

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine Vétérinaire

Titre de la thèse en français : Etude du gène Bo17 de l'herpèsvirus bovin 4

Titre de la thèse en anglais : Study of the bovine herpesvirus 4 Bo17 gene

Candidat : Nicolas Markine-Goriaynoff

Promoteur : Dr. A. Vanderplasschen

Co-promoteur : -

Département et Service : département des Maladies Infectieuses et Parasitaires. Service d'Immunologie-Vaccinologie

Date de la défense publique : le 23 mars 2003

Composition du Jury : P. Kerkhofs, L. Willems, J.-M. Godeau, P.-P. Pastoret, A. Vanderplasschen, F. Coignoul, D. Desmecht, L. Grobet, F. Rollin, E. Thiry

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

L'herpèsvirus bovin 4 (BoHV-4) est un gammaherpèsvirus bovin appartenant au genre *Rhadinovirus* au même titre que l'herpèsvirus humain 8 (HHV-8), l'agent responsable du sarcome de Kaposi (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003a). Le BoHV-4 a été isolé de par le monde, de bovins sains ou atteints de pathologies diverses. Son rôle en tant qu'agent étiologique d'une entité précise reste un sujet de controverses. Le BoHV-4 intéresse la communauté scientifique parce qu'il procure l'opportunité d'étudier la biologie d'un gammaherpèsvirus par l'infection de son hôte naturel. Par ailleurs, ce virus représente un candidat potentiel comme vecteur d'expression, en vaccinologie notamment. Le génome du BoHV-4 a récemment été séquencé et apparaît particulièrement pauvre en gènes de virulence (Zimmermann *et al.*, 2001). Néanmoins, son extrémité droite possède une séquence, nommée BORF F3-4 puis Bo17, présentant un très haut degré d'homologie avec un gène humain exprimant une enzyme de la famille des β -1,6-Nacétylglucosaminyltransférases (β 1,6GnT) : la h-C2GnT-M (core 2 β -1,6-Nacétylglucosaminyltransférase humaine de type mucinique). Cette découverte est fascinante à plus d'un titre. Tout d'abord, parce que tous les membres de la famille des β 1,6GnTs sont impliqués dans des processus biologiques majeurs, notamment liés à l'immunité et aux différenciations cellulaires et tissulaires (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2004b). Ceci laisse supposer que Bo17 pourrait jouer un rôle clef dans la biologie du BoHV-4. Aucun autre virus n'étant connu pour exprimer une β 1,6GnT, le BoHV-4 pourrait représenter un modèle uni-

que pour l'étude de la biologie complexe de cette famille enzymatique dans le contexte d'une infection virale. Ensuite, le haut degré de conservation de cette séquence virale d'origine cellulaire est peut-être l'indice d'une acquisition très récente par l'ancêtre du BoHV-4 actuel. L'ORF (*Open Reading Frame* ou cadre de lecture ouvert) Bo17 constitue par là un modèle adéquat pour étudier l'origine et l'évolution d'un gène d'herpèsvirus acquis aux dépens de son hôte.

Les objectifs du travail s'articulent autour de trois études originales. Le premier volet expérimental (Etude 1) visait à déterminer (i) si l'ORF Bo17 peut être considérée comme un gène, à savoir si cette séquence est exprimée lors de l'infection virale, et (ii) si le produit d'expression de Bo17 est un homologue fonctionnel de la h-C2GnT-M, à savoir s'il est capable de catalyser la synthèse des structures core 2, core 4 et I.

Les objectifs du second volet expérimental (Etude 2) étaient de déterminer : (i) l'espèce hôte aux dépens de laquelle la séquence de l'ORF Bo17 a été acquise par le BoHV-4 au cours de son évolution, (ii) la date approximative de l'acquisition de Bo17 par le BoHV-4, et (iii) une estimation du taux de mutations survenues au sein de la séquence de Bo17 consécutivement à son intégration dans le génome viral.

Le dernier volet expérimental (Etude 3) consistait à (i) déterminer si le fait d'exprimer une activité core 2 lors de la multiplication virale est une propriété de souches ou d'espèce, (ii) créer un virus délété pour la séquence de Bo17, et (iii) caractériser ce virus recombinant *in vitro*.

RÉSULTATS

La première partie de ce travail concernait l'étude des propriétés de l'ORF Bo17 du BoHV-4 et de son produit d'expression éventuel (Markine-Goriaynoff/Vanderplasschen *et al.*, 2000). Tout d'abord, une approche RT-PCR a permis de déterminer que cette séquence est un gène exprimé au cours de la multiplication virale *in vitro*. Ensuite, des cellules CHO-Py-leu dépourvues des activités enzymatiques de branchement core 2 et I ont été transfectées à l'aide d'un plasmide d'expression dans lequel le gène Bo17 avait été cloné. Ces cellules ont été soumises à un marquage immunofluorescent utilisant des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement à l'encontre des structures core 2 et I. Cette expérience a permis de montrer que le produit d'expression de Bo17 est doué des activités de branchement core 2 et I. Ces résultats ont été confirmés par un test enzymatique *in vitro* qui a également permis de montrer que le domaine catalytique pBo17 est doué de l'activité enzymatique de branchement core 4. Mis ensemble, ces résultats montrent que pBo17 constitue un homologue fonctionnel de la C2GnT-M humaine. Enfin, un protocole expérimental utilisant des cellules permissives à la multiplication virale et dépourvues d'activité enzymatique core 2 a permis de montrer que l'activité de branchement core 2 est exprimée au cours de la multiplication virale *in vitro*. Cette première étude montre donc que la séquence Bo17 du BoHV-4 constitue un gène exprimé au cours de la multiplication virale et dont le produit d'expression est un homologue fonctionnel de la C2GnT-M humaine, responsable au moins de l'apparition de structures glycosidiques de type core 2 au cours de la multiplication virale *in vitro*.

La seconde partie de ce travail consistait en une étude de l'origine et de l'évolution du gène Bo17 du BoHV-4 (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003b). Nous avons tout d'abord étudié la variation existant au sein des séquences Bo17 de neuf souches représentatives de l'espèce BoHV-4. L'analyse de ces données a révélé que la séquence Bo17 a été soumise à une forte contrainte de sélection visant à préserver la fonction de ce gène. Ce résultat suggère que Bo17 joue un rôle important dans la biologie du BoHV-4. Dans



Le BoHV-4 a acquis le gène Bo17 aux dépens d'un ancêtre du buffle africain il y a approximativement 1,5 millions d'années.

un deuxième temps, nous avons investigué l'origine du gène Bo17 du BoHV-4. Dans ce but, le gène C2GnT-M de plusieurs espèces de ruminants a été séquencé. Les espèces sélectionnées étaient les bovins domestiques (*Bos taurus*), le yak (*Bos grunniens*), le buffle africain (*Syncerus caffer*), le mouton (*Ovis aries*), le cerf (*Cervus elaphus*) et la girafe (*Giraffa camelopardalis*). L'analyse de ces séquences a révélé que le gène Bo17 du BoHV-4 a été acquis d'un ancêtre du buffle africain bien après la séparation des lignées *bos* et *syncerus*. La date d'acquisition a été estimée à plus ou moins 1,5 millions d'années. Cette observation fait du gène Bo17 du BoHV-4, le gène d'origine cellulaire le plus récent décrit chez un herpesvirus. Malgré cette acquisition récente, l'analyse de 34 souches de BoHV-4 isolées de par le monde a révélé que l'ensemble des souches actuelles possède le gène Bo17. Les données phylogéniques de cette étude associées aux données épidémiologiques indiquant la présence massive du BoHV-4 au sein de la niche buffle africain (Rossiter *et al.*, 1989) suggèrent que cette espèce pourrait être considérée comme le véritable hôte naturel du BoHV-4. La haute séroprévalence envers le BoHV-4 observée chez les buffles africains pourrait être le reflet d'un avantage sélectif conféré par le virus à son hôte, peut-être par le biais d'une protection immunitaire croisée vis-à-vis d'un autre gammaherpesvirus, l'alcélaphine herpesvirus 1, l'agent étiologique du coryza gangreneux (Rossiter *et al.*, 1989). En conclusion, cette étude fait du gène Bo17 l'exemple le plus récent et le mieux caractérisé d'acquisition d'un gène par un herpesvirus. Cette étude soulève également certains points de discussion intéressants par rapport à l'histoire et à la biologie du BoHV-4.

La troisième et dernière partie de ce travail visait à compléter l'étude des fonctions biologiques du gène Bo17 (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2004a). Tout d'abord, nous avons analysé la capacité d'un ensemble de souches représentatives de l'espèce BoHV-4 à induire l'apparition de structure core 2 au cours de la multiplication virale. Les résultats de ces expériences suggèrent que cette propriété est conservée au sein de l'espèce BoHV-4. Ces résultats constituent une extension des conclusions de la première étude de ce travail (étude réalisée sur la souche de référence belge de BoHV-4) et suggèrent que si le gène Bo17 a été fixé dans la population virale (Etude 2), il en est de même pour sa fonction. Dans un deuxième temps, l'étude des fonctions d'une protéine virale passe par la caractérisation de l'effet de la délétion du gène d'intérêt sur la biologie de l'infection virale. De manière à concrétiser cette approche, une souche recombinante délétée pour le gène d'intérêt a été produite, ainsi qu'une souche révertante validant l'utilisation de la souche délétée. Ces souches ont été comparées *in vitro* à la souche sauvage pour l'efficacité de production de particules virales infectieuses après inoculation d'un tapis cellulaire à forte ou à faible multiplicité d'infection. Ces souches ont également été comparées pour la taille et la morphologie des plages de lyses en fonction du temps. Les résultats de ces expériences montrent que la délétion de Bo17 n'a pas d'incidence sur la biologie de l'infection *in vitro*. Enfin, les protéines de structures des souches sauvage, délétée et révertante ont été purifiées et

analysées en électrophorèse protéique à deux dimensions. Les résultats de ces expériences indiquent que le gène Bo17 intervient dans la maturation post-traductionnelle des protéines de structure du BoHV-4.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le présent travail avait pour but l'étude de l'ORF Bo17 du BoHV-4. Les résultats obtenus ont révélé un gène fascinant à plus d'un titre. Premièrement, il a pu être établi que le gène Bo17 code pour un homologue fonctionnel de la C2GnT-M cellulaire, un membre de la famille protéique des β 1,6GnTs, pour laquelle aucun homologue viral n'avait été décrit avant ce travail (Etude 1). Notons qu'à ce jour, le gène Bo17 reste le seul gène viral connu pour exprimer pour une β 1,6GnT. Deuxièmement, l'analyse phylogénique du gène Bo17 a permis d'estimer que son acquisition est survenue il y a approximativement 1,5 millions d'années (Etude 2). Cette observation fait de Bo17 le gène d'origine cellulaire le plus récent décrit chez un herpesvirus. Troisièmement, l'analyse phylogénique du gène Bo17 a permis de démontrer qu'il a été acquis d'un ancêtre du buffle africain et non pas d'un ancêtre des bovins domestiques. Ce fait, allié à certaines données sérologiques et épidémiologiques, nous oblige à reconsidérer l'espèce hôte principale du BoHV-4, ainsi que la taxonomie de ce virus. Quatrièmement, bien qu'ayant une origine extrêmement récente, le gène Bo17 et sa fonction core 2 β 1,6GnT semblent avoir été fixés dans l'espèce BoHV-4 (Etudes 2 et 3). Ces observations suggèrent que Bo17 est responsable d'une fonction biologique importante pour le virus. Cinquièmement, la délétion du gène Bo17 a révélé son caractère non essentiel pour la multiplication virale *in vitro* (Etude 3). Cette observation suggère que les fonctions biologiques de Bo17, responsables de la sélection positive des souches virales qui possèdent ce gène, s'exercent exclusivement *in vivo*. Les membres de la famille des β 1,6GnTs sont impliqués dans des processus biologiques majeurs, notamment liés à l'immunité, au développement, à la différenciation cellulaire et à l'oncodifférenciation (Piller *et al.*, 1988; Fukuda, 1994; Shimodaira *et al.*, 1997; Tsuboi et Fukuda, 2001). Sur cette base, diverses hypothèses de travail attrayantes peuvent être proposées quant aux rôles du gène Bo17 dans la biologie de l'infection du BoHV-4 *in vivo*. Sixièmement, le produit d'expression du gène Bo17 est impliqué dans la maturation post-traductionnelle des

protéines de structure du BoHV-4 (Etude 3). Cette observation suggère que les fonctions biologiques de Bo17 s'exercent par l'intermédiaire des structures glycosidiques générées par le produit d'expression de Bo17 à la surface du virion, voire de la cellule infectée. Concernant les virions, il serait intéressant de comparer les virions sauvage, délété pour Bo17 et révertant quant à leur résistance à la neutralisation par anticorps et/ou par le système du complément et quant à leur tropisme pour divers types cellulaires. En ce qui concerne les cellules infectées par les trois types viraux décrits ci-dessus, elles pourraient être comparées quant à leur résistance vis-à-vis de diverses composantes du système immunitaire telles que la cytotoxicité dépendante du complément et des anticorps, l'action cytotoxique des lymphocytes T ou de cellules NK. Enfin, une dernière hypothèse plausible serait que l'expression de Bo17 contribue en l'exposition à la surface de la cellule infectée de ligands pour les molécules de sélectines. Ces ligands pourraient permettre aux cellules mononucléées sanguines supportant l'infection virale de s'attacher aux endothéliums vasculaires et contribueraient ainsi en la marginalisation de la cellule.

En conclusion, ce travail avait pour but l'étude de l'ORF Bo17 du BoHV-4, une séquence virale qui reste unique à ce jour. Les données générées par ce travail auront révélé un gène fascinant. Parmi les gènes d'herpesvirus homologues de gènes cellulaires, Bo17 apparaît comme celui ayant l'origine la plus récente. L'identification de son origine aura permis de retracer le parcours évolutif du BoHV-4 au cours des derniers 1,5 millions d'années et d'établir que ce virus doit être considéré comme un virus du buffle africain. Enfin, le gène Bo17 étant à ce jour le seul gène viral connu pour exprimer une β 1,6GnT, le BoHV-4 procure une opportunité unique pour étudier les fonctions d'une β 1,6GnT exprimée dans le contexte d'une infection virale.

REMERCIEMENTS

N. Markine-Goriaynoff est aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS). Ce travail a été supporté par une action concertée de la Communauté Française de Belgique (ARC 98/03-220), par une subvention du *U. S. National Cancer Institute* CA33000 et par différentes subventions du FNRS.

RÉFÉRENCES

- FUKUDA M. Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression. In: FUKUDA M., HINDSGAUL O. (Eds.), *Molecular Glycobiology*. Oxford University Press: Oxford, 1994, 1-52.
- PILLER F., PILLER V., FOX R.I., FUKUDA M. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem*, 1988, **263**, 15146-15150.
- ROSSITER P.B., GUMM I.D., STAGG D.A., CONRAD P.A., MUKOLWE S., DAVIES F.G., WHITE H. Isolation of bovine herpesvirus-3 from African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Res Vet Sci*, 1989, **46**, 337-343.
- SHIMODAIRA K., NAKAYAMA J., NAKAMURA N., HASEBE O., KATSUYAMA T., FUKUDA M. Carcinoma-associated expression of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: role of O-glycans in tumor progression. *Cancer Res*, 1997, **57**, 5201-5206.
- TSUBOI S., FUKUDA M. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *Bioessays*, 2001, **23**, 46-53.
- ZIMMERMANN W., BROLL H., EHLERS B., BUHK H.J., ROSENTHAL A., GOLTZ M. Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol*, 2001, **75**, 1186-1194.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- MARKINE-GORIAYNOFF N., VANDERPLASSCHEN A., LOMONTE P., SUZUKI M., HIRAOKA N., YEH J.C., BUREAU F., WILLEMS L., THIRY E., FUKUDA M., PASTORET P.P. A multipotential beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase is encoded by bovine herpesvirus type 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**, 5756-5761.
- MARKINE-GORIAYNOFF N., MINNER F., DE FAYS K., GILLET L., THIRY E., PASTORET P.-P., VANDERPLASSCHEN A. L'Herpèsvirus Bovin 4. *Ann. Méd. Vét.*, 2003a, **147**, 215-247.
- MARKINE-GORIAYNOFF N., GILLET L., VAN ETTEN, J.L., KORRES, H., VERMA, N. & N., VANDERPLASSCHEN A. Glycosyltransferases encoded by viruses. *Accepted for publication in J Gen Virology*, 2004b.
- MARKINE-GORIAYNOFF N., GEORGIN J.P., GOLTZ M., ZIMMERMANN W., BROLL H., WAMWAYI H.M., PASTORET P.P., SHARP P.M., VANDERPLASSCHEN A. The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase-mucin encoded by bovine herpesvirus 4 was acquired from an ancestor of the African buffalo. *J Virol*, 2003b, **77**, 1784-1792.
- MARKINE-GORIAYNOFF N., GILLET L., KARLSEN O.A., HAARR L., MINNER F., PASTORET P.P., FUKUDA M., VANDERPLASSCHEN A. The core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-M encoded by Bovine herpesvirus 4 is not essential for viral replication despite contributing to post-translational modifications of structural proteins. *J. Gen. Virol.*, 2004a, **85**, 355-367.