

## Résumé de thèse de doctorat

### Etude des interactions entre l'herpèsvirus bovin 4 et les cellules humaines

#### *Study of the interactions between bovine herpesvirus 4 and human cells*

CANDIDAT : Laurent Gillet

PROMOTEUR : Docteur A. Vanderplasschen

#### Département et Service

Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Service d'Immunologie-Vaccinologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique : 18 mars 2005

#### Composition du Jury

• MEMBRES EXTÉRIEURS À LA FACULTÉ :

Docteur G. Donofrio, University of Parma, Italie

Docteur L. Willems, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, Belgique

• MEMBRES INTERNES À LA FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE :

Professeur P. Gustin, Professeur P.-P. Pastoret, Professeur F. Rollin, Professeur E. Thiry, Docteur F. Bureau, Docteur D. Desmecht, Docteur L. Grobet, Docteur A. Vanderplasschen

#### **DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ**

L'herpèsvirus bovin 4 (BoHV-4) est un gammaherpesvirus très répandu dans la population des bovins domestiques. Divers scénarios permettent d'envisager une éventuelle contamination de l'homme par ce gammaherpesvirus. Tout d'abord, la présence du virus dans diverses sécrétions biologiques des animaux infectés a été démontrée (jetage nasal, écoulement vulvaire). Dès lors, les éleveurs ou les vétérinaires pourraient se contaminer lors des soins prodigués aux bovins. Ensuite, la présence du virus dans le lait a également été établie suggérant la possibilité d'une contamination de l'homme par le biais de l'alimentation. Enfin, le BoHV-4 est un contaminant fréquent du sérum de veau foetal intervenant

directement ou indirectement dans la composition de vaccins ou de préparations pharmacologiques injectables destinés à l'homme.

Vu la possibilité de contamination de l'homme par le BoHV-4, plusieurs équipes de recherches ont investigué la capacité de ce virus à infecter des cellules humaines. Ces études, bien que sommaires, ont révélé la sensibilité et/ou la permissivité de certaines lignées cellulaires humaines.

L'étude de la transmission d'un virus entre espèces hôtes doit impliquer deux notions : le risque de la transmission et le danger lié à cette transmission. Le risque de transmission d'un virus à une espèce non naturelle dépend de la fréquence du virus dans la nature, de l'existence d'événements permettant le passage du virus de l'espèce hôte

vers des espèces non naturelles et de la capacité du virus à franchir la barrière d'espèce. Le danger associé à la transmission inter-espèces est quant à lui principalement déterminé par le contenu du génome viral.

De nombreux membres de la sous-famille des *gammaherpevirinae* à laquelle appartient le BoHV-4 possèdent des gènes homologues de gènes cellulaires dont l'expression contribue à la transformation oncogénique de la cellule infectée. La comparaison entre les génomes des prototypes de la sous-famille des *gammaherpevirinae* et celui du BoHV-4 révèle que ce dernier possède comparativement peu de gènes susceptibles de conférer un pouvoir oncogénique. Néanmoins, le BoHV-4 possède 2 régulateurs potentiels de la survie cellulaire : une *v-bcl-2* (*viral B-cell lymphoma*) (ORF16) et

une v-FLIP (*viral FLICE Inhibitory Protein*) (ORF71) (Zimmermann *et al.*, 2001). Ces gènes interviennent dans l'inhibition de l'apoptose cellulaire, une des étapes nécessaires à la transformation cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000).

En conclusion, de nombreuses observations issues d'études épidémiologiques mais aussi de recherches en biologies cellulaire et moléculaire soutiennent tant la possibilité de l'existence d'un risque de transmission du BoHV-4 à l'homme que le danger potentiel lié à cette transmission. De plus amples études sont nécessaires pour cerner le risque et le danger potentiels associés à une éventuelle transmission du BoHV-4 à l'homme. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont eu pour but de répondre à ces questions.

## RÉSULTATS

Les résultats générés par ce travail s'articulent autour de 3 études.

Dans la première étude, des expériences *in vitro* ont été réalisées afin d'évaluer les risques et les conséquences d'une infection de l'homme par le BoHV-4. Dans un premier temps, en utilisant une souche de BoHV-4 recombinante exprimant la protéine EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) sous contrôle du promoteur précoce immédiat du cytomégalovirus humain, nous avons testé la sensibilité et la permissivité de 21 lignées cellulaires humaines. Ces expériences ont montré que les lignées cellulaires humaines d'origine lymphoïde et myéloïde sont résistantes à l'infection, alors que les cellules épithéliales, carcino-mateuses ou adénocarcino-mateuses isolées de divers organes sont sensibles mais peu permissives à l'infection par le BoHV-4. Dans un second temps, en prenant les cellules HeLa comme modèle de cellule sensible mais non permissive à l'infection par le BoHV-4, nous avons investigué la résistance des cellules infectées à l'apoptose et la persistance de l'infection au cours des divisions cellulaires. Les résultats obtenus peuvent être résumés comme suit : (i) l'infection des cellules HeLa par le BoHV-4 les protège de l'apoptose induite via le TNF- $\alpha$  ; (ii) l'infection non répliquative du BoHV-4 persiste en culture cellulaire, bien que le pourcentage de cellules infectées décroît au cours du temps à cause d'une transmission erratique

du génome viral lors des divisions cellulaires ; et (iii) l'infection par le BoHV-4 n'a pas d'effet sur le taux de division des cellules HeLa.

A côté des interactions entre le BoHV-4 et les cellules humaines mises en évidence dans la première étude, un autre type d'interaction a été mis en évidence et rapporté dans une seconde étude. Dans cette étude, nous avons observé que l'infection par le BoHV-4 provoque la mort par apoptose de certaines lignées cellulaires provenant de certains carcinomes humains. Une investigation plus poussée a permis de démontrer que l'expression d'un ou de plusieurs gènes du BoHV-4 était à l'origine de ce phénomène. De manière intéressante, la mort de ces cellules par apoptose implique l'activation de la caspase 10 dont les rôles sont à ce jour peu connus. Plusieurs études ont proposé l'utilisation de certains virus dans le but d'induire la lyse des cellules cancéreuses ; un concept appelé viro-oncolyse et qui représente un nouvel espoir en thérapies cancéreuses (Chiocca, 2002). Sur base des observations décrites ci-dessus, nous avons entrepris de tester le potentiel du BoHV-4 en tant que virus oncolytique. *In vitro*, nous avons montré que l'infection par le BoHV-4 pouvait induire de manière sélective la mort par apoptose des lignées cellulaires carcino-mateuses sensibles. *In vivo*, les résultats générés montrent que l'injection intra-tumorale du BoHV-4 réduit de manière significative la croissance de tumeurs humaines xénotransplantées dans des souris immunodéficientes.

Les résultats obtenus au cours de ces deux premières études illustrent la complexité des interactions virus – cellule hôte et la diversité de leur manifestation ; l'interaction du protéome viral et du protéome cellulaire aboutissant à une inhibition ou à une induction du processus apoptotique. L'identification des gènes responsables de ces deux phénomènes opposés requiert la construction de nombreux virus recombinants délétés pour chacun des gènes candidats. Les techniques de mutagenèse virale par recombinaison homologue en cellules eucaryotes utilisées habituellement étant longues et coûteuses, une méthode plus rapide de mutagenèse virale devait être développée. Récemment, la manipulation des génomes d'herpèsvirus a été facilitée par l'utilisation de Chromosomes Bactériens Artificiels (BAC) (Wagner *et al.*, 2002). Ces vecteurs permettent

le maintien stable et la mutagenèse des génomes viraux au sein de souches d'*E. coli* ; et ensuite, la reconstitution de virions par transfection des plasmides BAC modifiés au sein de cellules eucaryotes permissives. La troisième étude de ce travail a consisté à cloner le génome du BoHV-4 sous forme d'un BAC infectieux et à démontrer la possibilité de modifier le génome du BoHV-4 en exploitant les techniques de mutagenèse procaryotes.

Dans cette étude, le génome du BoHV-4 a d'abord été cloné sous forme d'un BAC en exploitant deux approches. Chacune de ces deux approches a permis l'obtention de clones « BoHV-4 BAC » maintenus de manière stable en bactérie et capables d'induire la production de particules virales infectieuses une fois transfectés dans des cellules permissives. Ces virus reconstitués se sont répliqués de manière comparable à la souche parentale sauvage. Enfin, l'infection de cellules exprimant la Cre recombinase a été testée avec succès comme méthode permettant d'exciser la cassette BAC flanquée de séquences *loxP*. Dans un deuxième temps, la possibilité de produire des virus BoHV-4 recombinants en exploitant les techniques de mutagenèse procaryotes a été investiguée. Pour ce faire, des souches virales recombinantes exprimant des protéines salivaires anti-complément de la tique *Ixodes ricinus* (IRAC I et IRAC II) ont été générées grâce à une méthode rapide de mutagenèse en deux étapes au sein de bactéries *E. coli*. Les deux souches recombinantes ont induit une forte expression de protéines IRAC fonctionnelles par les cellules infectées. Cette troisième étude a donc permis de cloner le BoHV-4 sous la forme d'un BAC manipulable par les techniques de mutagenèse procaryotes. Ce pas technologique important permettra à l'avenir une production rapide des virus recombinants nécessaires pour poursuivre l'étude des interactions entre le BoHV-4 et les cellules humaines.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats générés au cours de ce travail montrent que le BoHV-4 pourrait infecter l'homme. La première étude montre que, bien qu'aucune pathologie humaine n'ait été associée à l'infection par ce gammaherpèsvi-

rus, l'expression de certains gènes du BoHV-4 à propriété anti-apoptotique est potentiellement dangereuse pour la santé humaine. Cette étude souligne également qu'il est important de prendre en considération l'effet insidieux d'une infection non permissive lorsqu'on évalue la biosécurité d'une infection virale inter-espèce.

A côté de ce caractère potentiellement nocif pour l'homme, la seconde étude montre que le BoHV-4 exprime également des gènes dont le produit d'expression, exprimé dans le contexte d'un protéome cellulaire particulier, induit l'apoptose de certaines lignées cellulaires humaines carcinomateuses. L'exploitation de cette propriété *in vivo* a par ailleurs permis de ralentir de manière significative la croissance de tumeurs humaines xénotransplantées à des souris immunodéficientes. Les résultats générés dans cette seconde étude suggèrent que le BoHV-4 pourrait avoir un potentiel en tant qu'agent viro-onco-apoptotique pour le traitement de certains carcinomes humains.

Les résultats obtenus au cours de ces deux premières études, bien qu'apparemment opposés, ne sont pas contradictoires. Des phénomènes similaires ont été observés pour d'autres gammaherpèsvirus. Il paraît en effet probable que les virus interfèrent de manière différente au sein des voies apoptotiques cellulaires selon le stade de l'infection virale et le transcriptome cellulaire avec lequel ils interagissent. D'un point de vue viral, l'inhibition de l'apoptose au stade précoce de l'infection lytique ou durant l'infection latente permettrait respec-

tivement de maximiser la production virale ou la survie de la cellule supportant l'infection latente. Par ailleurs, l'induction de l'apoptose en fin d'infection lytique par certains virus pourrait représenter un moyen efficace de dissémination échappant à une partie de la réponse immunitaire de l'hôte.

Jusqu'à présent, les études de la manipulation des voies apoptotiques cellulaires par les virus se sont principalement focalisées sur l'étude des voies d'inhibition de l'apoptose. L'intérêt préférentiel pour l'étude des voies d'inhibition de l'apoptose se justifie par leur implication dans les phénomènes de développement de cancers. Dans le futur, l'étude des mécanismes utilisés par les virus afin d'induire l'apoptose ainsi que l'identification des gènes viraux impliqués dans ces phénomènes pourrait amener à mieux comprendre les voies apoptotiques cellulaires. Dans le passé, l'étude des mécanismes par lesquels les virus interagissent avec leur hôte ont déjà permis de découvrir de nouveaux mécanismes moléculaires de l'hôte ; citons à titre d'exemple la découverte des protéines virales v-FLIPs (Thome *et al.*, 1997) qui a permis la découverte de leur homologue cellulaire, la protéine c-FLIP (Irmeler *et al.*, 1997). En plus de leur intérêt fondamental évident, ces études pourraient également conduire à la découverte de nouvelles molécules inductrices d'apoptose potentiellement utilisables en thérapies anti-cancéreuses.

L'étude de phénomènes chez le BoHV-4 nécessitait une méthode rapide et précise de mutagenèse du génome

viral. Le clonage du génome du BoHV-4 en tant que Chromosome Bactérien Artificiel Infectieux, couplé aux méthodes de mutagenèse en système procaryote permet maintenant d'atteindre ce but. Dans le futur, l'utilisation de systèmes de mutagenèse aléatoire par transposition permettra de générer une banque de virus mutés aléatoirement. L'analyse de cette banque pourrait ainsi dans un avenir proche permettre l'identification des gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose par le BoHV-4.

En conclusion, ce travail suggère que les interactions entre le BoHV-4 et les cellules humaines sont nombreuses et complexes. Les données générées illustrent la complexité des interactions virus-cellule hôte et la diversité de leur manifestation, le devenir d'une infection virale dépendant de l'interaction des deux variables que sont les protéomes viraux et cellulaires. Les résultats générés pourraient avoir dans l'avenir des implications tant fondamentales qu'appliquées.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à l'octroi d'un mandat d'Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS). Ce travail a été supporté par différentes subventions : « Recherche d'initiative du Ministère de la Région wallonne » programme n°14628, « Service public et Fédéral santé publique, sécurité de la chaîne alimentaire et environnement » programme n°S-6146 et différentes subventions du FNRS.

---

## RÉFÉRENCES

- CHIOCCA E.A. Oncolytic viruses. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**, 938-950.
- HANAHAHAN D., WEINBERG R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, **100**, 57-70.
- IRMLER M., THOME M., HAHNE M., SCHNEIDER P., HOFMANN K., STEINER V., BODMER J.L., SCHROTER M., BURNS K., MATTMANN C., RIMOLDI D., FRENCH L.E., TSCHOPP J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997, **388**, 190-195.
- THOME M., SCHNEIDER P., HOFMANN K., FICKENSCHER H., MEINL E., NEIPEL F., MATTMANN C., BURNS K., BODMER J.L., SCHROTER M., SCAFFIDI C., KRAMMER P.H., PETER M.E., TSCHOPP J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, 1997, **386**, 517-521.
- WAGNER M., RUZSICS Z., KOSZINOWSKI U.H. Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.*, 2002, **10**, 318-324.
- 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

- GILLET L., DAIX V., DONOFRIO G., WAGNER M., KOSZINOWSKI U.H., CHINA B., ACKERMANN M., MARKINE-GORAYNOFF N., VANDERPLASSCHEN A. Development of Bovine Herpesvirus 4 as an expression vector using BAC cloning and prokaryotic recombination technologies. *J. Gen. Virol.*, 2005, **86**, 907-917.
- GILLET L., DEWALS B., FARNIR F., DELEVAL L., VANDERPLASSCHEN A. Bovine herpesvirus 4 induces apoptosis of human carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 2005, **65**, 9463-9472.
- GILLET L., MINNER F., DETRY B., FARNIR F., WILLEMS L., LAMBOT M., THIRY E., PASTORET P.P., SCHYNTS F., VANDERPLASSCHEN A. Investigation of the susceptibility of human cell lines to bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Virol.*, 2004, **78**, 2336-2347.
- GILLET L., VANDERPLASSCHEN A. Viral subversion of the immune system. In : Harinder Makkar, Viljoen G.J. (Eds.), Application of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Springer : Dordrecht, 2005, 257-292.