

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

- Orientation :** Médecine vétérinaire
- Titre de la thèse en français :** Contribution à l'étude des propriétés antivirales de la protéine MX1 de *Bos taurus*
- Titre de la thèse en anglais :** Contribution to the study of the antiviral properties of the *Bos taurus* MX1 protein
- Candidat :** Michaël Leroy
- Promoteur :** Professeur D. Desmecht
- Département et Service :** Département de Morphologie et Pathologie, Service de Pathologie spéciale
- Date de la défense publique :** le 24 mai 2006
- Composition du Jury :**
- Membres extérieurs à la faculté :*
J.-M. François, P. Staeheli, P. Kerkhof
- Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :*
E. Thiry, F. Bureau, M. Georges, A. Vanderplasschen, F. Rollin, F. Coignoul

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Les interférons de type I (IFNs- α/β) sont une composante essentielle du système immunitaire inné antiviral. Il s'agit de protéines, appelées cytokines, synthétisées et excrétées par les cellules suite à l'infection virale. Ils agissent par l'intermédiaire d'un récepteur de surface et induisent l'expression d'un nombre important de gènes dont certains, particulièrement bien caractérisés, possèdent des propriétés antivirales puissantes : le système de la 2'5'-oligoadénylate synthétase/Ribonucléase L (OAS/RNASE L), la protéine kinase R dépendante de l'ARN bicaténaire et le système Mx (Samuel, 2001 ; Sen, 2001).

Le système Mx a été mis en évidence chez de nombreuses espèces animales parmi les mammifères, oiseaux et poissons. Il est composé de deux ou trois protéines suivant l'espèce animale. Identifiées initialement chez

certaines souris de laboratoire (*Mus musculus*) par leur capacité à conférer aux souris une résistance à une infection mortelle par les virus influenza A (*Orthomyxoviridae*, *Influenzavirus A*), les protéines MX ont fait l'objet de nombreuses études dans cette espèce ainsi que chez l'homme (*Homo sapiens*) (Lindenmann, 1962 ; Haller *et al.*, 1998). Ces études ont permis d'étendre leur spectre antiviral à de nombreuses familles de virus dont les *Orthomyxoviridae*, les *Bunyaviridae*, les *Rhabdoviridae*, les *Paramyxoviridae*, les *Togaviridae*, les *Picornaviridae*, les *Hepadnaviridae* et les *Birnaviridae* (Lee and Vidal, 2002).

Dans l'espèce bovine (*Bos taurus*), deux protéines MX (boMX) ont été identifiées. La protéine boMX1 a été identifiée pour la première fois en 1988 par Horisberger et clonée en 1998 par Ellinwood et collaborateurs (Horisberger, 1988 ; Ellinwood *et al.*,

1998). L'analyse de l'organisation du promoteur et du génome rappelle celle des autres gènes *mx*. Tout comme la plupart des protéines MX, elle est exprimée dans le noyau et adopte un aspect granulaire (Haller *et al.*, 1998 ; Lee and Vidal, 2002).

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer par quelle mécanisme moléculaire, les interférons de type I étaient capable de bloquer la multiplication du virus parainfluenza de type 3 bovin (boPi-3 ; *Paramyxoviridae*, *Respirovirus*) et de caractériser ce/ces mécanismes. Il s'articule autour de quatre études originales. La première étude avait pour objet de déterminer la nature du mécanisme moléculaire IFN-dépendant responsable de l'inhibition de la multiplication du virus boPi-3. Nous avons ainsi testé le rôle de l'OAS (recombinante humaine), de la PKR (endogène ; cellules vero *Cercopithecus aethiops*) et d'une protéine MX (recombinante humaine).

Suite aux résultats obtenus, nous nous sommes concentrés sur les propriétés antivirales de la protéine MX1 de l'espèce bovine (*Bos taurus*)

Dans une deuxième étude, étant donné qu'aucune donnée de la littérature ne décrit les propriétés antivirales de la protéine boMX1, nous avons évalué la capacité de cette dernière à inhiber la multiplication d'un virus appartenant à la famille des *Rhabdoviridae*, le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV ; *Vesiculovirus*). Au terme de cette étude, il nous est apparu que la protéine boMX1 était, à l'instar de son homologue humaine (huMXA), capable de bloquer de manière remarquable la multiplication de ce virus.

Dans une troisième étude, notre ambition a été de développer le premier résultat relatif à la protéine boMX1 en nous inscrivant dans un cadre plus vétérinaire côté hôte (MX) et dans une démarche plus différenciée, côté virus. Cette étude a consisté en l'évaluation de la fonction antivirale de la protéine boMX1 vis-à-vis d'au moins un représentant de la plupart des *Paramyxoviridae*, dont deux virus bovins : le virus parainfluenza de type 3 (*Respirovirus*) et le virus respiratoire syncytial bovin (*Pneumovirus*).

Dans une quatrième étude, nous avons entrepris d'étendre l'évaluation fonctionnelle de la protéine boMX1 à un autre virus de la famille des *Rhabdoviridae*, mais appartenant au genre *Lyssavirus*, le virus de la rage. Comme la fonction anti-VSV de la protéine huMXA avait été rapportée sans que ses propriétés anti-rabique n'aient jamais été décrites, nous avons examiné l'hypothèse d'une fonction anti-rabique simultanément pour les protéines huMXA et boMX1.

RÉSULTATS

Dans la première partie de ce travail, nous avons validé l'utilisation de nos cellules vero en évaluant l'effet antiviral de l'IFN- α vis-à-vis d'un *Paramyxoviridae*, le virus parainfluenza de type 3 bovin. Ce dernier présentait une sensibilité importante tant du point de vue de la synthèse des protéines virales au cours du premier cycle de multiplication qu'au niveau de la production de particules virales infectieuses après plusieurs cycles de multiplication. Nous avons ensuite étudié l'effet antiviral potentiel des trois systèmes antiviraux les mieux caractérisés : l'OAS, la PKR et le système Mx. Pour l'OAS, les études ont été effectuées en systèmes transitoires après un cycle de multiplication. Nos résultats en immunofluorescence et en cytométrie en flux ont mis en évidence l'incapacité du système OAS/RNase L à lui seul à inhiber la synthèse des protéines virales. Nous avons ensuite évalué l'effet de l'expression de la protéine huMXA après un ou plusieurs cycles de multiplication. Les résultats en immunofluorescence et en cytométrie en flux ont mis en évidence la capacité du système à limiter la synthèse des protéines virales après un cycle de multiplication virale. Afin de confirmer ces résultats, une série de titration en retour a été effectuée et a confirmé les résultats précédents, suggérant l'implication au moins partielle du système Mx dans l'effet puissant des IFNs- α/β vis-à-vis du virus boPi-3. Enfin, le rôle de la PKR a été évalué par sa capacité à phosphoryler la sérine 51 du facteur eucaryote d'initiation de la traduction (eIF2 α) suite à l'infection par certains virus. Nos travaux ont mis en évidence l'absence de phosphorylation de l'eIF2 α virale induite ce qui suggère que ce système n'est pas profondément impliqué dans l'effet antiviral des IFNs- α/β vis-à-vis

du virus boPi-3.

Dans la deuxième étude, nous nous sommes concentrés sur le système Mx de l'espèce bovine (*Bos taurus*) et plus particulièrement de la protéine boMX1. Les propriétés antivirales de cette dernière n'ayant jamais été évaluées auparavant, il nous était indispensable de l'évaluer vis-à-vis d'un virus réputé sensible à l'effet des protéines MX à localisation cytoplasmique, le virus de la stomatite vésiculeuse (*Rhabdoviridae*, *Vesiculovirus*) (Baise *et al.*, 2004). La titration directe sous croûte d'agar ainsi que la titration en retour de deux souches virales (Indiana et New Jersey) ont permis de mettre en évidence la capacité de la protéine boMX1 à bloquer la multiplication du virus. Il s'agit par conséquent de la première étude soulignant le potentiel antiviral du système Mx bovin.

Dans la troisième étude, nous avons testé les propriétés antivirales de la protéine boMX1 vis-à-vis de plusieurs virus représentant de la famille des *Paramyxoviridae*, dont notamment deux virus bovins, le virus parainfluenza de type 3 et le virus respiratoire syncytial (Leroy *et al.*, 2005). Les premiers résultats en immunofluorescence et en cytométrie en flux concernant la synthèse des protéines du virus boPi-3 lors de l'expression de la protéine boMX1 suggèrent l'absence d'influence de l'expression de cette dernière sur la multiplication du virus. Ces résultats ont ensuite été confirmés par titration directe, titration en retour et mesure de la diminution du métabolisme cellulaire. Rassemblés, ces résultats suggèrent que la protéine boMX1 n'est pas à même d'influencer la multiplication du virus boPi-3. Les expériences ont ensuite été effectuées sur le virus respiratoire syncytial et à

nouveau, que ce soit après un cycle de multiplication virale ou plusieurs, la protéine boMX1 n'est pas même d'influencer la multiplication du virus. Enfin, l'extension des recherches à d'autres membres de la même famille de virus a donné des résultats similaires. Il fallait donc en conclure que la protéine boMX1 n'intervient pas dans l'effet puissant des IFNs de type I vis-à-vis des virus de la famille des *Paramyxoviridae*.

Afin d'élargir le spectre antiviral de la protéine boMX1 à la famille des *Rhabdoviridae*, dont seul le genre *Vesiculovirus* a été testé jusqu'ici, nous avons testé son potentiel avec le virus de la Rage, du genre *Lyssavirus* et comparé les résultats avec un effet potentiel de la protéine huMXA (Leroy *et al.*, 2006). Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ajoutent un nouveau genre au spectre antiviral de boMX1 puisque le virus est sensible à l'expression de la protéine et ce, quelle que soit la souche utilisée. Pour ce qui est de la protéine huMXA, l'effet antiviral est bien moins important et dépendant, dans nos études de la souche virale utilisée. Au terme de cette étude, nous avons, pour la première fois, identifié un nouveau genre viral sensible à une protéine MX, en l'occurrence, la protéine boMX1, le *Lyssavirus* de la rage.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, il nous est apparu que le système MX avait la capacité d'inhiber la multiplication du virus parainfluenza de type 3 de l'espèce bovine. C'est pourquoi, nous avons choisi d'évaluer le potentiel antiviral de la protéine boMX1 en se plaçant dans un contexte vétérinaire et en étudiant l'interaction entre la

protéine et certains *Paramyxoviridae* touchant l'espèce bovine. Ce qui nous est apparu, c'est que, à l'instar de la protéine MXA humaine, la protéine boMX1 possède des propriétés antivirales vis-à-vis d'un virus couramment utilisé pour évaluer la fonction antivirale des protéines MX cytoplasmiques, le virus de la stomatite vésiculeuse (*Rhabdoviridae*, *Vesiculovirus*). Il était par conséquent évident que la protéine boMX1 pouvait être ajoutée à la liste des protéines MX possédant des propriétés antivirales. Cependant, bien que la stimulation aux IFNs de type I de cellules d'origine bovine soit à même de bloquer la multiplication du virus boPi-3, il semblerait ce ne soit pas la protéine boMX1 qui en soit responsable, même partiellement. De même, aucun des *Paramyxoviridae* testés ne s'est avéré sensible à son activité antivirale. À l'opposé, l'effet antiviral de la protéine boMX1 vis-à-vis du *Lyssavirus* (*Rhabdoviridae*) de la rage semble évident alors que la protéine huMXA est rapidement dépassée. Ces résultats, bien que contradictoires par rapport à ceux obtenus avec la Mx homologue humaine, pourraient s'expliquer de différentes manières. L'environnement cellulaire pourrait jouer un rôle et il a été démontré que certains virus présentaient une sensibilité variable suivant le type cellulaire utilisé. Dans notre étude, le rôle antiviral de la protéine huMXA a pu être confirmé en cellules vero ce qui élimine l'influence négative du type cellulaire vis-à-vis du virus parainfluenza de type 3. La structure intrinsèque de la protéine, et notamment certains acides aminés cruciaux, pourraient expliquer ces différences. Certaines mutations apportées à la protéine huMXA modifient ou inhibent ses propriétés antivirales. Il n'est donc pas exclu que les différences de séquences protéique

puissent expliquer ces comportements différents.

Ce travail nous a permis de valider le potentiel antiviral de la protéine boMX1, mais de nombreuses études sont encore nécessaires soit pour étendre le spectre antiviral à des virus comme les virus influenza et Thogoto (*Orthomyxoviridae*), ou certains *Bunyaviridae*. L'utilisation de notre lignée stable inductible doit également être mise à profit pour évaluer, sur un plan plus fondamental, les mécanismes moléculaires intimes de l'interaction directe ou indirecte entre la protéine boMX1 et les virus sensibles. Enfin, les études ne seraient pas complètes si le rôle antiviral du système n'était pas évalué *in vivo* afin de déterminer le rôle biologique de la protéine dans un contexte plus complexe. À ces études fondamentales du spectre antiviral et des mécanismes moléculaires sous-jacents s'ajoutent des projets plus appliqués, visant notamment à évaluer le potentiel des protéines Mx dans un contexte de thérapie génique visant à améliorer les traitements antiviraux vis-à-vis de virus sensibles au système boMX1 ou MX en général.

REFERENCES

- ELLINWOOD N., MCCUE J., GORDY P., BOWEN, R. Cloning and characterization of cDNAs for a bovine (*Bos taurus*) Mx protein. *J Interferon Cytokine Res*, 1998, **18**, 745-55
- HALLER O., FRESE M., KOCHS G. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech*, 1998, **17**, 220-30
- HORISBERGER M.A. The action of recombinant bovine interferons on influenza virus replication correlates with the induction of two Mx-related proteins in bovine cells. *Virology*, 1988, **162**, 181-6
- LEE S.H., VIDAL S.M. Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. *Genome Res.*, 2002, **12**, 527-30
- LINDENMANN J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology*, 1962, **16**, 203-204
- SAMUEL C.E. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, **14**, 778-809.
- SEN G.C. Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, **55**, 255-81.
- PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE**
- BAISE E., PIRE G., LEROY M., GÉRARDIN J., GORIS N., DE CLERCK K., KERKHOF P., DESMECHT D. Conditional expression of bovine MX1 GTPase in a stable transgenic Vero Cell line interferes with replication of vesicular stomatitis virus. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2004, **24**, 513-521.
- LEROY M., BAISE E., PIRE G., GÉRARDIN J., DESMECHT D. Resistance of Paramyxoviridae to type I interferon-induced *Bos taurus* MX1 dynamin. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2005, **25**, 192-2001.
- LEROY M., DESMECHT D. Les interférons de type I et leur fonction antivirale. *Ann. Med. Vét.*, 2006, **150**, 73-107.
- LEROY M., PIRE G., BAISE E., DESMECHT D. Expression of the interferon-alpha/beta-inducible bovine Mx1 dynamin interferes with replication of rabies virus. *Neurobiol. Dis.*, 2006, **21**, 515-521.

REMERCIEMENTS

Michaël Leroy a été boursier du F.R.I.A. (Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture, rue Egmont 5, 1000 Bruxelles). Cette recherche a été permise grâce au projet n° S-6042 octroyé par le Service fédéral publique belge pour la Santé publique, la Sécurité de la Chaîne alimentaire et de l'Environnement.