex Virus 1 UL34 Protein Regulates the Global Architecture of the Endoplasmic Reticulum in Infected Cells. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00271-17, e00271-17, doi:10.1128/JVI.00271-17.
- Mahmoud, H.Y.A.H.; Andoh, K.; Hattori, S.; Terada, Y.; Noguchi, K.; Shimoda, H.; Maeda, K. Characterization of Glycoproteins in Equine Herpesvirus-1. *J. Vet. Med. Sci.* **2013**, *75*, 1317–1321, doi:10.1292/jvms.13-0168.
- Malik, P.; Pálfi, V.; Bálint, Á. Development of a New Primer–Probe Energy Transfer Method for the Differentiation of Neuropathogenic and Non-Neuropathogenic Strains of Equine Herpesvirus-1. *J. Virol. Methods* **2010**, *169*, 425–427, doi:10.1016/j.jviromet.2010.08.007.

- Marcaccini, A.; López Peña, M.; Quiroga, M.I.; Bermúdez, R.; Nieto, J.M.; Alemañ, N. Pseudorabies Virus Infection in Mink: A Host-Specific Pathogenesis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2008**, *124*, 264–273, doi:10.1016/j.vetimm.2008.03.013.
- Martella, V.; Lanave, G.; Camero, M.; Larocca, V.; Lorusso, E.; Catella, C.; Capozza, P.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. Identification of a Novel α -Herpesvirus Associated with Ulcerative Stomatitis in Donkeys. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 3044–3047, doi:10.3201/eid2612.200201.
- Martin, D.W.; Deb, S. Cloning and Expression of an Equine Herpesvirus 1 Origin-Binding Protein. *J. Virol.* **1994**, *68*, 3674.
- Masot, A.J.; Gil, M.; Risco, D.; Jiménez, O.M.; Núñez, J.I.; Redondo, E. Pseudorabies Virus Infection (Aujeszky's Disease) in an Iberian Lynx (*Lynx Pardinus*) in Spain: A Case Report. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 6, doi:10.1186/s12917-016-0938-7.
- Matsumura, T.; Kondo, T.; Sugita, S.; Damiani, A.M.; O'Callaghan, D.J.; Imagawa, H. An Equine Herpesvirus Type 1 Recombinant with a Deletion in the GE and GI Genes Is Avirulent in Young Horses. *Virology* **1998**, *242*, 68–79, doi:10.1006/viro.1997.8984.
- Matthews, T.; Boehme, R. Antiviral Activity and Mechanism of Action of Ganciclovir. *Clin. Infect. Dis.* **1988**, *10*, S490–S494, doi:10.1093/clinids/10.Supplement_3.S490.
- Matumoto, M.; Ishizaki, R.; Shimizu, T. Serologic Survey of Equine Rhinopneumonitis Virus Infection among Horses in Various Countries. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **1965**, *15*, 609–624, doi:10.1007/BF01245208.
- Maxwell, L.K. Antiherpetic Drugs in Equine Medicine. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **2017**, *33*, 99–125, doi:10.1016/j.cveq.2016.12.002.
- Maxwell, L.K.; Bentz, B.G.; Bourne, D.W.A.; Erkert, R.S. Pharmacokinetics of Valacyclovir in the Adult Horse. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2008**, *31*, 312–320, doi:10.1111/j.1365-2885.2008.00957.x.
- Maxwell, L.K.; Bentz, B.G.; Gilliam, L.L.; Ritchey, J.W.; Pusterla, N.; Eberle, R.; Holbrook, T.C.; McFarlane, D.; Rezabek, G.B.; Meinkoth, J.; et al. Efficacy of the Early Administration of Valacyclovir Hydrochloride for the Treatment of Neuropathogenic Equine Herpesvirus Type-1 Infection in Horses. *Am. J. Vet. Res.* **2017**, *78*, 1126–1139, doi:10.2460/ajvr.78.10.1126.
- Maxwell, L.K.; Gilliam, L.L.; Pusterla, N.; Carmichael, R.J.; Eberle, R.; Ritchey, J.W.; Holbrook, T.C.; Gull, T.; Rezabek, G.B.; McFarlane, D.; et al. Efficacy of Delayed Antiviral Therapy against EHV-1 Challenge.; Denver (CO), 2011.
- Mayr, A.; Pette, J. [1st experiments concerning the vaccination of horses against rhino-pneumonia (viral abortion of mares) with a live vaccine from cell cultures]. *Bull. - Off. Int. Epizoot.* **1968**, *70*, 133–140.
- Mayr, A.; Pette, J.; Petzoldt, K.; Wagener, K. [Studies on the development of a live vaccine against rhinopneumonitis (mare abortion) of horses]. *Zentralblatt Vet. Reihe B J. Vet. Med. Ser. B* **1968**, *15*, 406–418.
- McCann, S.H.E.; Mumford, J.A.; Binns, M.M. Development of PCR Assays to Detect Genetic Variation amongst Equine Herpesvirus-1 Isolates as an Aid to Epidemiological Investigation. *J. Virol. Methods* **1995**, *52*, 183–194, doi:10.1016/0166-0934(94)00162-A.
- McGeoch, D.J. Evolutionary Relationships of Virion Glycoprotein Genes in the S Regions of Alphaherpesvirus Genomes. *J. Gen. Virol.* **1990**, *71*, 2361–2367, doi:10.1099/0022-1317-71-10-2361.
- McGeoch, D.J.; Cook, S. Molecular Phylogeny of the Alphaherpesvirinae Subfamily and a Proposed Evolutionary Timescale. *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 9–22, doi:10.1006/jmbi.1994.1264.
- McGeoch, D.J.; Cook, S.; Dolan, A.; Jamieson, F.E.; Telford, E.A.R. Molecular Phylogeny and Evolutionary Timescale for the Family of Mammalian Herpesviruses. *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 443–458, doi:10.1006/jmbi.1995.0152.
- McNearney, T.A.; Odell, C.; Holers, V.M.; Spear, P.G.; Atkinson, J.P. Herpes Simplex Virus Glycoproteins GC-1 and GC-2 Bind to the Third Component of Complement and Provide Protection against Complement-Mediated Neutralization of Viral Infectivity. *J. Exp. Med.* **1987**, *166*, 1525–1535, doi:10.1084/jem.166.5.1525.
- McStreet, G.H.; Elkunk, R.B.; Latiwonk, Q.I. Investigations of Environmental Conditions during Cluster Indicate Probable Vectors of Unknown Exogenous Agent(s) of Multiple Sclerosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **1992**, *15*, 75–77, doi:10.1016/0147-9571(92)90105-z.

- Melchjorsen, J.; Matikainen, S.; Paludan, S. Activation and Evasion of Innate Antiviral Immunity by Herpes Simplex Virus. *Viruses* **2009**, *1*, 737–759, doi:10.3390/v1030737.
- Mettenleiter, T.C. Herpesvirus Assembly and Egress. *J. Virol.* **2002**, *76*, 1537–1547, doi:10.1128/JVI.76.4.1537-1547.2002.
- Mettenleiter, T.C.; Klupp, B.G.; Granzow, H. Herpesvirus Assembly: An Update. *Virus Res.* **2009**, *143*, 222–234, doi:10.1016/j.virusres.2009.03.018.
- Miller, N.; Hutt-Fletcher, L.M. Epstein-Barr Virus Enters B Cells and Epithelial Cells by Different Routes. *J. Virol.* **1992**, *66*, 3409–3414, doi:10.1128/JVI.66.6.3409-3414.1992.
- Minke, J.M.; Audonnet, J.-C.; Fischer, L. Equine Viral Vaccines: The Past, Present and Future. *Vet. Res.* **2004**, *35*, 425–443, doi:10.1051/vetres:2004019.
- Moeller, R.B.; Crossley, B.; Pipkin, A.; Li, Y.; Balasuriya, U.B.R. Systemic Equid Alphaherpesvirus 9 in a Grant's Zebra. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2018**, *30*, 580–583, doi:10.1177/1040638718767722.
- Montali, R.J.; Allen, G.P.; Bryans, J.T.; Phillips, L.G.; Bush, M. Equine Herpesvirus Type 1 Abortion in an Onager and Suspected Herpesvirus Myelitis in a Zebra. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1985**, *187*, 1248–1249.
- Moodley, K.; Angel, C.E.; Glass, M.; Graham, E.S. Real-Time Profiling of NK Cell Killing of Human Astrocytes Using XCELLigence Technology. *J Neurosci Methods* **2011**, *200*, 173–180, doi:10.1016/j.jneumeth.2011.07.005.
- Moriuchi, H.; Moriuchi, M.; Straus, S.E.; Cohen, J.I. Varicella-Zoster Virus Open Reading Frame 10 Protein, the Herpes Simplex Virus VP16 Homolog, Transactivates Herpesvirus Immediate-Early Gene Promoters. *J. Virol.* **1993**, *67*, 2739–2746, doi:10.1128/JVI.67.5.2739-2746.1993.
- Mukaiya, R.; Kimura, T.; Ochiai, K.; Wada, R.; Umemura, T. Demonstration of Equine Herpesvirus-1 Gene Expression in the Placental Trophoblasts of Naturally Aborted Equine Fetuses. *J. Comp. Pathol.* **2000**, *123*, 119–125, doi:10.1053/jcpa.2000.0401.
- Mumford, J.A.; Edington, N. EHV1 and Equine Paresis. *Vet. Rec.* **1980**, *106*, 277, doi:10.1136/vr.106.12.277-a.
- Mumford, J.A.; Rossdale, P.D.; Jessett, D.M.; Gann, S.J.; Ousey, J.; Cook, R.F. Serological and Virological Investigations of an Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) Abortion Storm on a Stud Farm in 1985. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* *35* 509–518 1987.
- Murray, M.J.; Piero, F.; Jeffrey, S.C.; Davis, M.S.; Furr, M.O.; Dubovi, E.J.; Mayo, J.A. Neonatal Equine Herpesvirus Type 1 Infection on a Thoroughbred Breeding Farm. *J. Vet. Intern. Med.* **1998**, *12*, 36–41, doi:10.1111/j.1939-1676.1998.tb00494.x.
- Muylaert, I.; Elias, P. Knockdown of DNA Ligase IV/XRCC4 by RNA Interference Inhibits Herpes Simplex Virus Type I DNA Replication. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 10865–10872, doi:10.1074/jbc.M611834200.
- Nakhleh, L. Evolutionary Phylogenetic Networks: Models and Issues. In *Problem Solving Handbook in Computational Biology and Bioinformatics*; Heath, L.S., Ramakrishnan, N., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2010; pp. 125–158 ISBN 978-0-387-09759-6.
- Narita, M.; Uchimura, A.; Kimura, K.; Tanimura, N.; Yanai, T.; Masegi, T.; Fukushi, H.; Hirai, K. Brain Lesions and Transmission of Experimental Equine Herpesvirus Type 9 in Pigs. *Vet Pathol* **2000**, *37*, 476–479, doi:10.1354/vp.37-5-476.
- Ndjamen, B.; Farley, A.H.; Lee, T.; Fraser, S.E.; Bjorkman, P.J. The Herpes Virus Fc Receptor GE-GI Mediates Antibody Bipolar Bridging to Clear Viral Antigens from the Cell Surface. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1003961, doi:10.1371/journal.ppat.1003961.
- Negussie, H.; Gizaw, D.; Tessema, T.S.; Nauwynck, H.J. Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy, an Emerging Threat of Working Equids in Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* **2017**, *64*, 389–397, doi:10.1111/tbed.12377.
- Neubauer, A.; Braun, B.; Brandmüller, C.; Kaaden, O.-R.; Osterrieder, N. Analysis of the Contributions of the Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein GB Homolog to Virus Entry and Direct Cell-to-Cell Spread. *Virology* **1997**, *227*, 281–294, doi:10.1006/viro.1996.8336.
- Neubauer, A.; Osterrieder, N. Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Glycoprotein K Is Required for Efficient Cell-to-Cell Spread and Virus Egress. *Virology* **2004**, *329*, 18–32, doi:10.1016/j.viro.2004.07.034.

- Newcomb, W.W.; Brown, J.C.; Booy, F.P.; Steven, A.C. Nucleocapsid Mass and Capsomer Protein Stoichiometry in Equine Herpesvirus 1: Scanning Transmission Electron Microscopic Study. *J. Virol.* **1989**, *63*, 3777–3783, doi:10.1128/JVI.63.9.3777-3783.1989.
- Newcomb, W.W.; Homa, F.L.; Brown, J.C. Involvement of the Portal at an Early Step in Herpes Simplex Virus Capsid Assembly. *J. Virol.* **2005**, *79*, 10540–10546, doi:10.1128/JVI.79.16.10540-10546.2005.
- Newcomb, W.W.; Homa, F.L.; Thomsen, D.R.; Booy, F.P.; Trus, B.L.; Steven, A.C.; Spencer, J.V.; Brown, J.C. Assembly of the Herpes Simplex Virus Capsid: Characterization of Intermediates Observed during Cell-Free Capsid Formation. *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 432–446, doi:10.1006/jmbi.1996.0587.
- Nicola, A.V.; Hou, J.; Major, E.O.; Straus, S.E. Herpes Simplex Virus Type 1 Enters Human Epidermal Keratinocytes, but Not Neurons, via a PH-Dependent Endocytic Pathway. *J. Virol.* **2005**, *79*, 7609–7616, doi:10.1128/JVI.79.12.7609-7616.2005.
- Nicola, A.V.; Straus, S.E. Cellular and Viral Requirements for Rapid Endocytic Entry of Herpes Simplex Virus. *J. Virol.* **2004**, *78*, 7508–7517, doi:10.1128/JVI.78.14.7508-7517.2004.
- Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.C.; Mumford, J.A.; Swann, Z.; Newton, J.R.; Bowden, R.J.; Allen, G.P.; Davis-Poynter, N. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *J. Virol.* **2006**, *80*, 4047–4060, doi:10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006.
- Ojala, P.M.; Sodeik, B.; Ebersold, M.W.; Kutay, U.; Helenius, A. Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells: Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex in Vitro. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 4922–4931, doi:10.1128/mcb.20.13.4922-4931.2000.
- Okada, A.; Izume, S.; Ohya, K.; Fukushi, H. Equine Herpesvirus Type 1 Tegument Protein VP22 Is Not Essential for Pathogenicity in a Hamster Model, but Is Required for Efficient Viral Growth in Cultured Cells. *J. Vet. Med. Sci.* **2015**, *77*, 1293–1297, doi:10.1292/jvms.14-0648.
- Okada, A.; Suganuma, S.; Badr, Y.; Omatsu, T.; Mizutani, T.; Ohya, K.; Fukushi, H. Decreased Expression of the Immediate Early Protein, ICP4, by Deletion of the Tegument Protein VP22 of Equine Herpesvirus Type 1. *J. Vet. Med. Sci.* **2018**, *80*, 311–315, doi:10.1292/jvms.17-0380.
- Oladunni, F.S.; Horohov, D.W.; Chambers, T.M. EHV-1: A Constant Threat to the Horse Industry. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2668, doi:10.3389/fmicb.2019.02668.
- Oliveira, A.L. de; Cargnelutti, J.F.; Mortari, A.P.G.; Flores, E.F.; Weiblen, R. In Vitro Activity of Six Antiviral Drugs against Equid Alphaherpesvirus Type 1 Indicates Ganciclovir as Promising Drug for in Vivo Studies. *Ciênc. Rural* **2018**, *48*, doi:10.1590/0103-8478cr20180085.
- Ollis, D.L.; Brick, P.; Hamlint, R.; Xuong, N.G.; Steitz, T.A. Structure of Large Fragment of Escherichia Coli DNA Polymerase I Complexed with DTMP. **1985**, *5*.
- Ormrod, D.; Goa, K. Valaciclovir: A Review of Its Use in the Management of Herpes Zoster. *Drugs* **2000**, *59*, 1317–1340, doi:10.2165/00003495-200059060-00009.
- Osterrieder, N. Construction and Characterization of an Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein C Negative Mutant. *Virus Res.* **1999**, *59*, 165–177, doi:10.1016/S0168-1702(98)00134-8.
- Osterrieder, N.; Hübert, P.H.; Brandmüller, C.; Kaaden, O.-R. A Touchdown PCR for the Differentiation of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Field Strains from the Modified Live Vaccine Strain RacH. *J. Virol. Methods* **1994**, *50*, 129–136, doi:10.1016/0166-0934(94)90169-4.
- Osterrieder, N.; Neubauer, A.; Brandmüller, C.; Braun, B.; Kaaden, O.R.; Baines, J.D. The Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein Gp21/22a, the Herpes Simplex Virus Type 1 GM Homolog, Is Involved in Virus Penetration and Cell-to-Cell Spread of Virions. *J. Virol.* **1996**, *70*, 4110–4115, doi:10.1128/JVI.70.6.4110-4115.1996.
- Osterrieder, N.; Neubauer, A.; Fakler, B.; Brandmüller, C.; Seyboldt, C.; Kaaden, O.-R.; Baines, J.D. Synthesis and Processing of the Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein M. *Virology* **1997**, *232*, 230–239, doi:10.1006/viro.1997.8561.
- Osterrieder, N.; Seyboldt, C.; Elbers, K. Deletion of Gene 52 Encoding Glycoprotein M of Equine Herpesvirus Type 1 Strain RacH Results in Increased Immunogenicity. *Vet. Microbiol.* **2001**, *81*, 219–226, doi:10.1016/S0378-1135(01)00357-1.

- Osterrieder, N.; Van de Walle, G.R. Pathogenic Potential of Equine Alphaherpesviruses: The Importance of the Mononuclear Cell Compartment in Disease Outcome. *Vet. Microbiol.* **2010**, *143*, 21–28, doi:10.1016/j.vetmic.2010.02.010.
- Owen, D.; Crump, C.; Graham, S. Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses* **2015**, *7*, 5084–5114, doi:10.3390/v7092861.
- Packiarajah, P.; Walker, C.; Gilkerson, J.; Millar Whalley, J.; N. Love, D. Immune Responses and Protective Efficacy of Recombinant Baculovirus-Expressed Glycoproteins of Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) GB, GC and GD Alone or in Combinations in BALB/c Mice. *Vet. Microbiol.* **1998**, *61*, 261–278, doi:10.1016/S0378-1135(98)00189-8.
- Pagamjav, O.; Sakata, T.; Matsumura, T.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H. Natural Recombinant between Equine Herpesviruses 1 and 4 in the ICP4 Gene. *Microbiol. Immunol.* **2005**, *49*, 167–179, doi:10.1111/j.1348-0421.2005.tb03716.x.
- Paillot, R.; Case, R.; Ross, J.; Newton, R.; Nugent, J. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. *TOVSJ* **2008**, *2*, 68–91, doi:10.2174/1874318808002010068.
- Paillot, R.; El-Hage, C. The Use of a Recombinant Canarypox-Based Equine Influenza Vaccine during the 2007 Australian Outbreak: A Systematic Review and Summary. *Pathogens* **2016**, *5*, 42, doi:10.3390/pathogens5020042.
- Paillot, R.; Ellis, S.; Daly, J.; Audonnet, J.; Minke, J.; Davispoynter, N.; Hannant, D.; Kydd, J. Characterisation of CTL and IFN- γ Synthesis in Ponies Following Vaccination with a NYVAC-Based Construct Coding for EHV-1 Immediate Early Gene, Followed by Challenge Infection. *Vaccine* **2006**, *24*, 1490–1500, doi:10.1016/j.vaccine.2005.10.019.
- Paillot, R.; Pitel, P.-H.; Pronost, S.; Legrand, L.; Fougerolle, S.; Jourdan, M.; Marcillaud-Pitel, C. Florida Clade 1 Equine Influenza Virus in France. *Vet. Rec.* **2019**, *184*, 101, doi:10.1136/vr.11203.
- Paillot, R.; Sutton, G.; Thieulent, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Pronost, S. New EHV-1 Variant Identified. *Vet Rec* **2020**, *186*, 573.1-573, doi:10.1136/vr.m1441.
- Paim, W.P.; Weber, M.N.; Cibulski, S.P.; da Silva, M.S.; Puhl, D.E.; Budaszewski, R.F.; Varela, A.P.M.; Mayer, F.Q.; Canal, C.W. Characterization of the Viral Genomes Present in Commercial Batches of Horse Serum Obtained by High-Throughput Sequencing. *Biologicals* **2019**, *61*, 1–7, doi:10.1016/j.biologicals.2019.08.005.
- Pan, T.; Khare, S.; Ackah, F.; Huang, B.; Zhang, W.; Gabos, S.; Jin, C.; Stampfl, M. In Vitro Cytotoxicity Assessment Based on KC(50) with Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Assay. *Comput Biol Chem* **2013**, *47*, 113–120, doi:10.1016/j.compbiolchem.2013.08.008.
- Pascoe, R.R.; Spradbrow, P.B.; Bagust, T.J. EQUINE COITAL EXANTHEMA. *Aust. Vet. J.* **1968**, *44*, 485–485, doi:10.1111/j.1751-0813.1968.tb08985.x.
- Patel, J.R.; Bateman, H.; Williams, J.; Didlick, S. Derivation and Characterisation of a Live Equid Herpes Virus-1 (EHV-1) Vaccine to Protect against Abortion and Respiratory Disease Due to EHV-1. *Vet. Microbiol.* **2003**, *91*, 23–39, doi:10.1016/S0378-1135(02)00259-6.
- Patel, J.R.; Edington, N.; Mumford, J.A. Variation in Cellular Tropism between Isolates of Equine Herpesvirus-1 in Foals. *Arch. Virol.* **1982**, *74*, 41–51, doi:10.1007/BF01320781.
- Patel, J.R.; Földi, J.; Bateman, H.; Williams, J.; Didlick, S.; Stark, R. Equid Herpesvirus (EHV-1) Live Vaccine Strain C147: Efficacy against Respiratory Diseases Following EHV Types 1 and 4 Challenges. *Vet. Microbiol.* **2003**, *92*, 1–17, doi:10.1016/s0378-1135(02)00358-9.
- Patel, J.R.; Heldens, J. Equine Herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – Epidemiology, Disease and Immunoprophylaxis: A Brief Review. *Vet. J.* **2005**, *170*, 14–23, doi:10.1016/j.tvjl.2004.04.018.
- Pearson, A.; Coen, D.M. Identification, Localization, and Regulation of Expression of the UL24 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *JVI* **2002**, *76*, 10821–10828, doi:10.1128/JVI.76.21.10821-10828.2002.
- Penkert, R.R.; Kalejta, R.F. Tegument Protein Control of Latent Herpesvirus Establishment and Animation. *Herpesviridae* **2011**, *2*, 3, doi:10.1186/2042-4280-2-3.
- Perkins, G.; Babasyan, S.; Stout, A.E.; Freer, H.; Rollins, A.; Wimer, C.L.; Wagner, B. Intranasal IgG4/7 Antibody Responses Protect Horses against Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) Infection Including Nasal Virus Shedding and Cell-Associated Viremia. *Virology* **2019**, *531*, 219–232, doi:10.1016/j.virol.2019.03.014.

- Perkins, G.A.; Goodman, L.B.; Tsujimura, K.; Van de Walle, G.R.; Kim, S.G.; Dubovi, E.J.; Osterrieder, N. Investigation of the Prevalence of Neurologic Equine Herpes Virus Type 1 (EHV-1) in a 23-Year Retrospective Analysis (1984–2007). *Vet Mic* **2009**, *139*, 375–378, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.033.
- Perkins, G.A.; Wagner, B. The Development of Equine Immunity: Current Knowledge on Immunology in the Young Horse. *Equine Vet J* **2015**, *47*, 267–274, doi:10.1111/evj.12387.
- Pescovitz, M.D.; Rabkin, J.; Merion, R.M.; Paya, C.V.; Pirsch, J.; Freeman, R.B.; O’Grady, J.; Robinson, C.; To, Z.; Wren, K.; et al. Valganciclovir Results in Improved Oral Absorption of Ganciclovir in Liver Transplant Recipients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2811–2815, doi:10.1128/AAC.44.10.2811-2815.2000.
- Petit, A. Rhinopneumonie Équine: Point Sur Les Récentes Émergences, Faculté de Médecine de CRÉTEIL, 2014.
- Pilling, A.; Davison, A.J.; Telford, E.A.R.; Meredith, D.M. The Equine Herpesvirus Type 1 Glycoprotein Homologous to Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein M Is a Major Constituent of the Virus Particle. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75*, 439–442, doi:10.1099/0022-1317-75-2-439.
- Poelaert, K.C. Immune-Metabolic Factors Mediate the Pathogenesis of Equine Herpesvirus 1: An Evolutionary Pas-de-Deux., 2019.
- Poelaert, K.C.K.; Van Cleemput, J.; Laval, K.; Favoreel, H.W.; Couck, L.; Van den Broeck, W.; Azab, W.; Nauwynck, H.J. Equine Herpesvirus 1 Bridles T Lymphocytes To Reach Its Target Organs. *J. Virol.* **2019**, *93*, e02098-18, /jvi/93/7/JVI.02098-18.atom, doi:10.1128/JVI.02098-18.
- Poelaert, K.C.K.; Van Cleemput, J.; Laval, K.; Favoreel, H.W.; Soboll Hussey, G.; Maes, R.K.; Nauwynck, H.J. Abortigenic but Not Neurotropic Equine Herpes Virus 1 Modulates the Interferon Antiviral Defense. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 312, doi:10.3389/fcimb.2018.00312.
- Poelaert, K.C.K.; Van Cleemput, J.; Laval, K.; Xie, J.; Favoreel, H.W.; Nauwynck, H.J. Equine Herpesvirus 1 Infection Orchestrates the Expression of Chemokines in Equine Respiratory Epithelial Cells. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 1567–1579, doi:10.1099/jgv.0.001317.
- Pomeranz, L.E.; Reynolds, A.E.; Hengartner, C.J. Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2005**, *69*, 462–500, doi:10.1128/MMBR.69.3.462-500.2005.
- Poole, C.L.; James, S.H. Antiviral Therapies for Herpesviruses: Current Agents and New Directions. *Clin. Ther.* **2018**, *40*, 1282–1298, doi:10.1016/j.clinthera.2018.07.006.
- Pronost, S.; Cook, R.F.; Fortier, G.; Timoney, P.J.; Balasuriya, U.B.R. Relationship between Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy and Viral Genotype: EHV-1, Genotype and EHM. *Equine Vet. J.* **2010**, *42*, 672–674, doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00307.x.
- Pronost, S.; Legrand, L.; Pitel, P.-H.; Wegge, B.; Lissens, J.; Freymuth, F.; Richard, E.; Fortier, G. Outbreak of Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy in France: A Clinical and Molecular Investigation: Outbreak of EHV-1 Myeloencephalopathy. *Transbound. Emerg. Dis.* **2012**, *59*, 256–263, doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01263.x.
- Pronost, S.; Léon, A.; Legrand, L.; Fortier, C.; Miszczak, F.; Freymuth, F.; Fortier, G. Neuropathogenic and Non-Neuropathogenic Variants of Equine Herpesvirus 1 in France. *Vet. Microbiol.* **2010**, *145*, 329–333, doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.031.
- Pronost, S.; Pitel, P.H.; Miszczak, F.; Legrand, L.; Marcillaud-Pitel, C.; Hamon, M.; Tapprest, J.; Balasuriya, U.B.R.; Freymuth, F.; Fortier, G. Description of the First Recorded Major Occurrence of Equine Viral Arteritis in France. *Equine Vet. J.* **2010**, *42*, 713–720, doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00109.x.
- Prusoff, W.H. Synthesis and Biological Activities of Iododeoxyuridine, an Analog of Thymidine. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *32*, 295–296, doi:10.1016/0006-3002(59)90597-9.
- Pusterla, N.; David Wilson, W.; Madigan, J.E.; Ferraro, G.L. Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy: A Review of Recent Developments. *Vet. J.* **2009**, *180*, 279–289, doi:10.1016/j.tvjl.2008.08.004.
- Pusterla, N.; Hatch, K.; Crossley, B.; Wademan, C.; Barnum, S.; Flynn, K. Equine Herpesvirus-1 Genotype Did Not Significantly Affect Clinical Signs and Disease Outcome in 65 Horses

- Diagnosed with Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy. *Vet. J.* **2020**, *255*, 105407, doi:10.1016/j.tvjl.2019.105407.
- Pusterla, N.; Hussey, G.S. Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **2014**, *30*, 489–506, doi:10.1016/j.cveq.2014.08.006.
- Pusterla, N.; Madigan, J.E.; Leutenegger, C.M. Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Novel Molecular Diagnostic Tool for Equine Infectious Diseases. *10*.
- Pusterla, N.; Mapes, S.; Wademan, C.; White, A.; Estell, K.; Swain, E. Investigation of the Role of Mules as Silent Shedders of EHV-1 during an Outbreak of EHV-1 Myeloencephalopathy in California. *Vet. Rec.* **2012**, *170*, 465.1-465, doi:10.1136/vr.100598.
- Pusterla, N.; Mapes, S.; Wilson, W.D. Prevalence of Equine Herpesvirus Type 1 in Trigeminal Ganglia and Submandibular Lymph Nodes of Equids Examined Postmortem. *Vet. Rec.* **2010**, *167*, 376–379, doi:10.1136/vr.c3748.
- Rebello, A.R.; Carman, S.; Shapiro, J.; van Dreumel, T.; Hazlett, M.; Nagy, É. Equid Herpesvirus 9 (EHV-9) Isolates from Zebras in Ontario, Canada, 1989 to 2007. *Can J Vet Res* **2015**, *79*, 155–159.
- Rebhun, W.C.; Jenkins, D.H.; Riis, R.C.; Dill, S.G.; Dubovi, E.J.; Torres, A. An Epizootic of Blindness and Encephalitis Associated with a Herpesvirus Indistinguishable from Equine Herpesvirus I in a Herd of Alpacas and Llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1988**, *192*, 953–956.
- Réseau d'Epidémio-Surveillance En Pathologie Equine (RESPE) Available online: <https://respe.net/lassociation/>.
- Reynolds, A.E.; Liang, L.; Baines, J.D. Conformational Changes in the Nuclear Lamina Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 Require Genes UL31 and UL34. *J. Virol.* **2004**, *78*, 5564–5575, doi:10.1128/JVI.78.11.5564-5575.2004.
- Reynolds, A.E.; Ryckman, B.J.; Baines, J.D.; Zhou, Y.; Liang, L.; Roller, R.J. UL31 and UL34 Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1 Form a Complex That Accumulates at the Nuclear Rim and Is Required for Envelopment of Nucleocapsids. *J. Virol.* **2001**, *75*, 8803–8817, doi:10.1128/JVI.75.18.8803-8817.2001.
- Riaz, A.; Murtaz-ul-Hasan, K.; Akhtar, N. Recent Understanding of the Classification and Life Cycle of Herpesviruses: A Review. **2017**, *14*.
- Roizman, B.; Baines, J. The Diversity and Unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **1991**, *14*, 63–79, doi:10.1016/0147-9571(91)90122-T.
- Roizman, B.; Zhou, G. The 3 Facets of Regulation of Herpes Simplex Virus Gene Expression: A Critical Inquiry. *Virology* **2015**, *479–480*, 562–567, doi:10.1016/j.virol.2015.02.036.
- Rollinson, E.A. Comparative Efficacy of Three 2'-Fluoropyrimidine Nucleosides and 9-(1,3-Dihydroxy-2-Propoxymethyl)Guanine (BW B759U) against Pseudorabies and Equine Rhinopneumonitis Virus Infection in Vitro and in Laboratory Animals. *Antiviral Res.* **1987**, *7*, 25–33, doi:10.1016/0166-3542(87)90036-2.
- Rollinson, E.A.; White, G. Relative Activities of Acyclovir and BW759 against Aujeszky's Disease and Equine Rhinopneumonitis Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *24*, 221–226, doi:10.1128/AAC.24.2.221.
- Roop, C.; Hutchinson, L.; Johnson, D.C. A Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Unable to Express Glycoprotein L Cannot Enter Cells, and Its Particles Lack Glycoprotein H. *J. Virol.* **1993**, *67*, 2285–2297, doi:10.1128/JVI.67.4.2285-2297.1993.
- Rosas, C.T.; Goodman, L.B.; von Einem, J.; Osterrieder, N. Equine Herpesvirus Type 1 Modified Live Virus Vaccines: Quo Vaditis? *Expert Rev Vaccines* **2006**, *5*, 119–131, doi:10.1586/14760584.5.1.119.
- Rudolph, J.; Osterrieder, N. Equine Herpesvirus Type 1 Devoid of GM and Gp2 Is Severely Impaired in Virus Egress but Not Direct Cell-to-Cell Spread. *Virology* **2002**, *293*, 356–367, doi:10.1006/viro.2001.1277.
- Rudolph, J.; Seyboldt, C.; Granzow, H.; Osterrieder, N. The Gene 10 (UL49.5) Product of Equine Herpesvirus 1 Is Necessary and Sufficient for Functional Processing of Glycoprotein M. *J. Virol.* **2002**, *76*, 2952–2963, doi:10.1128/JVI.76.6.2952-2963.2002.
- Ruiz-Saenz, J.; Góez, Y.; Urcuqui-Inchima, S.; Gongora, A.; Lopez-Herrera, A. Evidencia Serológica de La Infección Por Herpesvirus Equino Tipos 1 y 4 En Dos Regiones de Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu. ISSN 0120-0690 Vol 21 N° 2 2008* **2009**, *21*.

- Ruyechan, W.T.; Dauenhauer, S.A.; O'Callaghan, D.J. Electron Microscopic Study of Equine Herpesvirus Type 1 DNA. *J. Virol.* **1982**, *42*, 297–300, doi:10.1128/JVI.42.1.297-300.1982.
- Sabine, M.; Robertson, G.R.; Whalley, J.M. Differentiation of Sub-Types of Equine Herpesvirus I by Restriction Endonuclease Analysis. *Aust. Vet. J.* **1981**, *57*, 148–149, doi:10.1111/j.1751-0813.1981.tb00495.x.
- Sacks, S.L.; Wilson, B. Famciclovir/Penciclovir. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *458*, 135–147, doi:10.1007/978-1-4615-4743-3_13.
- Sakaguchi, K.; Kim, K.; Langohr, I.; Wise, A.G.; Maes, R.K.; Pirie, G.; Yanai, T.; Haridy, M.; Gaschen, L.; Del Piero, F. Zebra-Borne Neurotropic Equid Herpesvirus 1 Meningoencephalitis in a Thomson's Gazelle (*Eudorcas Thomsonii*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **2017**, *29*, 548–556, doi:10.1177/1040638717707000.
- Saklou, N.T.; Burgess, B.; Morley, P.W.; Goehring, L.S. Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) in the Environment: How Long Will It Stay Infective? *Equine Vet. J.* **2013**, *45*, 16–16, doi:10.1111/evj.12145_40.
- Saklou, N.T.; Burgess, B.A.; Ashton, L.V.; Morley, P.S.; Goehring, L.S. Environmental Persistence of Equid Herpesvirus Type-1. *Equine Vet. J.* **2020**, evj.13313, doi:10.1111/evj.13313.
- Saleh, A.G.; El-Habashi, N.; Abd-Ellatieff, H.A.; Abas, O.M.; Anwar, S.; Fukushi, H.; Yanai, T. Comparative Study of the Pathogenesis of Rhinopneumonitis Induced by Intranasal Inoculation of Hamsters with Equine Herpesvirus-9, Equine Herpesvirus-1 Strain Ab4p and Zebra-Borne Equine Herpesvirus-1. *J Comp Pathol* **2020**, *180*, 35–45, doi:10.1016/j.jcpa.2020.08.002.
- Sanabria-Solano, C.; Gonzalez, C.E.; Richerieux, N.; Bertrand, L.; Dridi, S.; Griffiths, A.; Langelier, Y.; Pearson, A. Regulation of Viral Gene Expression by the Herpes Simplex Virus 1 UL24 Protein (HSV-1 UL24 Inhibits Accumulation of Viral Transcripts). *Virology* **2016**, *495*, 148–160, doi:10.1016/j.virol.2016.05.006.
- Sasaki, M.; Hasebe, R.; Makino, Y.; Suzuki, T.; Fukushi, H.; Okamoto, M.; Matsuda, K.; Taniyama, H.; Sawa, H.; Kimura, T. Equine Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Act as Entry Receptors That Bind to Equine Herpesvirus-1 Glycoprotein D. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **2011**, *16*, 343–357, doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01491.x.
- Satoh, T.; Arii, J.; Suenaga, T.; Wang, J.; Kogure, A.; Uehori, J.; Arase, N.; Shiratori, I.; Tanaka, S.; Kawaguchi, Y.; et al. PILRalpha Is a Herpes Simplex Virus-1 Entry Coreceptor That Associates with Glycoprotein B. *Cell* **2008**, *132*, 935–944, doi:10.1016/j.cell.2008.01.043.
- Sawtell, N.M.; Thompson, R.L.; Stanberry, L.R.; Bernstein, D.I. Early Intervention with High-Dose Acyclovir Treatment during Primary Herpes Simplex Virus Infection Reduces Latency and Subsequent Reactivation in the Nervous System In Vivo. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 964–971, doi:10.1086/323551.
- Schaeffer, H.J.; Beauchamp, L.; de Miranda, P.; Elion, G.B.; Bauer, D.J.; Collins, P. 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) Guanine Activity against Viruses of the Herpes Group. *Nature* **1978**, *272*, 583–585, doi:10.1038/272583a0.
- Schmidt, S.; Bohn-Wippert, K.; Schlattmann, P.; Zell, R.; Sauerbrei, A. Sequence Analysis of Herpes Simplex Virus 1 Thymidine Kinase and DNA Polymerase Genes from over 300 Clinical Isolates from 1973 to 2014 Finds Novel Mutations That May Be Relevant for Development of Antiviral Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 4938–4945, doi:10.1128/AAC.00977-15.
- Schnabel, C.L.; Babasyan, S.; Rollins, A.; Freer, H.; Wimer, C.L.; Perkins, G.A.; Raza, F.; Osterrieder, N.; Wagner, B. An Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Ab4 Open Reading Frame 2 Deletion Mutant Provides Immunity and Protection from EHV-1 Infection and Disease. *J. Virol.* **2019**, *93*, doi:10.1128/JVI.01011-19.
- Schnabel, C.L.; Wimer, C.L.; Perkins, G.; Babasyan, S.; Freer, H.; Watts, C.; Rollins, A.; Osterrieder, N.; Wagner, B. Deletion of the ORF2 Gene of the Neuropathogenic Equine Herpesvirus Type 1 Strain Ab4 Reduces Virulence While Maintaining Strong Immunogenicity. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*, 245, doi:10.1186/s12917-018-1563-4.
- Schrenzel, M.D.; Tucker, T.A.; Donovan, T.A.; Busch, M.D.M.; Wise, A.G.; Maes, R.K.; Kiupel, M. New Hosts for Equine Herpesvirus 9. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1616–1619, doi:10.3201/eid1410.080703.

- Schulman, M.L.; Kass, P.H.; Becker, A.; Merwe, B.V. der A Predictive Model for Reproductive Performance Following Abortion in Thoroughbred Mares. *Vet. Rec.* **2013**, *172*, 44–44, doi:10.1136/vr.100670.
- Schynts, F.; Meurens, F.; Detry, B.; Vanderplasschen, A.; Thiry, E. Rise and Survival of Bovine Herpesvirus 1 Recombinants after Primary Infection and Reactivation from Latency. *J. Virol.* **2003**, *77*, 12535–12542, doi:10.1128/jvi.77.23.12535-12542.2003.
- Scott, S.; Molesti, E.; Temperton, N.; Ferrara, F.; Böttcher-Friebertshäuser, E.; Daly, J. The Use of Equine Influenza Pseudotypes for Serological Screening. *J Mol Genet Med* **2012**, *6*, 304–308.
- Selvaraj, P. Molecular Characterization and Pathogenesis of Equine and Elephant Herpesviruses, Freie Universität Berlin, 2019, p. XVIII, 165 Seiten.
- Sharma, P.C.; Cullinane, A.A.; Onions, D.E.; Nicolson, L. Diagnosis of Equid Herpesviruses –1 and –4 by Polymerase Chain Reaction. *Equine Vet. J.* **1992**, *24*, 20–25, doi:10.1111/j.2042-3306.1992.tb02772.x.
- Sheoran, A.S.; Timoney, J.F.; Holmes, M.A.; Karzenski, S.S.; Crisman, M.V. Immunoglobulin Isotypes in Sera and Nasal Mucosal Secretions and Their Neonatal Transfer and Distribution in Horses. *Am. J. Vet. Res.* **2000**, *61*, 1099–1105, doi:10.2460/ajvr.2000.61.1099.
- Shiraki, K. Antiviral Drugs Against Alphaherpesvirus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1045*, 103–122, doi:10.1007/978-981-10-7230-7_6.
- Sijmons, S.; Vissani, A.; Tordoya, M.S.; Muylkens, B.; Thiry, E.; Maes, P.; Matthijnsens, J.; Barrandeguy, M.; Van Ranst, M. Complete Genome Sequence of Equid Herpesvirus 3. *Genome Announc.* **2014**, *2*, e00797-14, 2/5/e00797-14, doi:10.1128/genomeA.00797-14.
- Simpson-Holley, M.; Colgrove, R.C.; Nalepa, G.; Harper, J.W.; Knipe, D.M. Identification and Functional Evaluation of Cellular and Viral Factors Involved in the Alteration of Nuclear Architecture during Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J. Virol.* **2005**, *79*, 12840–12851, doi:10.1128/JVI.79.20.12840-12851.2005.
- Singh, B.K.; Ahuja, S.; Gulati, B.R. Development of a Neutralizing Monoclonal Antibody-Based Blocking ELISA for Detection of Equine Herpesvirus 1 Antibodies. *Vet. Res. Commun.* **2004**, *28*, 437–446, doi:10.1023/B:VERC.0000034996.18533.90.
- Slater, J. Equine Herpesvirus. *Slater JD Equine Herpesvirus Equine Infect. Dis. Selon DC Long MT Saunders St Louis 2007134-152* 2007.
- Slater, J. Equine Herpesviruses. In *Equine Infectious Diseases*; Elsevier, 2014; pp. 151-168.e8 ISBN 978-1-4557-0891-8.
- Slater, J.; Gibson, J.; Barnett, K.; Field, H. Chorioretinopathy Associated with Neuropathology Following Infection with Equine Herpesvirus-1. *Vet. Rec.* **1992**, *131*, 237–239, doi:10.1136/vr.131.11.237-a.
- Slater, J.D.; Borchers, K.; Thackray, A.M.; Field, H.J. The Trigeminal Ganglion Is a Location for Equine Herpesvirus 1 Latency and Reactivation in the Horse. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75*, 2007–2016, doi:10.1099/0022-1317-75-8-2007.
- Smith, D.J.; Iqbal, J.; Purewal, A.; Hamblin, A.S.; Edington, N. In Vitro Reactivation of Latent Equid Herpesvirus-1 from CD5+/CD8+ Leukocytes Indirectly by IL-2 or Chorionic Gonadotrophin. *J. Gen. Virol.* **1998**, *79* (Pt 12), 2997–3004, doi:10.1099/0022-1317-79-12-2997.
- Smith, K.; Whitwell, K.; Mumford, J.; Hannant, D.; Blunden, A.; Tearle, J. Virulence of the V592 Isolate of Equid Herpesvirus-1 in Ponies. *J. Comp. Pathol.* **2000**, *122*, 288–297, doi:10.1053/jcpa.1999.0373.
- Smith, K.C.; Borchers, K. A Study of the Pathogenesis of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) Abortion by DNA In-Situ Hybridization. *J. Comp. Pathol.* **2001**, *125*, 304–310, doi:10.1053/jcpa.2001.0513.
- Smith, K.C.; Mumford, J.A.; Lakhani, K. A Comparison of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) Vascular Lesions in the Early versus Late Pregnant Equine Uterus. *J. Comp. Pathol.* **1996**, *114*, 231–247, doi:10.1016/s0021-9975(96)80045-4.
- Smith, K.C.; Whitwell, K.E.; Binns, M.M.; Dolby, C.A.; Hannant, D.; Mumford, J.A. Abortion of Virologically Negative Foetuses Following Experimental Challenge of Pregnant Pony Mares with Equid Herpesvirus 1. *Equine Vet. J.* **1992**, *24*, 256–259, doi:10.1111/j.2042-3306.1992.tb02830.x.

- Smith, K.C.; Whitwell, K.E.; Blunden, A.S.; Bestbier, M.E.; Scase, T.J.; Geraghty, R.J.; Nugent, J.; Davis-Poynter, N.J.; Cardwell, J.M. Equine Herpesvirus-1 Abortion: Atypical Cases with Lesions Largely or Wholly Restricted to the Placenta. *Equine Vet. J.* **2004**, *36*, 79–82, doi:10.2746/0425164044864732.
- Smith, K.C.; Whitwell, K.E.; Mumford, J.A.; Gower, S.M.; Hannant, D.; Tearle, J.P. An Immunohistological Study of the Uterus of Mares Following Experimental Infection by Equid Herpesvirus 1. *Equine Vet. J.* **1993**, *25*, 36–40, doi:10.1111/j.2042-3306.1993.tb02898.x.
- Smith, K.L.; Allen, G.P.; Branscum, A.J.; Frank Cook, R.; Vickers, M.L.; Timoney, P.J.; Balasuriya, U.B.R. The Increased Prevalence of Neuropathogenic Strains of EHV-1 in Equine Abortions. *Vet. Microbiol.* **2010**, *141*, 5–11, doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.030.
- Smith, K.L.; Li, Y.; Breheny, P.; Cook, R.F.; Henney, P.J.; Sells, S.; Pronost, S.; Lu, Z.; Crossley, B.M.; Timoney, P.J.; et al. New Real-Time PCR Assay Using Allelic Discrimination for Detection and Differentiation of Equine Herpesvirus-1 Strains with A₂₂₅₄ and G₂₂₅₄ Polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1981–1988, doi:10.1128/JCM.00135-12.
- Smith, K.O.; Galloway, K.S.; Hodges, S.L.; Ogilvie, K.K.; Radatus, B.K.; Kalter, S.S.; Heberling, R.L. Sensitivity of Equine Herpesviruses 1 and 3 in Vitro to a New Nucleoside Analogue, 9-[[2-Hydroxy-1-(Hydroxymethyl) Ethoxy] Methyl] Guanine. *Am. J. Vet. Res.* **1983**, *44*, 1032–1035.
- Smith, K.O.; Galloway, K.S.; Kennell, W.L.; Ogilvie, K.K.; Radatus, B.K. A New Nucleoside Analog, 9-[[2-Hydroxy-1-(Hydroxymethyl)Ethoxyl]Methyl]Guanine, Highly Active in Vitro against Herpes Simplex Virus Types 1 and 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *22*, 55–61, doi:10.1128/aac.22.1.55.
- Smith, P.M.; Kahan, S.M.; Rorex, C.B.; von Einem, J.; Osterrieder, N.; O’Callaghan, D.J. Expression of the Full-Length Form of Gp2 of Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) Completely Restores Respiratory Virulence to the Attenuated EHV-1 Strain KyA in CBA Mice. *J. Virol.* **2005**, *79*, 5105–5115, doi:10.1128/JVI.79.8.5105-5115.2005.
- Smith, R.H.; Caughman, G.B.; O’Callaghan, D.J. Characterization of the Regulatory Functions of the Equine Herpesvirus 1 Immediate-Early Gene Product. *J. Virol.* **1992**, *66*, 936–945, doi:10.1128/JVI.66.2.936-945.1992.
- Smith, R.H.; Zhao, Y.; O’Callaghan, D.J. The Equine Herpesvirus Type 1 Immediate-Early Gene Product Contains an Acidic Transcriptional Activation Domain. *Virology* **1994**, *202*, 760–770, doi:10.1006/viro.1994.1398.
- Snijder, J.; Radtke, K.; Anderson, F.; Scholtes, L.; Corradini, E.; Baines, J.; Heck, A.J.R.; Wuite, G.J.L.; Sodeik, B.; Roos, W.H. Vertex-Specific Proteins PUL17 and PUL25 Mechanically Reinforce Herpes Simplex Virus Capsids. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00123-17, e00123-17, doi:10.1128/JVI.00123-17.
- Soboll Hussey, G.; Ashton, L.V.; Quintana, A.M.; Lunn, D.P.; Goehring, L.S.; Annis, K.; Landolt, G. Innate Immune Responses of Airway Epithelial Cells to Infection with Equine Herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* **2014**, *170*, 28–38, doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.018.
- Soboll Hussey, G.; Ashton, L.V.; Quintana, A.M.; Van de Walle, G.R.; Osterrieder, N.; Lunn, D.P. Equine Herpesvirus Type 1 PUL56 Modulates Innate Responses of Airway Epithelial Cells. *Virology* **2014**, *464–465*, 76–86, doi:10.1016/j.virol.2014.05.023.
- Soboll Hussey, G.; Hussey, S.B.; Wagner, B.; Horohov, D.W.; Van de Walle, G.R.; Osterrieder, N.; Goehring, L.S.; Rao, S.; Lunn, D.P. Evaluation of Immune Responses Following Infection of Ponies with an EHV-1 ORF1/2 Deletion Mutant. *Vet Res* **2011**, *42*, 23, doi:10.1186/1297-9716-42-23.
- Soboll, G.; Whalley, J.M.; Koen, M.T.; Allen, G.P.; Fraser, D.G.; Macklin, M.D.; Swain, W.F.; Lunn, D.P. Identification of Equine Herpesvirus-1 Antigens Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2625–2634, doi:10.1099/vir.0.19268-0.
- Soehner, R.L.; Gentry, G.A.; Randall, C.C. Some Physicochemical Characteristics of Equine Abortion Virus Nucleic Acid. *Virology* **1965**, *26*, 394–405, doi:10.1016/0042-6822(65)90003-6.
- Spear, P.G. Herpes Simplex Virus: Receptors and Ligands for Cell Entry. *Cell. Microbiol.* **2004**, *6*, 401–410, doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00389.x.
- Spießchaert, B.; Goldenbogen, B.; Taferner, S.; Schade, M.; Mahmoud, M.; Klipp, E.; Osterrieder, N.; Azab, W. Role of GB and PUS3 in Equine Herpesvirus 1 Transfer between Peripheral

- Blood Mononuclear Cells and Endothelial Cells: A Dynamic *In Vitro* Model. *J. Virol.* **2015**, *89*, 11899–11908, doi:10.1128/JVI.01809-15.
- Staczek, J.; Atherton, S.S.; O’Callaghan, D.J. Genetic Relatedness of the Genomes of Equine Herpesvirus Types 1, 2, and 3. *J. Virol.* **1983**, *45*, 855.
- Stahel, A.B.J.; Baggenstos, R.; Engels, M.; Friess, M.; Ackermann, M. Two Different Macaviruses, Ovine Herpesvirus-2 and Caprine Herpesvirus-2, Behave Differently in Water Buffaloes than in Cattle or in Their Respective Reservoir Species. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e83695, doi:10.1371/journal.pone.0083695.
- Stasiak, K.; Dunowska, M.; Rola, J. Outbreak of Equid Herpesvirus 1 Abortions at the Arabian Stud in Poland. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 374, doi:10.1186/s12917-020-02586-y.
- Stasiak, K.; Rola, J.; Ploszay, G.; Socha, W.; Zmudzinski, J.F. Detection of the Neuropathogenic Variant of Equine Herpesvirus 1 Associated with Abortions in Mares in Poland. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 102, doi:10.1186/s12917-015-0416-7.
- Stevens, J.G. Overview of Herpesvirus Latency. *Semin. Virol.* **1994**, *5*, 191–196, doi:10.1006/smvy.1994.1020.
- Stierstorfer, B.; Eichhorn, W.; Schmahl, W.; Brandmüller, C.; Kaaden, O.R.; Neubauer, A. Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Myeloencephalopathy: A Case Report. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **2002**, *49*, 37–41, doi:10.1046/j.1439-0450.2002.00537.x.
- Stokes, A.; Alber, D.G.; Greensill, J.; Amellal, B.; Carvalho, R.; Taylor, L.A.; Doel, T.R.; Killington, R.A.; Halliburton, I.W.; Meredith, D.M. The Expression of the Proteins of Equine Herpesvirus 1 Which Share Homology with Herpes Simplex Virus 1 Glycoproteins H and L. *Virus Res.* **1996**, *40*, 91–107, doi:10.1016/0168-1702(95)01256-7.
- Stokol, T.; Yeo, W.M.; Burnett, D.; DeAngelis, N.; Huang, T.; Osterrieder, N.; Catalfamo, J. Equid Herpesvirus Type 1 Activates Platelets. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0122640, doi:10.1371/journal.pone.0122640.
- Studdert, M.; Simpson, T.; Roizman, B. Differentiation of Respiratory and Abortigenic Isolates of Equine Herpesvirus 1 by Restriction Endonucleases. *Science* **1981**, *214*, 562–564, doi:10.1126/science.6270790.
- Studdert, M.J.; Hartley, C.A.; Dynon, K.; Sandy, J.R.; Slocombe, R.R.; Charles, J.A.; Milne, M.E.; Clarke, A.F.; El-Hage, C. Outbreak of Equine Herpesvirus Type 1 Myeloencephalitis: New Insights from Virus Identification by PCR and the Application of an EHV-1 -Specific Antibody Detection ELISA. *Vet. Rec.* **2003**, *153*, 417–423, doi:10.1136/vr.153.14.417.
- Suenaga, T.; Satoh, T.; Somboonthum, P.; Kawaguchi, Y.; Mori, Y.; Arase, H. Myelin-Associated Glycoprotein Mediates Membrane Fusion and Entry of Neurotropic Herpesviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 866–871, doi:10.1073/pnas.0913351107.
- Sun, Y.; Brown, S.M. The Open Reading Frames 1, 2, 71, and 75 Are Nonessential for the Replication of Equine Herpesvirus Type 1 in Vitro. *Virology* **1994**, *199*, 448–452, doi:10.1006/viro.1994.1143.
- Sun, Y.; MacLean, A.R.; Aitken, James.D.; Brown, S.M. The Role of the Gene 71 Product in the Life Cycle of Equine Herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* **1996**, *77*, 493–500, doi:10.1099/0022-1317-77-3-493.
- Sun, Y.; MacLean, A.R.; Dargan, D.; Brown, S.M. Identification and Characterization of the Protein Product of Gene 71 in Equine Herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75* (Pt 11), 3117–3126, doi:10.1099/0022-1317-75-11-3117.
- Sutton, G.; Thieulent, C.; Fortier, C.; Hue, E.S.; Marcillaud-Pitel, C.; Pléau, A.; Deslis, A.; Guitton, E.; Paillot, R.; Pronost, S. Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C2254/H752 Strain in French Horses Showing No Major Impact on the Strain Behaviour. *Viruses* **2020**, *12*, 1160, doi:10.3390/v12101160.
- Sutton, G.A.; Viel, L.; Carman, P.S.; Boag, B.L. Pathogenesis and Clinical Signs of Equine Herpesvirus-1 in Experimentally Infected Ponies in Vivo. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire* **1998**, *62*, 49–55.
- Tallmadge, R.L.; Žygelytė, E.; Van de Walle, G.R.; Kristie, T.M.; Felipe, M.J.B. Effect of a Histone Demethylase Inhibitor on Equine Herpesvirus-1 Activity In Vitro. *Front. Vet. Sci.* **2018**, *5*, 34, doi:10.3389/fvets.2018.00034.

- Taniguchi, A.; Fukushi, H.; Matsumura, T.; Yanai, T.; Masegi, T.; Hirai, K. Pathogenicity of a New Neurotropic Equine Herpesvirus 9(Gazelle Herpesvirus 1) in Horses. *J. Vet. Med. Sci.* **2000**, *62*, 215–218, doi:10.1292/jvms.62.215.
- Taniguchi, A.; Fukushi, H.; Yanai, T.; Masegi, T.; Yamaguchi, T.; Hirai, K. Equine Herpesvirus 9 Induced Lethal Encephalomyelitis in Experimentally Infected Goats. *Arch Virol* **2000**, *145*, 2619–2627, doi:10.1007/s007050070011.
- Taouji, S.; Collobert, C.; Gicquel, B.; Sailleau, C.; Brisseau, N.; Moussu, C.; Breuil, M.-F.; Pronost, S.; Borchers, K.; Zientara, S. Detection and Isolation of Equine Herpesviruses 1 and 4 from Horses in Normandy: An Autopsy Study of Tissue Distribution in Relation to Vaccination Status. *J. Vet. Med. Ser. B* **2002**, *49*, 394–399, doi:10.1046/j.1439-0450.2002.00590.x.
- Tearle, J.P.; Smith, K.C.; Boyle, M.S.; Binns, M.M.; Livesay, G.J.; Mumford, J.A. Replication of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) in the Testes and Epididymides of Ponies and Venereal Shedding of Infectious Virus. *J. Comp. Pathol.* **1996**, *115*, 385–397, doi:10.1016/S0021-9975(96)80073-9.
- Telford, E.A.; Watson, M.S.; Perry, J.; Cullinane, A.A.; Davison, A.J. The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-4. *J. Gen. Virol.* **1998**, *79* (Pt 5), 1197–1203, doi:10.1099/0022-1317-79-5-1197.
- Telford, E.A.R.; Watson, M.S.; McBride, K.; Davison, A.J. The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-1. *Virology* **1992**, *189*, 304–316, doi:10.1016/0042-6822(92)90706-U.
- Tewari, D.; Whalley, J.M.; Love, D.N.; Field, H.J. Characterization of Immune Responses to Baculovirus-Expressed Equine Herpesvirus Type 1 Glycoproteins D and H in a Murine Model. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75*, 1735–1741, doi:10.1099/0022-1317-75-7-1735.
- Thackray, A.M.; Field, H.J. Famciclovir and Valaciclovir Differ in the Prevention of Herpes Simplex Virus Type 1 Latency in Mice: A Quantitative Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1555–1562, doi:10.1128/AAC.42.7.1555.
- Thackray, A.M.; Field, H.J. Further Evidence from a Murine Infection Model That Famciclovir Interferes with the Establishment of HSV-1 Latent Infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *45*, 825–833, doi:10.1093/jac/45.6.825.
- Thackray, A.M.; Field, H.J. The Effects of Antiviral Therapy on the Distribution of Herpes Simplex Virus Type 1 to Ganglionic Neurons and Its Consequences during, Immediately Following and Several Months after Treatment. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 2385–2396, doi:10.1099/0022-1317-81-10-2385.
- The Herpesviruses: Volume 3*; Roizman, B., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1985; ISBN 978-1-4612-9456-6.
- Thieulent, C. Criblage in Vitro de Molécules Antivirales Contre l'herpèsvirus Équin 1 Par Impédancemétrie et Évaluation Clinique de l'effet Du Valganciclovir, Université de Caen Normandie, 2020.
- Thieulent, C.; Fortier, C.; Munier-Lehmann, H.; Suzanne, P.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Hans, A.; Paillot, R.; Vidalain, P.-O.; Pronost, S.; et al. Screening of Potential Antiviral Molecules against Equid Herpesvirus-1 Using Cellular Impedance Measurement: Dataset of 2,891 Compounds. *Data Brief* **2020**, *33*, 106492, doi:10.1016/j.dib.2020.106492.
- Thieulent, C.; Hue, E.S.; Sutton, G.; Fortier, C.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Paillot, R.; Vidalain, P.-O.; et al. Identification of Antiviral Compounds against Equid Herpesvirus-1 Using Real-Time Cell Assay Screening: Efficacy of Decitabine and Valganciclovir Alone or in Combination. *Antiviral Res.* **2020**, *183*, 104931, doi:10.1016/j.antiviral.2020.104931.
- Thieulent, C.J.; Hue, E.S.; Fortier, C.I.; Dallemagne, P.; Zientara, S.; Munier-Lehmann, H.; Hans, A.; Fortier, G.D.; Pitel, P.-H.; Vidalain, P.-O.; et al. Screening and Evaluation of Antiviral Compounds against Equid Alpha-Herpesviruses Using an Impedance-Based Cellular Assay. *Virology* **2019**, *526*, 105–116, doi:10.1016/j.virol.2018.10.013.
- Thomson, G.R.; Mumford, J.A.; Campbell, J.; Griffiths, L.; Clapham, P. Serological Detection of Equid Herpesvirus 1 Infections of the Respiratory Tract. *Equine Vet J* **1976**, *8*, 58–65, doi:10.1111/j.2042-3306.1976.tb03291.x.
- Thomson, G.R.; Mumford, J.A.; Smith, I.M. Experimental Immunization against Respiratory Disease Due to Equid Herpesvirus 1 Infection (Rhinopneumonitis) Using Formalin-Inactivated Virus

- with Various Adjuvants. *Vet. Microbiol.* **1979**, *4*, 209–222, doi:10.1016/0378-1135(79)90057-9.
- Porsteinsdóttir, L. Equine Herpesviruses in Iceland Course of Infection and Immune Response against Gammaherpesviruses Type 2 and 5, and Isolation of an Alphaherpesvirus, Type 3, 2020.
- Thurlow, J.K.; Murphy, M.; Stow, N.D.; Preston, V.G. Herpes Simplex Virus Type 1 DNA-Packaging Protein UL17 Is Required for Efficient Binding of UL25 to Capsids. *J. Virol.* **2006**, *80*, 2118–2126, doi:10.1128/JVI.80.5.2118-2126.2006.
- Tian, D.; Zhang, W.; He, J.; Liu, Y.; Song, Z.; Zhou, Z.; Zheng, M.; Hu, Y. Novel, Real-Time Cell Analysis for Measuring Viral Cytopathogenesis and the Efficacy of Neutralizing Antibodies to the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31965, doi:10.1371/journal.pone.0031965.
- Tischer, B.K.; Osterrieder, N. Herpesviruses--a Zoonotic Threat? *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 266–270, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.020.
- Tognon, M.; Furlong, D.; Conley, A.J.; Roizman, B. Molecular Genetics of Herpes Simplex Virus. V. Characterization of a Mutant Defective in Ability to Form Plaques at Low Temperatures and in a Viral Fraction Which Prevents Accumulation of Coreless Capsids at Nuclear Pores Late in Infection. *J. Virol.* **1981**, *40*, 870.
- Topalis, D.; Gillemot, S.; Snoeck, R.; Andrei, G. Thymidine Kinase and Protein Kinase in Drug-Resistant Herpesviruses: Heads of a Lernaean Hydra. *Drug Resist Updat* **2018**, *37*, 1–16, doi:10.1016/j.drug.2018.01.003.
- Traub-Dargatz, J.L.; Pelzel-McCluskey, A.M.; Creekmore, L.H.; Geiser-Novotny, S.; Kasari, T.R.; Wiedenheft, A.M.; Bush, E.J.; Bjork, K.E. Case-Control Study of a Multistate Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy Outbreak. *J. Vet. Intern. Med.* **2013**, *27*, 339–346, doi:10.1111/jvim.12051.
- Tsujimura, K.; Yamada, M.; Nagata, S.; Yamanaka, T.; Nemoto, M.; Kondo, T.; Kurosawa, M.; Matsumura, T. Pharmacokinetics of Penciclovir after Oral Administration of Its Prodrug Famciclovir to Horses. *J. Vet. Med. Sci.* **2010**, *72*, 357–361, doi:10.1292/jvms.09-0350.
- Tsujimura, K.; Yamanaka, T.; Kondo, T.; Fukushi, H.; Matsumura, T. Pathogenicity and Immunogenicity of Equine Herpesvirus Type 1 Mutants Defective in Either GI or GE Gene in Murine and Hamster Models. *J. Vet. Med. Sci.* **2006**, *68*, 1029–1038, doi:10.1292/jvms.68.1029.
- Van de Walle, G.R.; Goupil, R.; Wishon, C.; Damiani, A.; Perkins, G.A.; Osterrieder, N. A Single-Nucleotide Polymorphism in a Herpesvirus DNA Polymerase Is Sufficient to Cause Lethal Neurological Disease. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 20–25, doi:10.1086/599316.
- Van de Walle, G.R.; May, M.L.; Sukhumavasi, W.; von Einem, J.; Osterrieder, N. Herpesvirus Chemokine-Binding Glycoprotein G (GG) Efficiently Inhibits Neutrophil Chemotaxis In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 4161–4169, doi:10.4049/jimmunol.179.6.4161.
- Van de Walle, G.R.; Peters, S.T.; VanderVen, B.C.; O'Callaghan, D.J.; Osterrieder, N. Equine Herpesvirus 1 Entry via Endocytosis Is Facilitated by AV Integrins and an RSD Motif in Glycoprotein D. *J. Virol.* **2008**, *82*, 11859–11868, doi:10.1128/JVI.00868-08.
- van der Meulen, K.; Caij, B.; Pensaert, M.; Nauwynck, H. Absence of Viral Envelope Proteins in Equine Herpesvirus 1-Infected Blood Mononuclear Cells during Cell-Associated Viremia. *Vet. Microbiol.* **2006**, *113*, 265–273, doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.048.
- van der Meulen, K.M.; Favoreel, H.W.; Pensaert, M.B.; Nauwynck, H.J. Immune Escape of Equine Herpesvirus 1 and Other Herpesviruses of Veterinary Importance. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *111*, 31–40, doi:10.1016/j.vetimm.2006.01.006.
- van Der Meulen, K.M.; Nauwynck, H.J.; Buddaert, W.; Pensaert, M.B. Replication of Equine Herpesvirus Type 1 in Freshly Isolated Equine Peripheral Blood Mononuclear Cells and Changes in Susceptibility Following Mitogen Stimulation. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 21–25, doi:10.1099/0022-1317-81-1-21.
- van der Meulen, K.M.; Nauwynck, H.J.; Pensaert, M.B. Absence of Viral Antigens on the Surface of Equine Herpesvirus-1-Infected Peripheral Blood Mononuclear Cells: A Strategy to Avoid Complement-Mediated Lysis. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 93–97, doi:10.1099/vir.0.18864-0.
- van der Meulen, K.M.; Nauwynck, H.J.; Pensaert, M.B. Mitogen Stimulation Favours Replication of Equine Herpesvirus-1 in Equine Blood Mononuclear Cells by Inducing Cell Proliferation and

- Formation of Close Intercellular Contacts. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 1951–1957, doi:10.1099/0022-1317-82-8-1951.
- van Galen, G.; Leblond, A.; Tritz, P.; Martinelle, L.; Pronost, S.; Saegerman, C. A Retrospective Study on Equine Herpesvirus Type-1 Associated Myeloencephalopathy in France (2008–2011). *Vet. Microbiol.* **2015**, *179*, 304–309, doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.003.
- van Maanen, C. Equine Herpesvirus 1 and 4 Infections: An Update. *Vet. Q.* **2002**, *24*, 57–78, doi:10.1080/01652176.2002.9695126.
- van Maanen, C.; Willink, D.L.; Smeenk, L.A.J.; Brinkhof, J.; Terpstra, C. An Equine Herpesvirus 1 (EHV1) Abortion Storm at a Riding School. *Vet. Q.* **2000**, *22*, 83–87, doi:10.1080/01652176.2000.9695030.
- Vandekerckhove, A.P.; Glorieux, S.; Gryspeerdt, A.C.; Steukers, L.; Duchateau, L.; Osterrieder, N.; Van de Walle, G.R.; Nauwynck, H.J. Replication Kinetics of Neurovirulent versus Non-Neurovirulent Equine Herpesvirus Type 1 Strains in Equine Nasal Mucosal Explants. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 2019–2028, doi:10.1099/vir.0.019257-0.
- VanDevanter, D.R.; Warren, P.; Bennett, L.; Schultz, E.R.; Coulter, S.; Garber, R.L.; Rose, T.M. Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR. *J. Clin. Microbiol.* **1996**, *34*, 1666–1671, doi:10.1128/JCM.34.7.1666-1671.1996.
- Villa, T.G.; Feijoo-Siota, L.; Rama, J.L.R.; Ageitos, J.M. Antivirals against Animal Viruses. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 97–116, doi:10.1016/j.bcp.2016.09.029.
- Vissani, M.A.; Becerra, M.L.; Olguín Perglione, C.; Tordoya, M.S.; Miño, S.; Barrandeguy, M. Neuropathogenic and Non-Neuropathogenic Genotypes of Equid Herpesvirus Type 1 in Argentina. *Vet. Microbiol.* **2009**, *139*, 361–364, doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.025.
- Vissani, M.A.; Thiry, E.; Dal Pozzo, F.; Barrandeguy, M. Antiviral Agents against Equid Alphaherpesviruses: Current Status and Perspectives. *Vet. J.* **2016**, *207*, 38–44, doi:10.1016/j.tvjl.2015.06.010.
- Vollebregt, T. *Economic Analysis of Equine Herpes Virus within the Dutch Commercial Horse Sector*; 2014;
- von Einem, J.; Schumacher, D.; O’Callaghan, D.J.; Osterrieder, N. The α -TIF (VP16) Homologue (ETIF) of Equine Herpesvirus 1 Is Essential for Secondary Envelopment and Virus Egress. *J. Virol.* **2006**, *80*, 2609–2620, doi:10.1128/JVI.80.6.2609-2620.2006.
- von Einem, J.; Smith, P.M.; Van de Walle, G.R.; O’Callaghan, D.J.; Osterrieder, N. In Vitro and in Vivo Characterization of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Mutants Devoid of the Viral Chemokine-Binding Glycoprotein G (GG). *Virology* **2007**, *362*, 151–162, doi:10.1016/j.virol.2006.12.008.
- Wagner, B.; Goodman, L.B.; Babasyan, S.; Freer, H.; Torsteinsdóttir, S.; Svansson, V.; Björnsdóttir, S.; Perkins, G.A. Antibody and Cellular Immune Responses of Naïve Mares to Repeated Vaccination with an Inactivated Equine Herpesvirus Vaccine. *Vaccine* **2015**, *33*, 5588–5597, doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.009.
- Wagner, B.; Perkins, G.; Babasyan, S.; Freer, H.; Keggan, A.; Goodman, L.B.; Glaser, A.; Torsteinsdóttir, S.; Svansson, V.; Björnsdóttir, S. Neonatal Immunization with a Single IL-4/Antigen Dose Induces Increased Antibody Responses after Challenge Infection with Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) at Weanling Age. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169072, doi:10.1371/journal.pone.0169072.
- Wagner, B.; Wimer, C.; Freer, H.; Osterrieder, N.; Erb, H.N. Infection of Peripheral Blood Mononuclear Cells with Neuropathogenic Equine Herpesvirus Type-1 Strain Ab4 Reveals Intact Interferon- α Induction and Induces Suppression of Anti-Inflammatory Interleukin-10 Responses in Comparison to Other Viral Strains. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2011**, *143*, 116–124, doi:10.1016/j.vetimm.2011.06.032.
- Wagner, W.N.; Bogdan, J.; Haines, D.; Townsend, H.G.G.; Misra, V. Detection of Equine Herpesvirus and Differentiation of Equine Herpesvirus Type 1 from Type 4 by the Polymerase Chain Reaction. *Can. J. Microbiol.* **1992**, *38*, 1193–1196, doi:10.1139/m92-196.
- Walker, C.; Perotti, V.M.; Love, D.N.; Whalley, J.M. Infection with Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) Strain HVS25A in Pregnant Mice. *J. Comp. Pathol.* **1999**, *120*, 15–27, doi:10.1053/jcpa.1998.0251.

- Walter, J.; Seeh, C.; Fey, K.; Bleul, U.; Osterrieder, N. Clinical Observations and Management of a Severe Equine Herpesvirus Type 1 Outbreak with Abortion and Encephalomyelitis. *Acta Vet. Scand.* **2013**, *55*, 19, doi:10.1186/1751-0147-55-19.
- Weinberg, E.D. Pregnancy-Associated Depression of Cell-Mediated Immunity. *Rev Infect Dis* **1984**, *6*, 814–831, doi:10.1093/clinids/6.6.814.
- Weller, S.; Blum, M.R.; Doucette, M.; Burnette, T.; Cederberg, D.M.; de Miranda, P.; Smiley, M.L. Pharmacokinetics of the Acyclovir Pro-Drug Valaciclovir after Escalating Single- and Multiple-Dose Administration to Normal Volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1993**, *54*, 595–605, doi:10.1038/clpt.1993.196.
- Weller, S.K.; Coen, D.M. Herpes Simplex Viruses: Mechanisms of DNA Replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a013011–a013011, doi:10.1101/cshperspect.a013011.
- Wellington, J.E.; Allen, G.P.; Gooley, A.A.; Love, D.N.; Packer, N.H.; Yan, J.X.; Whalley, J.M. The Highly O-Glycosylated Glycoprotein Gp2 of Equine Herpesvirus 1 Is Encoded by Gene 71. *J. Virol.* **1996**, *70*, 8195–8198, doi:10.1128/JVI.70.11.8195-8198.1996.
- Wellington, J.E.; Love, D.N.; Whalley, J.M. Evidence for Involvement of Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein B in Cell-Cell Fusion. *Arch. Virol.* **1996**, *141*, 167–175, doi:10.1007/BF01718598.
- Whalley, J.M.; Robertson, G.R.; Davison, A.J. Analysis of the Genome of Equine Herpesvirus Type 1: Arrangement of Cleavage Sites for Restriction Endonucleases EcoRI, BglII and BamHI. *J. Gen. Virol.* **1981**, *57*, 307–323, doi:10.1099/0022-1317-57-2-307.
- Whitley, R.J. Herpesviruses. In *Medical Microbiology*; Baron, S., Ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston (TX), 1996 ISBN 978-0-9631172-1-2.
- Whitwell, K.E.; Blunden, A.S. Pathological Findings in Horses Dying during an Outbreak of the Paralytic Form of Equid Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Infection. *Equine Vet. J.* **1992**, *24*, 13–19, doi:10.1111/j.2042-3306.1992.tb02771.x.
- Wilkins, P.A.; Papich, M.; Sweeney, R.W. Pharmacokinetics of Acyclovir in Adult Horses. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **2005**, *15*, 174–178, doi:10.1111/j.1476-4431.2005.00145.x.
- Wilson, M.E.; Holz, C.L.; Kopec, A.K.; Dau, J.J.; Luyendyk, J.P.; Soboll Hussey, G. Coagulation Parameters Following Equine Herpesvirus Type 1 Infection in Horses. *Equine Vet. J.* **2019**, *51*, 102–107, doi:10.1111/evj.12843.
- Wilson, W.D. Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **1997**, *13*, 53–72, doi:10.1016/S0749-0739(17)30255-9.
- Wilsterman, S.; Soboll-Hussey, G.; Lunn, D.P.; Ashton, L.V.; Callan, R.J.; Hussey, S.B.; Rao, S.; Goehring, L.S. Equine Herpesvirus-1 Infected Peripheral Blood Mononuclear Cell Subpopulations during Viremia. *Vet. Microbiol.* **2011**, *149*, 40–47, doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.004.
- Wimer, C.L.; Damiani, A.; Osterrieder, N.; Wagner, B. Equine Herpesvirus Type-1 Modulates CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9, and CXCL10 Chemokine Expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2011**, *140*, 266–274, doi:10.1016/j.vetimm.2011.01.009.
- Wimer, C.L.; Schnabel, C.L.; Perkins, G.; Babasyan, S.; Freer, H.; Stout, A.E.; Rollins, A.; Osterrieder, N.; Goodman, L.B.; Glaser, A.; et al. The Deletion of the ORF1 and ORF71 Genes Reduces Virulence of the Neuropathogenic EHV-1 Strain Ab4 without Compromising Host Immunity in Horses. *PLoS One* **2018**, *13*, e0206679, doi:10.1371/journal.pone.0206679.
- Witkowski, P.T.; Schuenadel, L.; Wiethaus, J.; Bourquain, D.R.; Kurth, A.; Nitsche, A. Cellular Impedance Measurement as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralization Testing and Evaluation of Antiviral Substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *401*, 37–41, doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.003.
- Wohlsein, P.; Lehmbecker, A.; Spitzbarth, I.; Algermissen, D.; Baumgärtner, W.; Böer, M.; Kummrow, M.; Haas, L.; Grummer, B. Fatal Epizootic Equine Herpesvirus 1 Infections in New and Unnatural Hosts. *Vet. Microbiol.* **2011**, *149*, 456–460, doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.024.
- Wong, G.; Lu, J.; Zhang, W.; Gao, G.F. Pseudorabies Virus: A Neglected Zoonotic Pathogen in Humans? *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 150–154, doi:10.1080/22221751.2018.1563459.
- Woźniakowski, G.; Samorek-Salamonowicz, E. Animal Herpesviruses and Their Zoonotic Potential for Cross-Species Infection. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2015**, *22*, 191–194, doi:10.5604/12321966.1152063.

- Xie, Y.; Wu, L.; Wang, M.; Cheng, A.; Yang, Q.; Wu, Y.; Jia, R.; Zhu, D.; Zhao, X.; Chen, S.; et al. Alpha-Herpesvirus Thymidine Kinase Genes Mediate Viral Virulence and Are Potential Therapeutic Targets. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 941, doi:10.3389/fmicb.2019.00941.
- Yanai, T.; Fujishima, N.; Fukushi, H.; Hirata, A.; Sakai, H.; Masegi, T. Experimental Infection of Equine Herpesvirus 9 in Dogs. *Vet Pathol* **2003**, *40*, 263–267, doi:10.1354/vp.40-3-263.
- Yanai, T.; Sakai, T.; Fukushi, H.; Hirai, K.; Narita, M.; Sakai, H.; Masegi, T. Neuropathological Study of Gazelle Herpesvirus 1 (Equine Herpesvirus 9) Infection in Thomson's Gazelles (*Gazella Thomsoni*). *J. Comp. Pathol.* **1998**, *119*, 159–168, doi:10.1016/S0021-9975(98)80060-1.
- Yanai, T.; Tujioka, S.; Sakai, H.; Fukushi, H.; Hirai, K.; Masegi, T. Experimental Infection with Equine Herpesvirus 9 (EHV-9) in Cats. *J Comp Pathol* **2003**, *128*, 113–118, doi:10.1053/jcpa.2002.0613.
- Yang, H.; Baker, S.F.; González, M.E.; Topham, D.J.; Martínez-Sobrido, L.; Zand, M.; Holden-Wiltse, J.; Wu, H. An Improved Method for Estimating Antibody Titers in Microneutralization Assay Using Green Fluorescent Protein. *J Biopharm Stat* **2016**, *26*, 409–420, doi:10.1080/10543406.2015.1052475.
- Yasunaga, S.; Maeda, K.; Matsumura, T.; Kai, K.; Iwata, H.; Inoue, T. Diagnosis and Sero-Epizootiology of Equine Herpesvirus Type 1 and Type 4 Infections in Japan Using a Type-Specific ELISA. *J. Vet. Med. Sci.* **1998**, *60*, 1133–1137, doi:10.1292/jvms.60.1133.
- Yasunaga, S.; Maeda, K.; Matsumura, T.; Kondo, T.; Kai, K. Application of a Type-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Equine Herpesvirus Types 1 and 4 (EHV-1 and -4) to Horse Populations Inoculated with Inactivated EHV-1 Vaccine. *J. Vet. Med. Sci.* **2000**, *62*, 687–691, doi:10.1292/jvms.62.687.
- Yeo, W.M.; Osterrieder, N.; Stokol, T. Equine Herpesvirus Type 1 Infection Induces Procoagulant Activity in Equine Monocytes. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 16, doi:10.1186/1297-9716-44-16.
- Yu, M.H.H.; Kasem, S.; Yoshizaki, N.; Pagamjav, O.; Yamaguchi, T.; Ohya, K.; Fukushi, H. Functional Characterization of EUL47 in Productive Replication, Morphogenesis and Infectivity of Equine Herpesvirus 1. *Virus Res.* **2012**, *163*, 310–319, doi:10.1016/j.virusres.2011.10.021.
- Zarrouk, K.; Piret, J.; Boivin, G. Herpesvirus DNA Polymerases: Structures, Functions and Inhibitors. *Virus Res* **2017**, *234*, 177–192, doi:10.1016/j.virusres.2017.01.019.
- Zarski, L.M.; Giessler, K.S.; Jacob, S.I.; Weber, P.S.D.; McCauley, A.G.; Lee, Y.; Soboll Hussey, G. Identification of Host Factors Associated with the Development of Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy by Transcriptomic Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Horses. *Viruses* **2021**, *13*, 356, doi:10.3390/v13030356.
- Zhao, J.; Poelaert, K.C.K.; Van Cleemput, J.; Nauwynck, H.J. CCL2 and CCL5 Driven Attraction of CD172a+ Monocytic Cells during an Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Infection in Equine Nasal Mucosa and the Impact of Two Migration Inhibitors, Rosiglitazone (RSG) and Quinacrine (QC). *Vet. Res.* **2017**, *48*, 14, doi:10.1186/s13567-017-0419-4.
- Zhou, Z.H.; Chen, D.H.; Jakana, J.; Rixon, F.J.; Chiu, W. Visualization of Tegument-Capsid Interactions and DNA in Intact Herpes Simplex Virus Type 1 Virions. *J. Virol.* **1999**, *73*, 3210–3218, doi:10.1128/JVI.73.4.3210-3218.1999.

ANNEXES

ANNEXE 1: Equid Alphaherpesvirus 9 Outbreak Associated with Mortality in a Group of Grevy's Zebra (*Equus Grevyi*) Housed in a Mixed-Species Exhibit **Leclerc et al. (in revision)**

RH: ALPHAHERPESVIRUS OUTBREAK IN GREVY'S ZEBRAS

EQUID ALPHAHERPESVIRUS 9 OUTBREAK ASSOCIATED WITH MORTALITY IN A GROUP OF GREVY'S ZEBRA (*EQUUS GREVYI*) HOUSED IN A MIXED-SPECIES EXHIBIT

5 Antoine Leclerc, DVM, Dipl. E.C.Z.M.(Z.H.M.), Baptiste Mulot, DVM, Nicolas Goddard, DVM, Amélie Nicolau, DVM, Gabrielle Sutton, MSc, Romain Paillot, PhD, HDR, Karin Lemberger, DVM, Dipl. A.C.V.P., Stéphane Pronost, MSc, PhD, HDR, Loïc Legrand, MSc, PhD.

10 From ZooParc de Beauval & Beauval Nature, 41110 Saint-Aignan, France (Leclerc, Goddard, Nicolau, Mulot); Biotargen EA7450-UniCaen-LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France (Sutton, Paillot, Pronost, Legrand); Vet Diagnostics, 69008 Lyon, France (Lemberger). Correspondence should be directed to Dr. Leclerc

15 (antoine.leclerc@zoobeauval.com).

Abstract: A herd of seven captive-born Grevy's zebras (*Equus grevyi*) experienced an outbreak of nasal discharge and sneezing. Clinical signs, including lethargy and anorexia, were severe and acute in three animals, including a 16-month-old male that died within 48h.

20 Treatment of two severely affected zebras included valacyclovir (40mg/kg PO TID), meloxicam (0.6mg/kg IM/PO) and cefquinome (2.5mg/kg IM q48h). An adult female improved rapidly and clinical signs resolved within 48 hr of treatment. Administration of valacyclovir pellets was very complicated in a 2-month-old female, and death occurred within 48h. Histologic examination of the two individuals that died revealed severe fibrinonecrotic

25 interstitial pneumonia with prominent hyaline membranes and type II pneumocyte hyperplasia. Additionally, the 16-month-old male presented systemic endothelial activation with vascular thrombosis and necrosis and mild non suppurative meningoencephalitis. Herpesviral DNA was detected in the lungs of both individuals by nested PCR. The nucleic acid sequence of the amplicons showed 100% similarity with previously published Equid

30 Alphaherpesvirus 9 (EHV-9) sequences. Three additional animals developed mild nasal
discharge only, and recovered spontaneously. The zebras shared housing facilities with other
species, including white rhinoceros (*Ceratotherium simum*), reticulated giraffes (*Giraffa*
camelopardalis reticulata) and several antelope species. None of these animals showed
clinical signs. Additionally, nasal swabs and whole blood samples were collected from co-
35 housed white rhinoceroses (n = 3), and springboks (*Antidorcas marsupialis*, n = 3), as well as
nasal swabs from co-housed reticulated giraffes (n=4). Nucleic acid sequence from equid
herpesviruses was not detected in any of these samples. The source of the infection in the
zebras remains unclear.

40

INTRODUCTION

Grevy's zebras (*Equus grevyi*) are an endangered species of zebra only found in the Horn
of Africa. Populations have markedly decreased in the past 30 years and a continuing decline
of 10% over the next three generations is estimated.²³ In captivity, the population is large and
45 based on a sufficient number of captive animals to conserve the genetic diversity.²²

Equid Alphaherpesviruses are among the most important pathogens of equidae worldwide.
Equid Alphaherpesviruses types 1, 4, 8 and 9 (EHV-1, EHV-4, EHV-8 and EHV-9,
respectively) have been associated with abortion, neonatal death, respiratory disease, and
neurological disorders in domestic equids.¹²¹³ EHV-1 can cause a wide spectrum of
50 diseases^{13,26} and viruses closely-related to EHV-1 have been reported in many equid species,
including Grevy's zebras.^{2,9,13,15,24,25} EHV-9 is closely related to EHV-1, and seropositivity
for both viruses has been reported in zebras, generally associated with little to no clinical sign
of disease.^{3,7,9,13,15}

The antiviral drug, valacyclovir, is a prodrug of acyclovir. Pharmacokinetic studies in
55 domestic horses showed that an oral administration achieved plasma concentrations within the
sensitivity range of EHV-1, and significantly decreased viral replication and signs of disease
in experimentally infected horses.^{11,19,20} To the authors' knowledge, the use of valacyclovir
has not previously been reported in zebra spp.

This report focuses on cases of EHV-9 infection in a herd of captive Grevy's zebras,
60 associated with mortality, and an apparent lack of interspecies transmission to closely-housed
other ungulates.

CASE REPORTS

ZooParc de Beauval housed a herd of seven captive-born Grevy's zebras (*Equus grevyi*) in a mixed-species enclosure with white rhinoceros (*Ceratotherium simum*), reticulated giraffes (*Giraffa camelopardalis reticulata*), blue wildebeests (*Connochaetes taurinus*), sable antelopes (*Hippotragus niger*), springboks (*Antidorcas marsupialis*), Egyptian geese (*Alopochen aegyptiacus*), and ostriches (*Struthio camelus*). From March to October, all animals ranged freely together in the outdoor exhibit and were housed in separate stalls within the same building at night, or when necessary for performing routine animal husbandry activities. All animals were offered *ad libitum* hay both indoors and outdoors, and appropriate pellets with or without browse when stalled. Water was available in each stall, while it was shared in the outdoor exhibit. From November to February, species were separated during daytime and given access to outdoor paddocks instead of the shared exhibit, with water provided in a trough and *ad libitum* hay. They were still stalled at night, in the mixed-species building.

In December 2016, three of the seven Grevy's zebra were isolated from the herd following acute onset of lethargy, dysorexia, nasal discharge, and sneezing. Clinical signs in Case 1 (16-month-old male) were most severe (weakness progressed to lateral recumbency within a few hours) so supportive care including meloxicam (Metacam® 20 mg/mL, Boehringer Ingelheim France, 51721 Reims Cedex, France; 0.6 mg/kg IM) was promptly administered, followed by IV fluid therapy at the time of lateral recumbency (no restraint was necessary at that time). Cases 2 (8-yr-old female) and 3 (2-month-old foal of Case 2) presented with milder clinical signs and were simply isolated and monitored initially. Forty-eight hours after initial presentation, Case 1 died and clinical signs in Cases 2 and 3 progressed to increased nasal discharge, with a thickening of exudate. Treatment of Cases 2 and 3 with valacyclovir (Valacyclovir Sandoz® 500 mg, Sandoz, 92300 Levallois-Perret, France; 40mg/kg PO TID), cefquinome (Cobactan® LA 7.5%, MSD Santé Animale, 49071 Beaucouze Cedex, France; 2.5 mg/kg IM q 48h), and meloxicam (Metacam; 0.6 mg/kg IM/PO q 24h) was initiated within 48 hr of onset of clinical signs. Oral administration of valacyclovir (crushed tablets mixed with pellets) was successful in Case 2 but difficult in Case 3 for which pellet intake was limited, and lethargy more severe. It is very likely that Case 3 received a limited fraction of each dose. Case 2 recovered with full resolution of clinical signs within 48 hr of treatment initiation while Case 3 died within 4 days of onset of clinical signs. Three more zebras in the herd began exhibiting clinical signs (mild nasal discharge without lethargy). One zebra had no observable clinical signs throughout the outbreak. During outbreak, all animals continued to be housed in the same building, with non-case zebra stalled 4 m from Cases 2 and 3 and mild-

case zebra stalled adjacent to Cases 2 and 3. Mild cases and non-case zebra were allowed access to separate outdoor paddocks during the day and stalled at night.

100 Gross necropsies of Cases 1 and 3 revealed marked pulmonary edema and congestion, severe necrohaemorrhagic pneumonia, severe rhinitis and marked splenic congestion, epicardial hemorrhages, and musculoskeletal necrosis. Histology revealed severe fibrinonecrotizing rhinitis and severe fibrinonecrotic interstitial pneumonia with prominent hyaline membranes and type 2 pneumocyte hyperplasia (Fig. 1). Additional findings in Case 1
105 included systemic endothelial activation with vascular thrombosis and occasional necrosis, non-suppurative meningoencephalitis (Fig. 2), and fibrinonecrotic tracheobronchial lymphadenitis, while Case 3 showed moderate to marked fibrinonecrotic enteritis, which was not considered of similar etiology. Both individuals additionally presented marked acute musculoskeletal myofiber necrosis which was attributed to prolonged recumbency.

110 To detect the presence of mammalian herpesviruses, a consensus-nested PCR on the ORF30 fragment was performed on samples from Cases 1, 2 and 3 (Table 1) as previously described by VanDevanter *et al.*²⁷ Amplicon sequencing revealed a 181 bp sequence that showed 100% similarity with EHV-9.

The ORF30 region was further amplified and sequenced using the method described by
115 Abdelgawad *et al.*^{1,2}. The 719 bp amplicon obtained (MT991402) confirmed sequence homology with EHV9 strains (99.7% with EHV-9 strains AP010838.1 and KX101094.1, 99.9% with KX101093.1 and 100% with KX101092.1 and KX101096.1). The virus was isolated from the lung on RK13 cells. Sequencing of the 719 bp ORF30 fragment obtained from this cell culture isolate confirmed the homology with the EHV-9 strains cited above.

120 Based on post mortem examination, histology, virus isolation and PCR results, death was attributed to EHV-9 infection in both cases.

Blood samples and nasal swabs from co-housed white rhinoceros, nasal swabs from co-housed springbok, and nasal swabs from co-housed giraffe collected 7 days after the initial symptoms in zebra were all negative on consensus-nested herpesvirus PCR. Blood samples
125 collected from springbok 7 days after the initial symptoms in zebra were positive and showed 100% similarity with Springbok herpesvirus 1 (AB_194010). Nasal swabs collected from four (including Case 2) of the remaining five zebras six months following the initial outbreak were negative. Four years following the outbreak no further clinical cases or deaths attributable to herpesvirus infection have occurred in the animals in this mixed-species enclosure.

DISCUSSION

EHV-9 is the most recently discovered member of the *Alphaherpesvirinae* subfamily.^{3,13,21} It has been isolated from several non-domestic equid species,^{2,9,13} and serological studies indicate that captive zebras have a lower prevalence of seropositivity than wild zebras.^{3,13,15}

135 Clinical disease produced by EHV-1 and EHV-9 in zebra is rare^{2,9,15,24} as zebras are not only considered natural hosts,^{2,4-7,13} *Equus grevyi* has been implicated as an EHV-9 reservoir.^{15,24} Prior to the outbreak in this report, a single case of EHV-9-associated non-suppurative encephalitis in a Grevy's zebra had been reported in the literature.² A single case of systemic fatal EHV-9 infection in a Grant's zebra (*Equus quagga boehmi*) has also been

140 reported, however this case did not report any neurological clinical signs nor central nervous system lesions.²¹ While Case 1 in this report did have encephalitis similar to the previous Grevy's zebra case report, all cases reported here manifested additional systemic clinical signs and pathology of the respiratory system. Histopathology of Cases 1 and 3 was suggestive of a systemic viral infection with primary respiratory and endothelial tropism, despite the lack of

145 visualization of intranuclear inclusions and syncytial cells (often transient). Concurrent bacterial infection in these cases cannot be ruled out, however, even if present, it would have been considered a complication of a primary viral infection based on virus culture from the lung and a histologic pattern primarily in favor of a viral etiology.

EHV-1 and 9 can cause disease in a wide variety of non-equid species,^{1,4,8,10,13,14,16,17,24,28}

150 hence the recommendation to separate zebras from other susceptible species.^{8,28} In the present report, zebras were housed in the same building and immediately next to the giraffes and white rhinoceroses. PCR results obtained after the outbreak on nasal swabs and blood samples of co-housed white rhinoceroses were negative. These animals might still have been the source of infection, as herpesvirus excretion is cyclic,²⁶ and African rhinoceroses have been

155 considered as potential reservoirs for EHV-9 infections in the wild.¹³ Similarly, the presence of a group of giraffes close to the zebras represented a risk of cross-species transmission and giraffes have shown high susceptibility to EHV infections.^{16,17} Nasal swabs obtained from the giraffes after the outbreak were negative, and none of them showed any signs of disease.

Absent introduction of new animals to the mixed-species enclosure, the source of the

160 outbreak in report remains undetermined. Herpesviruses are latent pathogens and viral reactivation may occur in a stressed or immunocompromised individual.^{15,25,26} In a recent study, fecal glucocorticoid metabolite concentration was significantly correlated with an increased likelihood of EHV shedding in captive Grevy's zebra.²⁵ No social or environmental

stressor was observed by animal care staff immediately preceding nor during the outbreak
165 described here nor were any of the individuals in the affected mixed-species enclosure
considered immunocompromised. However, animals were kept more frequently indoors or in
a smaller outdoor enclosure during that season, which might have facilitated viral
transmission due to increased stocking density. Viral reactivation in one pre-infected zebra or
white rhinoceros in a confined environment could explain the outbreak, and repeated PCR
170 testing prior to this event would have been necessary to completely understand the dynamics
of EHV-9 circulation in the facility in the months or years before the outbreak.

Valacyclovir, rather than acyclovir, was prescribed in Cases 2 and 3 because of its higher
bioavailability and dosage was based on data available from use in domestic horses.¹¹
Administration of valacyclovir pellets was associated with a full recovery of Case 2 while
175 only a limited fraction of the dose was effectively received by Case 3. Caution is advised
when evaluating efficacy of any drug based on a single case, but the authors observed clinical
recovery combined with effective valacyclovir administration in Case 2.

The absence of evidence of valacyclovir efficacy against EHV infections in zebra,
combined with the challenge of consistent and reliable administration of the domestic horse
180 dose (40 mg/kg) using currently available formulations, make EHV vaccination in captive
zebra an attractive approach. In a serosurvey of EHV infections in North-American zoos,
vaccination was reported in six institutions, with variable results.⁹ While previous reports
demonstrate seroconversion in zebra following vaccination,¹⁸ to the authors' knowledge no
data regarding EHV vaccine efficacy in nondomestic equids is available and it is unclear in
185 existing reports if seroconversion is due to vaccination or previous exposure. Further
investigation of vaccine efficacy in nondomestic species is warranted to aid in determination
of vaccination as an appropriate tool for prevention of EHV in nondomestic species,¹³
particularly those housed in mixed-species enclosures. Consistent monitoring of viral
shedding among captive ungulates in zoological institutions is also of paramount importance
190 to better understand EHV epidemiology.

To the authors' knowledge, this case series is the first to report both respiratory and
neurological lesions associated with EHV-9 in zebras and the first EHV outbreak with clinical
disease in several captive zebras.

195 Acknowledgments: The authors would like to thank the ZooParc de Beauval and LABÉO
staff for their help with these cases.

LITERATURE CITED

- 200 1. Abdelgawad A, Azab W, Damiani AM, Baumgartner K, Will H, Osterrieder N, Greenwood AD. Zebra-borne equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in non-African captive mammals. *Vet Microbiol.* 2014;169(1–2):102–106.
2. Abdelgawad A, Damiani A, Ho S, Strauss G, Szentiks C, East M, Osterrieder N, Greenwood A. Zebra Alphaherpesviruses (EHV-1 and EHV-9): Genetic Diversity, Latency
205 and Co-Infections. *Viruses.* 2016;8(9):262.
3. Abdelgawad A, Hermes R, Damiani A, Lamglait B, Czirják GÁ, East M, Aschenborn O, Wenker C, Kasem S, Osterrieder N, Greenwood AD. Comprehensive Serology Based on a Peptide ELISA to Assess the Prevalence of Closely Related Equine Herpesviruses in Zoo and Wild Animals. *PLOS ONE.* 2015;10(9):e0138370.
- 210 4. Azab W, Dayaram A, Greenwood AD, Osterrieder N. How Host Specific Are Herpesviruses? Lessons from Herpesviruses Infecting Wild and Endangered Mammals. *Annu Rev Virol* [Internet]. 2018 [cited 2018 Sep 17];5(1). Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-092917-043227>
5. Barnard BJ, Paweska JT. Prevalence of antibodies against some equine viruses in
215 zebra (*Zebra burchelli*) in the Kruger National Park, 1991-1992. *Onderstepoort J Vet Res.* 1993;60(3):175–179.
6. Borchers K, Böttner D, Lieckfeldt D, Ludwig A, Frölich K, Klingeborn B, Widèn F, Allen G, Ludwig H. Characterization of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) Related Viruses from Captive Grevy's Zebra and Blackbuck. *J Vet Med Sci.* 2006;68(7):757–760.
- 220 7. Borchers K, Wiik H, Frölich K, Ludwig H, East ML. Antibodies against equine herpesviruses and equine arteritis virus in Burchell's zebras (*Equus burchelli*) from the Serengeti ecosystem. *J Wildl Dis.* 2005;41(1):80–86.
8. Donovan TA, Schrenzel MD, Tucker T, Pessier AP, Bicknese B, Busch MDM, Wise AG, Maes R, Kiupel M, McKnight C, Nordhausen RW. Meningoencephalitis in a Polar
225 Bear Caused by Equine Herpesvirus 9 (EHV-9). *Vet Pathol.* 2009;46(6):1138–1143.
9. Flanders JA, Wack RF, Pusterla N, Mapes SM, Collins D, Gamble KC. Survey for equine herpesviruses in polar bears (*Ursus maritimus*) and exotic equids housed in US AZA institutions. *J Zoo Wildl Med.* 2018;49(3):599–608.
10. Fukushi H, Tomita T, Taniguchi A, Ochiai Y, Kirisawa R, Matsumura T, Yanai T, Masegi T, Yamaguchi T, Hirai K. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus
230 immunologically related to equine herpesvirus 1. *Virology.* 1997;227(1):34–44.

11. Garre B, Shebany K, Gryspeerdt A, Baert K, van der Meulen K, Nauwynck H, Deprez P, De Backer P, Croubels S. Pharmacokinetics of Acyclovir after Intravenous Infusion of Acyclovir and after Oral Administration of Acyclovir and Its Prodrug Valacyclovir in Healthy Adult Horses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(12):4308–4314. 235
12. Garvey M, Suárez NM, Kerr K, Hector R, Moloney-Quinn L, Arkins S, Davison AJ, Cullinane A. Equid herpesvirus 8: Complete genome sequence and association with abortion in mares. Devlin JM (ed.). *PLOS ONE.* 2018;13(2):e0192301.
13. Greenwood AD, Osterrieder K. Equine Herpesviruses and Interspecies Infections. Miller RE, Lamberski N, Calle PP (eds): *Fowler's zoo and wild animal medicine, Volume 9, Current Therapy.* St. Louis, Missouri: Elsevier; 2018. p. 227–232. 240
14. Greenwood AD, Tsangaras K, Ho SYW, Szentiks CA, Nikolin VM, Ma G, Damiani A, East ML, Lawrenz A, Hofer H, Osterrieder N. A Potentially Fatal Mix of Herpes in Zoos. *Curr Biol.* 2012;22(18):1727–1731.
15. Guevara L, Abdelgawad A, Onzere C, Greenwood AD, Davidson Z, Bishop R, Mutinda M. Seroprevalence of Equine Herpesviruses 1 and 9 (EHV-1 and EHV-9) in Wild Grévy's Zebra (*Equus grevyi*) in Kenya. *J Wildl Dis.* 2018;54(4):848–851. 245
16. Hoenerhoff MJ, Janovitz EB, Richman LK, Murphy DA, Butler TC, Kiupel M. Fatal Herpesvirus Encephalitis in a Reticulated Giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *Vet Pathol.* 2006;43(5):769–772. 250
17. Kasem S, Yamada S, Kiupel M, Woodruff M, Ohya K, Fukushi H. Equine Herpesvirus Type 9 in Giraffe with Encephalitis. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(12):1948–1949.
18. Kennedy MA, Ramsay E, Diderrich V, Richman L, Allen GP, Potgieter LND. Encephalitis Associated with a Variant of Equine Herpesvirus 1 in a Thomson's Gazelle (*Gazella thomsoni*). *J Zoo Wildl Med.* 1996;27(4):533–538. 255
19. Maxwell LK, Bentz BG, Bourne DWA, Erkert RS. Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse. *J Vet Pharmacol Ther.* 2008;31(4):312–320.
20. Maxwell LK, Bentz BG, Gilliam LL, Ritchey JW, Pusterla N, Eberle R, Holbrook TC, McFarlane D, Rezabek GB, Meinkoth J, Whitfield C, Goad CL, Allen GP. Efficacy of the early administration of valacyclovir hydrochloride for the treatment of neuropathogenic equine herpesvirus type-1 infection in horses. *Am J Vet Res.* 2017;78(10):1126–1139. 260
21. Moeller Jr RB, Crossley B, Pipkin A, Li Y. Systemic equid alphaherpesvirus 9 in a Grant's zebra. *J Vet Diagn Invest.* 2018;30(4):580-583.
22. Rademacher U, Winkler A, Matern B, Moehlman PD, Williams S, Zima J. 2009 EEP African Equids Husbandry Guidelines. 2009;82. 265

23. Rubenstein D, Low Mackey B, Davidson ZD, Kebede F, King SRB. *Equus grevyi*.

In: The International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species.

<http://www.iucnredlist.org/details/7950/0>. Accessed November 2018. [Internet]. International

Union for Conservation of Nature; 2016 [cited 2018 Nov 22]. Available from:

270 <http://www.iucnredlist.org/details/7950/0>

24. Schrenzel MD, Tucker TA, Donovan TA, Busch MDM, Wise AG, Maes RK,

Kiupel M. New Hosts for Equine Herpesvirus 9. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(10):1616–1619.

TABLES

Table 1: Results of the nested PCR with primers targeting the ORF30 (viral DNA polymerase) fragment, in Cases 1-3 (Grevy's zebras).

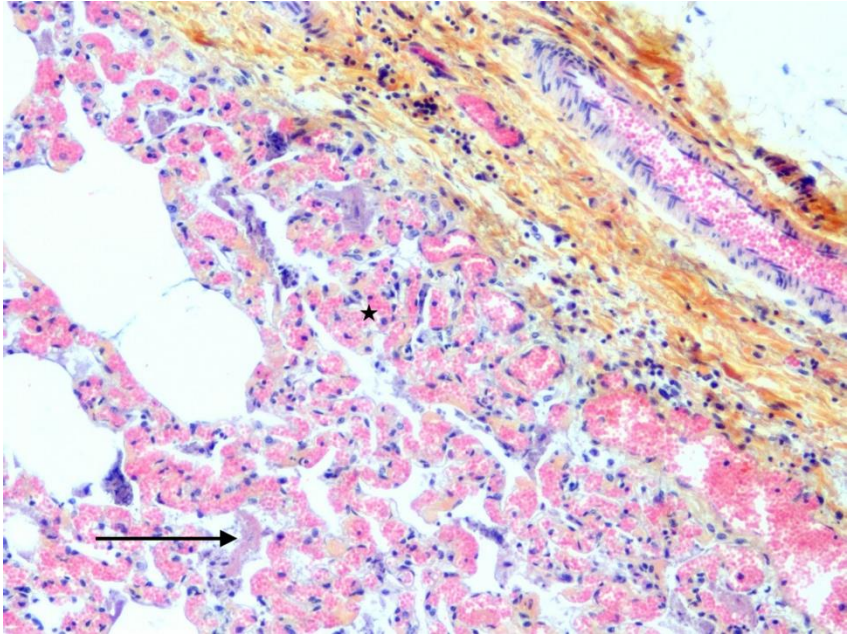
Individual	EHV nested PCR (ORF30)	
	Sample type	Result
<i>Case 1</i>	Nasal swab	Positive
	Whole blood	Positive
	Lung	Positive
<i>Case 2</i>	Nasal swab	Positive
	Nasal crust	Positive
<i>Case 3</i>	Lung	Positive

290 EHV: Equid herpesvirus.

CAPTIONS

295 Figure 1: Histologic section of the lung (Case 1), showing severe fibrinonecrotic interstitial pneumonia. Note the alveoli walls coated by hyaline membranes (arrow), with type 2 pneumocyte hyperplasia, marked diffuse congestion of the capillaries with prominent endothelial cells (asterisk). Hematoxylin and eosin, x10.

300 Figure 2: Histologic section of the brain (Case 1), showing marked mononuclear meningoencephalitis. Note the mononuclear infiltration (ellipse) of the cerebral parenchyma at the periphery of the choroid, with perivascular infiltrates (arrow). Hematoxylin and eosin, x2.



EHV nested PCR (ORF30)		
	Sample type	Result
Individual		
<i>Case 1</i>	Nasal swab	Positive
	Whole blood	Positive
	Lung	Positive
<i>Case 2</i>	Nasal swab	Positive
	Nasal crust	Positive
<i>Case 3</i>	Lung	Positive

ANNEXE 2 : Publications scientifiques**Publications acceptées**

Sutton G, Thieulent C, Fortier C, Hue ES, Marcillaud-Pitel C, Pléau A, Deslis A, Guitton E, Paillot R, Pronost S. *Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C2254/H752 Strain in French Horses Showing no Major Impact on the Strain Behaviour*. *Viruses*. 2020 Oct 13;12(10):1160. doi: 10.3390/v12101160. PMID: 33066315; PMCID: PMC7650556.

Sutton G, Garvey M, Cullinane A, Jourdan M, Fortier C, Moreau P, Foursin M, Gryspeerdt A, Maisonnier V, Marcillaud-Pitel C, Legrand L, Paillot R, Pronost S. *Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion*. *Viruses*. 2019 Oct 4;11(10):916. doi: 10.3390/v11100916. PMID: 31590336; PMCID: PMC6832873.

Paillot R, Sutton G, Thieulent C, Marcillaud-Pitel C, Pronost S, 2020. *New EHV-1 variant identified*. *Veterinary Record* 186, 573.

Publications en cours de preparation

Sutton G, Normand C, Thieulent C, Fortier C, Hue ES, Leclerc A, Mulot B, Goddard N, Nicolau A, Legrand L, Paillot R, Pronost S. *Equid alphaherpesviruses 8 and 9: strain isolation in France, molecular characteristics and antiviral assay* (En préparation).

Sutton G, Carnet F, Thieulent C, Hue ES, Fortier C, Pléau A, Deslis A, Guitton E, Buisson B, Pronost S, Paillot R. *Development of a neutralising antibody assay using Real Time Cell Analysis for the measurement of Equid herpesvirus 1 antibody immune response in horses after experimental infection or field vaccination* (En preparation pour publication dans le journal Vaccines).

Publications associées

Thieulent C, Hue E, Sutton G, Fortier C, Dallemagne P, Zientara S, Munier-Lehmann H, Hans A, Paillot R, Vidalain P-O, Pronost S, 2020. *Identification of antiviral compounds against equid herpesvirus-1 using real-time cell assay screening: Efficacy of decitabine and valganciclovir alone or in combination*. *Antiviral Research* 183, 104931.

Leclerc A, Mulot B, Goddard N, Nicolau A, Sutton G, Paillot R, Lemberger K, Pronost S, Legrand L. *Equid alphaherpesvirus 9 outbreak associated with mortality in a group of Grevy's zebra (Equus Grevyi) housed in a mixed-species exhibit.* (In review).

Thieulent C, Sutton G, Toquet M-P, Fremaux S, Hue E, Fortier C, Pléau A, Deslis A, Guitton E, Pronost S, Paillot R, 2020. *Oral administration of valganciclovir reduces clinical signs, virus shedding and cell-associated viremia in ponies experimentally infected with the new variant C2254 of equid herpesvirus-1.* Pathogens (En préparation).

ANNEXE 3 : Valorisation des travaux scientifiques

Communications orales

46^{èmes} journées annuelles de l'Association Vétérinaire Equine Française (AVEF), Bordeaux, 2018 : Quelles souches en 2018 ? Gabrielle Sutton, **Romain Paillot**, Marion Jourdan, Christine Fortier, Virginie Maisonnier *et al.*

1st Colloque European Meeting of Equine Infectious Diseases, Caen, 2019: Equine herpesvirus 1: phylogenic analysis in France & new approaches for antiviral therapy. Sutton G & **Thieulent C**, Hue ES, Fortier C, Paillot R & Pronost R.

1st Colloque European Meeting of Equine Infectious Diseases, Caen, 2019: Measurement of the neutralisation of equine influenza virus by impedancemetry. **Flora Carnet**, Gabrielle Sutton, Côme Thieulent, Stéphane Pronost, Romain Paillot.

47^{èmes} journées annuelles de l'Association Vétérinaire Equine Française (AVEF), Tours, 2019 : L'Equid HerpèsVirus 8 (HVE-8) : Emergence d'un nouvel herpèsvirus dans l'espèce équine : quels risques pour la filière ? Sutton G, Normand C, Marcillaud-Pitel C, Fortier C, Jourdan M, Legrand L, Paillot R, Pronost S.

Journées Sciences et innovations équines de l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation, Saumur, 2019 : Une décennie de Rhinopneumonie : étude phylogénétique. Sutton G, Jourdan M, Fortier C, Maisonnier V, Dervin S, Marcillaud-Pitel C, Legrand L, Paillot R & Pronost S.

XIII^{ème} journée scientifique Herpesvirus est pathologies associées (HerPAs), Lyon, 2019 : Les herpèsvirus équins 8 et 9 : Quels risques représentent ces deux virus émergents pour la santé équine ? Sutton G, Thieulent C, Fortier C, Mulot B, Leclerc A, Legrand L, Paillot R, Pronost S.

37^{ème} Symposium du Veterinary Comparative Respiratory Society, Caen, 2019: Impedance & other original tools for cellular models. Stéphane Pronost, Côme Thieulent, **Erika Hue**, Gabrielle Sutton, Flora Carnet *et al.*

12th European College of Equine Internal Medicine, Valence, Spain, 2019: **Romain Paillot**, Gabrielle Sutton, Stéphane Pronost. EHV-1 outbreaks, some examples & the question of virus strain.

Posters

46^{èmes} journées annuelles de l'Association Vétérinaire Equine Française (AVEF), Bordeaux, 2018 : Confirmation d'infections mortelles par HVE-9 chez des zèbres de Grévy en captivité. **Sutton G**, Thieulent C, Fortier C, Mulot B, Paillot R, Legrand L, Leclerc A, Pronost S.

XXII^{ème} édition des Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EDNBISE), Caen, 2019 : Phylogenic study of Equine Herpesvirus 1 after a major outbreak in France in 2018. **Sutton G**, Jourdan M, Fortier C, Maisonnier V, Dervin S, Marcillaud-Pitel C, Legrand L, Paillot R & Pronost S.

37^{ème} Symposium du Veterinary Comparative Respiratory Society, Caen, 2019: Equid herpesviruses 8 and 9: two emerging respiratory viruses in equids : Sutton G, Normand C, Thieulent C, Fortier C, **Hue E**, Mulot B, Leclerc A, Legrand L, Paillot R, Pronost S.

Confirmation d'infections mortelles par HVE-9 chez des zèbres de Grévy en captivité

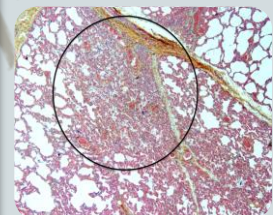
INTRODUCTION

- Neuf types d'herpèsvirus sont classiquement décrits chez les équidés :
 - ⇒ chez les chevaux : herpèsvirus équin (HVE)-1,3,4 pour les alphaherpèsvirus et HVE-2,5 pour les gammaherpèsvirus.
 - ⇒ chez les ânes : HVE-6 et 8 pour les alphaherpèsvirus et HVE-7 pour les gammaherpèsvirus.
 - ⇒ l'HVE-9 initialement isolé chez une Gazelle de Thomson.
- Même si la majorité de ces herpèsvirus sont connus pour avoir une spécificité d'hôtes, certains d'entre eux semblent avoir franchi la barrière d'espèce comme c'est le cas pour l'HVE-1 et l'HVE-9, retrouvés chez plusieurs espèces d'animaux sauvages (gazelles, zèbres, rhinocéros).

Objectif: Confirmer l'infection de trois zèbres de Grévy ayant montré des signes cliniques respiratoires et neurologiques entraînant la mort d'un mâle de 16 mois et d'une femelle de 2 mois.



Nasaux de zèbre présentant un écoulement nasal.



Fibronécrose intersticielle pulmonaire
Histologie de poumon après autopsie.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Isolement du virus:

- Broyage du poumon du zèbre mâle de 16 mois.
- Isolement sur cellules RK13, lignée cellulaire fréquemment utilisée pour la culture d'HVE.

Détection des herpèsvirus:

- Extraction d'acides nucléiques (poumon et souche isolée) à l'aide du QIAmp® DNA et Viral RNA Mini Kit (Qiagen).
- Réalisation d'une PCR consensuelle pour la détection d'herpèsvirus chez les mammifères (VanDevanter *et al.* 1996).

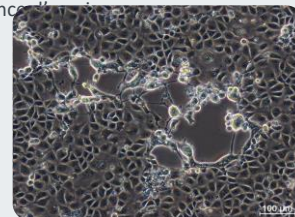
Typage des herpèsvirus:

- Séquençage des ORF30 et ORF33 par méthode Sanger.
- Arbre phylogénétique réalisé selon la méthode Maximum Composite Likelihood.



RÉSULTATS

- Un effet cytopathogène a été observé sur les cellules mises en culture en présence du broyage de poumon du mâle de 16 mois attestant de la présence d'un virus.



- La PCR de détection a permis d'identifier un herpèsvirus de mammifère.
- L'homologie de 99% de la séquence obtenue, à partir du poumon, avec celle de la souche d'HVE-9 de référence APO10838.1 (référence Pubmed) révèle la présence d'HVE-9 chez ce zèbre.
- La mutation G, dite neuropathogène, en position 2254 de l'ORF30 a été mise en évidence par séquençage.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats *in vitro* suggèrent que l'HVE-9 est à l'origine de l'épisode neurologique observé chez les zèbres de Grévy.

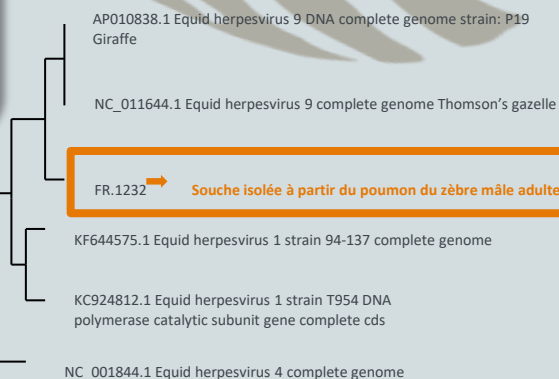
Il s'agit du premier cas mortel lié à l'HVE-9 chez des zèbres de Grévy en France. La présence de la mutation G2254 pose la question d'une pathogénicité accrue de cette souche.

Perspectives: Le franchissement de la barrière d'espèce de cette souche chez les mammifères rend nécessaire sa surveillance chez les équidés.

De plus, l'isolement de la souche permettra:

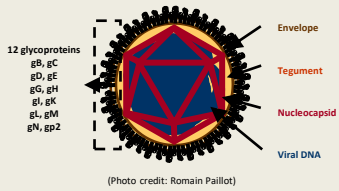
- L'étude des mécanismes de pathogénicité de ce virus.
- L'évaluation de l'efficacité de molécules antivirales.

Arbre phylogénétique situant la souche isolée parmi 2 souches d'HVE-1, 2 souches d'HVE-9 et 1 souche d'HVE-4.



INTRODUCTION

The *Herpesviridae* is a family of virus infecting mammals. It gathers viruses such as Varicella Zoster Virus (causing Chicken Pox and Zona, reactivated form after latency) and Epstein-Barr Virus (kissing disease) affecting humans for example but also EHV1 (Equine Herpesviruses) affecting equids.

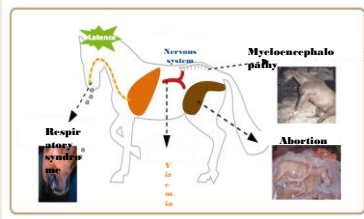


(Photo credit: Romain Paillet)

Equid herpesvirus ID card:

- ❖ Enveloped DNA viruses
- ❖ They belong to the *Herpesviridae* family
- ❖ 9 types were described and isolated in horses but also other mammals.

- ❖ Specificity to establish latency. Viral replication is reactivated under stress conditions.



(Photo credit: Stéphane Pronost)

Equine herpesvirus type 1:

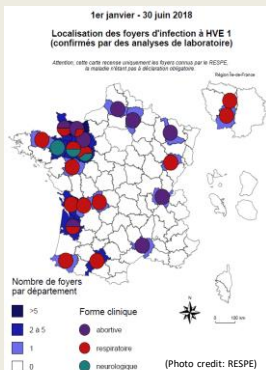
- ❖ Three types of diseases:
 - Respiratory syndrome
 - Abortion or still-born death
 - Neurological form.

- ❖ Because of its major impact on health and economy, it is essential to understand EHV-1 mechanisms of infection and to consolidate our knowledge concerning the diversity of field strains.

In 2018, a major epizootic crisis occurred with the report of a very large number of EHV1 outbreaks compared to previous years.

A major question was:
⇒ Is this crisis caused by a new strain (evolution)?

⇒ What is the molecular evolution of EHV1 strains in France since 2010? Is there any molecular association with pathogenicity?



(Photo credit: RESPE)

MATERIAL AND METHODS

Different types of samples were collected on horses during EHV1 outbreaks. DNA was extracted from organs and respiratory fluids using QIAmp DNA and Viral RNA Mini Kit® (Qiagen) and blood samples were extracted using NucleoSpin Blood L® (Macherey-Nagel) kits.

Molecular investigations

1. **Virus detection by PCR** (Diallo *et al.* 2006) – Glycoprotein B is essential for EHV1 entry in target cells. Its encoding region is very conserved and allows EHV-1 detection.

2. **Neuropathogenicity typing by PCR** (Allen *et al.* 2006) Nugent *et al.* (2006) suggested the involvement of a mutation in the DNA polymerase gene (ORF30 position 2254 A₂₂₅₄/G₂₂₅₄) with the intensity of viral replication and neuropathogenicity.

3. ORF30 based phylogeny

Bryant *et al.* 2018 were the first to conduct whole genome sequencing on a large number of strains. Yet, small DNA regions sequencing appears to be sufficient for phylogenetic studies.

Our work was based on ORF30 (3688bp) sequencing in order to compare strains from 2010 to 2018.

Sequences were analysed using MEGA7 software and a tree was built using Neighbour-joining method and Maximum Composite Likelihood model.

Phylogenetic study of Equine Herpesvirus 1 after a major outbreak in France in 2018

Gabrielle Sutton^{1,2}, Marion Jourdan³, Christine Fortier^{1,2}, Virginie Maisonnier³, Stéphanie Dervin³, Christel Marcillaud-Pitel³, Loïc Legrand^{1,2}, Romain Paillet^{1,2} & Stéphane Pronost^{1,2}

¹ LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France.

² Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France.

³ RESPE, 14280 Saint-Contest, France.

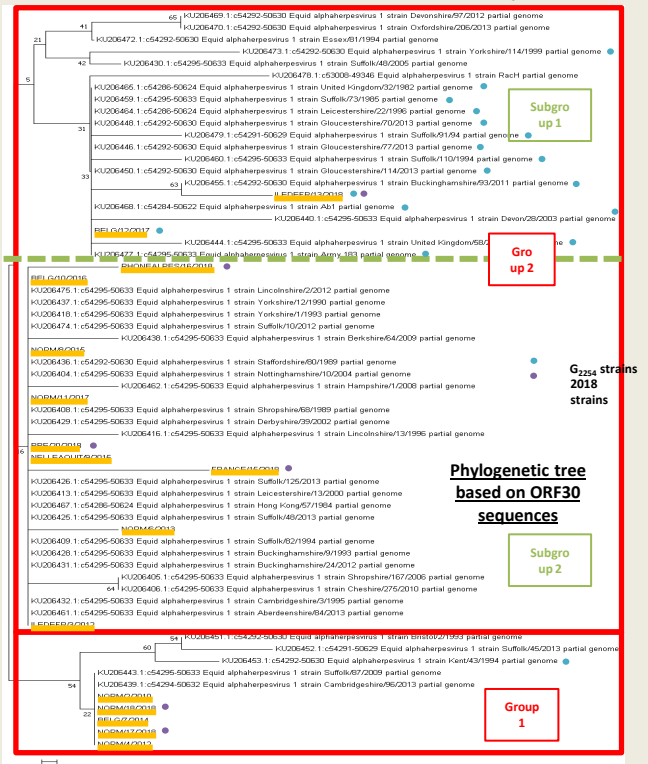
RESULTS

In this table are presented EHV-1 epidemiological data collected in France during 2018 outbreak.

	Respiratory	Abortion	Neurological	Information missing	Total
Number of cases reported to the RESPE	33	17	5	/	55
Number of cases analysed in the lab by PCR	19	19	5	8	51
Number of samples*	30	21	17	8	76
Number of samples typed A ₂₂₅₄	11	16	10	2	39
Number of samples typed G ₂₂₅₄	8	1	3	5	17

*only one sample counted when multiple samples for the same horse – A₂₂₅₄ = “non-neuropathogenic type” – G₂₂₅₄ = “neuropathogenic type”.

- ❖ There are several strains involved in 2018 EHV-1 crisis and there is no correlation between the diseases and the genotype A/G₂₂₅₄.



Phylogenetic tree based on ORF30 sequences

- ❖ Two strains from 2018 epizooty were isolated on RK13 cell lines and 6 strains were sequenced (DNA polymerase encoding region, ORF30) as well as 10 strains collected in France from 2010 to 2017.
- ❖ Strains were compared in a phylogenetic tree with UK strains (Bryant *et al.* 2018).
- ❖ There is an evidence of two main groups and two subgroups (1 and 2).
- ❖ G₂₂₅₄ strains are mainly gathered in one subgroup (1).

CONCLUSION

- ❖ Some genetic diversity can be observed concerning ORF30 sequences of strains collected in France since 2010 and compared to UK strains. This diversity does not seem to be associated with time.
- ❖ As A₂₂₅₄ strains and G₂₂₅₄ seem to belong to separate subgroups, we can suggest that one or the other is the fruit of genetic evolution. Based on other herpesvirus DNA polymerase conserved region, Nugent *et al.* (2006) suggested that G₂₂₅₄ were the primitive strains even though they seem to be less persistent.
- ❖ Further investigations could be performed using Multi Locus Sequence Typing in order to cover a larger number of sequences. This has been shown to strengthen single ORF sequencing (Garvey *et al.* 2019).

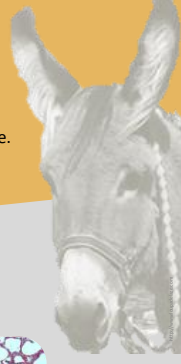
Equid herpesviruses 8 and 9: two emerging respiratory viruses in equids

Sutton G.^{1,2}, Normand C.^{1,2}, Thieulent C.^{1,2}, Fortier C.^{1,2}, Hue E.^{1,2}, Mulot B.³, Leclerc A.³, Legrand L.^{1,2}, Paillot R.^{1,2}, Pronost S.^{1,2}

¹LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France.

²Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450, 14053 Caen, France.

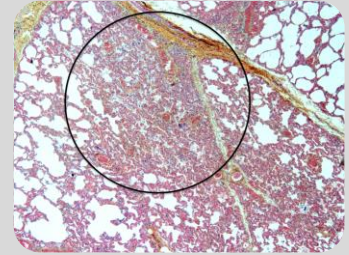
³ZooParc de Beauval & Beauval Nature, 41110 Saint-Aignan, France.



Introduction

- Nine herpesviruses are able to infect equids in the wild or in captivity:
 - ⇒ subfamily *Alphaherpesvirinae*: equid herpesvirus (EHV)-1,3,4,6,8 and 9
 - ⇒ subfamily *Gammapherpesvirinae*: EHV-2,5 and 7
- EHV-1 is by far the most dangerous, causing the most serious forms of disease in horses (respiratory infection, abortion and myeloencephalopathy).
- EHV-8, formerly known as Asinine herpesvirus type 3 (AHV-3), was primarily isolated in donkeys but has recently been associated with abortion in horses (Garvey *et al.* 2018).
- EHV-9, initially described in a Thomson's gazelle, has a strong homology with EHV-1.
- Although the majority of these equidherpesviruses are known to have host specificity, some of them seem to have crossed the species barrier as it is the case for EHV-1 and EHV-9, found in several species of wild animals (onagers, zebras, rhinoceros) and other animal species kept in captivity.

This report describes the first isolation in France of an EHV-9 strain from a captive Grevy's zebras and the prevalence of EHV-8 in French horses and donkeys populations.



(Photo credit: Antoine Leclerc)

Pulmonary interstitial fibronecrosis, Histology of lung after autopsy.

Material and methods

Biological samples:

- Zebra lung biopsy (male, 16 months), post-mortem.
- 185 samples (162 fetuses, 23 nasal swabs) from horses and donkeys (collected between 2005 and 2019 from EHV-induced abortion cases or respiratory diseases) provided by LABÉO.

Viral strain isolation:

- Viral strain isolation on RK13 cells from crushed/grinding Zebra lung biopsy,.

Detection of equid herpesviruses:

- DNA extracted using DNA Mini Kit (Qiagen) for tissues and Viral RNA Mini Kit (Qiagen) for respiratory fluids and isolated strain.
- Detection of mammalian herpesvirus by PCR (van Deanter *et al.*, 1996).
- Detection of EHV-1 glycoprotein B by PCR (Diallo *et al.*, 2006).

Equid herpesvirus phylogeny:

- ORF30 sequencing using Sanger method.
- Phylogenetic analysis using Neighbor-Joining method and Maximum Composite Likelihood model.

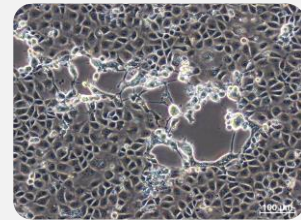
Conclusion

- These results are the first confirmation of EHV-8 and EHV-9 in France.
- These results illustrate the importance of monitoring the specificity of diagnostic tools over time.
- The results obtained *in vitro* suggest that HVE-9 may be responsible for the neurological episode observed in Grevy's zebras. This is the first report of lethal case related to EHV-9 in Grevy's zebras in France.
- Their strong genetic proximity to EHV-1 and the possibility to cross the species barriers warrant future studies.
- The isolation of these two viruses will allow studying their mechanisms of pathogenicity and the efficacy of several antiviral molecules, which could be a therapeutic option in the context of safeguarding endangered species in captivity, such as the Grevy's zebra (endangered species according to the IUCN classification).

Results

EHV-9

- A mammalian herpesvirus was detected by PCR in the zebra lung biopsy.
- Sequencing revealed a 99% homology with several EHV-9 referenced strains. This result was confirmed by the complete sequencing of ORF30.
- An EHV-9 strain was isolated from this sample on RK13, with a characteristic cytopathic effect observed in culture, in presence of crushed/grinding zebra lung.
- ORF30 sequencing confirmed the virus identification as EHV-9.



(photo credit: LABÉO)

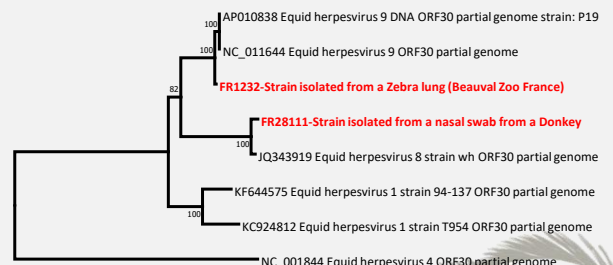
- ORF30 G2254 mutation was detected (also called neuropathogenic mutation, Nugent *et al.*, 2006).

EHV-8

- 164/185 samples from horses and donkeys tested positive for EHV-1.
- 6 samples were finally identified as EHV-8 (all from donkeys) and showed 99% homology with ORF30 sequence of an EHV-8 strain isolated from a fetus after abortion (MF431611.1; Garvey *et al.* 2018).

Phylogeny study

- The phylogenetic study of all these sequences (EHV-1, EHV-8 and EHV-9) showed a strong proximity between EHV-8 and EHV-9, and EHV-1.



0.020

ORF30 based Neighbour-Joining phylogenetic tree including EHV-1, EHV-8, EHV-9 and EHV-4 reference strains and two strains (FR1232 and FR28111) isolated from field samples representative from the EHV-1 strains.

Contact: Erika Hue
erika.hue@laboratoire-labeo.fr

Financements:

Fonds Éperon



BEAUVAL NATURE
NORMANDIE



ifce
Institut Français
de Recherche
pour l'éducation
et la Formation



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE




BTG
BIOTARGEN



ANNEXE 4 : Formations transversales et scientifiques

Formations de l'école doctorale:

Fiche Bilan Formation doctorale			
			
NOM, Prénom : SUTTON Gabrielle			
Unité de recherche : BIOTARGEN			
Directeur(s) de thèse : Stéphane Pronost et Romain Paillot			
Date (jour/mois/année) de la 1 ^{ère} inscription : 01/02/2018			
Formations transversales	Nombre d'heures suivies	Equivalence (h) attribuée par l'ED	Volume retenu par l'ED (mars 2021)
Modules proposés par Normandie université (cf Livret "Offre de formation doctorale") :			
<i>lister les formations suivies + nb d'heures réellement suivies (colonne G)</i>			
FM-Outils innovant de présentation d'une thèse	6	1h = 1h limité à 30h par formation	6
FM-Mener sa thèse comme un projet	18	1h = 1h limité à 30h par formation	18
FM - Développer son réseau professionnel	3,5	1h = 1h limité à 30h par formation	3,5
FM-Comprendre le fonctionnement d'une entreprise	12		12
FM-Construire son projet professionnel	7		6
Protéger, valoriser et diffuser les résultats et produits de la recherche en Science	3		3
Protection des données à caractère personnel	3		3
Stratégie de présence numérique et recherche	4		4
Lecture rapide de document		12h reportée en mars (11/03 et 17/03)	
Autres activités :			
Apprentis chercheurs	10		10
TOTAL Formations transversales (50 h minimum) :		27,5	65,5
Formations scientifiques	Nombre d'heures suivies	Equivalence attribuée par l'ED	Volume retenu par l'ED (mars 2021)
Formations spécifiques proposées par l'ED nBISE :			
Imagerie cellulaire	15	15	13
Séquençage haut débit	6	6	6
Formation 2 jours Fragment Analyzer et prosize 3.0 (Advanced Analytical Techno	12h		12
TOTAL formations scientifiques :			31
TOTAL Formations (100 h minimum) :			96,5

- Membre du Comité de Suivi Individuel de Florent Lebrun, doctorant (INSERM UMR-S 1237 (PhIND), team A) Université de Normandie, Plateforme Cyceron, CAEN, 14000.
- Participation au dispositif Apprentis chercheurs (L'Arbre des Connaissances) en encadrant deux étudiants durant l'année scolaire 2019/2020 : Robin Molinier, élève de 3^{ème} au Collège Dunois et Asafa Al Ameen, élève de 3^{ème} au Collège Stephen Hawkin. Expérience interrompue par la situation sanitaire liée à la COVID-19.

Séjours à l'étranger

Mars 2019 – Séjour à l'Irish Equine Center (IEC), Naas, Irlande auprès de Ann Culinane et Marie Garvey pour la transmission de la technique de Multi Locus Sequence Typing de l'EHV-1.

Juillet – Aout 2019 – Séjour dans la « Viral Pseudotype Unit », Medway School of Pharmacy, Chatham, Kent, Royaume-Uni, auprès de Simon Scott et Cecilia Di Genova.

ANNEXE 5 : Filière équine, économie

L'EHV-1, lorsqu'il entraîne l'apparition de signes cliniques, représente de grandes contraintes économiques pour la filière équine. Comme décrit par Tara Vollebregt en 2014, en se basant sur le modèle économique d'un centre équestre au Pays-Bas, les dépenses liées à l'EHV-1 peuvent être classées en deux catégories qui sont les dépenses directes et les dépenses indirectes (Vollebregt 2014). Les dépenses directes comprennent principalement :

- Les soins vétérinaires (anti-inflammatoires, antibiotiques, antiviraux, voire sangles pour maintenir les chevaux debout en cas d'atteinte nerveuse sévère ainsi que la main d'œuvre requise pour prodiguer les soins parfois intensifs).
- Les coûts d'analyses médicales pour le diagnostic.
- Les coûts de désinfection du matériel, d'équipement du personnel et des dispositifs à mettre en place dans la structure pour éviter la transmission au sein de la population équine sur place.
- L'euthanasie parfois inévitable en cas de syndrome nerveux ainsi que la prise en charge de la dépouille. De même que lors d'avortements, la perte économique peut s'avérer accrue selon la valeur de l'animal décédé.

En ce qui concerne les dépenses indirectes, elles comprennent :

- Les soins de prévention (prise de température des chevaux ne présentant pas de signe clinique).
- La fermeture des structures hébergeant des chevaux malades pour limiter la circulation du virus et endiguer l'épisode infectieux. Selon le type de structure, (élevage, centre d'entraînement, site dédié à la reproduction, centre équestre), les pertes seront variables et pourront être impactées par une perte de clientèle.
- Le temps de convalescence des animaux affectés. Selon l'activité de ces animaux (compétition, reproduction, enseignement/tourisme), cette perte sera variable mais notable.

En complément de ces coûts viennent s'ajouter ceux liés à l'arrêt des courses et la diminution des performances des chevaux affectés impactant ainsi ce type de revenu.

L'étude économique menée par Tara Vollebregt au sein d'un centre équestre Néerlandais a permis d'estimer une perte économique aux alentours 26 000 euros lors d'un épisode infectieux dans un centre équestre, en prenant en compte les coûts directs et indirects.

Ce modèle d'étude a par ailleurs été comparé à d'autres structures, telles que les haras de reproduction, au sein desquels la perte d'un poulain estimée à 3 000 euros remplacerait celle liée à l'arrêt des cours du centre équestre. Dans ce type de structure, les contacts étant limités entre les chevaux, la propagation du virus est probablement mieux contrôlée. En ce qui concerne les centres d'élevage ou d'entraînement, les chevaux sont généralement plus regroupés, favorisant la propagation du virus. Dans ces cas de figures, les chevaux accueillis pour plusieurs années gagnent de la valeur, ce qui est à prendre en compte dans les coûts en cas de perte de l'animal. Il en est de même pour les haras de pension. Cette analyse ne prend pas en compte les pertes liées à l'arrêt des courses en compétition, mais permet de rendre compte de la portée économique d'un épisode infectieux au sein d'une structure, quelle que soit son activité principale.

Étude phylogénique de souches d'alphaherpèsvirus isolées chez les équidés français et développement d'un outil innovant pour la mesure des anticorps neutralisants après infection ou vaccination.

Mots clés : alphaherpèsvirus ; Equidés ; EHV-1 ; phylogénie; biologie moléculaire ; ADN polymérase ; MLST ; antiviraux ; séroneutralisation; anticorps neutralisants ; analyse cellulaire en temps réel.

Résumé

L'herpèsvirus équin 1 (EHV-1), classé parmi les *Herpesviridae*, est l'un des pathogènes les plus fréquemment rencontrés au sein de la population équine. Ce virus peut être à l'origine de formes de maladie respiratoire, abortive ou néonatale, oculaire ou nerveuse pouvant conduire à l'euthanasie de l'animal. Les mesures de prévention incluant la vaccination constituent la première barrière dans la lutte contre ce virus. En cas d'épizootie, le suivi et l'identification des souches peuvent constituer une aide précieuse pour la compréhension des modes d'infection. Ce travail de thèse a porté sur le suivi moléculaire par différentes approches d'une population de souches d'EHV-1 isolées en France entre 2009 et 2018. Le typage de 137 souches d'EHV-1 pour le polymorphisme en position 2254 du gène de l'ADN polymérase (ORF30) associé à la pathogénicité des souches a montré une association significative des souches de type A₂₂₅₄ avec les cas d'avortements. Quatorze souches d'intérêt ont ensuite été analysées par séquençage de l'ORF30 et Multi Locus Sequence Typing (MLST). Le séquençage complet de l'ORF30 s'est montré peu discriminant mais a permis de mettre en évidence un troisième génotype (C₂₂₅₄ (H₇₅₂)) en position 2254 de l'ORF30. L'analyse par MLST a permis de classer ces souches parmi 7 des 10 clades U_L décrits par l'outil à ce jour. Deux autres souches d'herpèsvirus d'équidés, une d'EHV-8 et une d'EHV-9, ont pu être mises en évidence grâce au séquençage de l'ORF30. Ces différentes souches d'alphaherpèsvirus des équidés ont été caractérisées, comparées et leur sensibilité vis-à-vis de sept molécules antivirales a été évaluée *in vitro*. Leur proximité génétique a pu être visualisée par la construction d'un network phylogénétique basé sur les séquences de l'ORF30. Une seconde partie du travail a porté sur le suivi du niveau de protection conféré par les anticorps neutralisant l'EHV-1. Une technique innovante de quantification a été mise au point grâce à la technologie xCELLigence® sur cellules E. Derm et a permis de déterminer les titres induisant 50% de la neutralisation d'une concentration de virus (NT₅₀) à partir d'une population d'échantillons qualifiés provenant d'une infection expérimentale avec la souche d'EHV-1 C₂₂₅₄. Les valeurs de NT₅₀ obtenues ont montré une bonne corrélation avec les valeurs de titres obtenues avec la méthode de référence sur cellules RK13. Les réponses de chevaux à la vaccination ont ensuite pu être étudiées selon le protocole de vaccination reçu et selon l'historique des chevaux.

Keywords : alphaherpesviruses ; Equids ; EHV-1 ; phylogeny ; molecular biology; DNA polymerase; MLST; antivirals; virus neutralising assay; neutralising antibodies; Real Time Cell Analysis.

Abstract

The equine herpesvirus 1 (EHV-1) is classified among the *Herpesviridae* and is one of the most frequently encountered pathogens in the equine population. This virus can cause a respiratory form of disease, abortion or still-birth, an ocular form of disease or a nervous form of disease that can lead to euthanasia of the animal. Prevention measures including vaccination are the primary barrier against the virus. In case of an epizootic, the tracking and identification of the strains can be a precious help to understand infection mechanisms. This thesis work focused on the molecular monitoring of a population of EHV-1 strains isolated in France between 2009 and 2018 using different approaches. The typing of 137 EHV-1 strains for the polymorphism in position 2254 of the DNA polymerase gene (ORF30) associated with the pathogenicity of the strains showed a significant association of the A₂₂₅₄ genotype with abortion cases. Fourteen strains of interest were then analysed using ORF30 sequencing and Multi Locus Sequence Typing (MLST). Complete ORF30 sequencing resulted in poor discrimination but allowed a third genotype (C₂₂₅₄ (H₇₅₂)) to be identified in position 2254 of the ORF30. MLST analysis allowed classifying these strains among 7 of the 10 U_L clades described with this tool to date. Two other equid herpesvirus strains, one EHV-8 and one EHV-9, were identified using ORF30 sequencing. These different strains of equid alphaherpesviruses were characterised, compared and their sensitivity towards seven antiviral molecules was evaluated *in vitro*. Their genetic proximity could be visualised in a phylogenetic network based on the ORF30 sequences. A second part of the work focused on monitoring the level of protection conferred by EHV-1 neutralizing antibodies. An innovative quantification assay was developed using the xCELLigence® technology on E. Derm cells and allowed to determine the titres inducing 50% of the neutralisation of a virus concentration (NT₅₀) from a population of qualified serum samples taken during an experimental infection with the EHV-1 C₂₂₅₄ strain. The NT₅₀ values obtained were correlated with the titre values obtained with the reference method on RK13 cells. The response of a horse population to vaccination was then studied according to the vaccination protocol received and the history of the horses.