

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

- Orientation :** Médecine vétérinaire
- Titre de la thèse en français :** Contributions à l'étude de la relation évolutive entre deux herpesvirus d'artiodactyles africains : l'herpesvirus bovin 4 et l'herpesvirus alcélaphin 1
- Titre de la thèse en anglais :** Contributions to the study of the evolutive relationship between two herpesviruses infecting african artiodactyls: bovine herpesvirus 4 and alcelaphine herpesvirus 1
- Candidat :** Benjamin Dewals
- Promoteur :** Dr. Alain Vanderplasschen
- Département et Service :** Département des Maladies infectieuses et parastaires, Immunologie-Vaccinologie
- Date de la défense publique :** le 13 janvier 2006
- Composition du Jury :**
- Membres externes à la Faculté :*
L. Willems (FUSAGx), P. Kerkofs (CERVA-CODA).
- Membres internes à la Faculté de Médecine vétérinaire:*
L. Grobet, A. Linden, B. Losson, J.-F. Beckers, P. Lekeux, F. Bureau.

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

L'herpesvirus alcélaphin 1 (AIHV-1) est un gammaherpèsvirus du genre *rhadinovirus* de gnou (*Connochaetes taurinus*) chez lequel l'infection est asymptomatique. L'AIHV-1 est de toute évidence un virus particulièrement bien adapté à son hôte naturel, le gnou. Cette adaptation est démontrée par la prévalence très élevée de l'infection et par son caractère asymptomatique. Lors des épisodes de réactivation virale, le gnou contamine d'autres espèces de ruminants avec lesquelles il partage ses aires de pâturage (Plowright, 1990). Chez ceux-ci, l'AIHV-1 induit une pathologie complexe le plus souvent létale connue sous le nom de coryza gangreneux (CG). En terme d'évolution, l'AIHV-1 représente une véritable arme biologique permettant aux troupeaux de gnous de réguler les espèces avec lesquelles ils entrent en compétition pour

l'herbe. De plus, les animaux atteints de CG représentant des proies faciles pour les grands carnivores, ceux-ci se désintéressent donc des gnous et de leurs progénitures. L'AIHV-1 étant parfaitement adapté à son hôte naturel, on peut donc décrire la relation AIHV-1/gnou comme une association durable et réciproquement profitable entre deux entités biologiques, ce qui est précisément la définition d'une symbiose. D'un point de vue expérimental, l'infection de lapins par l'AIHV-1 reproduit une pathologie en tous points comparable à celle développée chez les espèces naturellement sensibles au CG (Edington *et al.*, 1979 ; Buxton et Reid, 1980). Malgré la disponibilité de ce modèle expérimental, l'étude de la pathogénie du CG et le développement d'un vaccin permettant de protéger les espèces sensibles n'ont que fort peu progressé au cours des deux dernières décennies. Cette carence s'explique prin-

ciellement par la propriété intrinsèque de l'AIHV-1 à perdre son pouvoir pathogène lors de sa multiplication *in vitro* (Handley *et al.*, 1995). Cette propriété rend hasardeuse la préparation d'un inoculum destiné à reproduire expérimentalement la maladie, et empêche toute stratégie de production de virus recombinants par des approches classiques.

Le BoHV-4 est un autre *rhadinovirus* qui semble également particulièrement bien adapté à ses espèces hôtes naturelles, les bovins et le buffle africain chez lesquelles il ne semble induire aucune pathologie sévère. De nombreuses études sérologiques et virologiques réalisées de part le monde ont révélé le rôle de l'espèce bovine en temps que réservoir du BoHV-4 (Wellenberg *et al.*, 1999 ; Graham *et al.*, 2005). Des études sérologiques et virologiques ont également été réalisées pour l'espèce buffle africain. Ces études limitées à une région restreinte de l'Afrique

de l'Est (Rossiter *et al.*, 1989) suggèrent une prévalence très élevée de l'infection. Le rôle du buffle africain en temps qu'espèce hôte naturelle du BoHV-4 a récemment été renforcé par une étude phylogénétique démontrant que le gène Bo17 du BoHV-4 a été acquis il y a approximativement 1,5 million d'années d'un ancêtre du buffle africain, soit bien après la séparation des lignées *Syncerus* et *Bos* (12-14 millions d'années) (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2003). Cette même étude phylogénétique, basée exclusivement sur l'analyse du gène Bo17, suggère que les souches de BoHV-4 isolées de bovins et du buffle africain ont divergé il y a quelques 700.000 ans.

Les buffles africains côtoient régulièrement dans leur biotope naturel des troupeaux de gnous infectés par l'AIHV-1. Bien que certains buffles développent le CG et en meurent (Venter, 2003), l'espèce semble néanmoins peu sensible à l'AIHV-1 (Dr. Rossiter, Dr. Wamwayi, communications personnelles). Sur base de la réaction sérologique croisée existant entre l'AIHV-1 et le BoHV-4 (Rossiter *et al.*, 1977 ; Osorio *et al.*, 1985 ; Rossiter *et al.*, 1988 ; Rossiter *et al.*, 1989), Rossiter et collaborateurs (1989) ont proposé que l'infection naturelle du buffle par le BoHV-4 pourrait lui conférer une immunité protectrice à l'encontre de l'AIHV-1 (Rossiter *et al.*, 1988 ; Rossiter *et al.*, 1989). Selon cette hypothèse, impliquant une relation symbiotique entre le BoHV-4 et le buffle, les rares cas de CG observés chez le buffle représenteraient l'élimination des animaux séronégatifs envers le BoHV-4. Cette hypothèse permettrait ainsi d'expliquer la séroprévalence très élevée observée chez le buffle envers le BoHV-4 par rapport à celles estimées pour l'espèce bovine (Van Malderen *et al.*, 1987 ; Wellenberg *et al.*, 1999). Des expériences réalisées sur quelques bovins soutiennent la crédibilité de l'hypothèse proposée (Rossiter *et al.*, 1988 ; Rossiter

et al., 1989). Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour but de répondre aux obstacles et questions préliminaires qui empêchent de tester cette hypothèse de travail. Les résultats générés au cours de ce travail ont été regroupés en trois études (Figure 1).

RÉSULTATS

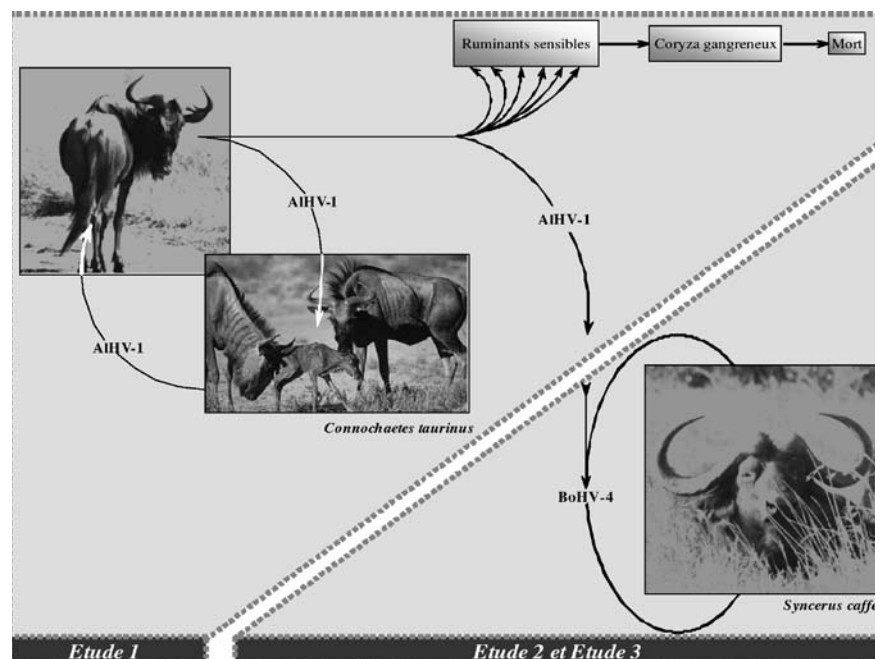
(i) Clonage du génome de l'herpèsvirus alcélaphin 1 sous la forme d'un chromosome artificiel bactérien stable, infectieux et pathogène

La propriété intrinsèque de l'AIHV-1 à perdre son pouvoir pathogène lors de sa multiplication *in vitro* rend hasardeuse la préparation d'un inoculum destiné à reproduire expérimentalement la maladie, et réduit à néant toute stratégie de production de virus recombinants par des approches classiques. Pour surmonter ces difficultés, nous avons cloné l'entièreté du génome de l'AIHV-1 sous la forme d'un chromosome artificiel bactérien (BAC) stable, infectieux et pathogène. Pour ce faire, une cassette BAC modifiée et flanquée de séquences *loxP* a été insérée dans une des deux grandes régions du génome de l'AIHV-1 décrites comme non codan-

tes. Cette insertion a mené à la production d'un clone AIHV-1 BAC maintenu de manière stable en bactérie et capable d'induire la production de particules virales après transfection en cellules permissives. La cassette BAC flanquée des séquences *loxP* a ensuite pu être excisée du génome des particules virales reconstituées, par multiplication du virus dans des cellules exprimant la recombinase Cre de manière stable. Enfin, le virus dérivé du BAC AIHV-1 et le virus sauvage parental ont été comparés quant à leur propriété à se multiplier en culture de cellules et à induire le CG chez des lapins inoculés. Les résultats obtenus démontrent que le virus dérivé du BAC AIHV-1 produit possède un pouvoir de multiplication et un pouvoir pathogène identiques à ceux de la souche parentale ayant subi un nombre restreint de multiplication *in vitro*. La propagation du génome de l'AIHV-1 sous la forme d'un BAC permet donc, contrairement à la multiplication virale en culture de cellules, de propager ce génome de manière stable et d'envisager enfin sa mutagenèse.

Cette première étude a permis de générer un outil indispensable pour induire de manière reproductible la forme africaine

Figure 1. Organisation des études originales réalisées au cours de ce travail basée sur l'hypothèse de l'existence d'une relation évolutive entre l'AIHV-1 et le BoHV-4.



du CG lors d'inoculations d'épreuves. De plus la disponibilité du BAC AIHV-1 représente une avancée importante dans l'étude des gènes impliqués dans la pathogénie du CG et ouvre des voies potentielles à la production de candidats vaccinaux contre le CG.

(ii) Les anticorps dirigés contre l'herpèsvirus bovin 4 sont hautement prévalents chez les buffles africains sauvages d'Afrique de l'Est et du Sud

Dans cette seconde étude, nous nous sommes intéressés à deux questions suscitées par les travaux de Rossiter et collaborateurs (1989). Premièrement, afin d'investiguer le rôle du buffle africain en tant qu'espèce hôte naturelle du BoHV-4, la séroprévalence envers ce virus a été analysée chez des buffles africains sauvages provenant d'Afrique de l'Est et du Sud. Un total de 400 sérums ont été analysés par deux techniques complémentaires de marquages immunofluorescents. Les résultats observés démontrent qu'indépendamment de leur origine, les buffles africains sauvages exhibent une séroprévalence envers le BoHV-4 supérieure à 68 %. Ce chiffre est de loin supérieur aux valeurs généralement rencontrées chez les bovins. Deuxièmement, la relation antigénique humorale croisée entre le BoHV-4 et l'AIHV-1 a été investiguée. Les résultats générés démontrent que parmi les antigènes exprimés dans les cellules infectées par l'AIHV-1, le(s) seul(s) épitope(s) reconnu(s) par des anticorps anti-BoHV-4 sont exclusivement nucléaires. Ces résultats suggèrent que l'hypothétique propriété du BoHV-4 à induire une immunité protectrice vis-à-vis de l'AIHV-1 repose sur des mécanismes d'immunité cellulaire plutôt qu'humorale.

Les résultats générés lors des deux premières études nous permettent d'une part de pouvoir nous fier à un moyen de reproduction fiable du CG par le biais du clonage de l'AIHV-1 sous forme d'un BAC

et d'autre part de pouvoir affirmer que le BoHV-4 est hautement prévalent au sein de la population du buffle africain. Ce dernier résultat conforte l'hypothèse formulée. La troisième étude avait pour but d'évaluer la distance phylogénétique entre souches isolées de bovins et de buffle africains afin d'utiliser les souches de BoHV-4 susceptibles d'induire une immunité protectrice envers l'AIHV-1.

Une étude phylogénétique récente basée exclusivement sur l'analyse du gène Bo17 du BoHV-4 a démontré que ce gène a été acquis d'un ancêtre du buffle africain il y a environ 1,5 million d'années. Cette étude a également suggéré que le BoHV-4 aurait été transmis d'un ancêtre du buffle africain à un ancêtre des bovins (*Bos primigenius*) il y a approximativement 700.000 ans. Suite à ce saut d'espèces le BoHV-4 aurait co-spécié avec l'ancêtre des bovins pour générer les souches actuelles isolées de zébu et de bovins taurins. Selon ce scénario, les souches de BoHV-4 isolées de buffles africains seraient le fruit d'un processus de co-spéciation d'au moins 1,5 millions d'années entre le BoHV-4 et le buffle africain ; alors que les souches bovines résulteraient d'un processus de co-spéciation plus récent datant de 700.000 ans. Quoi qu'il en soit, cette hypothèse suggère que les souches de BoHV-4 isolées des buffles africains et de bovins pourraient représenter des espèces virales naissantes adaptées à leurs hôtes spécifiques. Ces deux espèces virales proches pourraient néanmoins se distinguer l'une de l'autre par une ou plusieurs propriétés biologiques comme par exemple la capacité de conférer une immunité protectrice vis-à-vis de l'AIHV-1.

(iii) Evolution de l'herpèsvirus bovin 4 : recombinaisons et transmission entre buffle africain et bovins.

Dans cette troisième étude, nous nous sommes dès lors intéressés à détailler

la relation phylogénique existant entre les souches de BoHV-4 isolées de buffles africains et de bovins. A cette fin, neuf souches représentatives de l'espèce BoHV-4 ont été comparées sur base de six régions génomiques. Les résultats obtenus ont menés aux conclusions suivantes. (i) Les souches de BoHV-4 isolées du buffle africain et des bovins forment des clades ayant divergé il y a environ 850.000 ans. (ii) Depuis cette divergence, des événements de recombinaisons inter- et intra-clades ont eu lieu à différents moments dans la préhistoire démontrant que ces souches sont restées géographiquement proches jusqu'il y a peu. (iii) La topologie de l'arbre phylogénique formé par les souches de BoHV-4 isolées de zébu et de bovins taurins suggère que le BoHV-4 n'a pas co-évolué avec les bovins mais a été transmis à cette dernière espèce très récemment à la suite de sauts d'espèces au cours de la préhistoire. Ces observations nous ont amenés à proposer un scénario expliquant quand et comment le BoHV-4 a acquis une distribution mondiale à partir de l'Afrique sub-saharienne.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, ce travail aura donc permis de fournir les réponses nécessaires afin de pouvoir à l'avenir éprouver expérimentalement la relation évolutive entre l'AIHV-1 et le BoHV-4 proposée par Rossiter et collaborateurs (1989). Les données obtenues lors de ce travail illustrent également la complexité des relations et interactions d'un virus avec son hôte naturel au cours de l'évolution ainsi que la complexité par laquelle des virus peuvent intervenir dans la régulation des populations d'un écosystème. A l'avenir, les résultats générés pourraient avoir des implications dans divers domaines, tant d'un point de vue appliqué que fondamental.

REFERENCES

- BUXTON D., REID H.W. Transmission of malignant catarrhal fever to rabbits. *Vet. Rec.*, 1980, **106**, 243-245.
- DEWALS B., BOUDRY C., MARKINE-GORIAYNOFF N., DESMECHT D., PASTORET P.P., VANDERPLASSCHEN A. L'herpèsvirus alcélaphin 1, l'agent responsable de la forme africaine du coryza gangreneux. *Ann. Méd. Vét.*, 2003, **147**, 373-386.
- DEWALS B., GILLET L., GERDES T., TARACHA E.L., THIRY E., VANDERPLASSCHEN A. Antibodies against bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild African buffaloes throughout eastern and southern Africa. *Vet. Microbiol.*, 2005, **110**, 209-220.
- DEWALS B., BOUDRY C., GILLET L., MARKINE-GORIAYNOFF N., DE LEVAL L., HAIG D.M., VANDERPLASSCHEN A. Cloning of the genome of Alcelaphine herpesvirus 1 as an infectious and pathogenic bacterial artificial chromosome. *J. Gen. Virol.*, 2006a, **87**, 509-517.
- DEWALS B., THIRION M., MARKINE-GORIAYNOFF N., GILLET L., DE FAYS K., MINNER F., DAIX V., SHARP P., VANDERPLASSCHEN A. Evolution of Bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between African buffalo and cattle. *J. Gen. Virol.*, 2006b, 1509-1519
- EDINGTON N., PATEL J., RUSSELL P.H., PLOWRIGHT W. The nature of the acute lymphoid proliferation in rabbits infected with the herpes virus of bovine malignant catarrhal fever. *Eur. J. Cancer*, 1979, **15**, 1515-1522.
- GRAHAM D.A., MCNEILL G.J., CALVERT V., MAWHINNEY K., CURRAN W., BALL N.W., TODD D. Virological and serological evidence of bovine herpesvirus type 4 in cattle in Northern Ireland. *Vet. Rec.*, 2005, **157**, 539-543.
- HANDLEY J.A., SARGAN D.R., HERRING A.J., REID H.W. Identification of a region of the alcelaphine herpesvirus-1 genome associated with virulence for rabbits. *Vet. Microbiol.*, 1995, **47**, 167-181.
- 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-acetylglucosaminyltransferase-mucin encoded by bovine herpesvirus 4 was acquired from an ancestor of the African buffalo. *J. Virol.*, 2003, **77**, 1784-1792.
- OSORIO F.A., REED D.E., VAN DER MAATEN M.J., METZ C.A. Comparison of the herpesviruses of cattle by DNA restriction endonuclease analysis and serologic analysis. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 2104-2109.
- PLOWRIGHT W. Malignant catarrhal fever virus. In: DINTER Z., MOREIN B. (Eds.), Virus infections of ruminants. Elsevier Sci Pub: Amsterdam, 1990, 123-150.
- ROSSITER P.B., MUSHI E.Z., PLOWRIGHT W. The development of antibodies in rabbits and cattle infected experimentally with an african strain of malignant catarrhal fever virus. *Vet. Microbiol.*, 1977, **2**, 57-66.
- ROSSITER P.B., GUMM I.D., MIRANGI P.K. Immunological relationships between malignant catarrhal fever virus (alcelaphine herpesvirus 1) and bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 3). *Vet. Microbiol.*, 1988, **16**, 211-218.
- 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.
- VAN MALDEREN G., VAN OPDENBOSCH E., WELLEMANS G. Bovien herpes virus 1 en 4: een sero-epidemiologisch onderzoek van de Belgische Rundveestapel. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 1987, **56**, 364-371.
- VENTER L.J. Epizootic of mucopurulent nasal discharge in african hoofstock. Adresse URL : http://www.aazv.org/epi_bovids.ppt:
- WELLENBERG G.J., VAN ROOIJ E.M., MAISSAN J., VAN OIRSCHOT J.T. Evaluation of newly developed immunoperoxidase monolayer assays for detection of antibodies against bovine herpesvirus 4. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1999, **6**, 447-451.

PUBLICATIONS ISSUES

DU TRAVAIL DE THÈSE

- DEWALS B., BOUDRY C., MARKINE-GORIAYNOFF N., DESMECHT D., PASTORET P.P., VANDERPLASSCHEN A. L'herpèsvirus alcélaphin 1, l'agent responsable de la forme africaine du coryza gangreneux. *Ann. Méd. Vét.*, 2003, **147**, 373-386.
- DEWALS B., GILLET L., GERDES T., TARACHA E.L., THIRY E., VANDERPLASSCHEN A. Antibodies against bovine herpesvirus 4 are highly prevalent in wild african buffaloes throughout eastern and southern Africa. *Vet. Microbiol.*, 2005, **110**, 209-220.
- DEWALS B., BOUDRY C., GILLET L., MARKINE-GORIAYNOFF N., DE LEVAL L., HAIG D.M., VANDERPLASSCHEN A. Cloning of the genome of alcelaphine herpesvirus 1 as an infectious and pathogenic bacterial artificial chromosome. *J. Gen. Virol.*, 2006a, **87**, 509-517.
- DEWALS B., THIRION M., MARKINE-GORIAYNOFF N., GILLET L., DE FAYS K., MINNER F., DAIX V., SHARP P., VANDERPLASSCHEN A. Evolution of bovine herpesvirus 4: recombination and transmission between African buffalo and cattle. *J. Gen. Virol.*, 2006b, **87**, 1509-1519

Remerciements

La réalisation de ce travail a été rendue possible grâce notamment à l'aide financière du Conseil Interuniversitaire de la Communauté française de Belgique (CIUF), Commission de Coopération Universitaire au Développement (CUD), programme Actions-Nord. Ce travail a été réalisé grâce aux mandats d'Aspirant que le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) m'a octroyés.