

## **Etude du rôle de la protéine ORF9p du virus de la varicelle et du zona dans la fusion cellulaire**

**Auteur** : Jassin, Mégane

**Promoteur(s)** : Sadzot, Catherine; Lebrun, Marielle

**Faculté** : Faculté des Sciences

**Diplôme** : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

**Année académique** : 2020-2021

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/12494>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**Université de Liège**

**Faculté des Sciences**

**Département des Sciences de la Vie**

**Laboratoire de Virologie & Immunologie (GIGA-I3)**

**Promoteur : Dr. M. LEBRUN**

**Co-promoteur : Pr C. SADZOT-DELVAUX**



**Etude du rôle de la protéine ORF9p du virus de la varicelle  
et du zona dans la fusion cellulaire**

Mémoire de fin d'études rédigé par

**JASSIN Mégane**

Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, à finalité approfondie

Année académique 2020-2021

## **REMERCIEMENTS**

En premier lieu, la personne que je voudrais remercier est ma promotrice, le Dr. Marielle Lebrun, qui m'a guidée, aidée et conseillée tout au long de mon mémoire. Sa patience, sa bonne humeur et son soutien ont été pour moi un moteur de motivation dans mes moments de doutes et de remise en question. De plus, toutes les connaissances et le savoir-faire qu'elle m'a transmis m'ont permis de perfectionner mon apprentissage et d'avoir plus confiance en moi ; et me seront utiles pour mon avenir professionnel et social.

Je tiens également à exprimer un remerciement spécial au Prof. Catherine Sadzot-Delvaux pour m'avoir accordé sa confiance et me permettre de réaliser mon mémoire dans son Laboratoire de Virologie & Immunologie et d'encadrer les travaux pratiques du cours de 3<sup>ème</sup> BAC de Biologie. Co-promotrice mais également mon professeur, les cours que vous m'avez enseignés m'ont fait prendre conscience de la branche scientifique dans laquelle je voudrais m'émanciper dans mon avenir professionnel.

Je voudrais exprimer ma plus profonde reconnaissance aux autres membres du Laboratoire de Virologie & Immunologie. En effet, je remercie Judith Sanchez Gil, pour sa joie de vivre, son aide précieuse quant à l'utilisation de certaines machines et son accent espagnol attachant. Je remercie aussi Paolo D'Arrigo pour son calme imperturbable et sa serviabilité, et Julien Lambert pour son aide quant à l'utilisation de l'IncuCyte® et de la bioinformatique. Je remercie également Maxime Dubois, également étudiant en Master 2 BBMC et mémorant au laboratoire, pour son humour et son soutien.

Un grand merci aux membres du laboratoire d'immunométabolisme de Sylvie Legrand, notamment à Margaud Iovino et Chloé Wilkin, au laboratoire PSI de Franck Dequiedt, notamment à Zhara Al Oula Hassoun, Olivia Barada, Margaux Claes, Bartimé Galvan, Yvette Habraken, Florence Lemaitre, Loïc Ongena, Stéphanie Skupiewski et Roxane Terres, et à François Girouille de la plateforme *Viral Vectors*, pour leur gentillesse et leur soutien. Un grand merci également à Alexandre Hego et Sandra Ormenese de la plateforme *Giga Cell Imaging* pour leur aide quant à l'utilisation de l'IncuCyte® et des microscopes confocaux.

Enfin, merci à mes parents, mon frère et sa compagne Barbara, qui ont toujours cru en moi et me soutiennent depuis le début de mes études à l'Université de Liège. Merci également à mon compagnon et à mes amis pour leur soutien moral et leur intérêt pour mon mémoire même s'ils n'ont pas tous des connaissances approfondies en biologie.



## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**AA** : Acides aminés

**AC** : Anticorps

**AP-1** : *Adaptator protein 1*

**BAC** : *Bacterial artificial chromosome*

**B-gly** :  $\beta$ -glycérophosphate

**BSA** : *Bovine serum albumin*

**Cm** : Chloramphénicol

**DMEM** : *Dulbecco's modified eagle medium*

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**HSV** : Human herpes virus

**IF** : Immunofluorescence

**IP** : Immunoprécipitation

**LB** : Luria Bertani

**LC** : *Light chains*

**MAPK** : *Mitogen-activated protein kinase*

**MEM** : *Minimum essential medium*

**NI** : Non infecté

**PAF** : Paraformaldéhyde

**PBS** : *Phosphate buffer saline*

**PEI** : Poly-éthylène imine

**PMSF** : *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

**NPP** : Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase

**RT** : *Room Temperature*

**SET** : *Salt EDTA tris*

**VZV** : *Varicella zoster virus*

**WB** : *Western blot*



# SOMMAIRE

## REMERCIEMENTS

## LISTE DES ABREVIATIONS

## TABLE DES FIGURES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. DESCRIPTION DU VIRUS DE LA VARICELLE ET DU ZONA.....</b>	<b>1</b>
1.1. Historique.....	1
1.2. Pathologie.....	1
1.2.1. Varicelle.....	1
1.2.2. Zona.....	2
1.3. Morphologie, taxonomie et génome du VZV.....	3
1.3.1. Morphologie.....	3
1.3.2. Taxonomie.....	4
1.3.3. Génome.....	5
<b>2. CYCLE LYTIQUE.....</b>	<b>6</b>
2.1. Entrée du virus dans sa cellule-hôte.....	7
2.2. Entrée dans le noyau et expression génique virale.....	7
2.3. Formation et sortie des virions.....	8
<b>3. PROTEINES CLES DE LA FUSION CELLULE-CELLULE.....</b>	<b>10</b>
3.1. La phosphoprotéine virale tégumentaire ORF9p (VP22).....	10

3.2. Le complexe cellulaire AP-1 ( <i>adaptor protein complex 1</i> ).....	11
3.3. Les glycoprotéines virales.....	12
3.3.1. Les glycoprotéines gE et gI.....	13
3.3.2. Les glycoprotéines gB, gH et gL.....	14
3.3.3. Les glycoprotéines gM et gN.....	16
3.3.4. Les glycoprotéines gK et gC.....	16
4. RESULTATS PRELIMINAIRES.....	17
<b>BUTS &amp; OBJECTIFS</b> .....	20
<b>MATERIEL &amp; METHODES</b> .....	21
<b>1. PREPARATION DES CULTURES DE CELLULES</b> .....	21
1.1. Transfection des cellules.....	21
<b>2. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE DE VZV A PARTIR DE CELLULES INFECTEES</b> .....	21
2.1. Matériel utilisé.....	21
2.2. Préparation du gradient de tartrate de potassium.....	22
2.3. Extraction des nucléocapsides virales.....	22
2.4. Extraction de l'ADN viral et séquençage à haut débit.....	22
<b>3. CLONAGE</b> .....	23



<b>3.1. Génération des mutants dans le BAC-VZV</b> .....	23
3.1.1. La technique « en passant ».....	23
3.1.2. Génération des cassettes de recombinaison.....	24
3.1.3. Purification de la cassette de recombinaison.....	24
3.1.4. Electro-compétence, transformation et 1 <sup>ère</sup> étape de recombinaison homologue.....	25
3.1.5. <i>Screening</i> des colonies bactériennes par PCR.....	25
3.1.6. Transformation et deuxième recombinaison.....	25
3.1.7. Criblage des colonies par PCR et séquençage.....	26
<b>3.2. Protocole pour le clonage de plasmides</b> .....	26
3.2.1. Génération de l'insert par PCR.....	26
3.2.2. Recombinaison homologue entre le vecteur et l'insert produit par PCR.....	27
3.2.3. Electro-compétence et transformation.....	27
3.2.4. <i>Screening</i> des colonies bactériennes par PCR.....	27
3.2.5. Purification du produit PCR.....	27
<b>3.3. Maxi-préparation de BAC sur gradient de chlorure de césium</b> .....	28
<b>4. CO-IMMUNOPRECIPITATION</b> .....	28
<b>4.1. Matériel utilisé</b> .....	28
4.1.1. Composition des tampons de lavage et de lyse contenant un cocktail d'inhibiteurs.....	28
4.1.2. Liste des anticorps IP, primaires et secondaire.....	29
<b>4.2. Préparation des extraits protéiques</b> .....	29
<b>4.3. Western blot</b> .....	30
<b>4.4. Stripping</b> .....	30
<b>5. MESURE DE LA CROISSANCE VIA L'AUTOMATE INCUCYTE®</b> .....	30
<b>6. IMMUNOFLUORESCENCE</b> .....	31
<b>6.1. Matériel utilisé</b> .....	31

6.2. Préparation des <i>coverslips</i> dans une plaque 6 puits.....	31
6.3. Fixation et perméabilisation.....	32
6.4. Immunomarquage.....	32
6.5. Montage des lames et analyse au microscope confocal.....	32

**RESULTATS.....33**

<b>1. LES MUTATIONS W169F, F181A, F181W ET W201F IMPACTENT-ELLES L'INFECTIVITE VIRALE ET LA CAPACITE DE FUSION DES CELLULES INFECTEES ?.....</b>	<b>33</b>
--	-----------

<b>2. LES MUTATIONS F181A, F181W ET W201F INTERFERENT-ELLES DANS LES INTERACTIONS ENTRE ORF9p ET LES GLYCOPROTEINES gE, gH ET gB ?.....</b>	<b>36</b>
---	-----------

2.1. Les mutations F181A et F181W impactent les interactions entre ORF9p et gE.....	36
---	----

2.2. Les mutations F181A et F181W impactent les interactions entre ORF9p et gH.....	39
---	----

<b>3. OU SE SITUENT LA PROTEINE ORF9p ET SES PARTENAIRES DANS LES CELLULES INFECTEES LORSQU'ELLE EST MUTEE SUR LES RESIDUS F181A ET F181W ?.....</b>	<b>43</b>
--	-----------

3.1. Y a-t-il une <i>down regulation</i> des glycoprotéines en surface chez les mutants ?.....	43
--	----

3.2. Y a-t-il une différence de localisation entre ORF9p et les glycoprotéines chez les mutants ?.....	49
--	----

3.3. Y a-t-il une différence de localisation entre ORF9p et AP-1 ?.....	52
---	----

**4. OBSERVE-T-ON DES MUTATIONS COMPENSATOIRES DANS LE GENOME DES  
MUTANTS F181A, F181W ET W201F LORSQU’ILS SONT MAINTENUS PENDANT DE  
NOMBREUX PASSAGES EN CULTURE ?.....54**

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....56**

**ANNEXES**

**BIBLIOGRAPHIE**

## TABLE DES FIGURES

Numéro de la figure	Description	Page
1	Schéma de la pathologie du virus de la varicelle et du zona	2
2	Structure d'un <i>herpesviridae</i>	3
3	Tableau récapitulatif des 8 Herpesvirus humains	4
4	Arbre phylogénétique des Alphaerpesvirinae	5
5	Schéma du génome du VZV et des expressions relatives des gènes durant le cycle lytique	6
6	Schéma du cycle lytique du VZV	6
7	Schéma du NEC de HSV-1	8
8	Schéma de la sortie de HSV-1 hors de sa cellule-hôte	9
9	Structure de la protéine ORF9p	10
10	Localisation des complexes cellulaires AP	11
11	Structure des complexes AP	12
12	Présentation des 9 glycoprotéines virales	13
13	Structure de la glycoprotéine gE de VZV	13
14	Structure de la glycoprotéine gH de VZV	14
15	Structure de la glycoprotéine gB de VZV	15
16	Tableau récapitulatif des mutations spontanées compensatoires apparues dans les virus mutants exprimant la protéine OEF9p-L231A	17
17	Montages des <i>blots</i> issus des IP gE et gH	18
18	Mutations opérées dans le domaine WW de VP22	19
19	Schéma récapitulatif de l'insertion de matériel génétique exogène grâce à la technique « en passant »	24
20	La mutation F181A impacte drastiquement la propagation virale alors que la mutation F181W semble ne pas avoir d'impact	34
21	La mutation F181A diminue fortement la taille des foyers d'infection alors que la mutation F181W l'augmente légèrement	35
22	Schéma récapitulatif des interactions de protéines étudiées	36
23	La mutation F181A réduit l'interaction ORF9p-gE à l'inverse de la mutation F181W qui la favorise, et diminue fortement l'interaction de gE avec gB et gI	38
24	La mutation F181A réduit l'interaction ORF9p-gH	39
25	La protéine ORF9p-V5 sauvage ou mutée interagit avec le complexe gH/gL en transfection transitoire	42
26	La mutation F181A provoque un défaut d'expression de gB et gH surface contrairement à la mutation F181W	44
27	La mutation F181A provoque une accumulation des glycoprotéines dans des vésicules proches du noyau	47
28	La mutation F181A provoque une accumulation de gH et de gE dans des vésicules proches du noyau où elles colocalisent partiellement mais où ORF9p n'est pas présente	50
29	La mutation F181A provoque une accumulation de gB et de gE dans des vésicules proches du noyau où elles co-localisent partiellement mais où ORF9p n'est pas présente	51
30	La mutation F181A provoque une perte de colocalisation entre ORF9p et AP-1, alors que la mutation F181W l'augmente	53
31	Des mutations spontanées compensatoires sont apparues dans l'ADN génomique des mutants ORF9p-F181A et ORF9p-W201F	55
S1	Template pEP-Kan S2	I
S2	Carte du vecteur pCAGGS	II
S3	Photographie d'un puits prise par l'automate IncuCyte® brute (à	III

	gauche) et après traitement par une macro de comptage et mesure des foyers viraux	
S4	Calculs des paramètres statistiques pour réaliser le <i>box-plot</i>	IV
S5	Etudes statistiques de la surface des foyers viraux après 48h d'infection	V
S6	Etudes statistiques de la moyenne des ratios ORF9p/gE des sept IP gE	VI
S7	Calculs des ratios ORF9p/gE des sept IP gE, de la moyenne et de l'écart-type pour réaliser des statistiques	VII
S8	Liste des tags et des amorces PCR pour le clonage dans le vecteur pCAGGS ou dans le BAC	VIII
S9	Photo du gel réalisé lors du <i>screening</i> des colonies bactériennes par PCR (~ 1500 pb) où tous les clones tag-gH du WT sont positifs	IX
S10	Immunofluorescences zoomées de gE, gH et ORF9p étudiées dans des cellules perméabilisées après 48h d'infection du WT et des mutants F181W et F181A	X
S11	Immunofluorescences de gE, gH et ORF9p étudiées dans des cellules perméabilisées après 48h d'infection du mutant F181A (overlays)	XI
S12	Immunofluorescences totales de gB, gE et ORF9p étudiées dans des cellules perméabilisées après 48h d'infection du WT et des mutants F181W et F181A	XII
S13	Immunofluorescences de gE, gB et ORF9p étudiées dans des cellules perméabilisées après 48h d'infection du mutant F181A (overlays)	XIII





# INTRODUCTION



# **1. Description du virus de la varicelle et du zona**

## **1.1. Historique**

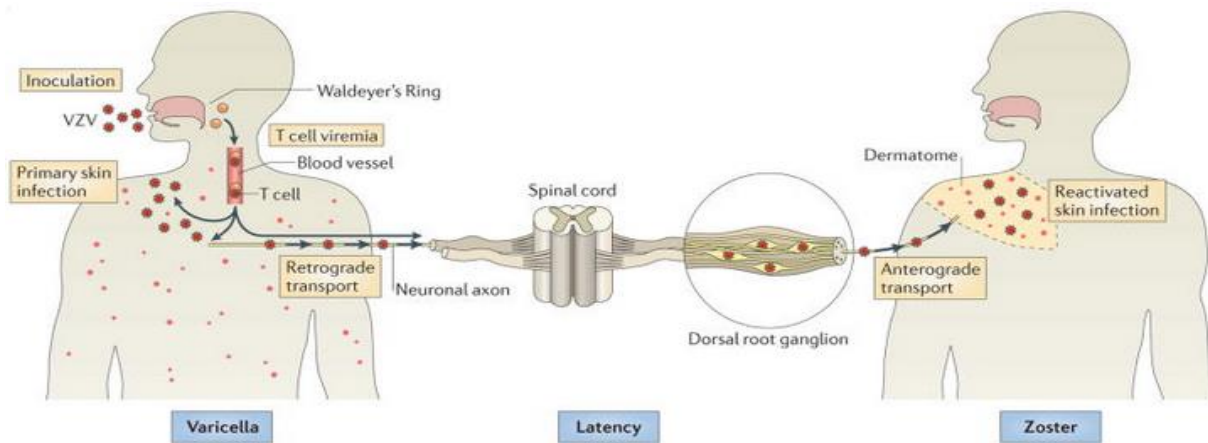
Autrefois, la varicelle était considérée comme une variante plus douce de la variole (*smallpox*). Ce n'est qu'en 1767 qu'un physicien anglais William Heberden a défini la varicelle (*chickenpox*) comme une maladie unique, même si son nom reste intimement lié à celui de la variole (« petite variole »). Ce scientifique a également déclaré qu'une personne guérie de cette maladie n'est plus capable de la contracter à nouveau [1].

Un siècle plus tard, Ernest Edward Tyzzer a montré qu'il n'était pas possible d'infecter des singes ou des cornées de lapin par contact avec le fluide provenant des vésicules de la varicelle, ce qui indique que l'agent infectieux est différent de la variole. Il s'est également attardé sur une autre maladie similaire à la varicelle, le zona, qui apparaît à l'âge adulte, et non lors de l'enfance, période durant laquelle se manifeste la varicelle. Sur base de cela, Ernest Goodpasture a également pu démontrer que la varicelle est liée à un virus différent de la variole. Grâce à leurs travaux, ils ont pu mettre en lien le fait que la varicelle et le zona sont deux manifestations d'un seul agent infectieux viral, plus connu aujourd'hui sous le nom de virus de la varicelle et du zona (VZV) [1]. Vers la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, l'essor de la génomique et de la biotechnologie a permis à Davison et Scott de séquencer entièrement le génome du VZV à partir de la souche Dumas [2], mais a aussi permis de montrer que le zona correspond à une réactivation du virus de la varicelle en dormance dans son hôte. Ces progrès ont également permis de mettre au point un vaccin à partir de la souche *Oka* et de ses dérivés [3].

## **1.2. Pathologie**

### **1.2.1. Varicelle**

La varicelle est une maladie hautement contagieuse qui se transmet d'une part, par les gouttelettes en suspension dans l'air, et d'autre part, par contact direct avec des individus infectieux ou encore avec le fluide vésiculaire des lésions cutanées. La varicelle forme une maladie infantile généralement bénigne contrairement au zona qui peut provoquer des complications sévères chez les adultes [4]. Le site initial de l'infection par le VZV est la partie haute du tractus respiratoire et les cellules épithéliales mucoales. Le virus infecte ensuite les lymphocytes T des tissus lymphoïdes, c'est le début de la virémie primaire [4] [5]. Le virus migre ensuite vers l'épithélium de la peau et différents organes puis vers le système nerveux périphérique (ganglions et nerfs) où il établit un cycle de latence (figure 1). La période d'incubation est de 10 à 20 jours. Pendant cette période, l'enfant infecté peut avoir de la fièvre, des douleurs articulaires ou encore des maux de tête et de gorge. Ensuite, une éruption cutanée va apparaître sur le visage, le tronc et le haut des jambes, et provoquer des démangeaisons [4]. Il peut également y avoir, dans de rares cas, des complications sévères comme une pneumonie, une encéphalite ou encore des complications hémorragiques [6].



**Figure 1 : Schéma de la pathologie du virus de la varicelle et du zona.** Le virus infecte son hôte par des gouttelettes en suspension dans l'air ou via contact direct avec un individu infectieux. Initialement, le virus entre et se réplique dans les cellules épithéliales muqueuses des voies respiratoires supérieures. Ces cellules épithéliales transmettent ensuite le virus aux lymphocytes T des tissus lymphoïdes associés (amygdales palatines et ganglions de la chaîne de Waldeyer). Ces dernières, via la circulation sanguine, vont permettre au virus de migrer vers les cellules épithéliales de la peau et le système nerveux périphérique pour entrer en état de dormance [7]. Le virus peut se réactiver, suite à une immunodépression, c'est le zona. Lors de cette réactivation, le virus va se déplacer de manière antérograde à partir du ganglion où il a établi sa latence vers le dermatome innervé par ce ganglion, et provoquer une éruption cutanée généralement limitée à la zone anatomique innervée par le ganglion dans lequel s'est faite la réaction. [6].

L'entrée en latence démarre par l'entrée du virus via les terminaisons nerveuses des neurones sensoriels au niveau de la peau ou des neurones associés au tractus digestif. Un transport axonal rétrograde permet ensuite au virus d'atteindre les corps cellulaires neuronaux dans les ganglions [6] [8]. Une théorie alternative suggère que les lymphocytes T infectés pourraient transmettre directement le virus dans les ganglions sensoriels [9]. Il faut également noter que la varicelle est une maladie qui peut avoir des conséquences sérieuses chez la femme enceinte. En effet, durant la grossesse, le virus peut passer la barrière placentaire et provoquer des problèmes graves chez le fœtus. Si la maladie se manifeste lors du premier trimestre de la grossesse, cela peut causer le syndrome de varicelle congénitale caractérisé par l'hypoplasie et des anomalies squelettiques, des défauts neurologiques et oculaires, des cicatrices sur la peau ou encore un poids faible à la naissance. Si elle se manifeste à la fin de la grossesse, cela peut provoquer un accouchement d'un enfant prématuré, voire à un mort-né. Par contre, si le virus se propage chez le fœtus 2 à 5 jours avant l'accouchement, le nouveau-né pourra développer la varicelle durant 10 à 15 jours après la naissance [4].

### 1.2.2. Zona

Les réactivations du VZV à partir des sites de latence sont fréquentes et souvent asymptomatiques. Cependant, en cas d'une diminution de l'immunité cellulaire anti-VZV, liée à la vieillesse ou à tout traitement ou maladies susceptibles de faire baisser l'immunité, la réactivation devient symptomatique.

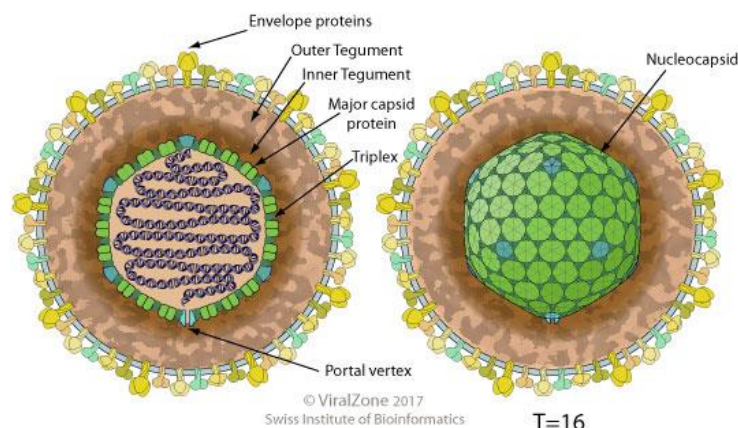
La manifestation la plus fréquente est une éruption cutanée localisée, contrairement à la varicelle, et douloureuse qu'on appelle le zona. En plus des douleurs nerveuses, cette maladie provoque des maux de tête et des malaises, symptômes qui subsistent plusieurs mois après la disparition des lésions cutanées. Le zona peut entraîner des complications optiques comme la névrite optique et la kératite, des inflammations gastro-intestinales (ulcère, pancréatite, hépatite, appendicite), cardiaques (myocardite), des articulations (arthrite), des vaisseaux sanguins (thrombose) et des gonades (orchite chez l'homme), ou encore des myélites et méningites [4] [6] [10] [11]. On parle également du syndrome de Ramsay-Hunt lorsque le zona apparaît au niveau du ganglion gémiclé présent dans le canal facial de l'os temporal. Ceci provoque une otalgie accompagnée de violents acouphènes, voire la surdité, et la perte de goût dans les deux tiers antérieurs de la langue suite à un problème au niveau de la corde du tympan, une branche nerveuse du nerf facial [11]. Des complications neurologiques peuvent également avoir lieu, incluant des anévrysmes cérébraux, des encéphalites, une thrombose veineuse cérébrale et vertébrale périphérique, le syndrome de Reye, voire le syndrome de Guillain-Barré [11] [12].

### **1.3. Morphologie, taxonomie et génome du VZV**

#### **1.3.1. Morphologie**

Au niveau morphologique, les *Herpesviridae* ont une structure générale commune décrite par microscopie électronique (figure 2). Du point de vue structurel, le VZV est un virus sphérique enveloppé d'environ 200 nm qui comprend différentes couches, de la plus interne vers la plus externe :

- Une nucléocapside icosaédrique de 60 unités asymétriques composées chacune de 16 protéines (T=16), formant au total 12 capsomères pentamériques et 150 hexamériques. Elle mesure environ 100 nm de diamètre et entoure le génome d'ADN double-brin. ORF40p est la protéine majeure de la capsid (figure 2, « *major capsid protein* », vert clair). Elle forme les capsomères reliés entre eux par des triplex composés d'1 copie d'ORF20p et de 2 copies d'ORF41p (figure 2, vert foncé) [13] [14].
- Une matrice tégmentaire comprenant beaucoup de protéines structurales et régulatrices encore étudiées aujourd'hui, comme par exemple les protéines précoces immédiates IE62 et IE63, et la protéine ORF9p très importante pour le cycle du virus.
- Une enveloppe lipidique modifiée provenant de la cellule hôte où sont insérées des glycoprotéines virales comme ORF31p (gB), ORF37p (gH), ORF67p (gI) et ORF68p (gE) [13].



**Figure 2 : Structure d'un *herpesviridae*. [15]**

### 1.3.2. Taxonomie

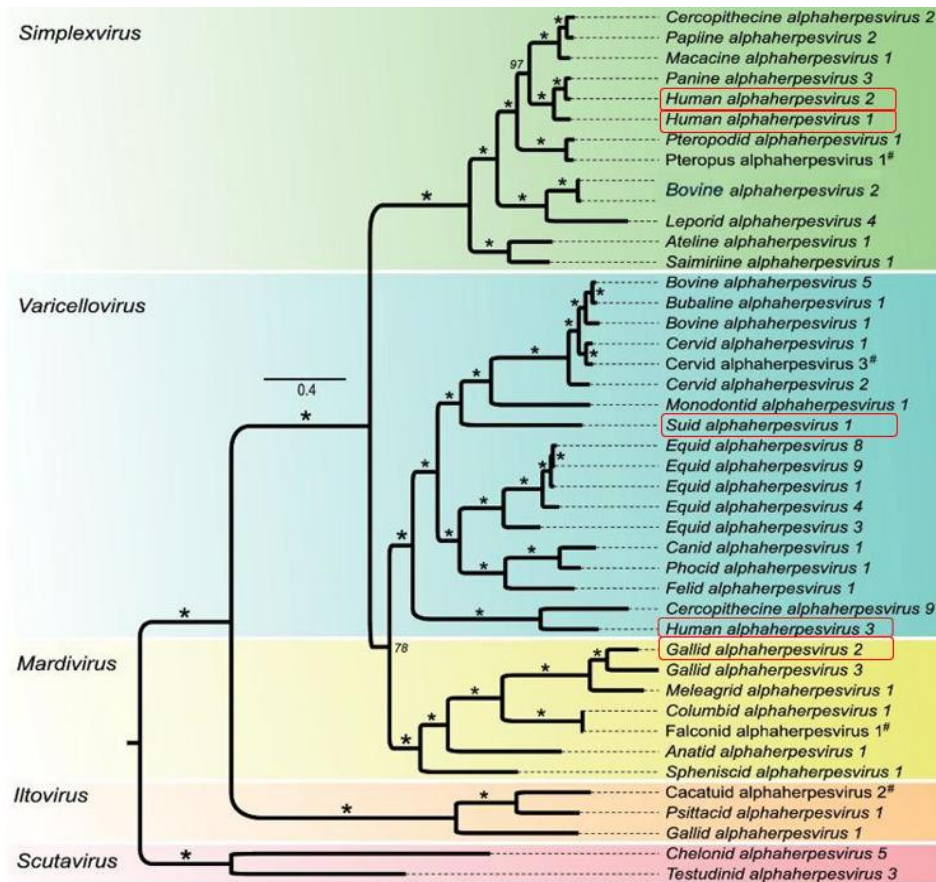
Le virus de la varicelle et du zona appartient à l'ordre des Herpesvirales. Cet ordre comprend la famille des Herpesviridae qui reprend la sous-famille des Alphaherpesvirinae au sein de laquelle se trouve le genre Varicellovirus qui englobe l'espèce herpesvirus humain de type 3 (HHV-3), aussi appelé VZV. La classification basée sur la taxonomie virale vient de l'organisme scientifique et international nommé l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Elle décrit la famille des Herpesviridae divisée en 3 sous-familles :

- *Alphaherpesvirinae*, comprend des virus qui s'installent dans les ganglions sensoriels pour le cycle latent. Cette sous-famille reprend le *Gallid alphaherpesvirus 2* (MVD) chez les Gallinacés qui provoque la maladie de Marek, le virus de la varicelle et du zona (VZV ou HHV-3), les virus de l'Herpès simples de type 1 et 2 qui infectent l'homme, ainsi que le *Suid alphaherpesvirus 1* (PRV), touchant principalement le bétail (figure 3) [16].
- *Betaherpesvirinae*, a un cycle de réplication plus lent que les Alphaherpesvirus et a pour site de latence les cellules T-helpers (CD4 T cells). Elle comprend HHV-6 et HHV-7 responsables de la roséole infantile et HHV-5 aussi appelé cytomégalovirus (figure 3) [16].
- *Gammaherpesvirinae*, établit sa latence dans les tissus lymphoïdes et peut infecter les fibroblastes en plus des cellules épithéliales. On y trouve HHV-8 responsable du sarcome de Kaposi chez les individus immunodéprimés, et HHV-4 (virus Epstein-Barr) qui provoque la mononucléose (figure 3) [16].

Type	Name	Sub-Family	Pathology
HHV-1	Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1)	Alpha-herpesvirinae	Oral and/or Genital herpes (Orofacial) cold sores or herpes labialis
HHV-2	Herpes simplex virus-2 (HSV-2)	Alpha herpesvirinae	Genital and/or Oral herpes (Genital) herpes genitalis or warts
HHV-3	Varicella zoster virus (VZV)	Alpha herpesvirinae	Chickenpox and Shingles
HHV-4	Epstein-Barr virus (EBV)	Gamma herpesvirinae	Infectious mononucleosis, Burkitt's and CNS lymphoma, post-transplant lympho-proliferative syndrome (PTLD), Naso-pharyngeal carcinoma
HHV-5	Cytomegalovirus (CMV)	Beta herpesvirinae	Infectious mononucleosis-like syndrome, retinitis etc.
HHV-6, 7	Roseolovirus B	Beta herpesvirinae	Roseola infantum or exanthem subitum
HHV-8	Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV)	Gamma herpesvirinae	Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, Castleman's disease

**Figure 3 : Tableau récapitulatif des 8 Herpesvirus humains.** Le VZV (ou HHV-3) appartient à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* [17].

Les Alphaherpesvirus sont séparés en 5 genres, dont le genre Simplexvirus qui comprend HSV-1 et HSV-2, très étudiés scientifiquement, et le genre Varicellovirus. Celui-ci est divisé en 19 espèces virales infectant de nombreux mammifères, comme les Bovins, Equidés et Cétacés. Il existe également une espèce virale spécifique aux Cheloniidés, mais aussi le VZV (ou HHV-3) qui est l'unique espèce de Varicellovirus spécifique à l'Homme (figure 4) [18].



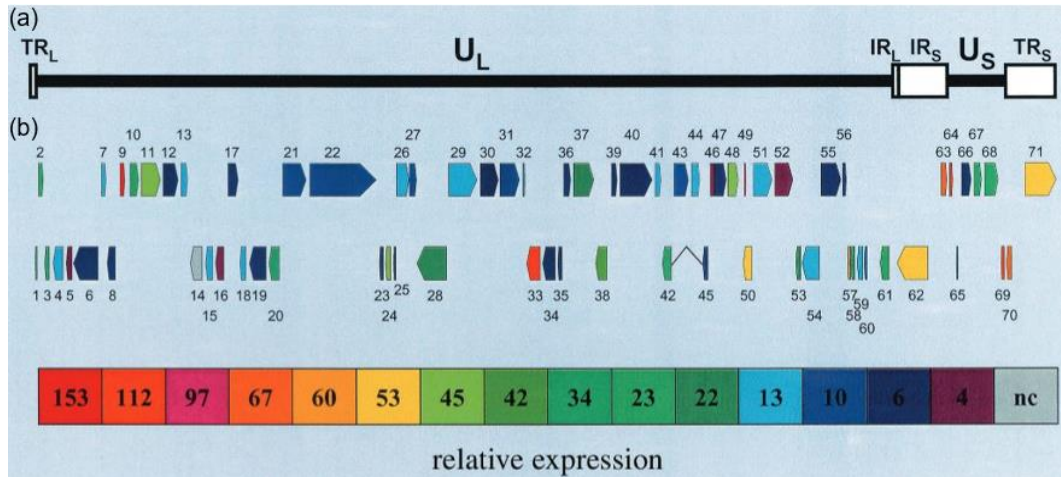
**Figure 4 : Arbre phylogénétique des Alphaherpesvirinae :** Selon l’*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), le VZV est un Herpesviridae de la sous-famille Alphaherpesvirinae qui englobe le genre Varicellovirus qui comprend l’espèce HHV-3 (ou VZV) [19] [17]. Modifié à partir de l’article : F. Pfaff *et al.*, “Full genome sequence of bovine alphaherpesvirus 2 (BoHV-2),” *Arch. Virol.*, vol. 166, no. 2, pp. 639–643, 2021, doi: 10.1007/s00705-020-04895-x

Une autre classification de virus est celle proposée par D. Baltimore en 1975. Cette taxonomie se base sur la nature du génome viral, son mode de répllication et d’expression des ARNm. Le VZV appartient à la classe I, à savoir les virus ayant pour génome de l’ADN double-brin transcrit directement en ARNm. Cette classe de virus comprend les Pandoraviridae (infectent les amibes), les Herpesviridae (dont le VZV), les Poxviridae (variole, vaccine, virus de la myxomatose), et les Papillomaviridae (HPV responsables du cancer du col de l’utérus).

### 1.3.3. Génome

Le génome complet du VZV a été séquencé en 1986 par Davison et Scott à partir de cellules infectées par un virus de la souche Dumas. Il a une longueur de 124 884 paires de bases et comprend un taux de G-C de 46% [2] [20]. Il consiste en un long segment unique ( $U_L$ ) et un petit segment unique ( $U_S$ ) qui peut être orienté dans les deux directions, tous deux délimités par des séquences d’ADN répétées inversées internes  $IR_L/IR_S$  et terminales  $TR_L/TR_S$  (figure 5) [21]. Le génome comprend 5 régions répétées dont la taille diffère selon les souches, à savoir R1 dans l’ORF11, R2 dans l’ORF14, R3 dans l’ORF22, R4 entre l’ORF62 et l’origine de répllication virale, et R5 entre ORF62 et ORF 61 [22]. Les régions répétées présentes de part et d’autre la région  $U_S$  contiennent trois gènes par conséquent présents en double exemplaire (ORF62, ORF63 et ORF64).

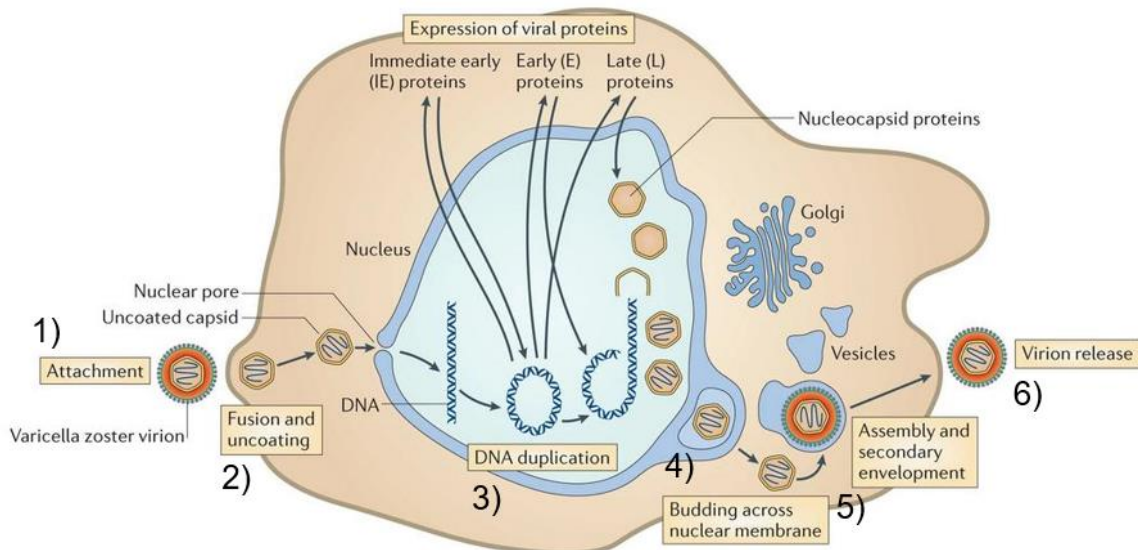




**Figure 5 : Schéma du génome du VZV et des expressions relatives des gènes durant le cycle lytique.** (a) Le génome est constitué d'un long segment unique U<sub>L</sub> et un petit segment U<sub>S</sub> délimités par des séquences d'ADN répétées inversées terminales et internes TR<sub>L</sub>/IR<sub>L</sub>/IR<sub>S</sub>/TR<sub>S</sub>. (b) Position, taille et orientation des différentes ORFs du VZV. Le code couleur représente le taux d'expression des gènes lors du cycle lytique du virus en croissance dans des cultures de cellules BSC-1 [21].

## 2. Cycle lytique

Dans la littérature scientifique, le cycle lytique HSV-1 a été fortement étudié. Comme ce cycle est commun à tous les Alphaherpesvirinae, celui-ci sera décrit de manière générale et sera complété par des précisions sur le VZV dès que les données le permettent (figure 6).



**Figure 6 : Schéma du cycle lytique du VZV.** 1) Les particules virales enveloppées se fixent à la membrane de sa cellule-hôte, fusionnent avec celle-ci et libèrent les capsides et le téguement dans le cytoplasme. 2) Les capsides migrent vers le noyau et s'accrochent aux pores de la membrane nucléaire pour injecter leur ADN dans le noyau. 3) Le génome viral va se circulariser pour permettre sa réplication. Ce sont tout d'abord les gènes immédiats précoces qui vont être exprimés, suivis des gènes précoces et tardifs. Les protéines de la capside vont s'assembler et empaqueter l'ADN génomique viral nouvellement synthétisé. 4) La nucléocapside va ensuite migrer vers la membrane nucléaire interne et la traverser par bourgeonnement puis fusion de l'enveloppe primaire avec la membrane nucléaire externe. Une fois sortie du noyau, la capside nue se retrouve dans le cytoplasme. 5) Les glycoprotéines du virion en provenance du trans-Golgi ou ayant transité par la surface s'accumulent dans des vésicules et les protéines téguementaires vont s'y associer via les queues cytoplasmiques des glycoprotéines : les capsides bourgeonnent à travers ces vésicules, c'est l'enveloppement secondaire. 6) Le virion mature est transporté à la surface de sa cellule-hôte et va pouvoir infecter une nouvelle cellule-hôte [7].

## **2.1. Entrée du virus dans sa cellule-hôte**

Le début du cycle lytique commence par l'attachement du virus enveloppé à la cellule-hôte. Chez HSV-1, cela se fait via les glycoprotéines B (gB) et C (gC) qui reconnaissent des protéoglycanes comme l'héparane-sulfate [23]. Chez VZV, comme le mannose-6-phosphate (M-6P) est présent dans les glycoprotéines, il y a également le récepteur cellulaire M-6P qui interagit avec les glycoprotéines virales, renforçant l'attachement du virus à sa cellule-hôte [7]. La seconde étape fait intervenir la glycoprotéine D (gD) qui va préférentiellement se lier à des protéines membranaires cellulaires, à savoir la nectine-1 (HveC) et un récepteur de la famille TNFR qui forme le *Herpes Virus Entry Mediator* (HVEM). Chez le VZV, la protéine gD est absente. La protéine du VZV qui semble compenser à l'absence de gD n'est autre que la glycoprotéine gE. Celle-ci permet l'entrée du virus en interagissant avec un récepteur membranaire enzymatique qui dégrade l'insuline (IDE) [24]. Intervient ensuite le complexe gB/gH/gL pour permettre la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire ou la vésicule d'endocytose [25]. D'autres protéines, comme l'hétérodimère gM-gN, peuvent également s'ajouter au complexe [26]. Pour entrer dans certains types cellulaires, dont les cellules gliales et les monocytes, il y a également la glycoprotéine myéline-associée cellulaire (MAG) qui interagit avec gB et gE [27]. Il a également été démontré pour HSV et VZV que, dans certains types cellulaires et/ou certaines conditions, l'attachement du virus à la cellule-hôte est suivi par un phénomène d'endocytose, la fusion de l'enveloppe virale se faisant, le cas échéant, avec la vésicule d'endocytose et dépend de l'acidification de cette vésicule [28].

## **2.2. Entrée dans le noyau et expression génique virale**

Après le phénomène de fusion, le virus se retrouve dans le cytoplasme dépourvu de son enveloppe. Celui-ci doit ensuite atteindre son site de réplication qu'est le noyau. Pour ce faire, la capsid interagit directement avec les protéines du cytosquelette cellulaire, à savoir la dynéine et la kinésine-1, protéines qui permettent des mouvements antérogrades et rétrogrades via les microtubules [29]. Une fois à proximité du noyau, la capsid s'attache au niveau des pores nucléaires et libère le génome viral à l'intérieur du noyau sous forme linéaire. Une fois le génome introduit dans le noyau, il va très rapidement se circulariser et exprimer les gènes dits immédiats précoces (IE) qui codent des régulateurs de la transcription de protéines, comme IE62, le transactivateur principal transcrit moins d'une heure après l'entrée du virus, et IE63 chez le VZV. Une fois exprimées dans ce cytoplasme, ces protéines vont revenir dans le noyau pour freiner la transcription des gènes IE et activer la transcription des gènes précoces (E). Les protéines E sont notamment nécessaires à la réplication virale. On peut citer pour le VZV les protéines sérines/thréonines kinases tégumentaires ORF47p et ORF66p, ORF9p (VP22 chez HSV), ou encore ORF28p qui forme l'ADN polymérase. La dernière vague génique est celle des gènes tardifs<sup>1</sup> (L) qui codent pour des protéines de structure comme les glycoprotéines telles que ORF31p (gB), ORF37p (gH), et ORF68p (gE), ou encore la protéine majeure de la nucléocapsid chez le VZV qu'est ORF40p [30].

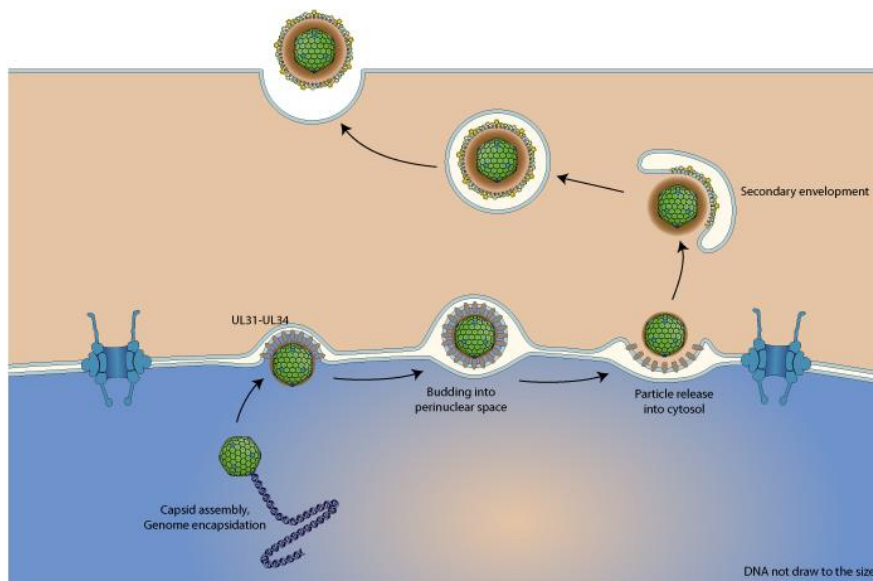
---

<sup>1</sup> Un gène tardif (*late gene*) est un gène qui dépend de la réplication du génome. Si la réplication de l'ADN viral est inhibée, alors l'expression de ce type de gènes est également inhibée.

### 2.3. Formation et sortie des virions

L'étape suivante consiste en l'assemblage des nucléocapsides à partir des pro-capsides. Ces dernières se constituent, au sein du noyau, à partir d'un échafaudage protéique temporaire composé des protéines ORF33p et ORF33.5p. Sur cet échafaudage, reposent les capsomères formés d'ORF40p reliés ensemble par 2 copies d'ORF41p et une copie d'ORF20p [31]. L'échafaudage doit ensuite être dégradé par protéolyse, et l'ADN doit être encapsidé pour former les nucléocapsides complètes de forme C. Seules les capsides de forme C peuvent quitter le noyau. Si la capside mature est dépourvue de génome viral, celle-ci est dite de forme A. La capside peut également adopter une forme B si l'échafaudage est fortement dégradé par protéolyse mais reste toujours présent, ce qui lui permet d'adopter sa forme finale icosaédrique.

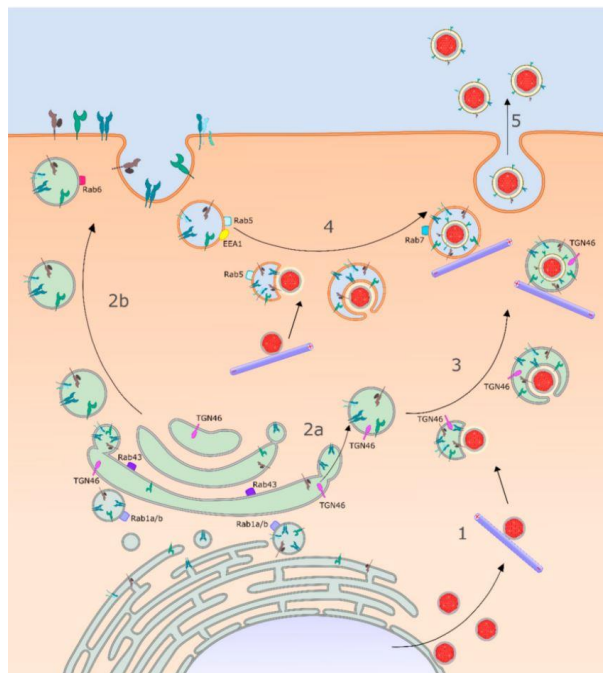
Pour pouvoir sortir du noyau, les capsides de forme C sont aidées par un complexe de sortie nucléaire (*Nuclear egress complex* ou NEC) indispensable. Ce complexe est formé de la protéine ORF24p, ancrée dans la membrane nucléaire interne, qui interagit avec la protéine ORF27p, un cofacteur nucléoplasmique associé aux lamines de la matrice nucléaire (figure 7). Le NEC permet la réorganisation de la lamine par phosphorylation suite au recrutement de kinases, mais également la migration des capsides par bourgeonnement de la membrane nucléaire interne [32].



**Figure 7 : Schéma du NEC de HSV-1.** Lorsque le génome est encapsidé, la capside interagit avec les protéines pUL31 et pUL34 (homologues ORF24p et ORF27p chez le VZV) du complexe NEC pour migrer du noyau au milieu péri-membranaire en passant au travers de la membrane nucléaire interne avec l'aide d'autres protéines virales comme les kinases. La fusion de l'enveloppe primaire avec la membrane nucléaire externe permet ensuite aux capsides nues d'atteindre le cytoplasme.



Arrivée dans l'espace péri-membranaire, la capside a acquis une enveloppe primaire temporaire et doit maintenant traverser la membrane nucléaire externe pour se retrouver sans enveloppe dans le cytoplasme [33]. Une fois dans le cytoplasme, la capside nue va s'entourer de l'ensemble des protéines tégmentaires avant de se lier à la surface d'une vésicule où est accumulé l'ensemble des glycoprotéines virales [23]. La capside bourgeonne à travers cette vésicule, ce qui génère des virions matures contenus dans une vésicule de transport. Celle-ci fusionne avec la membrane plasmique pour libérer les nouvelles particules dans le milieu extracellulaire. Chez le VZV, l'origine de l'enveloppe secondaire reste toujours hypothétique. En effet, une première théorie stipule que l'enveloppement secondaire se déroule dans le TGN puis la particule virale est transportée jusqu'à la membrane plasmique via une vésicule de transport (figure 8). Une seconde théorie mentionne le rôle des tubules d'endocytose, plus précisément un transport vésiculaire intracellulaire entre les endosomes et le réseau trans-golgien avec l'aide de vésicules de clathrine [34]. Une fois arrivé dans le milieu extracellulaire, le virion mature peut recommencer un nouveau cycle infectieux. Néanmoins, il est important de mentionner que le VZV est un des rares virus qui ne réside pratiquement pas dans le milieu extracellulaire. En effet, les virions produits sont exocytés mais restent accrochés à la membrane plasmique. Il faut un contact très étroit entre les cellules pour que les virions puissent interagir avec une cellule non infectée. C'est pour cela que le VZV est défini comme un virus fortement associé aux cellules (*cell-associated virus*). En outre, une autre caractéristique de l'infection par VZV est l'apparition des cellules géantes plurinucléées (*syncytia*) qui résultent de la fusion des cellules infectées entre elles [35].



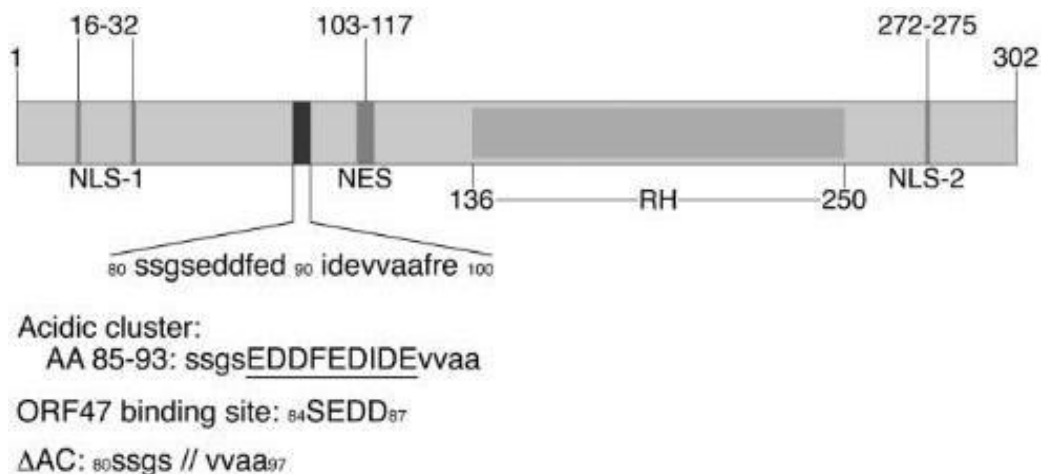
**Figure 8 : Schéma de la sortie de HSV-1 hors de sa cellule-hôte.** 1) Les capsides virales quittent le noyau et utilisent la kinésine pour se déplacer dans le cytoplasme et permettre leur enveloppement. 2) Les protéines de l'enveloppe présentes dans le RE vont migrer vers le TGN 2a) ou la membrane plasmique 2b). 3) Les capsides acquièrent leur enveloppe dérivée d'une vésicule du TGN. 4) Alternativement, des protéines virales en surface sont endocytées pour permettre l'enveloppement de la capside virale. 5) Les virions matures migrent vers la surface et quittent la cellule-hôte [36] [37].

### 3. Protéines clés de la fusion cellule-cellule

Comme expliqué précédemment, le VZV acquiert son enveloppe définitive au niveau du TGN même si les mécanismes restent encore hypothétiques. La protéine tégumentaire ORF9p joue un rôle crucial dans cet enveloppement secondaire. Un des partenaires cellulaires de la protéine ORF9p est la protéine AP-1 (*Adaptor Protein-1*), un régulateur du trafic intracellulaire. ORF9p interagit également avec les glycoprotéines virales qui interviennent dans la fusion des cellules et la formation de *syncytia*. Une absence de ces protéines provoque une diminution drastique de la propagation du virus.

#### 3.1. La phosphoprotéine virale tégumentaire ORF9p (VP22)

Le gène codant pour la protéine ORF9p, homologue de VP22 chez HSV-1, est le plus fortement exprimé lors de l'infection lytique du VZV, ce qui laisse penser que ORF9p joue un rôle crucial dans la réplication et la croissance virale [38]. ORF9p est une phosphoprotéine tégumentaire de 302 AA. A l'inverse de son homologue VP22 chez HSV-1, elle est essentielle et indispensable à la réplication virale. Des études en transfection transitoire ont montré que cette protéine comprend dans sa séquence des régions fonctionnelles NLS (*Nuclear localization signal*) que sont NLS-1 (<sub>16</sub>RRKTTPSYSGQYRTARR<sub>32</sub>) et NLS-2 (<sub>272</sub>RKPK<sub>275</sub>), et une région fonctionnelle NES (*Nuclear export signal*) riche en leucine (<sub>103</sub>LRHELVEDAVYENPL<sub>117</sub>) (figure 9) [38]. ORF9p a également été détectée dans le TGN par microscopie électronique. Par ailleurs, des études en transfection transitoire montrent que celle-ci interagit avec de nombreuses protéines virales comme IE62, gE et ORF11p. De plus, des études en double hybride (*Yeast two-hybrid screen*) montrent qu'elle interagit avec les protéines de l'enveloppe ORF15p et ORF38p, la petite protéine de la capsid ORF23p, et des glycoprotéines comme gE, gN, gH et gI. Cela laisse à supposer que la protéine ORF9p joue un rôle important dans l'enveloppement secondaire [39] [40].



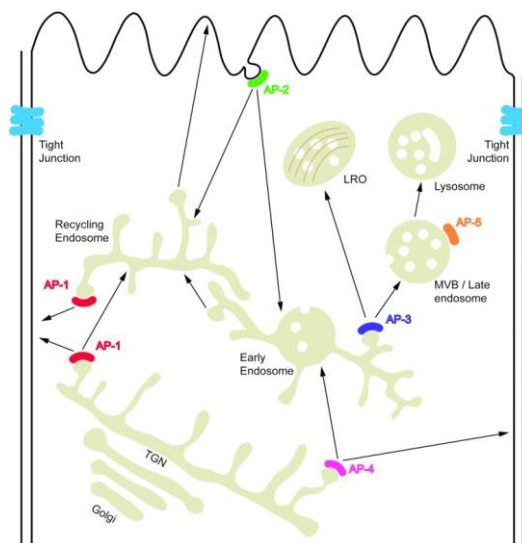
**Figure 9 : Structure de la protéine ORF9p.** La protéine ORF9p comprend deux régions NLS-1 et NL-2, et une région NES qui lui permet de voyager entre le noyau et le cytoplasme. Elle est phosphorylée par la kinase ORF47p au niveau d'une région acide (<sub>85</sub>EDDFEDIDE<sub>93</sub>) [39].

Il a été récemment démontré par notre laboratoire que la sérine/thréonine kinase ORF47p interagit et phosphoryle ORF9p dans sa région acide ( $_{85}\text{EDDFEDIDE}_{93}$ ). En effet, une mutation E85R, ou encore la délétion totale de la région acide (ORF9p- $\Delta$ AC), modifie drastiquement le profil électrophorétique de la protéine ORF9p avec une disparition quasiment totale des formes phosphorylées. Ces mutations provoquent par ailleurs l'accumulation de virions immatures dans des membranes dérivées du TGN et dans le noyau. Ceci montre qu'ORF9p et ORF47P sont indispensables pour la sortie des particules hors du noyau et l'enveloppement primaire, mais aussi au niveau de l'enveloppement secondaire dans le TGN [39] [33].

Pour mettre en évidence les partenaires potentiels de ORF9p dans l'enveloppement, une expérience de screening double hybride en levure (*Yeast two-hybrid screen*) a été réalisée au sein de notre laboratoire. Celle-ci a dénombré 31 partenaires d'interaction avec ORF9p parmi lesquels la sous-unité  $\mu$ 1 du complexe cellulaire AP-1. ORF9p possède 5 motifs potentiels d'interaction avec AP-1 (une région acide  $_{85}\text{EDDFEDIDE}_{93}$ , deux motifs tyrosines  $_{61}\text{YADL}_{64}$  et  $_{227}\text{YAQV}_{232}$ , et deux motifs di-leucines  $_{211}\text{ELDRLL}_{216}$  et  $_{227}\text{EGLNLI}_{232}$ ). Plus précisément, il a été montré qu'un des deux motifs di-leucines, hautement conservé chez les Alphaherpesvirus, est indispensable pour pouvoir interagir avec AP-1. En effet, une mutation de la leucine 231 en alanine (L231A) entraîne une perte d'interaction avec AP-1 et perturbe la croissance virale [34].

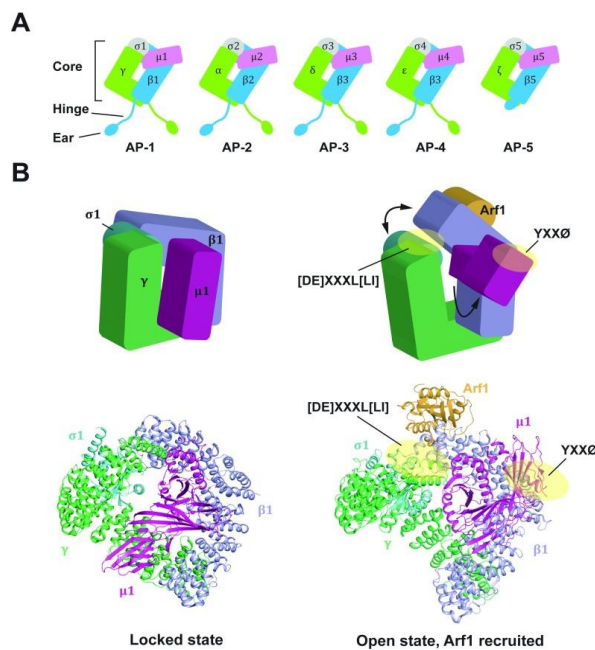
### **3.2. Le complexe cellulaire AP-1 (adaptor protein complex 1)**

Les complexes cellulaires adaptines (AP) régulent le trafic intracellulaire des voies de transport endocytaires et sécrétoires. Il existe cinq complexes AP, et seuls AP-1, AP-2 et AP-3 sont associés à la clathrine. En effet, ceux-ci reconnaissent la queue cytoplasmique des protéines de cargaison et recrutent la clathrine et des protéines accessoires pour les concentrer dans des transporteurs vésiculaires pour permettre leur transport d'une membrane donneuse à une membrane cible. Ils permettent donc le maintien de certaines fonctions physiologiques indispensables des cellules eucaryotes (figure 10) [41].



**Figure 10 : Localisation des complexes cellulaires AP.** AP-1 régule le transport entre le TGN et l'endosome de recyclage.

Tous les complexes AP comportent un domaine corps responsable de la liaison des protéines cargos, une région charnière qui se lie à la clathrine, et des sous-domaines oreilles importants pour l'interaction entre les protéines cargos et accessoires. AP-1 a pour rôle le transfert bidirectionnel entre le TGN et les endosomes, la biogenèse des granules de sécrétion et la polarité des cellules épithéliales (figure 11). Son domaine corps comprend des grandes sous-unités  $\beta 1$  (AP1B1) et  $\gamma$  (AP1G1), une sous-unité moyenne  $\mu 1$  (AP1M1) et une petite sous-unité  $\sigma 1$  (AP1S1). Lorsque le complexe est sous forme fermée, les sites de liaison aux protéines cargos sont cachés par les deux grandes sous-unités. En présence de la GTPase Arf1, le complexe subit un changement conformationnel et peut interagir avec les protéines cargos (figure 12). Il existe plusieurs types de motifs reconnus par le complexe AP-1 que sont les signaux tyrosines YXXO (Y tyrosine, X n'importe quel AA, O un AA hydrophobe), reconnus par la sous-unité  $\mu 1$ , et les signaux dileucines D/EeXXXLL/Ii, reconnus par la sous-unité  $\gamma$ , ce qui permet une certaine spécificité du transport de protéines, et des motifs acides [41] [42].



**Figure 11 : Structure des complexes AP.** A. Les complexes d'adaptine sont composés d'un domaine central (*core*) relié à 2 domaines oreilles (*ear*) reliés par 2 domaines charniers (*hinge*). B. Configuration ouverte et fermée du complexe AP-1. Le domaine *core* comprend des grandes sous-unités  $\gamma$  (AP1G1) qui reconnaissent les signaux dileucines DeXXXLLi et  $\beta 1$  (AP1B1), une sous-unité moyenne  $\mu 1$  (AP1M1) qui reconnaît les signaux tyrosines YXXO et une petite sous-unité  $\sigma 1$  (AP1S1). La présence d'ARF-1 permet le changement de conformation et l'exposition des domaines de liaison au cargo.

### 3.3. Les glycoprotéines virales

Le VZV comprend neuf glycoprotéines virales (figure 12) [25]. La plupart de ces glycoprotéines sont indispensables pour le cycle viral, notamment au niveau de l'entrée du virus dans sa cellule-hôte. Puisque parmi celles-ci se trouvent les protéines permettant la fusion de l'enveloppe avec la membrane plasmique, et qu'elles sont également exprimées plus ou moins fortement à la surface des cellules infectées, les événements de fusion cellule à cellule ne sont pas rares lors d'une infection par un virus enveloppé. Le VZV provoque d'ailleurs, dans certains types cellulaires, particulièrement au niveau de la peau, la formation de cellules géantes plurinucléées, les *syncytia*.

ORF	Glycoprotein	Length		Mw (kDa) <sup>a</sup>	Required	Heterodimer
		NT	AA			
ORF5	gK	1023	340	40	Yes	ORF39
ORF9A	gN	264	87	7	No <sup>b</sup>	gM
ORF14	gC	1776	591	100	No	
ORF31	gB	2796	931	130	Yes	
ORF37	gH	2496	841	118	Yes	gL
ORF50	gM	1308	435	50	No <sup>b</sup>	gN
ORF60	gL	483	160	17	Yes	gH
ORF67	gI	1065	354	65	No <sup>b</sup>	gE
ORF68	gE	1872	623	110	Yes	gI

<sup>a</sup> Glycosylated form

<sup>b</sup> Severe replication defect in cell culture

**Figure 12 : Présentation des 9 glycoprotéines virales.** Tableau modifié à partir de l'article : S. L. Oliver, E. Yang, and A. M. Arvin, "Varicella-Zoster Virus Glycoproteins: Entry, Replication, and Pathogenesis," *Curr. Clin. Microbiol. Reports*, vol. 3, no. 4, pp. 204–215, 2016, doi: 10.1007/s40588-016-0044-4.

### 3.3.1. Les glycoprotéines gE et gI

La glycoprotéine gE (ORF68p) de 623 AA (110 kDa) est la plus abondante et essentielle à la réplication virale. Son endodomaine C-terminal (AA 562 à 624) comprend des motifs pour permettre son internalisation de la membrane plasmique vers le TGN. Des études de mutagenèse ont montré que la région N-terminale (AA 1 à 188) comprend des motifs permettant la liaison du VZV à son récepteur IDE (AA 24 à 71) [43]. La glycoprotéine gE est connue pour être exprimée à la surface des cellules infectées d'où elle est endocytée et renvoyée vers le TGN grâce à deux motifs tyrosines (YAGL ou AYRV) et une région acide (DDFEDSESTDEEE) présents dans l'endodomaine C-terminal (AA 562 à 624) (figure 13) [44] [45] [46]. Cette glycoprotéine intervient dans l'enveloppement secondaire, la propagation virale et l'infection de la peau *in vivo* [43].



**Figure 13 : Structure de la glycoprotéine gE de VZV.** La glycoprotéine gE (ORF68p) est endocytée et renvoyée dans le TGN à partir de la surface des cellules infectées grâce à 2 motifs tyrosines (AYRV et YAGL) et une région acide (DDFEDSESTDEEE) dans son endodomaine C-terminal (AA 562 à 624).

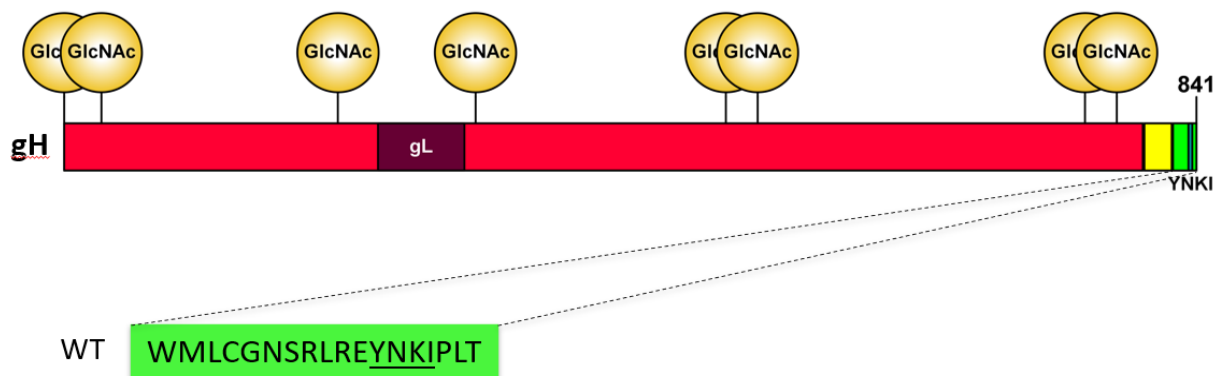
La glycoprotéine gI (ORF67p), composée de 354 AA (65 kDa), est divisée en 4 parties, à savoir un peptide signal (1 à 17 AA), un ectodomaine (18 à 277 AA), une région trans-membranaire (278 à 296 AA) et une région cytoplasmique (297 à 354 AA) [47]. Des études de mutagenèse ont également montré que la protéine gI est nécessaire pour la fusion des membranes cellulaires et la formation des *syncytia* mais n'est pas essentielle pour la formation des virions et leur entrée dans les cellules-hôtes [43] [45] [48].

Pour gI, des études ont montré que la thréonine T338 et la sérine S343 du domaine cytoplasmique de gI sont impliquées dans sa localisation dans le TGN [44]. La partie N-terminale de gI, à savoir les résidus 105 à 125 et la cystéine C95, très conservée chez les *Alphaherpesvirinae*, interagit avec la première région riche en cystéines (AA 208 à 236) de l'ectodomaine de gE [47] [45] pour former un complexe qui permet notamment la correcte localisation des deux protéines dans les cellules infectées et leur incorporation dans les particules virales nouvellement produites [43].

### 3.3.2. Les glycoprotéines gB, gH et gL

Les trois glycoprotéines gB (ORF31p), gH (ORF37p) et gL (ORF60p) très conservées chez les herpesvirus forment le complexe de fusion du VZV et sont essentielles à la réplication. Elles jouent un rôle important dans l'entrée du virus dans sa cellule-hôte mais également dans la fusion cellule-cellule.

La glycoprotéine gH est d'abord exprimée sous forme d'un polypeptide immature de 841 AA (100 kDa) et doit interagir avec la protéine chaperone gL, qui possède 160 AA (17 kDa), pour être correctement glycosylée dans l'appareil de Golgi (118 kDa). Comme gB, gH est ensuite exprimée vers la surface cellulaire avant d'être endocytée et renvoyée vers le TGN pour être incorporée dans l'enveloppe virale. Cette protéine comprend une région N-terminale extracellulaire hydrophobe et une courte région intra-cytoplasmique [49] (figure 14). Il a été démontré en transfection transitoire que gE ou gI peut interagir avec gH en absence de gL pour assurer le trafic de gH immature du RE/TGN à la membrane plasmique [50].

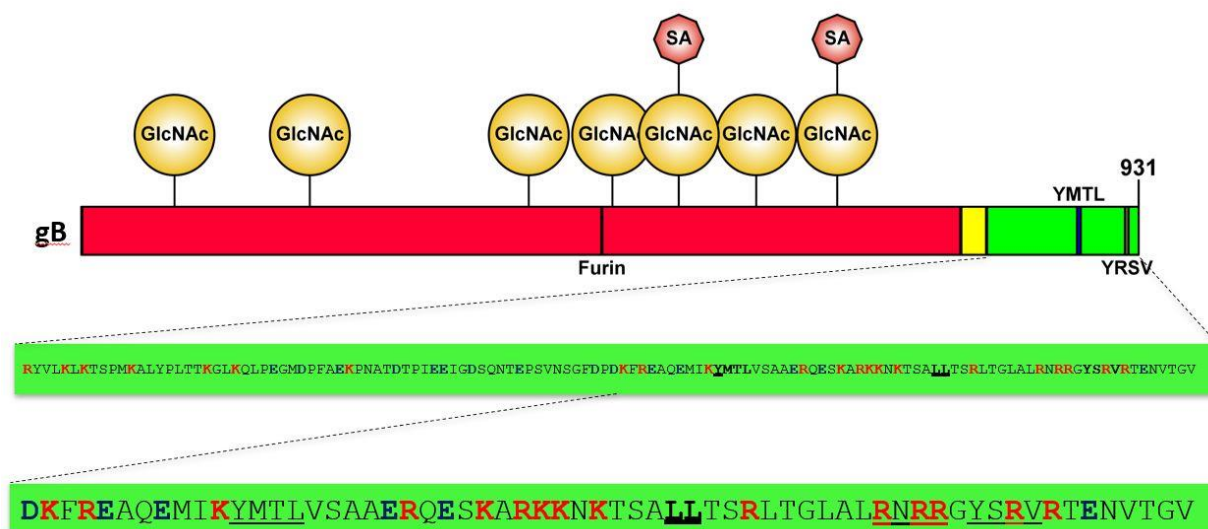


**Figure 14 : Structure de la glycoprotéine gH de VZV.** La glycoprotéine gH (ORF37p) comprend une région N-terminale extracellulaire, comprenant un domaine d'interaction avec gL et des motifs de glycosylation, un domaine transmembranaire (en jaune) et une courte queue intra-cytoplasmique contenant un motif d'adressage au TGN (YNKI). Figure modifiée à partir de la thèse de Julien Lambert.



Des études de mutagenèse et de cristallographie ont permis de caractériser dans la région N-terminale le rôle des 3 domaines de gH chez VZV par analogie avec HSV-2. Le premier domaine est important pour l'entrée du virus et la pathogénicité et est composé de feuillets  $\beta$  sans cystéine (contrairement à HSV-2). Le deuxième domaine central contient des hélices  $\alpha$  et un pont disulfure essentiel (entre C540 et C575) pour la structure, localisation et maturation de gH. Enfin, le troisième domaine C-terminal essentiel est formé de feuillets  $\beta$  et de 2 ponts disulfures essentiels ( $_{674}C...C_{703}$  et  $_{724}CXXC_{727}$ ) pour la stabilité et la fusion des membranes [51]. Le domaine cytoplasmique de gH (834 à 841 AA, nommé gHCyt) intervient dans la régulation de la fusion cellule-cellule médiée par le complexe gB/gH-gL. En effet, des études ont montré qu'une délétion de gHCyt conduit à une fusion cellule-cellule exagérée qui mène à l'apparition de *syncytia* de très grande taille. De façon intéressante, ce phénotype d'hyperfusion diminue la production de particules virales et donc l'infectivité du virus [49]. Cependant, ces études ont aussi montré que la régulation par gHCyt ne dépend pas des propriétés intrinsèques ou de la spécificité des AA mais simplement de la longueur physique du domaine [49].

Concernant la glycoprotéine gB, celle-ci comprend 931 AA (130 kDa) par monomère divisé en un ectodomaine, un domaine trans-membranaire et un domaine cytoplasmique de 124 AA [52] (figure 15). Contrairement à HSV, gB est clivée à maturation par une furine en 2 fragments de 69 kDa et 73 kDa au niveau du site de clivage (491RSRR494). Son côté C-terminal comprend d'une part, une région de 4 lysines (positions 894, 897, 898 et 900) qui favorise l'expression de gB, et d'autre part, un motif d'inhibition des immuno-récepteurs à base de tyrosine (ITIM) (879IKYMTLV885) qui régule la fusion cellule-cellule et la formation des *syncytia*, c'est pourquoi une mutation de cette région réduit la pathogénicité du virus [49] [53]. Le domaine extracellulaire, composé de 5 domaines, permet la fusion des membranes.



**Figure 15 : Structure de la glycoprotéine gB de VZV.** La glycoprotéine gB (ORF31p) comprend un site de clivage de la furine, un motif C-terminal YSRV pour permettre son endocytose, et un motif C-terminal YMTL pour retourner dans le TGN et s'insérer dans l'enveloppe du virion [54]. Figure modifiée d'après la thèse de Julien Lambert.

Selon la littérature, lors de l'entrée du virus, le complexe gH-gL interagit avec les protéines de la membrane cellulaire-hôte pour permettre la transition de gB. Cette transition permet aux boucles de fusion de l'ectodomaine de gB de s'intégrer dans la membrane plasmique pour pouvoir rapprocher les membranes cellulaire et virale lors d'une réaction de condensation. [55]. Cette glycoprotéine gB peut être exportée dans le RE puis processée dans l'appareil de Golgi avant de circuler jusqu'à la surface cellulaire. Ensuite, elle est endocytée via son motif YSRV dans la région C-terminale. De plus, grâce à son motif YMTL également présent dans la région C-terminale, elle peut retourner dans le TGN et s'insérer dans l'enveloppe virale [54].

### **3.3.3. Les glycoprotéines gM et gN**

Les glycoprotéines gN (ORF9Ap) et gM (ORF50p) ont respectivement un poids moléculaire de 7 kDa (87 AA) et 50 kDa (435 AA). Elles sont conservées chez tous les herpesvirus, ne sont pas essentielles pour la réplication virale, mais forment un hétérodimère qui participe à l'attachement du virus à sa cellule-hôte et la fusion cellule-cellule mais n'intervient pas dans la morphogénèse du virion. Les protéines gM et gN interagissent ensemble via des ponts disulfures entre leurs cystéines, et des mutations de la valine 42 et de la glycine 301 de gM bloquent sa maturation et son transport dans le TGN, ce qui inhibe son interaction avec gN [26].

### **3.3.4. Les glycoprotéines gK et gC**

La glycoprotéine K (ORF5p) comporte 340 AA (40 kDa), est essentielle au cycle viral et interagit avec une protéine de l'enveloppe ORF39p (homologue UL20 chez HSV-1). Il y a peu de données sur ces deux protéines hautement hydrophobes car il est difficile de générer des anticorps suffisamment spécifiques. La littérature décrit cependant que gK et ORF39p influencent mutuellement leur trafic intracellulaire, mais pas uniquement suite à leur co-expression (comme c'est le cas chez HSV-1). Il est connu chez HSV-1 et PRV que gK est impliquée dans l'enveloppement secondaire. En effet, des études sur des mutants dépourvus d'UL20 ou de gK montrent une accumulation des particules dans des vésicules cellulaires mais peu de particules extracellulaires. En outre, ces virus mutants sont hyperfusogènes et conduisent à l'apparition de *syncytia*, généralement absents lors d'une infection par HSV-1 ou PRV. Les informations concernant gK de VZV sont minces. Des études en transfection montrent que le complexe gK-ORF39p est localisé dans le RE, le TGN et la membrane plasmique, et est colocalisé avec gE, gB et gH qui facilitent son transport hors du RE [56] [57]. La dernière glycoprotéine est gC (ORF14p) de 591 AA (100 kDa). Cette protéine est non essentielle à la réplication virale. Elle ne possède pas de motif de transport dans sa queue cytoplasmique. Localisée dans le RE et le TGN, le rôle de cette glycoprotéine reste toujours méconnu à l'heure actuelle [58].



## 4. Résultats préliminaires

Comme décrit ci-dessus, la mutation de la leucine 231 de l'ORF9p en une alanine (L231A) perturbe complètement son interaction avec le complexe AP-1. Le mutant L231A présente un défaut de croissance très important mais génère également des foyers d'infection complètement dépourvus de *syncytium*. La mutation L231A semble donc impacter fortement la fusion cellule-cellule. De façon intéressante, après un certain nombre de passages en culture, une réversion de ce phénotype est observée avec une réapparition des *syncytia*. L'ADN génomique viral de dix souches du VZV issues d'évènements de réversion indépendants a été extrait à partir de cellules infectées et séquencé par séquençage à haut débit. Les résultats montrent que des mutations spontanées compensatoires apparaissent sur le virus L231A pour pallier au manque de croissance/fusion. Ces mutations identifiées se situent principalement dans la séquence des glycoprotéines gE et gH (figure 16).

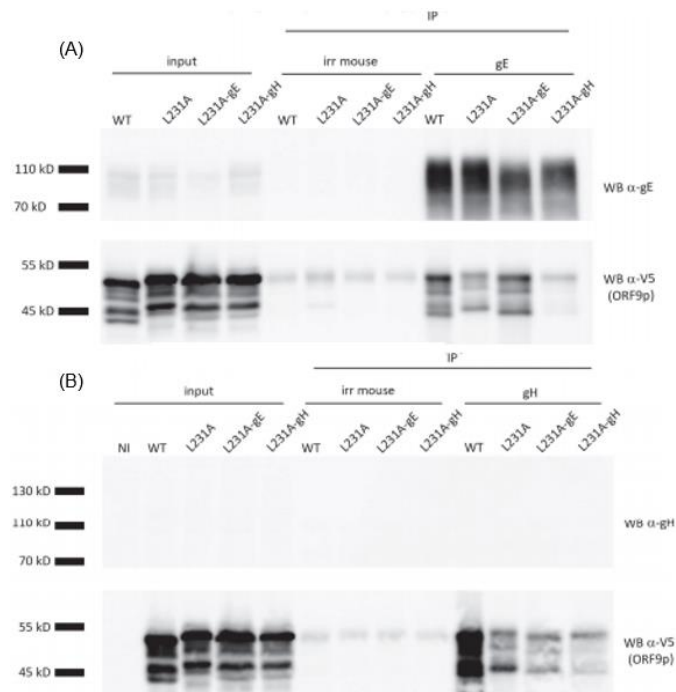
	ORF9			ORF31 (gB)			ORF37 (gH)								ORF68 (gE)				
	S168P	T217A	I221N	E84K	Q752R	V810M	promotor	R168T	T169P	A168V	S304F	D686Y	T736I	Y804D	STOP codon	D436H	G611W	S613W	D620Y
L231Arev1										x (11 %)					E834STOP (31 %)				x (42%)
L231Arev2																x (96%)			x (85%)
L231Arev3							A→G (33%)			x (11 %)					E834STOP (71 %)				
L231Arev4										x (21 %)					E834STOP (34 %)				x (52%)
L231Arev5					x (22%)			x (13%)									x (94%)		
L231Arev6															R833STOP (36 %)				
L231Arev7																x (85%)			x (89%)
L231Arev8														x (16%)	E834STOP (78 %)				
L231Arev9										x (9%)		x (17%)			E834STOP (72 %)				
L231Arev10															R833STOP (30 %)				
L231Arev11					x (13%)										R833STOP (41 %)				

**Figure 16 : Tableau récapitulatif des mutations spontanées compensatoires apparues dans les virus mutants exprimant la protéine OEF9p-L231A.** Après un certain nombre de passages en culture de cellules Mewo infectées par le virus ORF9p-L231A qui a perdu la capacité d'induire la formation de *syncytia*, une réversion du phénotype est observée, le caractère fusogène étant récupéré. L'ADN génomique viral de dix souches du VZVZ a été extrait et séquencé par séquençage à haut débit. Une grande majorité des mutations se situe principalement dans gE et gH. Figure modifiée d'après la thèse de Julien Lambert.

Deux mutations furent sélectionnées (gH-R833Stop et la double mutation gE-D436H/D620Y) sur base du fait que certaines souches révertées possédaient uniquement la mutation introduisant le codon stop dans la séquence codante de gH ou uniquement la double mutation dans la séquence de gE. Afin de vérifier que ces mutations restaurent le phénotype de fusion du mutant L231A, ces dernières ont été introduites dans le BAC VZV contenant la mutation L231A. Après transfection de ces BAC en cellules MeWo, l'analyse des foyers d'infection a permis de démontrer que les virus L231A mutés sur gE ou gH retrouvent leur phénotype de fusion, à savoir la capacité d'induire la formation des *syncytia*.

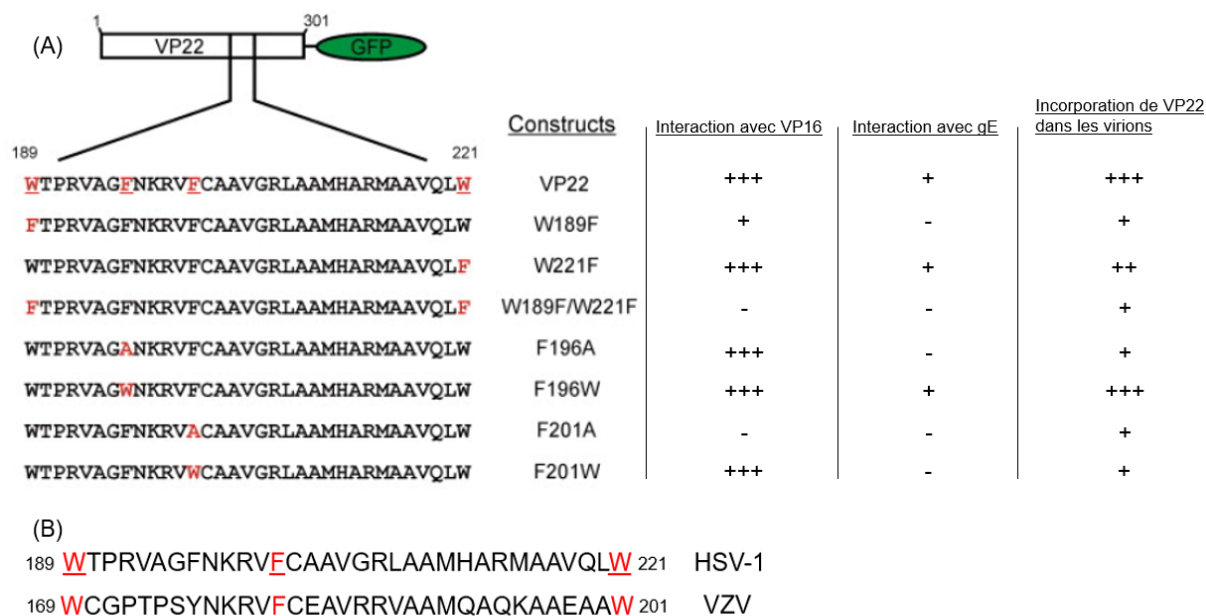
Des expériences de co-immunoprécipitation ont ensuite été menées pour déterminer si la mutation L231A d'ORF9p et les mutations compensatoires sur gH et gE perturbaient les interactions entre ORF9p et les glycoprotéines. Il faut noter que l'interaction entre ORF9p et gE avait déjà été décrite dans la littérature [40], mais que rien n'était connu d'une potentielle interaction entre ORF9p et gH.

Des extraits totaux de cellules MeWo infectées pendant 48h par le virus sauvage WT, le virus 9-L231A-V5, le virus 9-L231A-gHdeltaCyt ou le virus 9-L231A-V5-gE-D436H-D620Y ont été mis en contact avec des billes magnétiques recouvertes d'un anticorps anti-gH ou d'un anticorps anti-gE. Des billes recouvertes par des AC de souris non spécifiques ont été incubées en parallèle pour servir de contrôle. Après un lavage stringent des billes, les complexes protéiques liés aux AC ont été élués et déposés sur gel SDS-PAGE. Après migration et transfert sur une membrane de PVDF, les protéines immunoprécipitées ont été identifiées par WB. La partie supérieure de la membrane a été révélée par l'AC anti-gE ou l'anti-gH utilisé pour l'IP, et la partie inférieure de la membrane par un AC anti-V5, reconnaissant ORF9p-V5 (sauvage ou mutant). Comme attendu, dans une infection WT, ORF9p co-immunoprécipite avec gE (figure 17A). Dans le contexte de l'infection sauvage, la protéine ORF9p semble également interagir fortement avec gH (figure 17B). Il faut noter qu'aucun signal n'a pu être observé dans le WB réalisé sur la partie supérieure de la membrane, ce qui semble indiquer que l'AC anti-gH ne fonctionne pas en WB, lorsque la protéine est dénaturée. La mutation L231A diminue l'interaction entre ORF9p et gE mais encore plus fortement celle entre ORF9p et gH (figures 17A et 17B). La double mutation sur gE restaure l'interaction ORF9p-gE mais pas ORF9p-gH. Par contre, la mutation compensatoire sur gH ne restaure ni l'interaction ORF9p-gE, ni ORF9p-gH. En conclusion, la mutation L231A sur l'ORF9p, qui perturbe la propagation virale et la fusion cellule-cellule, impacte l'interaction d'ORF9p non seulement avec le complexe AP-1 mais également avec aux moins deux des glycoprotéines virales. Il serait maintenant intéressant de comprendre pourquoi ces pertes d'interaction conduisent au défaut de fusion observé.



**Figure 17 : Montages des blots issus des IP gE et gH.** A. Membrane correspondant à l'IP gE dont la partie supérieure a été révélée par l'AC anti-gE. Pour le WT, comme attendu, ORF9p co-immunoprécipite avec gE. La mutation L231A diminue fortement l'interaction mais encore plus fortement pour la mutation L231A-gH. B. Membrane correspondant à l'IP gE dont la partie supérieure a été révélée par l'AC anti-gH qui ne fonctionne pas en WB car la protéine est dénaturée (donc rien n'est visible). Pour le WT, ORF9p co-immunoprécipite avec gH. Les mutations L231A et L231A-gH diminuent fortement l'interaction. La double mutation sur gE ne restaure pas l'interaction.

Le domaine d'interaction entre ORF9p et gE et, à fortiori, celui entre ORF9p et gH ne sont pas encore connus à l'heure actuelle. Par contre, des données existent dans la littérature concernant VP22 d'HSV-1, à savoir la présence du domaine WW. Les domaines WW comportent généralement 35 à 40 AA caractérisés par 2 résidus aromatiques (W). Une étude a montré que les ligands du domaine WW comprennent également des motifs peptidiques riches en proline et des sites de sérine/thréonine-proline phosphorylés, ce qui permet à VP22 d'interagir avec VP16 (homologue d'ORF10p chez VZV) et gE [59]. Il faut noter que le domaine riche en prolines de gE n'est pas conservé chez VZV. Les auteurs de cette étude ont tout d'abord muté les deux tryptophanes en phénylalanines, formant les virus mutants W189F, W221F et le mutant double W189F/W221F [59]. Les mutations de l'étude, réalisées sur VP22 d'HSV-1, ont été réalisées sur les résidus homologues d'ORF9p chez VZV au sein de notre laboratoire, donnant les virus mutants W169F, W201F et W169F/W201F (figure 18). Les auteurs de l'étude ont ensuite muté deux résidus phénylalanines, présents en position 196 et 201 entre les deux tryptophanes du domaine WW de VP22, en une alanine ou un tryptophane, formant les virus mutants F169A, F201A, F196W et F201W [59]. Ces mutations ont également été réalisées au sein de notre laboratoire sur les résidus homologues d'ORF9p chez VZV, formant les virus mutants F181A et F181W (figure 18). Ces mutants forment la base de mon mémoire.



**Figure 18 : Mutations opérées dans le domaine WW de VP22.** (A). Séquences et positions des mutations insérées dans le domaine WW des virus mutants de VP22. La protéine VP22 de HSV-1 comprend un domaine WW qui a été muté à différents endroits, à savoir au niveau des résidus tryptophanes 189 et/ou 221 qui ont été remplacés par des phénylalanines (W189F, W221F et W189F/W221F), et les résidus phénylalanines 196 et 201 qui ont été remplacés par des alanines (F196A et F201A) ou en tryptophanes (F196W et F201W). Ces mutations ne perturbent pas l'incorporation de VP22 dans les virions mais certaines modifient l'interaction de VP22 avec VP16 et la glycoprotéine gE. (B). Alignement de la séquence du domaine WW d'HSV-1 et de VZV. La séquence du domaine WW entre HSV-1 et VZV est fortement conservée. Les résidus homologues à HSV-1 qui ont été mutés chez VZV sont les W en position 169 et 201 (189 et 221 chez HSV-1) et le F en position 181 (201 chez HSV-1). Figure adaptée à partir de l'article : K. J. O'Regan, M. J. Brignati, M. A. Murphy, M. A. Bucks, and R. J. Courtney, « Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is facilitated by trans-Golgi network localization and is independent of interaction with glycoprotein E, » *Virology*, vol. 405, no. 1, pp. 176-192, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.virol.2010.06.007.

# BUT & OBJECTIFS

Le but de cette recherche fondamentale est de comprendre le rôle de la plus abondante des protéines exprimées chez VZV, à savoir ORF9p. Cette protéine, étudiée depuis longtemps en laboratoire, est essentielle et possède de nombreux rôles au sein du cycle viral. Plus précisément, l'objectif de ce travail est d'étudier son rôle au sein de la fusion cellule-cellule pour permettre la propagation du VZV dans les tissus. Pour ce faire, le travail a été divisé en différentes problématiques, chacune représentée par une question :

- 1) Les mutations W169F, F181A, F181W et W201F impactent-elles l'infectivité du virus et la capacité de fusion des cellules infectées ?
- 2) Les mutations F181A, F181W et W201F interfèrent-elles dans les interactions entre ORF9p et les glycoprotéines gE, gH et gB ?
- 3) Où se situe la protéine ORF9p et ses partenaires dans les cellules infectées lorsque celle-ci est mutée sur les résidus F181A et F181W ?
- 4) Observe-t-on des mutations compensatoires dans le génome des mutants F181A, F181W et W201F lorsqu'ils sont maintenus pendant de nombreux passages en culture ?

Pour tenter de répondre à ces questions, les mutants ayant été créés avant mon arrivée au laboratoire de Virologie & Immunologie, différentes expériences ont été réalisées. Tout d'abord, la taille des foyers viraux a été analysée au cours du temps pour démontrer un éventuel défaut de fusion chez les mutants. Ensuite, des co-immunoprécipitations ont été effectuées pour étudier l'interaction entre ORF9p et ses partenaires dans deux types cellulaires (MeWo et lentiX-293). Des immunofluorescences en microscopie confocale ont permis d'étudier la localisation cellulaire des différentes protéines dans les cellules infectées par les virus mutants. Enfin, des analyses de séquençage à haut débit d'ADN viral extrait de cellules infectées ont été réalisées.

**MATERIEL  
ET  
METHODES**

## **1. Préparation des cultures de cellules**

Les cellules MeWo sont cultivées dans du milieu EMEM supplémenté de 10% de sérum foetal bovin, d'AA non essentiels et de pénicilline/streptomycine dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont passées tous les deux jours à un passage 1:2 ou tous les trois jours à un passage 1:3 à 1:4. Les cellules LentiX-293 sont cultivées et passées dans les mêmes conditions avec du milieu DMEM supplémenté.

### **1.1. Transfection des cellules**

Pour obtenir des cultures virales, les cellules MeWo sont transfectées au PEI (polyéthylèneimine) avec des plasmides BAC contenant l'entièreté du génome de VZV sauvage ou muté dans le gène codant pour la protéine ORF9p. Ce PEI est un long polymère cationique qui se lie à l'ADN chargé négativement pour former un complexe neutre. Ce complexe va traverser les membranes plasmique et nucléaire pour permettre la réplication virale et donc débiter l'infection virale dans les cellules MeWo. Des cellules MeWo sont ensemencées dans des plaques 6-puits à 70% de confluence. Les mélanges de transfection sont préparés en prélevant 3 µgr de chacun des BAC dans x µL de NaCl 150 mM dans 100 µL de volume total. Il faut ensuite rajouter 100 µL de PEI dilué dans du NaCl 150 mM selon un rapport de 1 µgr d'ADN pour 1.5 µL d'agent de transfection (soit 4.5 µL de PEI). Pour la transfection des cellules LentiX-293 avec des vecteurs plasmides contenant la séquence d'une protéine virale en plaque 6-puits, celles-ci sont ensemencées avec une confluence de 60 à 70%. Les mélanges de transfection sont préparés en prélevant au total 14 µgr de plasmides (3 à 5 µgr par plasmide) dans x µL de milieu EMEM dans un volume total de 350 µL. Il faut ensuite ajouter 350 µL de PEI dilué dans du milieu EMEM, toujours selon le rapport de 1 µgr d'ADN pour 1.5 µL d'agent de transfection (soit 21 µL de PEI pour 14 µgr).

## **2. Extraction d'ADN génomique de VZV à partir de cellules infectées**

### **2.1. Matériel utilisé**

<b>Gradient de tartrate de potassium</b>	<b>Tampons utilisés</b>
Solution A (60% de KC <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> dilué dans du tampon SET)	<b>Tampons utilisés</b>
Solution G (30% de glycérol dilué dans du tampon SET)	SET (NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris 50 mM pH 7.5)
Solution B (50 gr de A + 10 gr de G)	SET-Sucrose 30%
Solution C (40 gr de A + 20 gr de G)	MNT (NaCl 100 mM, MES 30 mM pH 6.7, Tris 20 mM pH 7.5)
Solution D (30 gr de A + 20 gr de G)	Tampon d'extraction nucléaire (Tris 10 mM pH 7.5, sucrose 10% et MgCl <sub>2</sub> 2 mM)
Solution E (20 gr de A + 40 gr de G)	Tampon de digestion de la protéinase K (EDTA 40 mM, NaCl 200 mM, SDS 0.8 %)
Solution F (10 gr de A + 50 gr de G)	

## **2.2. Préparation du gradient de tartrate de potassium**

La veille de l'extraction proprement dite, des gradients de tartrate de potassium/glycérol sont préparés dans des tubes de 14 mL adaptés pour le rotor SW40 de l'ultracentrifugeuse BECKMAN. Six solutions (A à G) comprenant différentes proportions de tartrate de potassium 60% et de glycérol 30% dilués dans du tampon SET ont été préparées et filtrées (0,22 µM). Ensuite, 1.6 mL de solution G sont placés dans le tube qui est alors incubé et gelé à -80°C jusqu'à congélation. Ensuite, il faut ajouter par-dessus 1.6 mL de solution F et geler de nouveau le tube. Puis, il suffit de répéter l'action avec les solutions E, D, C et B. Enfin, il faut ajouter la solution A et incubé le tube SW40 ON à 4°C.

## **2.3. Extraction des nucléocapsides virales**

Deux plaques de 500 cm<sup>2</sup> de cellules MeWo infectées pendant 48h à 72h sont rincées au PBS à froid et les cellules sont grattées dans 2x 15 mL de PBS + 5% de sucrose qui sert de stabilisant pour les nucléocapsides virales. Ensuite, les cellules sont lysées mécaniquement avec un homogénéisateur de potter (15 *strokes* avec le piston *loose* puis 5 *strokes* avec le piston *tight*). Les cellules sont ensuite soniquées au moyen d'un sonicateur à tige (70% 10x 1 sec entrecoupée de 2 sec d'arrêt). Puis, 600 µL de MgCl<sub>2</sub> 1M et 150 µL de DNase de la firme Roche (20 U/µL) sont ajoutés et les tubes sont incubés pendant 1h à 10°C. Les débris cellulaires sont retirés par une étape de centrifugation pendant 10 min à 2 500 g à 4°C. Le surnageant est transvasé délicatement au-dessus d'un coussin de sucrose (3 mL de sucrose 30 % dans du tampon SET) préalablement placé dans un tube SW27. Les tubes sont centrifugés 1h à 27 000 rpm à 4°C. Après cela, le surnageant est éliminé, le culot contenant les nucléocapsides est re-suspendu dans 500 µL de MNT et le mélange est placé au sommet d'un tube SW40 contenant le gradient de tartrate de potassium/glycérol. Les tubes sont ensuite centrifugés 16h à 30 000 rpm et la bande blanchâtre contenant les nucléocapsides est prélevée à l'aide d'une seringue et d'une aiguille assez large. Cette bande est diluée dans environ 14 mL de MNT puis ultra-centrifugée à nouveau dans un tube SW40 1h à 40 000 rpm à 4°C afin de récupérer le culot.

## **2.4. Extraction de l'ADN viral et séquençage à haut débit**

Le culot récupéré est re-suspendu dans 2.5 mL de tampon d'extraction nucléaire avec 2 µL de benzonase (10 U/µL) et de RNase A (10 mg/mL) à 37°C pendant 1h afin d'éliminer un maximum d'ADN et d'ARN cellulaires qui pourraient être encore présents. Ensuite, la benzonase est inactivée par ajout de 62.5 µL d'ETA 0.5 M. Les protéines sont éliminées par incubation pendant 3h à 50°C après l'ajout de 2.5 mL de tampon de digestion et 50 µL de protéinase K (20 mg/mL). Les suspensions contenant l'ADN génomique viral sont transvasées dans des falcons de 15 mL et 5 mL de solution de phénol-chloroforme alcool isoamylique sont ajoutés. Les tubes sont placés 15 min sur un agitateur rotatif avant d'être centrifugés 10 min à 4 500 rpm à 4°C. La phase supérieure est prélevée et placée dans un nouveau falcon de 15 mL. Après ajout de 5 mL de chloroforme, les tubes sont placés 15 min sur un agitateur rotatif et centrifugés à nouveau 10 min à 4 500 rpm.



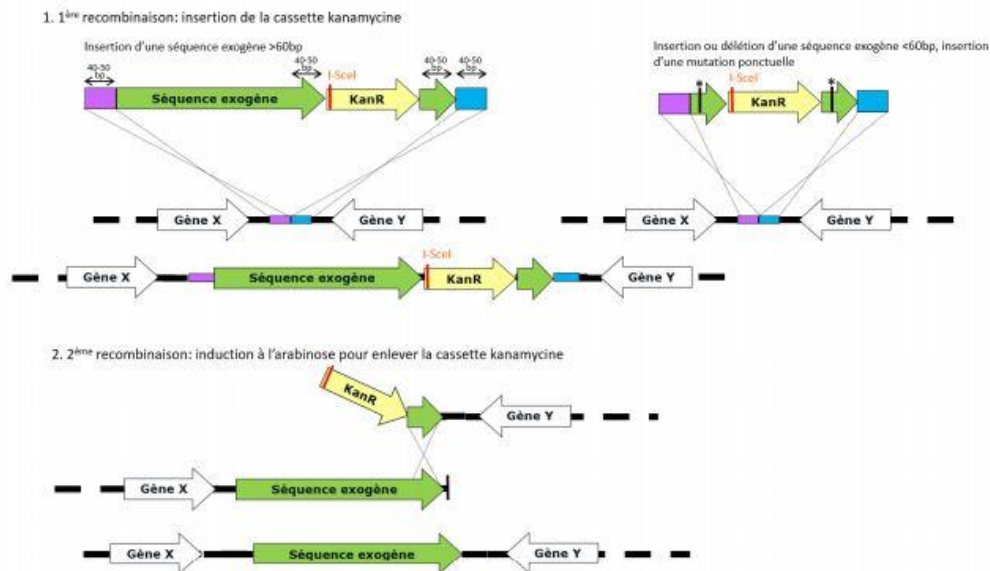
La phase supérieure est transvasée dans un tube de 35 mL. 450 µL d'acétate de sodium 3M et 4.5 mL d'isopropanol sont ajoutés, puis les tubes sont mélangés par inversion jusqu'à voir apparaître un trouble blanchâtre. Les tubes sont centrifugés 30 min à 4 500 rpm à 4°C, le surnageant est jeté et le culot d'ADN est rincé en ajoutant 4.5 mL d'éthanol 70%. Il faut ensuite re-centrifuger 15 min à 4 500 rpm à 4°C, retirer le surnageant et laisser sécher le culot à RT pendant 20 min. Enfin, l'ADN est re-suspendu dans 50 à 75 µL de Tris 10 mM pH 8.00 et la concentration en ADN viral est dosée au nanodrop. Les échantillons vont ensuite être séquencés par séquençage à haut débit via la plateforme *Genomics* du Giga. Ensuite, ils vont être analysés grâce à différents logiciels, à savoir bwa MEM pour aligner les *reads* obtenus, SAMtools pour générer et trier les *reads* tout au long du génome et IGV pour ouvrir le fichier généré par SAMtools. Ces logiciels permettent de localiser et d'identifier les mutations spontanées compensatoires apparues dans le génome des virus au phénotype réverté.

### **3. Clonage**

#### **3.1. Génération des mutants dans le BAC-VZV**

##### **3.1.1. La technique « en passant »**

La technique « en passant » permet d'insérer ou déléter une courte séquence dans une région définie d'un BAC via recombinaison homologue. Cette technique se réalise en 2 étapes. Premièrement, il faut générer par PCR une cassette de recombinaison qui comprend un site de restriction de l'enzyme *I-SceI* suivi d'un gène de résistance à la kanamycine régi par un promoteur bactérien, de courtes séquences homologues à la région du BAC (40 à 50 pb) aux extrémités, et une courte région répétée autour du gène de résistance qui permet la seconde recombinaison homologue. Cette cassette est introduite par électroporation dans la lignée GS1783 d'*E. coli* qui contient le BAC à modifier. La souche GS1783 possède dans son chromosome une copie défectueuse du prophage  $\lambda$  comprenant trois gènes nécessaires et suffisants pour permettre la recombinaison homologue : un gène Exo codant pour une exonucléase 5'-3' ADN, un gène Beta codant pour une protéine qui protège l'ADN simple-brin formé par Exo, et un gène Gam codant pour une protéine qui empêche les exonucléases endogènes Rec BCD et Sbc CD de digérer l'ADN simple-brin dans la bactérie. La transcription des gènes phagiques est sous le contrôle d'un répresseur thermosensible. Une induction des bactéries à 42°C permet donc l'expression transitoire de ces gènes qui induisent la recombinaison entre des séquences d'ADN homologues de quelques dizaines de nucléotides. Les bactéries ayant incorporé la cassette de recombinaison dans le BAC sont sélectionnées sur des géloses contenant de la kanamycine. Dans un deuxième temps, il faut induire l'expression de l'enzyme de restriction par induction à l'arabinose pour cliver le BAC et éliminer le gène de résistance à la kanamycine via une deuxième recombinaison homologue (figure 19).



**Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'insertion de matériel génétique exogène grâce à la technique « en passant ».** Pour insérer une mutation ponctuelle ou une courte séquence dans un BAC, il faut insérer une cassette contenant un gène de résistance à la kanamycine dans la région cible du BAC via une première recombinaison homologue. Il faut ensuite retirer le marqueur de sélection qu'est ce gène de résistance à l'aide de l'endonuclease *I-SceI* qui clive l'ADN double-brin pour permettre la recombinaison homologue par induction à l'arabinose.

### 3.1.2. Génération des cassettes de recombinaison

Les cassettes de recombinaison contenant la séquence à intégrer dans la cible sont amplifiées par PRC. Le mélange PCR est composé de 32  $\mu\text{L}$  d'eau désionisée, 10  $\mu\text{L}$  de tampon pour la polymérase, 4  $\mu\text{L}$  de mix de dNTP à 10 mM, 1,25  $\mu\text{L}$  de chaque amorce (*reverse* et *forwards*) à 10  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  d'ADN template (plasmide pEP-Kan S2, figure S1) et 0,5  $\mu\text{L}$  d'ADN polymérase GoTaq de la firme Promega. La PCR commence par une dénaturation à 95°C durant 1 min, suivi de vingt cycles : dénaturation à 95°C pendant 30 sec, hybridation à 65°C pendant 30 sec avec une perte de 0,5°C à chaque cycle, élongation à 72°C pendant 1 min 15 sec. S'en suivent vingt nouveaux cycles dans les mêmes conditions mis à part pour l'hybridation qui se fait à 62°C pendant 30 sec. Tout ceci est suivi d'une élongation finale à 72°C pendant 5 min.

### 3.1.3. Purification de la cassette de recombinaison

La cassette de recombinaison est traitée par 1  $\mu\text{L}$  de l'enzyme DpnI pendant 1h à 37°C afin d'éliminer le template pEP-KanS2. 5  $\mu\text{L}$  de la cassette sont déposés sur gel d'agarose (TAE + 1% d'agarose) pour vérifier la taille de la cassette produite. Si la taille correspond au profil attendu, le reste de la cassette est déposé sur gel d'agarose pour être extrait et purifié via le kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel) selon le protocole fourni dans le kit. La concentration en ADN est mesurée au Nanodrop.

### **3.1.4. Electro-compétence, transformation et 1<sup>ère</sup> étape de recombinaison homologue**

Des précultures de bactéries GS1783 contenant les BAC d'intérêt sont préparées dans 5 mL de milieu LB stérile contenant 12.5 µm/mL de chloramphénicol (Cm) et incubées une nuit à 32°C à 220 rpm. Le lendemain, 500 µL de ces précultures sont transférés dans 25 mL de LB + Cm dans des tubes de 50 mL qui sont alors placés dans l'incubateur à 32°C jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm comprise entre 0.5 et 0.6. Les tubes sont ensuite placés pendant 15 min dans un bain-marie à 42°C sous agitation puis rapidement refroidis par incubation dans un bain (eau + glace) pendant 5 min. Les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 10 min à 4 000 rpm. Le surnageant est éliminé et les culots de bactéries sont lavés par re-suspension dans 25 mL d'eau stérile glacée. L'étape de lavage est répétée dans les mêmes conditions. Le culot obtenu après le second lavage est re-suspendu dans 1.5 mL de glycérol 10% stérile et transvasé dans des tubes de 2 mL placés sur glace qui sont alors centrifugés 1 min à 14 000 rpm. Enfin, les culots sont re-suspendus dans 100 µL de glycérol 10% puis transvasés dans des tubes contenant 100 ngr du produit PCR formé précédemment. Le mélange est placé dans une cuvette d'électroporation (1 mm) et est soumis à 1.75 kV, 25 µF et 200 Ω. Ensuite, les bactéries sont re-suspendues dans 1 mL de LB-Cm et incubées 1h à 32°C à 220 rpm. 100 et 400 µL sont enfin étalés sur un milieu gélosé LB + Cm + kanamycine.

### **3.1.5. Screening des colonies bactériennes par PCR**

Les clones résistants à la kanamycine sont criblés par PCR sur colonie dans des plaques 96-puits. Le mix PCR comprend 0.625 µL de primers *forward* et *reverse* à 10 µM, 2 µL de mix dNTP 10 mM, 5 µL de tampon 5x de la polymérase, 15.75 µL d'eau désionisée et 0.125 µL de l'ADN polymérase GoTaq (PROMEGA) et 1 µL de suspension bactérienne. Le cycle de PCR commence par une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min avant de réaliser trente-cinq cycles dont chacun comprend une dénaturation de 30 sec à 95°C, une hybridation 58°C de 30 sec et une élongation à 72°C de 1 min. Ensuite, la taille du produit PCR est analysée sur gel d'agarose 1% pendant 30 min à 100 V.

### **3.1.6. Transformation et deuxième recombinaison**

Des précultures de clones positifs (deux clones par construction) sélectionnés à l'étape précédente sont préparées dans 5 mL de LB stérile contenant du Cm 12.5 µm/mL et de la kanamycine 25 µm/mL et incubées la nuit à 32°C à 220 rpm. Le lendemain, 250 µL de ces précultures sont transférés dans 5 mL de milieu LB-Cm. Les cultures sont incubées environ 2h à 32°C jusqu'à atteindre une densité optique entre 0.3 à 0.4. Ensuite, il faut retirer 3 mL de culture et ajouter 2 mL de LB-Cm contenant 1% d'arabinose avant d'incuber le tout 50 min à 32°C sous agitation pour permettre l'expression de *I-SceI*. Après cela, il faut transférer la culture dans un bain-marie à 42°C 15 min sous agitation pour induire le système de recombinaison. Puis, il faut incuber la culture à 32°C pendant 3h à 220 rpm. Enfin, il faut étaler 10 et 50 µL d'une dilution 10<sup>-5</sup> sur un milieu gélosé LB-Cm-Arabinose 1% et incuber le tout 24 à 48h à 32°C.

### **3.1.7. Criblage des colonies par PCR et séquençage**

Pour chaque construction, dix-huit clones obtenus sur gélose sont répliqués dans 100 µL de milieu LB-Cm et LB-Cm-kanamycine et sont incubés à 32°C pendant 24h. Les clones ayant poussé sur kanamycine ont toujours la cassette de la première recombinaison et sont à rejeter. Les autres clones sont criblés par PCR sur colonie. 5 µL du produit PCR obtenu sont analysés sur gel d'agarose 1% et, pour ceux qui présentent une bande à la taille attendue, 20 µL du produit PCR restants sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel). Après dosage au Nanodrop, les échantillons d'ADN sont envoyés au séquençage pour vérifier qu'aucune mutation indésirable n'est apparue.

### **3.2. Protocole pour le clonage de plasmides**

Les gènes codant pour les glycoprotéines gB, gH, gL, gE et gI du VZV ont été clonés dans le vecteur d'expression eucaryote pCAGGS via la technique « NEBuilder® HiFi DNA assembly ». Tout d'abord, il faut générer par PCR l'insert à intégrer dans le vecteur. Les amorces sont conçues pour rajouter de part et d'autre de l'insert une courte région (21 bp) homologue à l'une ou à l'autre des extrémités du vecteur après linéarisation. Ensuite, il suffit simplement de mélanger l'insert et le vecteur pCAGGS en présence du mix d'enzyme (NEBuilder®). Ce dernier contient une exonucléase 5'-3' qui génère aux extrémités de l'insert et du vecteur des régions simples brins. Les régions simples brins homologues vont alors s'apparier et l'ADN polymérase de haute-fidélité présente dans le mélange va remplir les espaces. Le mélange contient également une ADN ligase qui ligature finalement l'insert avec le vecteur. Le produit obtenu est inséré par électroporation dans la souche DH10B d'*E. coli*. Les clones ayant incorporé le produit sont sélectionnés sur gélose contenant de l'ampicilline et criblés par PCR sur colonie, et le produit PCR est purifié.

#### **3.2.1. Génération de l'insert par PCR**

Les séquences des gènes codant pour les différentes glycoprotéines virales ont été amplifiées par PCR en utilisant comme template le BAC-VZV sauvage. Le mix de PCR est composé de 32 µL d'eau désionisée, 10 µL de tampon pour la polymérase, 4 µL de mix de dNTP à 10 mM, 1.25 µL de chaque amorce (*reverse* et *forwards*) à 10 µM, 0.5 µL d'ADN template et 1 µL d'ADN polymérase Q5 de la firme NEB. Un cycle PCR en deux phases a été utilisé. La première phase comprend une dénaturation à 98°C de 30 sec suivie de vingt cycles : dénaturation de 10 sec à 98°C, hybridation de 65°C à 54°C (perte de 0.5°C par cycle) pendant 30 sec et enfin élongation à 72°C durant 1 min et 30 sec. La phase suivante, de vingt cycles, comprend une dénaturation de 98°C de 10 sec, une hybridation à 60°C de 30 sec et une élongation à 72°C de 1 min et 30 sec. Le produit PCR obtenu est analysé sur un gel d'agarose, puis traité par DpnI et purifié à l'aide du kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel).

### **3.2.2. Recombinaison homologue entre le vecteur et l'insert produit par PCR**

La recombinaison homologue de l'insert purifié avec le vecteur peut ensuite être réalisée. 5 µL de mix d'enzyme NeBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix sont mélangés avec 0.5 µL du vecteur pCAGGS (figure S2) et 4.5 µL d'insert sur glace. Le mix est ensuite incubé 1h au bain-marie à 50°C.

### **3.2.3. Electro-compétence et transformation**

La prochaine étape est de transformer des bactéries *E. coli* électro-compétentes de la souche DH10B provenant d'une ampoule stockée à -80°C. 50 µL de bactéries sont mélangés à 1 µL de plasmide sur glace. Le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation (1mm) et est soumis à 1.75 kV, 25 µF et 200 Ω. Ensuite les bactéries sont re-suspendues dans 1 mL de LB et incubées 1h à 37°C sous agitation. 100 µL de suspension bactérienne sont enfin étalés sur un milieu gélosé LB + ampicilline et placés une nuit à 37°C.

### **3.2.4. Screening des colonies bactériennes par PCR**

Les clones résistants à l'ampicilline sont ensuite criblés par PCR sur colonie dans une plaque 96 puits. Le mix de PCR comprend 0.625 µL de primer forward, 0.625 µL de primer reverse à 10 µM, 2 µL de mix dNTP 10 mM, 5 µL de tampon 5x de l'enzyme GoTaq, 15.75 µL d'eau désionisée et 0.125 µL de l'ADN polymérase GoTaq (PROMEGA). En parallèle, dans une autre plaque 96 puits, 15 µL de milieu LB + ampicilline sont placés dans chaque puits et six clones sont sélectionnés et placés dans les différents puits. Ensuite, 1 µL de chaque clone est mélangé au mix de PCR. Le cycle de PCR commence par une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min 30 sec avant de réaliser trente-cinq cycles dont chacun comprend une dénaturation de 30 sec à 95°C, une hybridation 58°C pendant 30 sec et une élongation à 72°C de 1 min 40 sec. La taille du produit PCR est analysée sur gel d'agarose 1% durant 30 min à 100 V.

### **3.2.5. Purification du produit PCR**

100 µL de LB sont ajoutés dans la plaque 96-puits contenant les clones sélectionnés. 30 µL sont transvasés dans des falcons 15 mL, mélangés à 5 mL de LB et incubés la nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, des mini-préparations sont réalisées pour pouvoir séquencer les clones par séquençage de Sanger (Plateforme GIGA-Genomics) pour vérifier qu'aucune mutation indésirable n'est apparue. 2 mL des précultures sont prélevés, centrifugés 2 min à 15 000 rpm puis re-suspendus dans 200 µL de tampon P1 contenant de la RNase (100 µg/mL). 300 µL de tampon P2 sont ensuite ajoutés et mélangés par inversion pour procéder à la lyse alcaline en laissant incuber 5 min à RT. Puis, 300 µL de tampon P3 sont ajoutés pour neutraliser la solution et précipiter les débris en laissant incuber sur glace 10 min. Le mélange est centrifugé 10 min à 10 000 rpm à 4°C, et le surnageant est transféré dans un tube contenant 600 µL d'isopropanol pour précipiter l'ADN. Le mélange est centrifugé 5 min à 15 000 rpm puis le surnageant est éliminé. Le culot est lavé dans 500 µL d'éthanol 70% en centrifugeant 5 min à 15 000 rpm. Le culot est ensuite séché sur la paillasse à RT, puis est stocké à -20°C.

### **3.3. Maxi-préparation de BAC sur gradient de chlorure de césium**

Pour réaliser une maxi-préparation de BAC, 500 µL de culture bactérienne issue d'une mini-préparation sont mélangés à 500 mL de LB + 12.5 µg/mL de Cm + 250 µL d'ampicilline la nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, les bactéries sont centrifugées 10 min à 6 000 rpm et le surnageant est jeté. Le culot est re-suspendu délicatement dans 50 mL de tampon de suspension P1 + RNase. 50 mL de tampon alcalin P2 sont ajoutés et mélangés par inversion avant de reposer 5 min à RT. Ensuite, 50 mL de tampon P3 sont ajoutés et mélangés délicatement par inversion. Le mélange est incubé 15 min sur glace puis centrifugé 15 min à 6 000 rpm à 4 °C. Le surnageant est filtré à travers une compresse placée dans un entonnoir et les acides nucléiques sont précipités par ajout de 105 mL d'isopropanol. Le filtrat est centrifugé 10 min à 8 000 rpm et le culot est égoutté sur du papier pendant 10 min. Ensuite, le culot est re-suspendu dans 6 mL d'eau et 4 mL de NH<sub>4</sub>Ac 1h sur glace pour éliminer les ARN résiduels. Le mélange est centrifugé 10 min à 8 000 rpm. Le surnageant est récupéré, mélangé à 7 mL d'isopropanol et centrifugé 10 min à 8 000 rpm. Le culot est récupéré et séché 15 min. L'ADN est ensuite purifié sur un gradient de chlorure de césium. En effet, le culot est re-suspendu délicatement dans 4 mL de Tris-EDTA, transvasé dans un tube de 50 mL puis mélangé à 4 gr de chlorure de césium et 400 µL de bromure d'éthidium 10 mg/mL. Le tube est centrifugé 15 min à 3 000 rpm à 4°C. La partie translucide de la solution est transférée dans des tubes d'ultra-centrifugeuse pour le rotor VTi 65.2. Les tubes sont scellés puis centrifugés 16 à 18h à 4 500 rpm à 18°C. Les bandes inférieure (ADN super-enroulé) et supérieure (ADN linéaire ou circulaire lâche) sont prélevées à l'aide d'une seringue. Ensuite, le bromure d'éthidium est éliminé grâce à cinq extractions successives volume/volume à l'aide d'alcool isoamylique. Chaque extraction est séparée par une centrifugation de 3 min à 9 000 rpm. Les deux phases une fois transparentes, la phase inférieure est récupérée et mélangée à trois volumes d'eau. L'ADN est précipité par ajout de huit volumes d'éthanol 100% en mélangeant par inversion jusqu'à l'apparition d'un cheveu blanc d'ADN. Les échantillons sont centrifugés 10 min à 8 000 rpm. Le culot est lavé dans 5 mL d'éthanol 70%, centrifugé 15 min à 8 000 rpm puis séché 30 min à RT. Enfin, le culot est re-suspendu dans 200 à 500 µL de Tris 10 mM à pH 8.00 puis dosé au Nanodrop.

## **4. Co-immunoprécipitation**

### **4.1. Matériel utilisé**

#### **4.1.1. Composition des tampons de lavage et de lyse contenant un cocktail d'inhibiteurs**

<b>Cocktail d'inhibiteurs de protéases (PR) et de phosphatases (PH) maison (20 mL)</b>	<b>Tampons de lyse et de lavage utilisés pour les IP (50 mL)</b>
B-glycérophosphate (PH) : 2 M	Tris-HCl : pH 7.00, 50 mM
NaF (PH) : 1.5 M	Triton/Digitonine : 1%
NPP (PH) : 1 M	CaCl <sub>2</sub> : 1 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (PH) : 1 M	MgCl <sub>2</sub> : 1 mM
Complete (PR) : 50x	NaCl : 150 mM
PMSF (PR) : 200 mM (200x)	H <sub>2</sub> O : 42.65 mL

#### 4.1.2. Liste des anticorps d'IP, primaires et secondaire

	Firme	Origine	Dilution	Référence
<b>Anticorps primaires</b>				
Anti-V8 (gE)	Créé au laboratoire	Souris	1/3000	/
Anti-gH	CapRi	Souris	1/5000	HR-VZV-22
Anti-AP-1	Sigma	Souris	1/2000	A-4200
IRR	Santa Cruz Biotechnology	Souris	/	/
Anti-V5	Invitrogen	Souris	1/5000	R960-25
Anti-gB	CapRi	Souris	1/2000	HR-VZV-15
Anti-gI	CapRi	Souris	1/1000	HR-VZV-32
Anti-Flag	Sigma	Souris	1/1000	f-3165
Anti-HA	Roche	Rat	1/2000	1867423
Anti-His	ClonTech Laboratory	Souris (monoclonal)	1/2000	/
<b>Anticorps secondaire</b>				
Anti-LC mouse	Jackson ImmunoResearch	Chèvre	1/5000	115-035-174

#### 4.2. Préparation des extraits protéiques

Une plaque de 150 cm<sup>2</sup> de cellules MeWo infectées pendant 48h (alternativement une plaque de 60 cm<sup>2</sup> de cellules lentiX-293 après 48h d'infection) est rincée au PBS à froid et les cellules sont grattées dans 2 mL de tampon de lyse (ou 800 µL / plaque de 60 cm<sup>2</sup>) contenant un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases après 30 min d'incubation sur glace. Puis, les cellules sont centrifugées à 3 300 g 2 min à 4°C et le surnageant est conservé. Un volume adéquat de billes (par condition, pour l'IP : 4 µL de billes et 1 mL d'extraits protéiques pour les cellules et 800 µM d'extraits protéiques pour les cellules transfectées pour 0.8 µgr d'AC + 4 µL de billes par condition pour le préclear) est rincé dans le tampon de lyse contenant le cocktail d'inhibiteurs, puis re-suspendu dans un volume 10x plus important de tampon de lyse contenant les inhibiteurs. Les extraits protéiques sont d'abord soumis à une étape de « préclear », une mise en contact avec des billes magnétiques non couplées à des anticorps, (40 µL par conditions d'AC) pendant 1h à 4°C sur un agitateur rotatif. Pendant cette étape, une quantité adéquate de billes est mise en contact avec les AC d'intérêt (pour chaque virus/condition de transfection : 40 µL pour 0.8 µgr d'AC), dans un volume suffisant de tampon de lyse contenant les inhibiteurs, également pendant 1h à 4°C sur un agitateur rotatif. Les billes sont ensuite placées sur un aimant. Les billes du préclear et le surnageant des billes en contact avec les AC sont éliminés. Les extraits sont répartis équitablement (1 à 1.5 mL par tube). Les billes couvertes d'AC sont re-suspendues dans x µL (50 µL par extrait) et mélangées aux extraits pour l'étape d'IP, réalisée pendant 2h à 4°C sur un agitateur rotatif. Ensuite, les billes sont placées sur un aimant pour éliminer le surnageant, puis sont lavées quatre fois pendant 5 minutes. Le premier lavage est réalisé dans un tampon contenant du NaCl 150 mM, les trois suivants dans un tampon contenant du NaCl 300 mM. Les billes sont re-suspendues dans 30 µL de tampon d'élution (TR2X-SDS 2%) 15 min à 37°C. Les protéines éluées sont récupérées et les billes éliminées.

### **4.3. Western blot**

Les protéines migrent ensuite sur un gel SDS-PAGE, puis sont transférées sur une membrane de PVDF la nuit à 70 V à 4°C. La membrane est saturée 45 min dans du TBS-Tween contenant 3% sur un agitateur à RT. Les AC primaires dilués dans la même solution sont incubés 2h avec la membrane sur un agitateur à RT. La membrane est lavée 5 min dans du TBS-Tween, puis incubée 1h sur un agitateur à RT avec les AC secondaires incubés dans du TBS-Tween contenant 3%. La membrane est lavée trois fois dans du TBS-Tween 5 min sur un agitateur rotatif. Les anticorps liés à la membrane sont détectés à l'aide d'une solution d'ECL maison et du système d'imagerie ImageQuant LAS4000.

### **4.4. Stripping**

Il est possible de réaliser un *stripping* d'une membrane pour retirer les AC du marquage et en réaliser un autre sur cette même membrane. La membrane est immergée pendant 30 min à 1h dans une boîte contenant du tampon de stripping (4 mL de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 65.5 mL de Tris pH 6.8, 2.6 mL de SDS 2% et 500 mL d'eau) et placée dans un bain-marie à 60°C sous agitation. Puis, la membrane est lavée dans du TBS-Tween plusieurs fois. Ensuite, il suffit de repartir de l'étape de saturation (décrite précédemment) et d'utiliser les bons AC pour le marquage avant de procéder à la révélation.

## **5. Mesure de la croissance via l'automate IncuCyte®**

Pour pouvoir scanner les plaques et suivre l'évolution et la croissance des foyers viraux, il faut préparer des plaques 6 puits de 10 cm<sup>2</sup>. 2 mL de cellules MeWo non infectées sont placés dans chaque puits. Ensuite, les cellules MeWo infectées par les différents virus sont trypsinisées et passées sur un tamis avec des pores de 70  $\mu$ M pour retirer les *syncytia* déjà présents et obtenir des cellules infectées isolées. Ces infections sont diluées selon un facteur logique (1:72 à 1:96 pour le WT et le mutant F181W, 1:24 à 1:36 pour le mutant W201F et 1:2 à 1:4 pour le mutant F181A), 4 à 5x plus important que le facteur utilisé lors de la préparation des cellules pour les IP ou les extractions de nucléocapsides. Ensuite ces infections sont réparties goutte à goutte dans les puits de la plaque. Cette plaque est placée dans l'incubateur à 37°C contenant une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub> pendant 1h, puis est placée dans l'automate de photographie (IncuCyte®). Une série de 81 photos avec l'objectif X10 sont prises pour chaque puits toutes les 2h pendant 96h. Le milieu est remplacé par du frais après 48h d'infection. Les photos sont traitées avec le logiciel Image J pour générer un overlay entre la photo prise en contraste de phase et celle prise en fluorescence représentée en « fire ». Les overlays générés sont ensuite alignés les uns derrière les autres pour former un film d'environ 40 secondes. Alternativement, les plaques 6-puits sont fixées après 24h (48h, 72h et 96h) d'incubation à 37°C. En effet, les puits sont rincés au PBS puis les cellules sont fixées 10 min dans de la PAF 4% et de nouveau rincées au PBS. Les noyaux sont marqués grâce au Nuclear-ID® Red (Enzo) dilué 1/10 000 dans de l'eau pendant 15 min à RT. Après trois lavages de 5 min au PBS, la plaque est placée dans l'automate (IncuCyte®) et des photos des puits entiers sont prises avec l'objectif X4.



Les photos sont exportées de l'automate dans les trois couleurs (vert pour la GFP, rouge pour le marquage des noyaux, gris pour la phase), traitées avec une macro (créée par Julien Lambert) du programme Fiji-Image J pour délimiter les foyers viraux aux différents temps d'infection. Comme les foyers à 24h sont parfois très petits, toutes les photos prises à 24h ont subi une légère modification du contraste, à l'aide du programme Adobe Photoshop, pour pouvoir mieux ressortir et être détectés par la macro. Le nombre de foyers varie en fonction du virus et du temps d'infection (entre 70 et 565 à 24h pour deux plaques, entre 650 et 2 115 à 48h pour 4 plaques, entre 190 et 1 300 à 72h pour deux plaques et entre 95 et 605 pour deux plaques). Des graphes et des tests statistiques sont réalisés via GraphPad, un test Kruskal-Wallis, pour tenter de voir si les résultats obtenus pour chaque virus sont différents les uns des autres, et un test de Mann-Whitney, pour comparer les résultats de chaque mutant au virus sauvage.

## **6. Immunofluorescence**

### **6.1. Matériel utilisé**

	<b>Firme</b>	<b>Origin e</b>	<b>Dilution</b>	<b>Référence</b>	<b>Longueur d'onde du fluorochrome (nm)</b>
<b>Anticorps primaires</b>					
Anti-V8 (gE)	Créé au laboratoire	Souris	1/50	/	/
Anti-gH	CapRi	Souris	1/250	HR-VZV-22	568 (CF, voir kit)
Anti-AP-1	Abcam	Lapin	1/500	ab220251	/
Anti-V5	Invitrogen	Souris	1/1000	R960-25	/
Anti-V5	Sigma	Lapin	1/1000	V8137	/
Anti-gB	CapRi	Souris	1/50	HR-VZV-15	633 (CF, voir kit)
Anti-gI	Santa Cruz	Souris	1/500	HR-VZV-32	568 (CF, voir kit)
<b>Anticorps secondaires</b>					
Anti-souris 405	Invitrogen	Chèvre	1/1000	/	405 (CF)
Anti-souris 633	Life Technologies™	Chèvre	1/1000	/	633 (Alexa)
Anti-lapin 568	Invitrogen	Âne	1/1000	/	568 (Alexa)
Anti-lapin 633	Invitrogen	Chèvre	1/1000	/	633 (Alexa)

### **6.2. Préparation des coverslips dans une plaque 6 puits**

Pour pouvoir observer les différents virus au microscope confocal, des *coverslips* en verre, sur lesquels les cellules infectées sont fixées, sont préparés. Cinq *coverslips* sont étalés dans le fond des puits d'une plaque 6-puits puis rincés au PBS. 2 mL de cellules MeWo non infectées sont placés dans chaque puits. Ensuite, les cellules MeWo infectées par les différents virus sont trypsinisées, diluées selon un facteur logique (1:72 à 1:96 pour le WT et le mutant ORF9p-F181W, 1:24 à 1:36 pour le mutant ORF9p-W201F et 1:2 à 1:4 pour le mutant ORF9p-F181A) 2.5x plus important que le facteur utilisé lors de la préparation des cellules pour les IP ou les extractions de nucléocapsides, et réparties goutte à goutte dans les puits de la plaque 6-puits.

### **6.3. Fixation et perméabilisation**

Les cellules infectées sont fixées après 24h et 48h. Il faut d'abord retirer le milieu de culture, rincer au PBS puis fixer les cellules en les recouvrant 30 min de PAF 2%. Ensuite, les cellules sont rincées à nouveau avec du PBS avant de les perméabiliser dans une solution de PBS + 0.1% de Triton 15 min à RT. Après cela, les cellules sont saturées dans du PBS + 5% de BSA 30 min à RT.

### **6.4. Immunomarquage**

Les AC dirigés contre les glycoprotéines de VZV (gB, gE, gI et gH) étant tous produits en souris, il n'était pas possible d'analyser simultanément leur localisation dans les cellules infectées. Les anticorps anti-gH, anti-gB et anti-gI ont donc été directement couplés à des fluorochromes (CF®568 pour l'anti-gH et CF®633 pour l'anti-gB et l'anti-gI) à l'aide d'un kit de marquage *Mix\_n\_Stain™ CF™ 633/568/405 Antibodies Labeling Kits* (Merck, Sigma-aldrich). En effet, un volume X d'AC a été mis en présence d'1/9 de ce volume de tampon de réaction. Le mélange a ensuite été placé dans le tube contenant le fluorochrome 30 à l'obscurité. Pour procéder à l'immunomarquage des IF, les *coverslips* sont incubés 2h avec l'AC primaire dilué 1/500 dans une solution de PBS + 5% de BSA, lavés 2x 5 min dans du PBS + 5% BSA, puis incubés 1h du PBS + 5% BSA contenant l'AC secondaire dilué 1/1 000 et couplé à un fluorochrome, et lavés 3x 5 min dans du PBS + 5% BSA. Ensuite, ces *coverslips* sont incubés 2h 30 min avec un AC primaire directement couplé à un fluorochrome et dilué dans du PBS + 5% BSA, puis lavés 3x 5 min du PBS + 5% BSA.

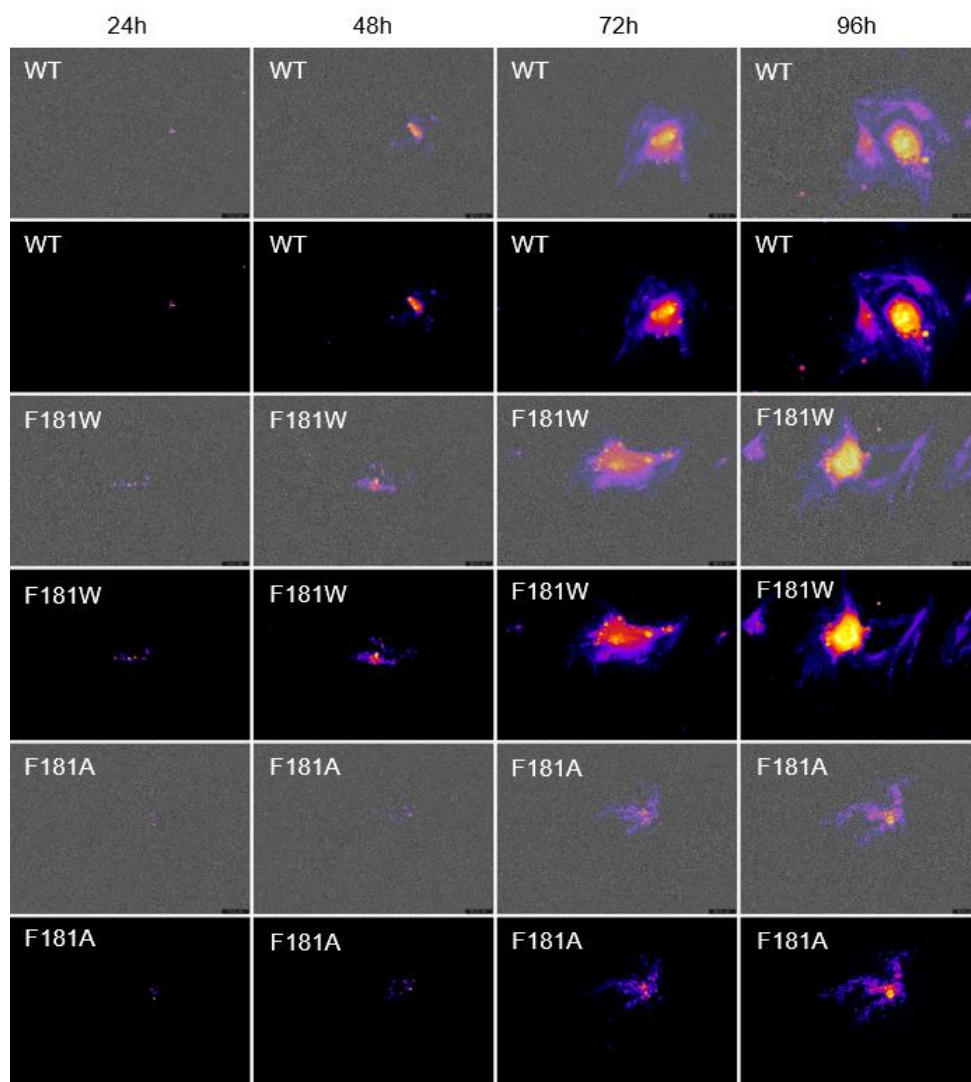
### **6.5. Montage des lames et analyse au microscope confocal**

Une goutte de mowiol chauffé à 60°C est placée sur la lame. Le *coverslip* est légèrement séché et est retourné pour placer les cellules en contact du mowiol. Le montage est laissé séché la nuit à RT à l'obscurité. Une fois terminé, les cellules sont observées sur les microscopes confocaux Olympus FV1000 et Zeiss LSM880 au grossissement 40X.

# RESULTATS

## **1. Les mutations W169F, F181A, F181W et W201F impactent-elles l'infectivité virale et la capacité de fusion des cellules infectées ?**

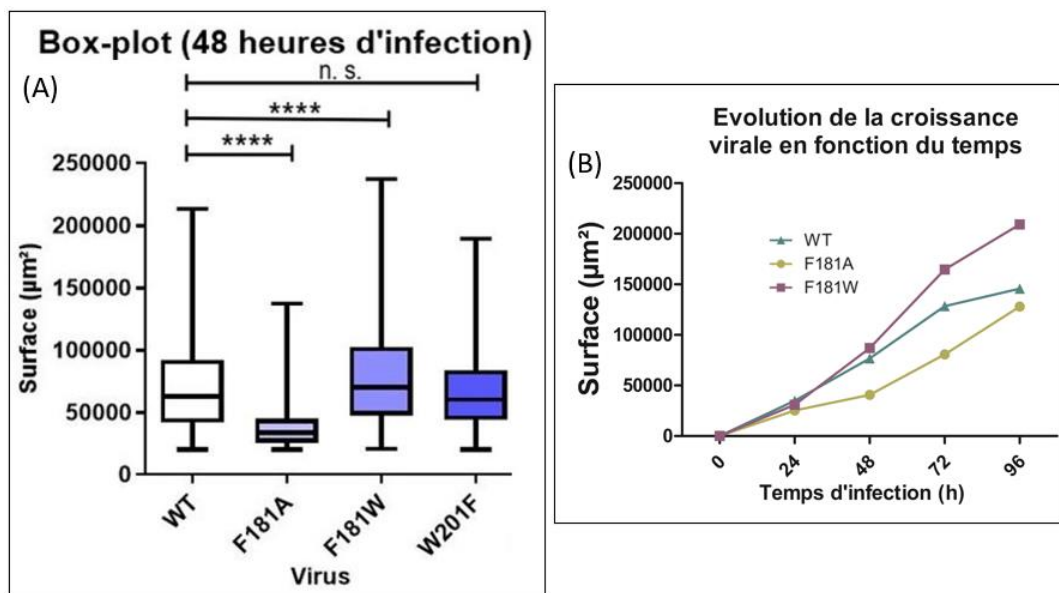
Avant mon arrivée au laboratoire, des vecteurs BAC contenant l'entièreté du génome pOka du VZV sauvage, ou porteurs de mutations ponctuelles dans le domaine WW-like de la protéine ORF9p ont été construits. Un tag V5 est présent à l'extrémité C-terminale d'ORF9p et un gène codant pour la GFP est présent dans le squelette du BAC pour pouvoir détecter facilement la présence du BAC-VZV dans les cellules. En premier lieu, afin de déterminer si les mutations sont compatibles avec la réplication virale, ces BAC ont été transfectés en cellule MeWo. Après transfection, les cellules ont été observées quotidiennement au microscope à fluorescence et passées tous les deux jours. Des foyers d'infection caractéristiques ont été observés après 2 à 3 passages pour les BAC WT et ORF9p-F181W, et après 4 à 6 passages pour les BAC ORF9p-F181A et -W201F. Ceci démontre que ces mutations sont compatibles avec la réplication virale. A l'inverse, la transfection du BAC portant la mutation ORF9p-W169F n'a jamais présenté d'apparition de foyers d'infection, même après plus de dix passages. Pourtant, l'observation des cellules, juste après transfection, a permis de conclure que le taux de transfection est totalement similaire à celui des quatre BAC. De plus, un séquençage complet du BAC ORF9p-W169F a permis d'exclure la présence d'éventuelles mutations non désirées qui auraient pu survenir lors de la création du BAC muté. La mutation W169F semble donc incompatible avec la réplication du virus. L'impact des mutations ORF9p-F181A, -F181W et -W201F sur la vitesse de propagation du virus a été évalué par analyse des foyers d'infection en microscopie. Premièrement, une plaque 6-puits a été préparée en mélangeant des cellules MeWo non infectées (NI) avec une faible quantité de cellules infectées (WT, F181A, F181W, W201F), isolées et non fusionnées, vu qu'elles ont été préalablement passées sur un tamis. Cette plaque a alors été placée dans un automate (IncuCyte®) pour prendre une série de 81 photos, réparties de façon homogène dans chacun des puits contenant les différents virus, toutes les 2h pendant 96h. Pour chaque virus, une série de photos d'un foyer caractéristique a été sélectionnée. Les photos ont ensuite été traitées avec le logiciel Image J pour générer un overlay entre la photo prise en contraste de phase et celle prise en fluorescence, représentée en « fire » pour permettre une visualisation plus aisée de l'intensité de fluorescence au cours du temps, au centre et en périphérie du foyer d'infection. Les photos des temps 24h/48h/72h/96h d'infection ont été choisies pour illustrer la croissance des différents virus (figure 20). En parallèle, de courtes vidéos ont été générées à partir de l'ensemble des 49 photos et sont disponibles dans un dossier à l'adresse suivante ([www.gigaviro.ULiege.be/mjassin](http://www.gigaviro.ULiege.be/mjassin)). Alors que le mutant F181W semble se propager de façon assez similaire au virus sauvage, la mutation F181A impacte drastiquement la propagation virale (figure 20). En effet, non seulement la taille des foyers d'infection est fortement réduite par rapport au WT, mais la capacité des cellules infectées à fusionner entre elles est fortement diminuée, avec une quasi absence de *syncytium*. Le mutant W201F, semble quant à lui, se propager de façon assez similaire au virus sauvage. Etrangement, dans les boîtes de culture dans lesquelles le virus est maintenu dans les incubateurs, la capacité de fusion des cellules infectées paraissait fortement impactée. Aucune explication logique n'a été émise pour expliquer ce changement de phénotype.



**Figure 20 : La mutation F181A impacte drastiquement la propagation virale alors que la mutation F181W semble ne pas avoir d'impact.** Dans une plaque 6 puits, des cellules MeWo NI ont été mélangées à une faible quantité de cellules infectées (WT, F181A, F181W) préalablement passées sur un tamis pour que ne conserve que les cellules isolées. Cette plaque a été placée dans un automate (IncuCyte®) et 81 photos de chaque puits ont été prises toutes les 2h pendant 96h d'infection. Une série de photos d'un foyer caractéristique a été choisie pour chaque virus. Ces photos ont ensuite été traitées avec le logiciel Image-J pour générer un overlay des photos en contraste de phase et en fluorescence (représentées en « fire »). L'overlay « contraste de phase + fluorescence » et la photo prise en fluorescence seule des temps 24h, 48h, 72h et 96h ont été choisis pour illustrer la croissance des virus WT, F181A et F181W.

Deuxièmement, quatre plaques 6-puits ont été préparées de la même façon que précédemment et ont été fixées à la PAF après 24h, 48h, 72h et 96h d'infection. Tout d'abord, seules les plaques fixées après 48h d'infection ont été analysées. Pour chaque virus, chaque puits entier a été photographié entièrement par l'automate (IncuCyte®). Ensuite, les photos en fluorescence ont été traitées via le logiciel Fiji-Image J à l'aide d'une macro permettant de délimiter la surface des foyers d'infection viraux. Cette macro génère un fichier Excel qui permet de trier tous les foyers et d'éliminer ceux clairement issus de la fusion de deux foyers adjacents (figure S3). L'expérience a été réalisée 4x, le nombre total de foyers comparés varie entre 650 et 2150. Une fois les foyers triés, un graphique sous forme de « boîte à moustaches » (*box-plot*) a été réalisé pour représenter les données (figure 21 A).

Ce graphique montre que la mutation F181A diminue très fortement la taille des foyers d'infection, contrairement à la mutation F181W qui l'augmente légèrement. Pour appuyer le graphique, deux types de tests statistiques ont été réalisés via GraphPad. Le test Kruskal-Wallis montre que tous les virus étudiés sont différents les uns des autres, et le test Mann-Whitney compare chaque mutant au virus WT et permet d'affirmer que, mis à part pour le mutant W201F, la croissance est différente du virus sauvage (figure 21 A). Afin de mesurer la croissance des différents virus au cours du temps, les plaques des temps 24h, 72h et 96h ont été photographiées par l'automate et traitées de la même façon que pour les plaques fixées après 48h d'infection. La taille moyenne des foyers aux différents temps d'infection a été calculée pour chaque virus. Ces données ont permis de réaliser une courbe de croissance du virus WT, ORF9p-F181A et ORF9p-F181W (figure 21 B). Après 24h d'infection, tous les virus semblent avoir des foyers de taille similaire. Par contre, après 48h, la courbe du F181W montre une croissance dans le temps plus importante que le virus sauvage, et inversement pour le mutant F181A.

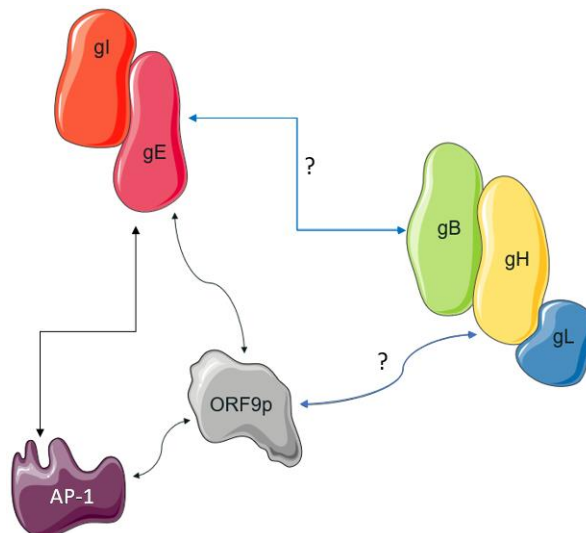


**Figure 21 : La mutation F181A diminue fortement la taille des foyers d'infection alors que la mutation F181W l'augmente légèrement.** Des cellules MeWo NI ont été ensemencées dans des puits de plaques 6 puits et infectées par les virus WT, F181A, F181W et W201F. Après 24h, 48h, 72h et 96h d'infection, les cellules ont été fixées puis des photos des puits entiers ont été prises en fluorescence via l'automate Incucyte®. Au moyen d'une macro du programme Fiji-Image J, les foyers ont été délimités et leur surface a été mesurée (figure S3). A). Box-plot (« boîte à moustaches ») de la moyenne de la surface des foyers d'infection à 48h (figure S4). Chaque boîte est divisée par une barre qui représente la médiane. Les barres présentes aux extrémités supérieure et inférieure correspondent respectivement au maximum et au minimum. Un test Kruskal-Wallis a été réalisé (\*\*\*) P-val  $\leq 0.001$  (figure S5), suivi d'un test de Mann-Whitney pour comparer la croissance des mutants par rapport au WT (\*\*\*\* P-val  $\leq 0.0001$ , n.s. non significatif) (figure S5). B). Courbe de l'évolution de la croissance des virus WT, ORF9p-F181A et ORF9p-F181W en fonction du temps. Les écarts-types ne sont pas présents sur le graphe pour permettre une meilleure visualisation.

## 2. Les mutations F181A, F181W et W201F interfèrent-elles dans les interactions entre ORF9p et les glycoprotéines gE, gH et gB ?

### 2.1. Les mutations F181A et F181W impactent les interactions entre ORF9p et gE

La protéine ORF9p est connue pour interagir avec la glycoprotéine gE et avec le complexe cellulaire AP-1. En outre, la glycoprotéine gH interagit directement avec gL, sa protéine chaperone, et, transitoirement avec gB pour permettre la fusion lors de l'entrée du virus ou de la fusion cellule-cellule. La glycoprotéine gE, quant à elle, interagit directement avec gI (figure 22). Des expériences de co-immunoprécipitations (co-IP) ont été mises en place pour déterminer si les mutations de la protéine ORF9p perturbent son interaction avec les glycoprotéines gB, gE et gH, ce qui pourrait avoir un impact sur la fusion cellule-cellule. Des extraits totaux de cellules MeWo infectées pendant 48h par les différents virus (WT, F181A, F181W, W201F) ont été mis en contact avec des billes magnétiques recouvertes d'un AC anti-gE. Parallèlement à cela, des billes recouvertes par des AC de souris non spécifiques ont été incubées pour servir de contrôle (IRR). Après un lavage stringent des billes, les complexes protéiques liés aux AC ont été élués et déposés sur gel SDS-PAGE. Après migration et transfert sur une membrane de PVDF, les protéines immunoprécipitées ont été identifiées par WB.



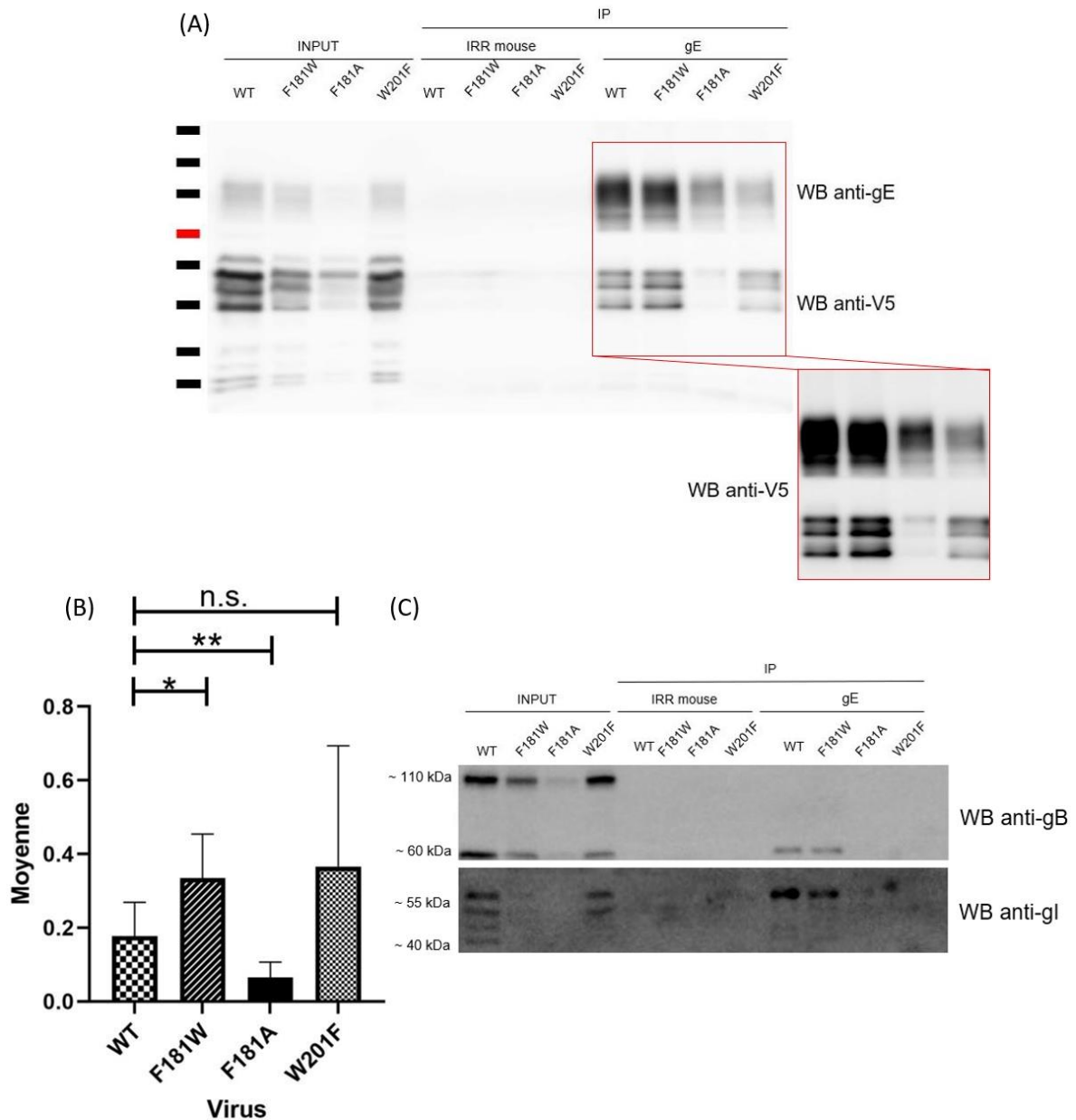
**Figure 22 : Schéma récapitulatif des interactions de protéines étudiées.** La protéine ORF9p interagit avec le complexe cellulaire régulateur du trafic AP-1, mais aussi avec la glycoprotéine gE. La glycoprotéine gH interagit avec sa protéine chaperone gL et avec gB pour permettre la fusion cellule-cellule. La glycoprotéine gE interagit avec gI.

La membrane a été coupée en deux parties pour permettre de révéler gE sur la partie supérieure (AC anti-gE) et ORF9p-V5 sur la partie inférieure (AC anti-V5 se lie au tag V5 présent dans la protéine) (figure 23 A). Bien que la quantité de gE immunoprécipitée dans les quatre conditions soit différente, il semble évident que la mutation F181A diminue fortement l'interaction d'ORF9p avec gE. Le mutant W201F semble également perdre en partie son interaction gE-ORF9p. A l'inverse, le mutant F181W, semble avoir un signal plus fort et donc une plus forte interaction entre gE et ORF9p par rapport au WT. Pour pouvoir conclure de façon irréfutable que les mutations sur ORF9p ont ou non un impact sur son interaction avec gE, il était crucial que la quantité de gE immunoprécipitée dans les différentes conditions soit identique. Par conséquent, cette expérience de co-IP a été répétée de nombreuses fois.

Il nous a malheureusement été impossible d'obtenir le même taux d'infection en culture pour atteindre ce but. Pour pallier ce problème et tenter de savoir si oui ou non il y a une modification de l'interaction entre gE et ORF9p chez les mutants par rapport au WT, les bandes d'ORF9p et de gE ont été densitométrées sur Image J sur les photos des sept expériences distinctes de co-IP pour établir le rapport de l'intensité d'ORF9p sur celle de gE. Pour chaque virus, la moyenne des rapports ORF9p/gE a été reportée sur un histogramme (figure 23 B). Deux tests statistiques ont ensuite été réalisés à partir des données du graphique, à savoir un test Kruskal-Wallis pour affirmer que les résultats sont tous différents les uns des autres (figure S6), et un test de Mann-Whitney qui compare chaque mutant au WT. Ce test montre que la mutation F181A réduit l'interaction entre ORF9p et gE, à l'inverse de la mutation F181W où l'interaction est plus forte que pour le WT. En revanche, la mutation W201F ne semble pas impacter de façon majeure l'interaction ORF9p-gE (figure S6).

Les membranes de PVDF ont ensuite subi un premier *stripping* suivi d'un nouvel immunomarquage pour pouvoir étudier l'impact des mutations vis-à-vis de la glycoprotéine gB, suivi d'un second *stripping* pour pouvoir étudier gI. Pour gB, dans les INPUTS, les formes mature et immature sont présentes, contrairement aux co-IP où il n'y a que la forme mature. Cela signifie que seule la forme clivée de gB interagit avec gE. Il faut noter que dans la littérature scientifique une potentielle interaction entre gE et gB n'a été peu, voire pas décrite. Pourtant, les résultats montrent un signal pour le WT, également présent chez le mutant F181W, ce qui signifie que la forme mature de gB interagirait avec gE. Pour gI, les résultats montrent un signal pour le WT et le mutant F181W, plus faiblement pour le F181A (figure 23 C).



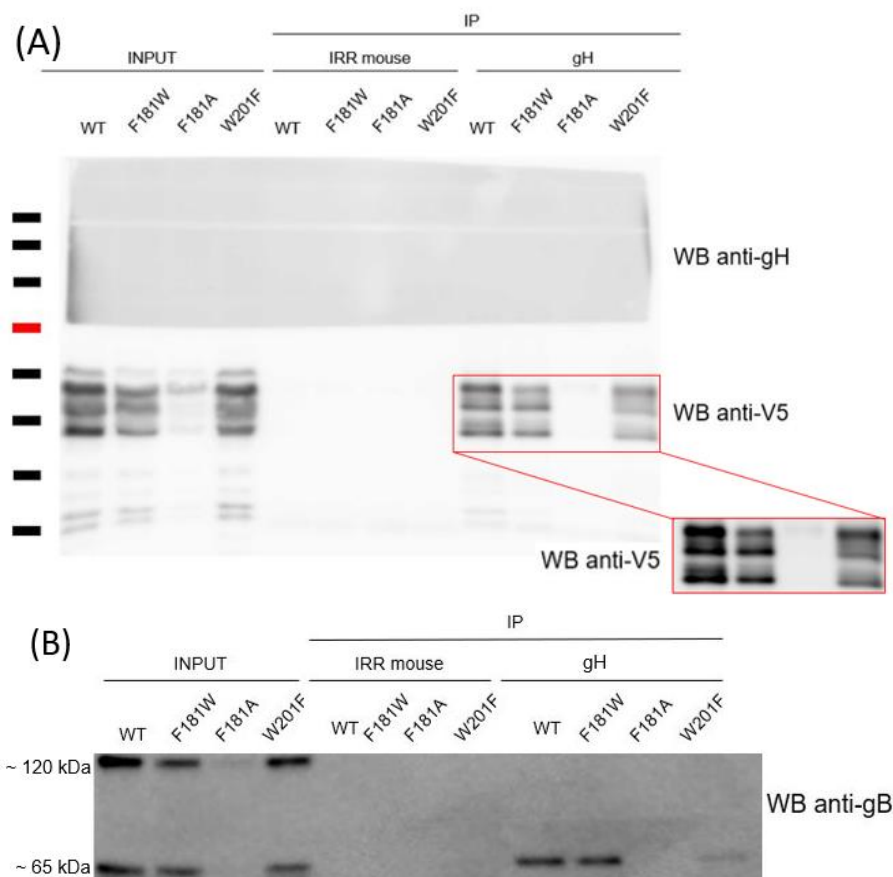


**Figure 23 : La mutation F181A réduit l'interaction ORF9p-gE à l'inverse de la mutation F181W qui la favorise, et diminue fortement l'interaction de gE avec gB et gI.** Des extraits totaux de cellules MeWo infectées pendant 48h par les différents virus (WT-V5, F181A-V5, F181W-V5, W201F-V5) ont été mis en contact avec des billes magnétiques recouvertes d'un AC anti-gE. Parallèlement, des billes recouvertes par des AC de souris non spécifiques ont été incubées pour servir de contrôle (IRR). Après migration et transfert sur une membrane de PVDF, la membrane a été coupée en deux et les protéines immunoprécipitées ont été identifiées par WB, avec l'AC anti-gE et l'AC anti-V5. L'expérience a été réalisée sept fois et les bandes d'ORF9p et de gE ont été densitométrées via Image J. Un rapport d'intensité (ORF9p/gE) a été calculé pour chaque mutant dans chacune des expériences. A). WB représentatif d'une des sept expériences. B). Histogramme de la moyenne des ratios ORF9p/gE des sept IP gE. Deux types de tests statistiques ont été réalisés sur les données (figures S6 et S7). Un test Kruskal-Wallis a été réalisé (\*\* P-val < 0.05) suivi d'un test de Mann-Whitney pour comparer chaque mutant au WT (\*\* P-val < 0.05, n.s., non significatif). C). WB issu du stripping de la membrane de l'IP de gE. Les deux morceaux de membranes ont subi un *stripping* pour procéder à un nouvel immunomarquage afin de révéler gB, suivi d'un second *stripping* et d'un autre immunomarquage pour révéler gI.

## 2.2. Les mutations F181A et F181W impactent les interactions entre ORF9p et gH

En parallèle, avec les mêmes extraits de cellules infectées utilisées pour la co-IP ORF9p-gE, une expérience de co-IP à partir de la glycoprotéine gH a été réalisée (figure 24 A). Les conditions sont exactement les mêmes que précédemment, mis à part l'AC couplé aux billes magnétiques qui est, cette fois, dirigé contre la glycoprotéine gH. La membrane a également été coupée en deux parties pour permettre de révéler lors du WB, d'une part, la protéine ORF9p-V5 sur la partie inférieure (AC anti-V5 que se lie au tag V5 présent dans la protéine), et d'autre part, gH sur la partie supérieure (AC anti-gH).

La mutation F181A semble réduire fortement l'interaction entre ORF9p et gH. La mutation F181W ne semble pas impacter l'interaction de ORF9p avec gH, et la mutation W201F semble la diminuer légèrement par rapport au WT. La membrane a ensuite subi un *stripping* suivi d'un nouvel immunomarquage pour savoir si gB est toujours capable d'interagir avec gH quand ORF9p est mutée (figure 24 B). Le mutant F181A comprend peu, voire aucune forme de gB, ce qui signifie que la mutation aurait un impact négatif sur l'interaction de gB avec gH. La mutation W201F provoque une perte d'interaction entre gB et gH, contrairement à la mutation F181W qui semble ne pas avoir d'impact.



**Figure 24 : La mutation F181A réduit l'interaction ORF9p-gH.** Des extraits totaux de cellules MeWo infectées pendant 48h par les différents virus (WT, F181A, F181W, W201F) ont été mis en contact avec des billes magnétiques recouvertes d'un AC anti-gE. Parallèlement, des billes recouvertes par des AC de souris non spécifiques ont été incubées pour servir de contrôle (IRR). Après migration et transfert sur une membrane de PVDF, les protéines immunoprécipitées ont été identifiées par WB. A). WB représentatif d'une des expériences. B). WB issu du stripping de la membrane de l'IP de gH. Les morceaux de membrane issue du WB de gH ont subi un *stripping* pour procéder à un nouvel immunomarquage afin de révéler gB.

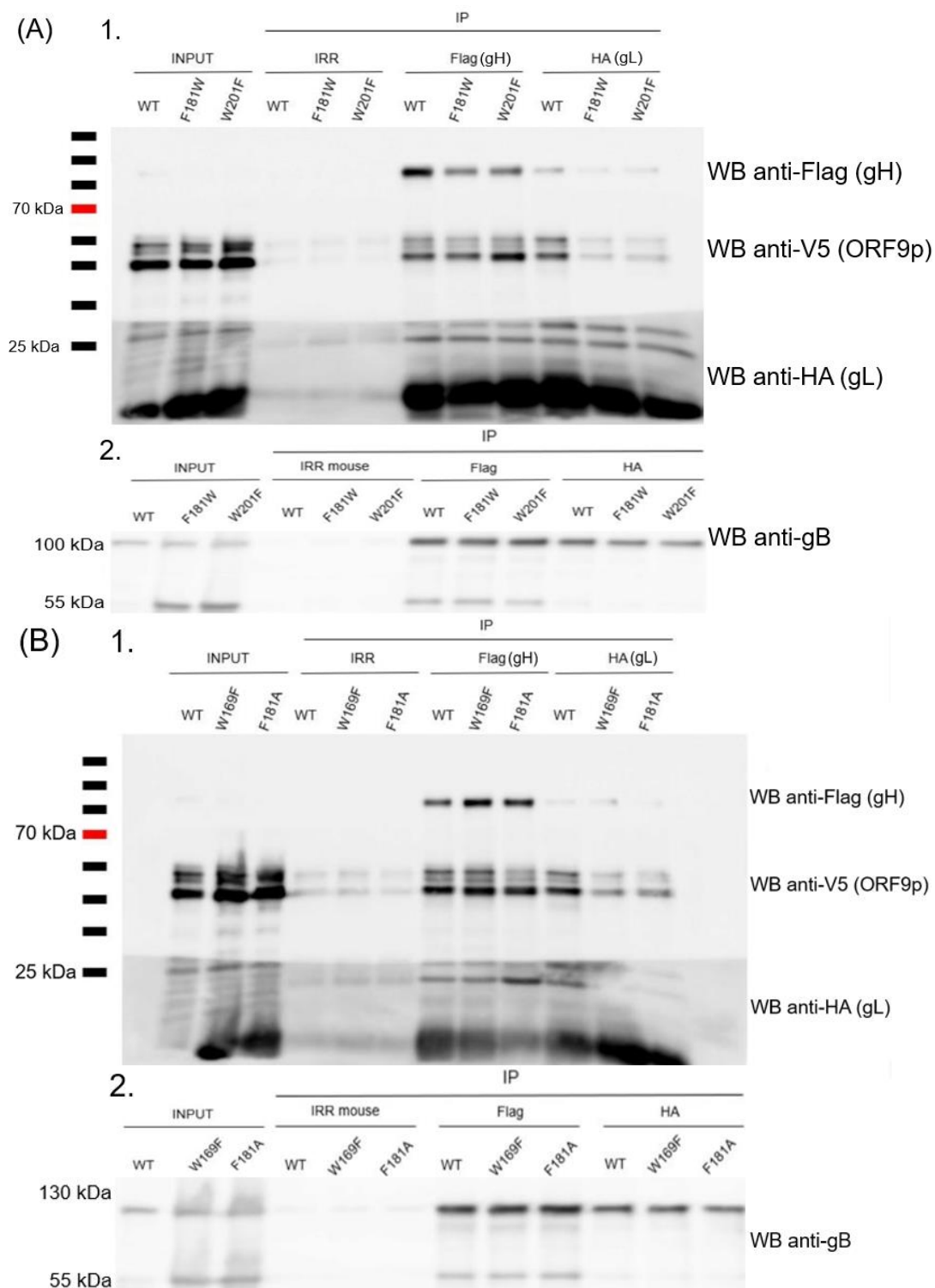
La révélation de la co-IP ORF9p-gH ne montre aucun signal concernant la partie supérieure de la membrane car l'AC anti-gH ne fonctionne pas en WB. Cela signifie qu'il n'est pas possible de prouver que gH a bien été immunoprécipitée, sachant qu'il n'existe pas non plus d'AC anti-gL qui aurait pu servir de contrôle qualité de l'IP. Comme il est difficile d'obtenir des taux d'infection homogènes, et qu'il n'est pas possible de faire de la densitométrie comme avec gE, il a fallu trouver un moyen de prouver que le ORF9p-WT interagit bien avec gH et que les mutations ont potentiellement un impact sur l'interaction.

La glycoprotéine gL étant connue pour former un complexe avec gH et participer au repliement correct de gH, des vecteurs d'expression eucaryote pour les glycoprotéines gB et gH, mais également gL, ont été générés. La queue cytoplasmique de gH étant courte et formant la seule partie accessible pour ORF9p, le tag a été inséré en N-terminal. De plus, gH est une protéine membranaire, donc le tag a été inséré juste derrière le peptide signal. Trois tags (flag, HA et his) ont été choisis pour maximiser les chances de succès. Pour gL, vu qu'il n'existe aucun AC décrit dans la littérature scientifique ou disponible commercialement, la glycoprotéine a été clonée dans le vecteur sans tag ou avec un tag HA en N-terminal après le peptide signal ou en C-terminal. Pour gB, comme notre laboratoire possède un AC fonctionnel, la glycoprotéine a été clonée sans tag. Les vecteurs d'expression pCAGGS-ORF9p-V5 sauvage et muté étaient déjà disponibles au laboratoire. Par PCR, les séquences des His-gH, HA-gH, flag-gH, gL, HA-gL et gB ont été amplifiées par PCR et clonées dans le vecteur pCAGGS préalablement digéré par PvuII et EcoRV grâce au kit « NeBuilder® HiFi DNA assembly ». Cette technologie nécessite que les fragments à assembler possèdent des régions d'homologie de 15 à 40 nucléotides de long, qui sont ajoutées lors de la PCR. Le kit contient un mélange de trois enzymes, une exonucléase 5'-3' qui va dans un premier temps grignoter les extrémités de l'insert et du vecteur. Ensuite, les régions homologues des extrémités simples brins vont s'apparier et la polymérase du kit combler les trous. Enfin, la ligase présente dans le kit répare les cassures pour former le vecteur d'ADN double-brin. Le tout a ensuite été introduit dans la souche DH10B d'*E. coli* par électroporation. Après cela, les bactéries ont été étalées sur boîte de Petri contenant de l'ampicilline et les clones résistants ont été criblés par PCR (figures S8 et S9). A partir des clones positifs, des cultures ont été préparées pour réaliser des mini-préparations qui ont été envoyées au séquençage pour s'assurer qu'aucune mutation indésirable ne soit apparue.

Une fois le clonage réalisé, les tests en transfection transitoire ont pu commencer. Comme les cellules MeWo sont difficilement transfectables, les tests ont été réalisés dans des cellules dérivées des HEK293T, les lentiX-293 (don de la plateforme « *viral vectors* » du GIGA). Dans un premier temps, l'expression des vecteurs pCAGGS-tag-gH, en présence ou en l'absence de pCAGGS-gL, pCAGGS-gL-HA ou pCAGGS-gL-HA a été contrôlée. Un premier WB a été réalisé pour voir s'il existe un signal pour les différents vecteurs. Ensuite, une série de tests d'IP en transfection a été réalisée pour les différents tags. Au final, c'est la composition flag-gH et gL-HA qui a été choisie.

Pour ce faire, des cellules lentiX-293 ont été transfectées par un mix de plasmides (3 µg de pCAGGS-gB, 3 µg de pCAGGS-gL-HA, 5 µg de pCAGGS-Flag-gH et 3 µg de pCAGGS-ORF9p du WT ou des mutants) pendant 48h. Ensuite, des extraits totaux ont été réalisés et mis en contact avec des billes magnétiques couvertes d'AC anti-flag ou anti-HA. Des billes magnétiques couvertes d'un AC de souris non spécifique ont été incubées en parallèle pour servir de contrôle. Après un lavage stringent des billes, les complexes protéiques liés aux AC ont été élués et déposés sur gel SDS-PAGE. Après migration et transfert sur une membrane de PDVF, ces protéines ont été identifiées par WB. Lorsque gH est immunoprécipitée (IP flag), ORF9p-WT-V5 et gL-HA co-immunoprécipitent. Si le complexe est immunoprécipité par l'intermédiaire de gL (IP HA), ORF9p-WT-V5 à nouveau, co-immunoprécipite efficacement, gH aussi, même si l'intensité de gH est plus faible. Ce résultat confirme l'existence d'un complexe gH/gL/ORF9p (figure 25 A et B). Concernant les mutants, pour l'IP gH (via flag), il n'y a pas vraiment de différences majeures d'interaction pour le F181W, mais il semble y avoir moins de gH dans l'IP et moins de gL qui co-immunoprécipite. Pour le W201F, il y a peut-être un peu plus d'ORF9p mais il y a moins de gH immunoprécipitée. Pour le F181A, il semble y avoir un peu moins d'ORF9p pour une quantité de gH légèrement plus élevée. Le W169F n'ayant pas pu être testé en infection, celui-ci a pu être testé en transfection transitoire. Puisque cette mutation s'avère incompatible avec la réplication virale, nous avons émis l'hypothèse que cela pouvait résulter d'une perte totale d'interaction avec gH (et avec gE), mais pour l'IP gH, il ne semble pas y avoir de différence avec le WT. Pour l'IP de gL (via HA), la quantité d'ORF9p présente dans le complexe semble plus faible pour les 4 mutants par rapport au WT, mais la quantité de gH immunoprécipitée l'est également, ce qui rend l'interprétation difficile (figure 25 A et B). En résumé, en transfection, il ne semble pas y avoir de différence majeure d'interaction ORF9p-gH en comparant l'ORF9p-WT et les différents mutants. Il ne semble pas non plus qu'il soit plus facile d'harmoniser la quantité immunoprécipitée dans les différentes conditions.

Les membranes ont ensuite subi un *stripping* pour procéder à la révélation de gB (figure 25 A et B). Dans ces expériences de transfection, gB est effectivement capable de se lier au complexe gH/gL. Par contre, c'est la forme immature de gB (non clivée, ~100 kDa) qui est majoritaire dans l'IP gH (flag), contrairement aux IP en infection où seule la forme mature était co-immunoprécipitée (figures 23 et 24). Dans l'IP par gL (HA), la forme mature semble même être complètement absente. Il n'y a aucune différence entre le WT et les mutants.



**Figure 25 : La protéine ORF9p-V5 sauvage ou mutée interagit avec le complexe gH/gL en transfection transitoire.** Des cellules lentiX-293 ont été transfectées avec un mix de plasmides (3  $\mu$ g de pCAGGS-gB, 3  $\mu$ g de pCAGGS-gL-HA, 5  $\mu$ g de pCAGGS-Flag-gH et 3  $\mu$ g de pCAGGS-ORF9p du WT ou des mutants) pour réaliser une IP en transfection transitoire. Après 48h, des extraits totaux ont été réalisés et mis en contact avec des billes magnétiques couvertes d'AC anti-flag ou anti-HA. Des billes magnétiques couvertes d'un AC de souris non spécifique ont été incubées en parallèle pour servir de contrôle. Après un lavage stringent des billes, les complexes protéiques liés aux AC ont été élués et déposés sur gel SDS-PAGE. Après migration et transfert sur une membrane de PVDF, ces protéines ont été identifiées par WB. A). WB anti-flag, anti-V5 et anti-HA pour révéler gH, ORF9p et gL sur les parties supérieure, moyenne et inférieure de la membrane, respectivement, pour le WT et les mutants F181W et W201F (A1) et W169F et F181A (A2). Poids moléculaire attendu : gH ~100 kDa, ORF9p plusieurs bandes entre 40 et 50 kDa, gL 15 kDa. B). WB anti-gB sur les membranes après *stripping* des AC.

Au vu des résultats étonnants, les tests en transfection transitoires ont également été faits en cellules MeWo pour réaliser une IP flag-gH (données non montrées). En effet, les lentiX-293, après trois tentatives se sont révélées non permissives à la souche pOka du VZV. Il était donc possible que les différences observées soient dues à des protéines cellulaires dont l'expression pourrait être moins importante dans les cellules lentiX-293. Des résultats similaires à ceux obtenus dans les lentiX-293 ont été obtenus. En conclusion, nous avons pu confirmer qu'ORF9p est capable d'interagir avec le complexe gH/gL mais il nous est impossible de tirer une conclusion quant à l'effet des mutations W169F, F181A, F181W et W201F d'ORF9p sur cette interaction. Il est possible que dans les expériences de transfection, il manque un ou plusieurs partenaires viraux extérieurs aux protéines ORF9p, gH, gL et gB, pour permettre par exemple le bon repliement protéique, le clivage de gB et sa correcte localisation. Puisqu'il semble difficile de récapituler en transfection ce qu'il se passe dans le contexte infectieux, des expériences de clonage ont été entreprises pour insérer le tag flag dans la séquence codante de gH dans le BAC contenant le ORF9p-WT, -F181W, -F181A et -W201F, pour ensuite réaliser une IP flag-gH en infection. Grâce à la technique « en passant », qui permet d'insérer une courte séquence dans une région définie d'un BAC par double recombinaison homologue, ce tag a été introduit du côté N-terminal de gH, juste après le peptide signal (figure S8). Comme le tag peut potentiellement influencer le repliement de la protéine, pour chaque virus, une deuxième construction a été créée en rajoutant un court linker entre le tag flag et la séquence juste derrière le peptide signal. Une fois tous les BAC produits, des cellules MeWo ont été transfectées. Le WT et les mutants contenant flag-gH et flag-linker-gH ont tous donné lieu à des infections productives. Hélas, par manque de temps, aucune IP flag ou gH n'a pu être réalisée.

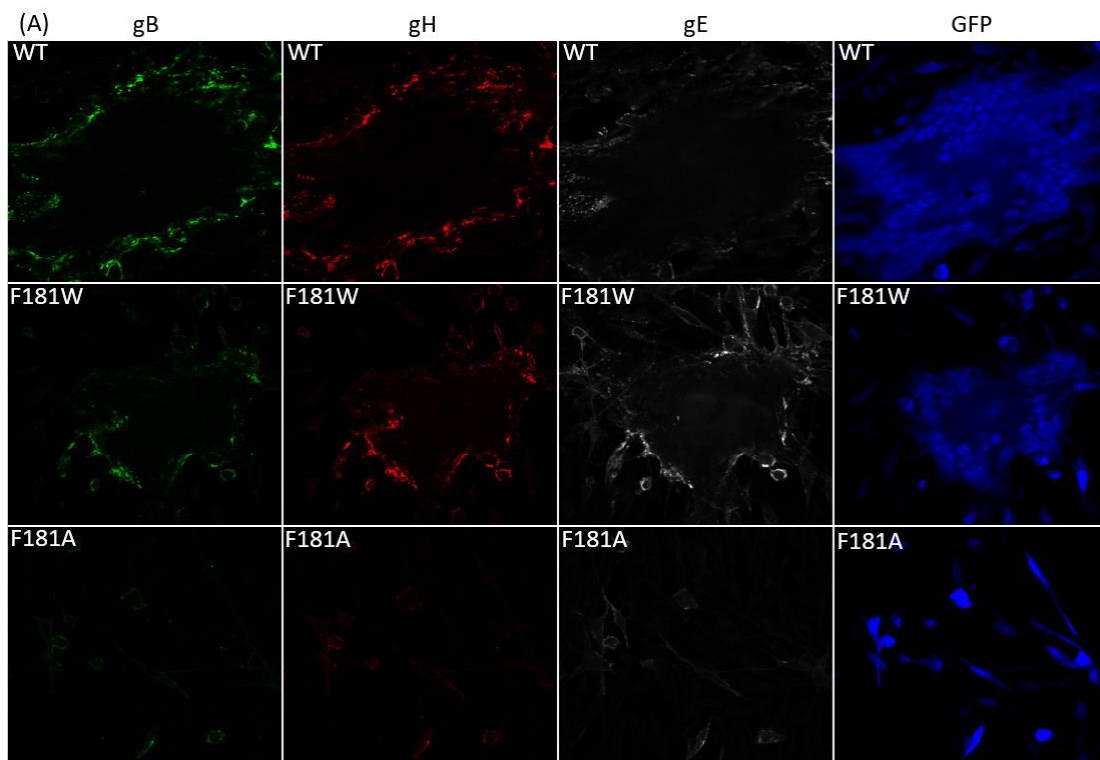
### **3. Où se situent la protéine ORF9p et ses partenaires dans les cellules infectées lorsqu'elle est mutée sur les résidus F181A et F181W ?**

Puisque la mutation F181A inhibe la fusion cellulaire et perturbe l'interaction entre ORF9p et les glycoprotéines, il faut se demander si elle conduit à un défaut de localisation des glycoprotéines dans les cellules infectées.

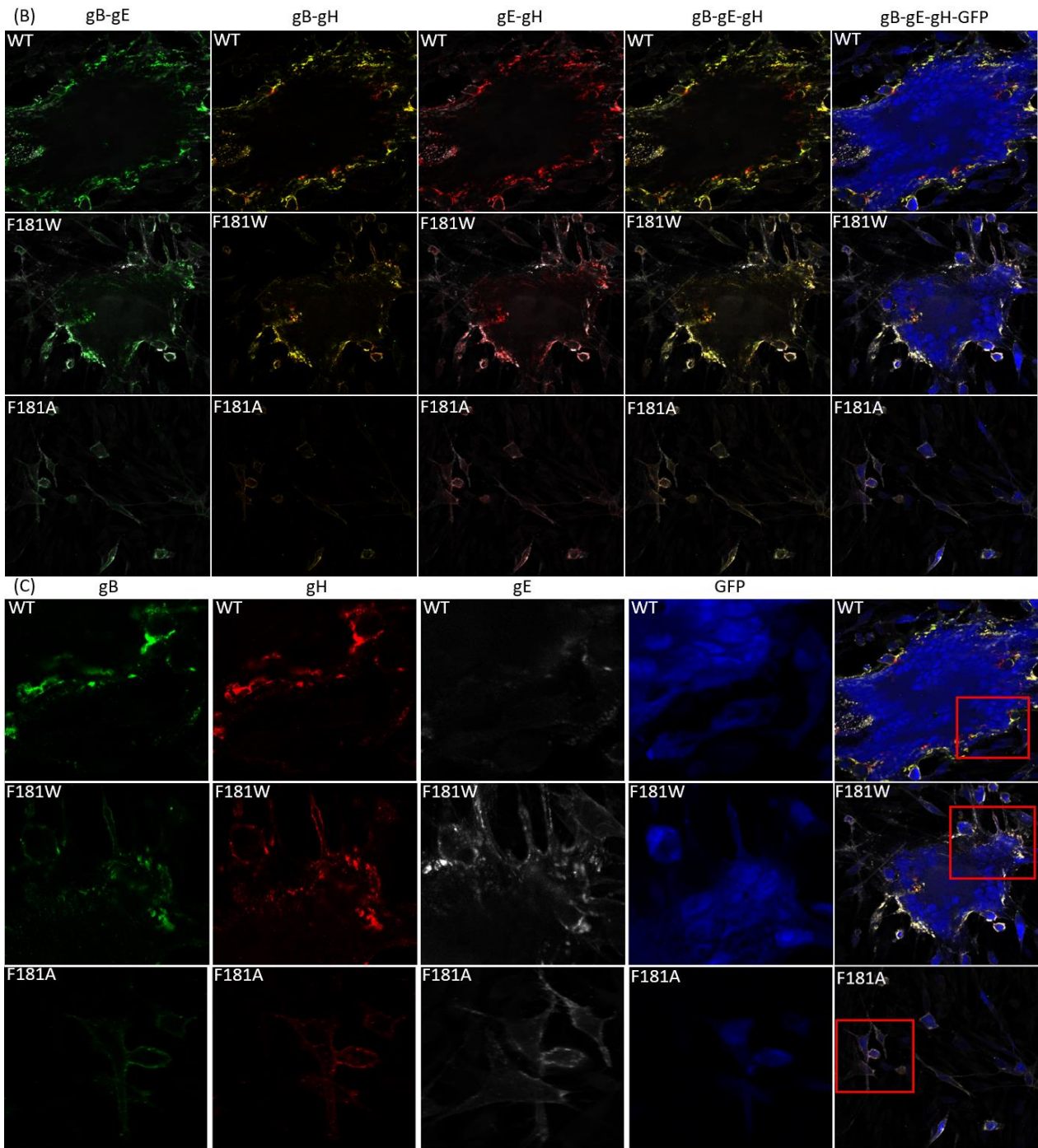
#### **3.1. Y a-t-il une *down regulation* des glycoprotéines en surface chez les mutants ?**

Puisqu'une diminution de l'expression à la surface des cellules pourrait expliquer un défaut de fusion, des immunofluorescences (IF) ont tout d'abord été entreprises sur des cellules non perméabilisées après de nombreuses mises au point. Premièrement, il a fallu trouver des conditions de PAF qui ne perméabilisent pas du tout les cellules mais qui les fixent suffisamment pour qu'elles conservent leur aspect et que les foyers ne se décrochent pas (2% de PAF pendant 30 min).

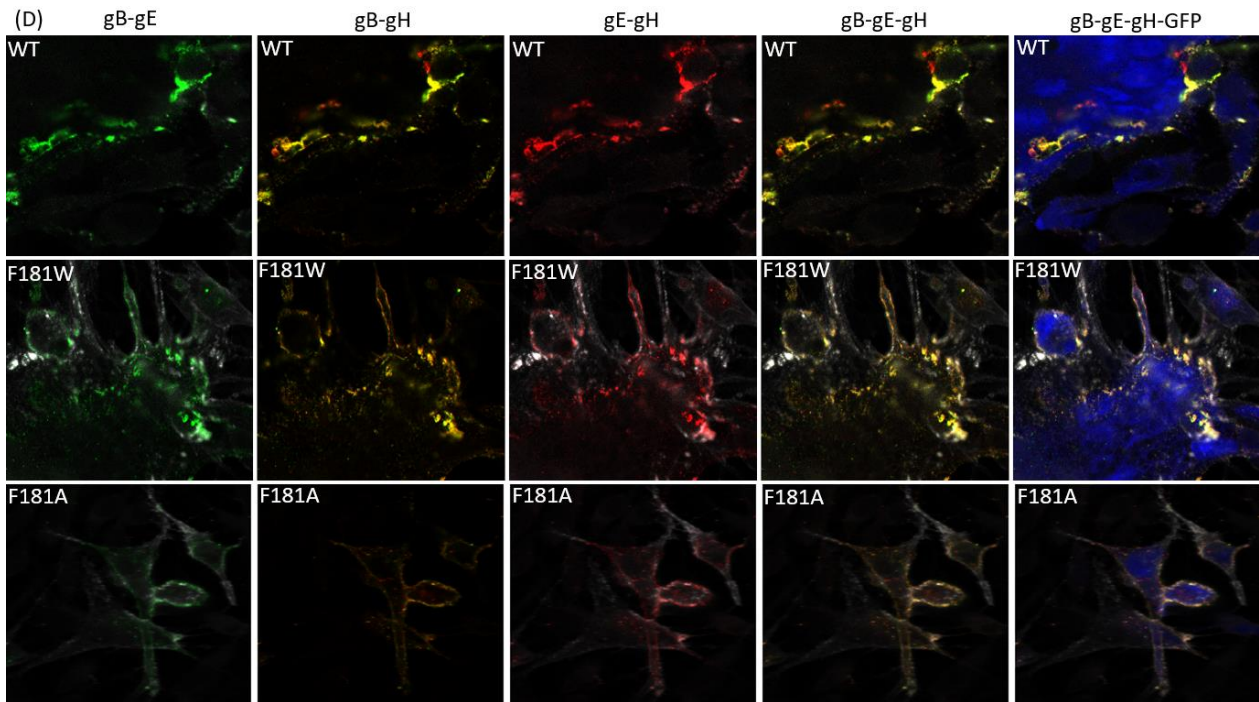
Deuxièmement, l'immunomarquage a été optimisé pour marquer jusqu'à trois protéines avec des AC, tous produits chez la souris. Le protocole élaboré débute par un immunomarquage standard, c'est-à-dire incuber les cellules en présence d'un AC primaire dirigé contre une seule glycoprotéine (AC anti-gE), puis d'un AC secondaire couplé à un fluorochrome et dirigé contre cet AC primaire. Ensuite, ces cellules ont été mises en présence d'un ou plusieurs AC primaires, dirigés contre d'autres protéines virales, qui ont été préalablement couplés directement à un fluorochrome grâce à un kit (AC anti-gB CF®633 et anti-gH CF®568). Des cellules MeWo ont été infectées pendant 24h et 48h, par le virus WT et les mutants F181W et F181A, lavées au PBS puis fixées 30 min avec de la PAF 2%. Elles ont ensuite été marquées simultanément avec un anti-gE, reconnu par un AC anti-IgG couplé au CF®405, un anti-gB-CF®633 et un anti-gH-CF®568. Les photos ont été prises à l'aide du microscope confocal à haute résolution Zeiss LSM880 au grossissement X40. Tout d'abord, de manière générale, il y a moins de gB et de gH en surface pour le mutant F181A (figure 26). Ce résultat extrêmement prometteur pourrait expliquer le défaut de fusion provoqué par la mutation. Il a potentiellement aussi moins de gE par rapport aux deux autres glycoprotéines. A l'inverse, il semble y avoir nettement plus de gE en surface pour le mutant F181W par rapport au virus sauvage (figure 26). Concernant la colocalisation, pour le virus sauvage, gB apparaît toujours colocalisée avec gH, qui se retrouve parfois située seule en surface. La glycoprotéine gE est soit localisée seule, soit avec gB et gH pour former une triple colocalisation. Ce résultat pour gE est nettement plus évident sur le mutant F181W, sachant que gE se retrouve en plus parfois seule en surface sous forme d'amas (figure 26). Il y a aussi quelques rares points de gB qui ne colocalisent ni avec gE, ni avec gH. Pour le mutant F181A, gB et gH semblent colocalisées et en partie isolées. Par contre, il y a peu de colocalisation de gB et gH avec gE.







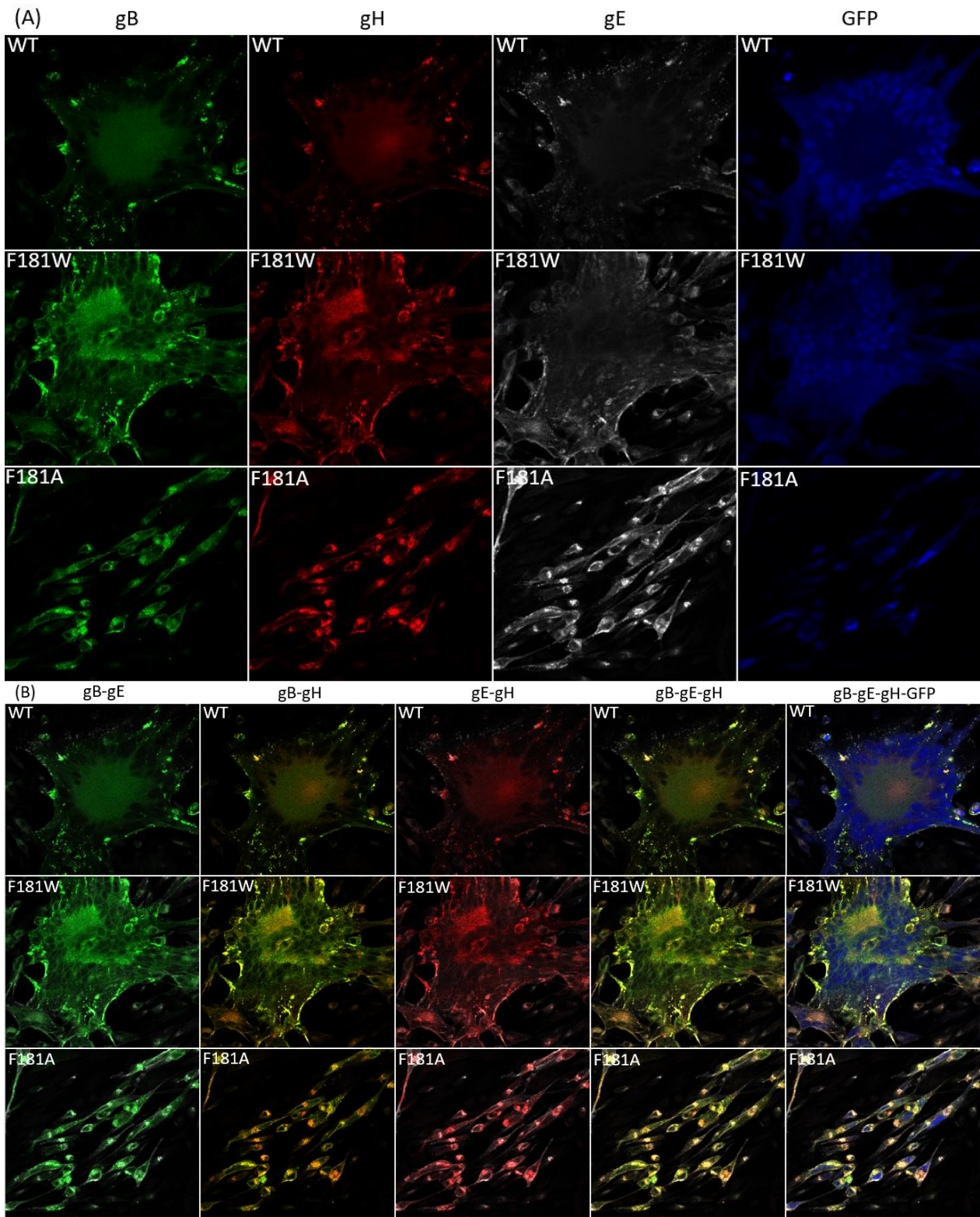




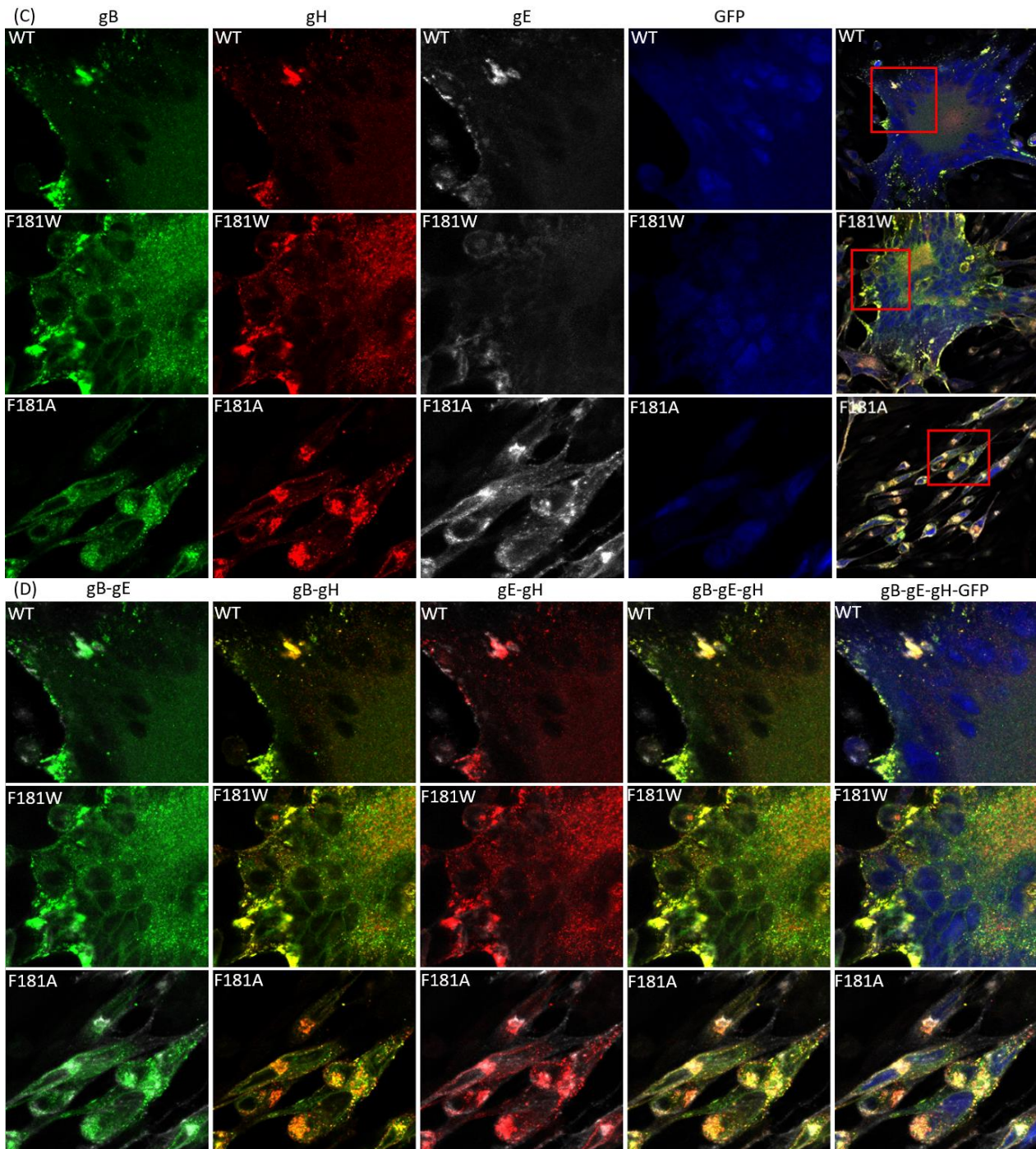
**Figure 26 : La mutation F181A provoque un défaut d'expression de gB et gH en surface contrairement à la mutation F181W.** Des cellules MeWo ont été infectées pendant 48h par le virus WT et les mutants F181W et F181A, puis fixées à la PAF 2%. Une IF a été réalisée avec un AC primaire de souris dirigé contre gE et un AC secondaire anti-IgG de souris (en gris) couplé à un CF@405. Deux autres AC primaires de souris directement couplés à un CF dirigé contre gB (CF@633, en vert) ou gH (CF@568, en rouge) ont été également utilisés. La GFP est représentée en bleu. Les photos ont été prises au X40 à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM880. A). Photos des quatre canaux séparés. B). Overlays. C). Zoom des photos représentées en A. D). Overlays des zooms présentés en C.

Ensuite, des cellules infectées issues des mêmes cultures ont été fixées à la PAF 2% puis perméabilisées. Pour pouvoir affirmer si oui ou non il y a une diminution de l'expression des glycoprotéines (en particulier gB et gH) en surface pour le mutant F181A, la seconde étape consiste à comparer les IF décrites précédemment à celles réalisées dans des cellules perméabilisées (figure 27). En comparaison au virus sauvage, il semble y avoir autant de glycoprotéines gB, gE et gH dans les cellules infectées par le F181A lorsqu'elles sont perméabilisées, ce qui confirme qu'il y a bien un défaut dans le trafficking qui conduit à une faible quantité de glycoprotéines en surface, et donc, potentiellement à un défaut de fusion. Dans les cellules infectées par le F181A, les trois glycoprotéines s'accumulent dans des vésicules qui sont, pour la plupart, proches du noyau, potentiellement dans le TGN, mais aussi dans des petites vésicules proches de la surface (figure 27 C et D). Dans ces structures, gB et gH colocalisent uniquement partiellement et gE est le plus souvent seule mais parfois colocalisée avec gB et gH. Il y a donc très peu de glycoprotéines en surface. Toujours en comparaison au virus sauvage, le mutant F181W semble exprimer plus de gB, gE et gH en surface (figure 27 A et B). De plus, il faut noter que globalement, le signal apparaît plus fort, ce qui pourrait résulter d'une plus forte expression globale des glycoprotéines en question. A priori, une plus forte expression aurait dû être observée en WB, ce qui n'est pas le cas, mais il serait intéressant de vérifier cette hypothèse. De plus, les zones de triple colocalisation semblent en général plus fréquentes chez le F181W en comparaison au WT (figure 27 C et D).

En conclusion, la mutation F181A provoque un défaut d'expression des glycoprotéines en surface ainsi qu'une diminution de la colocalisation gB/gH. A l'inverse, la mutation F181W semble augmenter le niveau d'expression des glycoprotéines en surface, en particulier celui de gE, mais également le taux de glycoprotéines présentes dans les cellules infectées de façon globale.







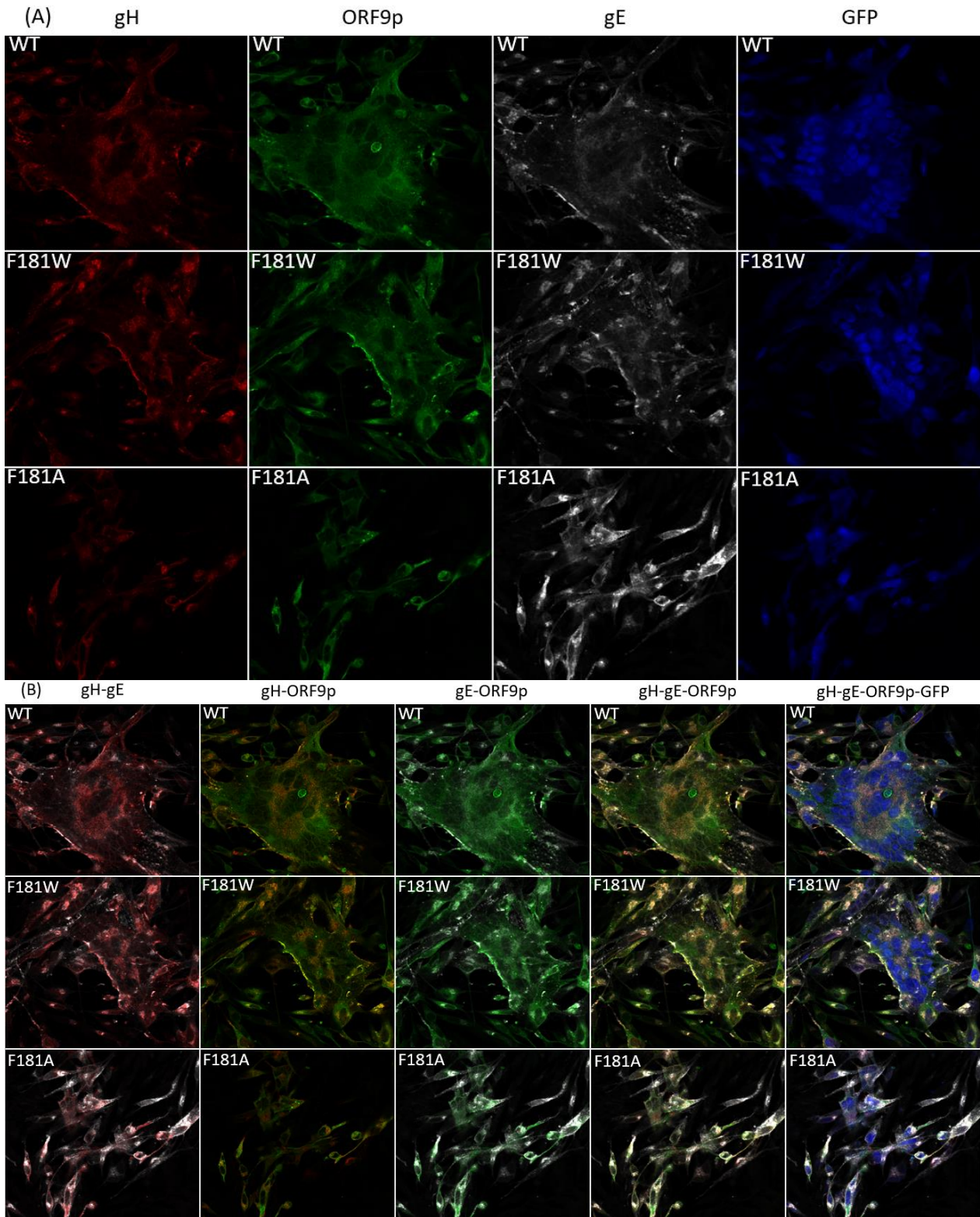
**Figure 27 : La mutation F181A provoque une accumulation des glycoprotéines dans des vésicules proches du noyau.** Des cellules MeWo ont été infectées pendant 48h par le virus WT et les mutants F181W et F181A, puis ont été fixées et perméabilisées. Une IF a été réalisée avec un AC primaire de souris dirigé contre gE, puis un AC secondaire anti-IgG de souris (en gris) couplé à un CF@405. Les lames ont ensuite été incubées avec un AC anti-gB directement couplé au fluorochrome CF@633 (en vert) et un AC anti-gH directement couplé au fluorochrome CF@568 (en rouge). Les photos ont été prises au X40 à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM880. A). Photo des quatre canaux séparés et l'overlay des quatre marquages. B). Overlays. C). Zoom des photos présentées en A. D). Zoom des foyers présentés en B.

### **3.2. Y a-t-il une différence de localisation entre ORF9p et les glycoprotéines chez les mutants ?**

Puisque la mutation F181A diminue l'interaction d'ORF9p avec gE et potentiellement gH, nous nous sommes demandés si cela conduisait à une modification de la localisation d'ORF9p par rapport à gE et gH ou si, à l'inverse le défaut d'interaction pouvait être dû à une mauvaise localisation d'ORF9p dans les cellules. Pour répondre partiellement à cette question, les cellules MeWo ont été fixées et perméabilisées après 48h d'infection. Les protéines ORF9p, gE et gH ont ensuite été mises en évidence simultanément. Les photos ont été prises à l'aide du microscope confocal à haute résolution Zeiss LSM880 au grossissement X40.

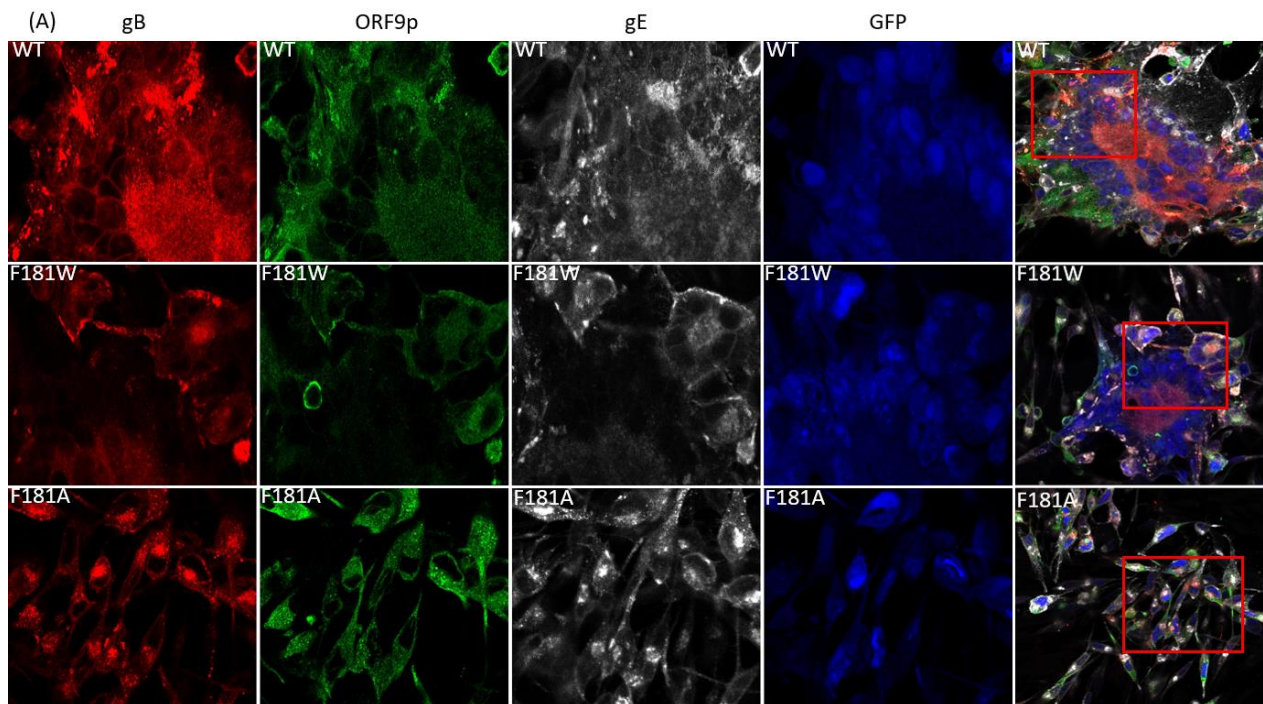
Premièrement, la protéine ORF9p est majoritairement cytoplasmique et présente une localisation globalement diffuse avec des endroits dans le cytoplasme où elle forme des amas plus denses. Nous avons précédemment démontré au laboratoire qu'une partie de ces structures colocalise avec le complexe AP-1. De façon générale, il ne semble pas y avoir de différence flagrante de localisation d'ORF9p entre le WT et les mutants (figure 28). Pour analyser correctement les résultats, il faut distinguer les cellules nouvellement infectées qui se trouvent en périphérie et dans lesquelles les glycoprotéines gE et gH sont majoritairement présentes dans des vésicules proches du noyau, des cellules se trouvant au centre, qui ont, dans l'infection WT et F181W, fusionné pour générer un *syncytium*. Dans les cellules infectées par le WT, les trois protéines colocalisent de façon prédominante au niveau de la membrane cellulaire du *syncytium*. Ces structures pourraient correspondre à des particules virales présentes à l'extérieur des cellules. Au même endroit, il est possible d'observer des petits amas positifs uniquement pour gE et de plus rares structures où ORF9p ne colocalise qu'avec gH. Dans le centre du *syncytium*, sur les photos zoomées (figure S10), les trois marquages présentent une série de petits points (en particulier les marquages de gH et d'ORF9p) qui pourraient correspondre à des vésicules cellulaires ou des particules virales à différents stades de maturation. Seulement une partie de ces structures est marquée par les trois AC. Dans les cellules nouvellement infectées présentes à la périphérie, comme déjà observé précédemment, gH et gE sont principalement dans des vésicules proches du noyau où elles co-localisent partiellement. Il pourrait s'agir, en partie, du RE ou du TGN. Pour le mutant F181W, les résultats sont assez similaires mais il apparaît que les zones de triple colocalisation sont plus abondantes au niveau de la membrane plasmique du *syncytium* mais aussi dans les cellules nouvellement infectées à la périphérie du foyer d'infection. Pour le F181A, il n'y a pratiquement aucune zone de triple colocalisation. Il n'y a que de très rares endroits, où gE et gH colocalisent, qui pourraient correspondre à ceux où les glycoprotéines sont synthétisées et glycosylées (RE et TGN) (figures 28, S10 et S11).



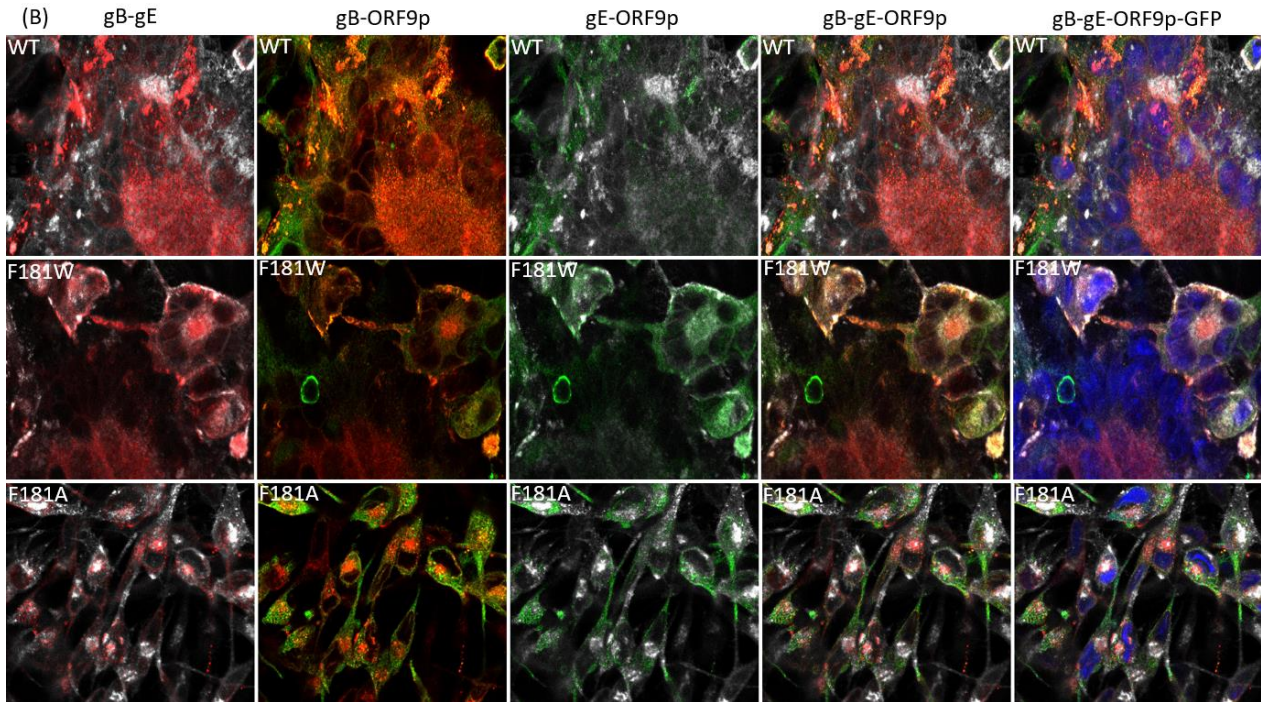


**Figure 28 : La mutation F181A provoque une accumulation de gH et de gE dans des vésicules proches du noyau où elles colocalisent partiellement mais où ORF9p n'est pas présente.** Des cellules MeWo ont été infectées pendant 48h par le virus WT et les mutants F181W et F181A, puis ont été fixées et perméabilisées. Les lames ont ensuite été incubées avec un AC primaire de souris dirigé contre gE et un AC primaire de lapin dirigé contre V5, puis avec un AC secondaire anti-IgG de souris couplé à un CF@405 (représenté en gris), un AC secondaire anti-IgG de lapin couplé à un CF@33 (représenté en vert) et, enfin, avec un AC primaire de souris anti-gH-CF@568 (représenté en rouge). Les photos ont été prises au X40 à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM880. A). Photos des canaux séparés. B). Overlays.

Dans une deuxième série d'IF, gB a été marquée en même temps que gE et ORF9p (figures 29 et S12). Les résultats sont proches de ceux obtenus à l'expérience précédente. Pour le virus WT, les trois protéines colocalisent principalement dans des structures denses présentes au niveau de la membrane plasmique du *syncytium*. A cet endroit, il y a également de nombreuses structures positives pour l'anti-gB mais qui ne colocalisent ni avec gE, ni avec ORF9p, ainsi que des structures positives uniquement pour gE. Au centre du *syncytium*, la colocalisation entre gB et OR9FP est très importante dans des petites vésicules alors que la colocalisation gB-gE ou ORF9p-gE est, elle, assez faible. Les cellules infectées par le F181W présentent à peu de chose près le même phénotype. Pour le F181A, gB a l'air d'être située surtout à l'intérieur des cellules sous forme d'amas et reste peu présente en surface (figure 29). Dans ces structures proches du noyau, il n'y a pratiquement aucune vésicule où la triple colocalisation est observée. Il y a peu d'endroits où ORF9p colocalise avec gB, et certains endroits où gB et gE colocalisent (figure S13).







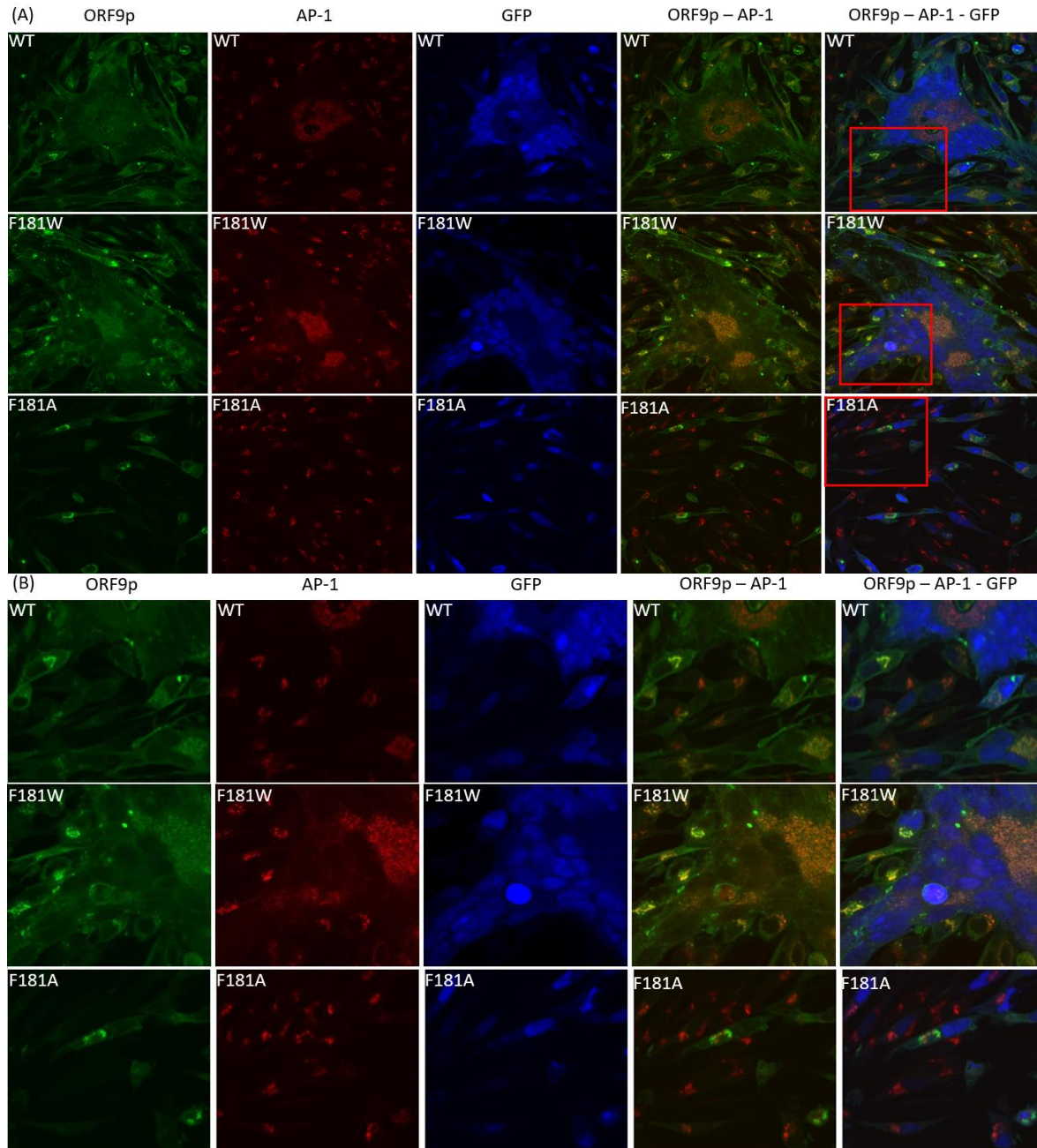
**Figure 29 : La mutation F181A provoque une accumulation de gB et de gE dans des vésicules proches du noyau où elles co-localisent partiellement mais où ORF9p n'est pas présente.** Des cellules MeWo ont été infectées pendant 48h par le virus WT et les mutants F181W et F181A, puis ont été fixées et perméabilisées. Les lames ont ensuite été incubées avec un AC primaire de souris dirigé contre gE et un AC primaire de lapin dirigé contre V5, puis avec un AC secondaire anti-IgG de souris couplé à un CF@405 (représenté en gris), un AC secondaire anti-IgG de lapin couplé à un CF@568 (représenté en vert) et, enfin, avec un AC primaire de souris anti gB-CF@633. Les photos ont été prises au X40 à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM880. Sur Image J, la luminosité de gB et ORF9p a été modifiée pour permettre une meilleure visualisation. A). Photos des canaux séparés. B). Overlays.

### **3.3. Y a-t-il une différence de localisation entre ORF9p et AP-1 ?**

Le premier mutant d'ORF9p présentant un phénotype de fusion est le mutant L231A, qui touche un domaine di-leucine permettant à ORF9p d'interagir avec le complexe cellulaire AP-1. Le mutant L231A se caractérise par un défaut d'interaction avec gE et avec gH. Il paraissait donc important de savoir si l'interaction d'ORF9p avec AP-1 lui permet d'interagir avec les glycoprotéines, ou si cette elle permet de renforcer l'interaction des glycoprotéines avec AP-1. Il a donc fallu se demander si le fait de muter un résidu qui perturbe l'interaction ORF9p-gH et ORF9-gE vient du fait qu'ORF9p n'interagit plus non plus avec AP-1, ou si le fait qu'ORF9p n'interagit plus avec gE et gH va diminuer l'interaction de gE avec AP-1 ou de gH avec AP-1. Avant d'entamer une nouvelle série de co-IP, des IF ont été réalisées pour déterminer s'il y a une perte de colocalisation ORF9p-AP-1 dans le mutant F181A (figure 30).

Comme dans les IF précédentes, ORF9p est présente dans le cytoplasme des cellules infectées par le virus WT de façon globalement diffuse mais de petites zones plus denses sont visibles, principalement dans les cellules situées en périphérie du foyer d'infection. Dans ces structures, une colocalisation partielle avec AP-1 est observable. Pour le mutant ORF9p-F181W, le niveau d'ORF9p est assez similaire au WT. Par contre, il y a plus de structures denses que pour le WT, tant dans les cellules en périphérie du foyer qu'au centre du *syncytium*. En comparaison au virus sauvage, il semble également y avoir plus d'AP-1 dans le centre du *syncytium*. Par conséquent, la mutation F181W semble provoquer une plus forte

colocalisation entre ORF9p et AP-1 dans le centre du foyer par rapport au WT. Il semble également y avoir une plus forte colocalisation entre les deux protéines au niveau des cellules nouvellement infectées, présentes en périphérie du foyer viral (figure 30). Pour le mutant ORF9p-F181A, les résultats sont tout autre. Même si ORF9p semble présente au centre comme en périphérie, les endroits où la protéine se trouve sous la forme de petits amas ne semblent pas vraiment colocalisés avec AP-1 qui a une localisation totalement normale. Comme il n’y a plus de colocalisation entre ORF9p et AP-1, il y a potentiellement une perte d’interaction (figure 30).



**Figure 30 : La mutation F181A provoque une perte de colocalisation entre ORF9p et AP-1, alors que la mutation F181W l’augmente.** Des cellules MeWo ont été infectées pendant 48h par le VZV WT et les mutants F181W et F181A, puis fixées et perméabilisées. Une IF a été réalisée avec un AC primaire de souris dirigé contre le tag V5 présent dans la séquence d’ORF9p, et un AC primaire de lapin dirigé contre AP-1. Un AC anti-IgG de souris couplé à un Alexa633 (représenté en vert) et un AC anti-IgG de lapin couplé à un Alexa568 (représenté en rouge) ont été utilisés comme AC secondaires. Les photos ont été prises au X40 à l’aide du microscope confocal Olympus FV1000. A). Photos des canaux séparés et des overlays. B). Zoom des zones délimitées par des carrés rouges des photos présentées en A.



#### **4. Observe-t-on des mutations compensatoires dans le génome des mutants F181A, F181W et W201F lorsqu'ils sont maintenus pendant de nombreux passages en culture ?**

Lorsque le mutant ORF9p-F181A est maintenu en culture pendant de nombreux passages, une réversion phénotypique se produit avec une réapparition des *syncytia*. Le mutant ORF9p-W201F, quant à lui, qui fusionne peu à passage faible, forme au fil du temps des *syncytia* de taille similaire au WT. L'ADN génomique viral a été extrait à partir de cellules MeWo infectées et séquencé par séquençage à haut débit.

Concernant le mutant ORF9p-F181A, l'ADN génomique viral de trois souches issues d'évènements de réversion bien distincts, en parallèle d'une souche à un passage assez faible, a été séquencé. Comme expliqué précédemment, il possède un défaut drastique de croissance/fusion, ce qui visiblement le pousse à induire de nombreuses mutations spontanées compensatoires dans son génome (figure 31). Ces mutations touchent principalement les gènes codant pour les glycoprotéines. Une mutation se retrouve dans la séquence du gène codant pour gB, deux dans la séquence du gène codant pour gE et au total quatre mutations distinctes apparaissent dans la séquence du gène codant pour gH. Il y a également une mutation localisée dans la séquence d'ORF9p, dans le promoteur de la glycoprotéine gL et dans la séquence de la glycoprotéine gC. D'autres mutations apparaissent dans le régulateur transcriptionnel IE62, et dans d'autres protéines moins pertinentes comme ORF0p (protéine membranaire), ORF52p (ADN hélicase) et ORF21p (protéine du tégument). Concernant le mutant ORF9p-W201F, l'ADN génomique viral de trois souches a été séquencé. Il faut noter que le révertant annoté rev2.2 est en réalité le rev2 maintenu en culture pour une dizaine de passages supplémentaires. Il y a moins de mutations que pour les révertants du F181A, sachant qu'aucune n'est apparue dans la séquence codante des glycoprotéines. En effet, les mutations se retrouvent directement dans le gène codant pour ORF9p ou celui d'IE62. D'autres mutations ont été détectées dans la séquence 3' UTR d'ORF56, dans celle d'ORF13 (thymidylate synthase) et d'ORF42 (sous-unité 1 de la terminase d'emballage d'ADN).

Mutants	Protéines	Mutations
F181A rev0 (faible passage)	ORF37p (gH)	Thr736 => Ile (30%)
F181A rev1	ORF0p (protéine membranaire) ORF14p (gC) ORF21p (protéine du tégment) ORF37p (gH) ORF37p (gH) ORF52p (ADN hélicase) Promoteur de gL (101829 bp) ORF68p (gE) ORF68p (gE)	Suppression du codon STOP (10%) Gly436 => Cys (10%) Thr83 => Ala (14%) Ser304 => Phe (20%) Thr736 => Ile (66%) Gln26 => Arg (31%) C => T (27%) Lys320 => Lys (12%) Ser613 => Trp (21%)
F181A rev2	ORF31p (gB) ORF37p (gH) ORF37p (gH)	Val810 => Met (32%) Thr169 => Pro (24%) Arg833 => STOP (30%)
F181A rev3	ORF9p ORF37p (gH) ORF62p (IE62) ORF62p (IE62)	Ile221 => Asn (14%) Ser304 => Phe (15%) Gln768 => Arg (11%) Arg958 => Gly (11%)
W201F rev1	ORF9p 3' UTR d'ORF56p	Thr217 => Ala (30%) (12%)
W201F rev2	ORF9p	Ser168 => Pro (11%)
W201F rev2-2	ORF9p ORF13p (thymidylate synthase) ORF13p (thymidylate synthase) ORF42p (sous-unité 1 de la terminase d'emballage d'ADN) ORF62p (IE62)	Ser168 => Pro (28%) Tyr190 => Cys (10%) Ile215 => Val (14%) Arg24 => Cys (14%)  Glu633 => Gly (13%)

**Figure 31 : Des mutations spontanées compensatoires sont apparues dans l'ADN génomique des mutants ORF9p-F181A et ORF9p-W201F.** Des cellules MeWo NI cultivées pendant 48h ont été mises en contact avec des cellules MeWo infectées par les virus au phénotype réverté. A partir de ces cultures, l'ADN viral a été extrait et séquençé par séquençage à haut débit.

CONCLUSION  
&  
PERSPECTIVES

Les mutants de la protéine ORF9p ayant déjà été créés avant mon arrivée au laboratoire, la première étape de la caractérisation des mutants a été de prouver qu'il existe chez eux un potentiel défaut de croissance dû aux mutations insérées dans cette protéine. Cette étape a été divisée en différentes expériences. Premièrement, les séries de photos prises toutes les 2h pendant 96h par l'automate (IncuCyte®) ont permis d'observer la propagation des virus WT, ORF9p-F181A, -F181W et -W201F en cellules vivantes. Deuxièmement, la superficie des foyers formés après 48h d'infection sur des cellules fixées à la PAF a été mesurée via une macro du logiciel Fiji-Image J. A partir de ces données, un graphique sous forme de « boîte à moustaches » a été réalisé et soutenu par deux tests statistiques (tests Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney). Troisièmement, une courbe de croissance a été réalisée en prenant des photos à 24h/48h/72h/96h d'infection qui ont été analysées de la même façon que l'expérience précédente.

Ces expériences nous ont permis de conclure que la mutation F181A réduit fortement la propagation virale, mais surtout le mutant n'est plus capable de faire fusionner correctement les cellules infectées pour former des *syncytia*, même après de longs temps d'infection. La mutation F181W favorise la propagation du virus, la surface des foyers à 48h est légèrement augmentée par rapport au virus sauvage, et la courbe de croissance surpasse celle du virus sauvage aux temps 72h et 96h. Par ailleurs, son phénotype de fusion semble légèrement plus prononcé par rapport au virus WT. Pour la mutation W201F, son phénotype de propagation reste inexplicable à l'heure actuelle. La taille des foyers d'infection n'est pas très différente du virus sauvage. Par contre, au niveau du pouvoir fusogène des cellules infectées, nous avons très clairement un défaut de fusion dans les flasques de culture, phénotype qui révertait aux environs du passage numéro vingt. Par contre, dans les expériences avec l'automate IncuCyte®, de nombreux *syncytia* étaient visiblement dès 48h d'infection. Il est possible que le taux de confluence des cellules ou le type de revêtement des plaques 6 puits puisse influencer le résultat de l'expérience. Nous n'avons pas eu le temps de creuser cette hypothèse. Pour cette raison, ce mutant n'a pas été représenté dans les overlays (photo prise en contraste de phase + photo prise en fluorescence représentée en « fire ») ni dans les courtes vidéos.

Afin de déterminer si la mutation F181W augmente la fusion cellule-cellule, il serait intéressant de mesurer la surface des *syncytia*/foyers d'infection formés par le mutant et le virus sauvage, ou encore mesurer et comparer le nombre de noyaux par *syncytia*. Afin d'essayer de quantifier l'effet positif ou négatif des différentes mutations sur la fusion, nous pourrions également envoyer nos vecteurs d'expression des mutants d'ORF9p à nos collaborateurs à Stanford (laboratoire du Pr Ann. Arvin). Ce laboratoire possède deux lignées de cellules (CHO-Dsp1 et CHO-Dps2) qui expriment chacune une demi luciférase. La transfection transitoire de la lignée Dsp1 par des vecteurs d'expression pour gB, gH et gL lui permet de fusionner avec la lignée Dps2 et une mesure de l'activité luciférase permet de quantifier la fusion cellule à cellule. Rajouter un vecteur d'expression pour ORF9p sauvage dans les cellules Dsp1 permet d'augmenter la fusion de façon significative (Julien Lambert, thèse de doctorat).

Il est important de noter qu'une perte de fusion ne signifie pas forcément une perte de particules virales. Il faudrait faire de la microscopie électronique pour voir s'il y a des particules virales dans les cellules infectées de type MeWo, ou dans d'autres types cellulaires pour voir s'il y a, par exemple, des particules virales extracellulaires [60].

Concernant le mutant W169F, il serait intéressant de comprendre pourquoi cette mutation n'est pas compatible avec la réplication virale. En transfection, la protéine mutée ne semble pas instable ou dégradée, ce qui aurait pu expliquer pourquoi le mutant ne pousse pas en infection. Il faut réaliser différentes expériences, comme par exemple, transfecter le BAC ORF9p-W169F-V5 et après 72h, réaliser un extrait total et un WB révélant V5 pour savoir si ORF9p s'exprime ou non dans les cellules MeWo, et si potentiellement, il y a une différence de pattern par rapport à la protéine sauvage. Avec les mêmes extraits, nous pourrions essayer de détecter les autres protéines virales comme par exemple gE, gB, ou ORF40p, qui sont des protéines « *late* », ce qui permettrait de savoir si la réplication de l'ADN est possible ou non avec ce mutant. Inclure le vecteur d'expression pCAGGS-ORF9-W169F-V5 dans le test de fusion par le laboratoire du Pr. Ann Arvin à Stanford pourrait également d'avérer intéressant.

La seconde étape a été de savoir si les mutations F181A, F181W et W201F dans la protéine ORF9p interfèrent dans ses interactions avec les glycoprotéines gB, gE, gI et gH. Tout d'abord, des co-IP de gE et gH en infection dans des cellules MeWo. Pour les co-IP de gE, les résultats ont été repris sous la forme d'un histogramme soutenu par deux tests statistiques (tests Kruskal-Wallis et Mann-Whitney) qui prend la moyenne des ratios ORF9p/gE obtenus dans les sept IP réalisées. Il faut noter que les domaines WW sont censés lier des domaines riches en proline. La queue cytoplasmique de gE de HSV-1 possède effectivement un domaine riche en proline, mais celui-ci n'est pas conservé chez VZV. Pourtant, la mutation F181A réduit drastiquement l'interaction entre ORF9p et gE. A l'inverse, la mutation F181W favorise cette interaction par rapport au WT, et la mutation W201F ne l'impacte pas. Dans la littérature, gE est décrite comme essentielle pour la stabilité et l'infectivité du VZV car elle se lie au récepteur IDE, ce qui favorise l'internalisation des virus et la formation des *syncytia* [24]. La glycoprotéine gE interagit également avec gI qui facilite la maturation et la distribution de gE. La mutation F181A provoque une perte d'interaction entre gE et gI, ce qui pourrait mener à une forme aberrante de gE, et donc potentiellement à un défaut de croissance du mutant [61]. Des IF de gE-gI-ORF9p ont été réalisées pour tenter d'appuyer cette hypothèse, mais n'ont pas encore pu être analysées.

Pour les co-IP de gH, même si l'AC anti-gH ne fonctionne pas en WB, il semble que la mutation F181A diminue fortement l'interaction entre ORF9p et gH et la mutation W201F la réduit légèrement par rapport au WT. Le F181W ne semble pas impacter l'interaction entre les deux protéines. Les membranes des IP gE et gH ont ensuite subi un *stripping* pour pouvoir révéler la glycoprotéine gB. Les résultats démontrent que gB peut interagir avec gE, en plus de pouvoir interagir avec gH, chez le WT et le mutant F181W. Pour le mutant W201F, il semble y avoir peu d'impact sur l'interaction entre ORF9p et gE, ou entre ORF9p et gB, mais la quantité de gB qui interagit avec gH est plus faible. Ce résultat devrait être confirmé et pourrait expliquer le phénotype de fusion observé pour ce mutant, par exemple en étudiant la colocalisation de gB-gH-ORF9p en IF. Ensuite, pour tenter de visualiser la glycoprotéine gH dans les co-IP, un tag flag a été ajouté du côté N-terminal, juste après le peptide signal via la technique de clonage « NeBuilder HiFi assembly » dans un vecteur pCAGGS. Un tag HA a été ajouté en C-terminal de gL, et gB a également été cloné. Tout cela (pCAGGS-gB, pCAGGS-gL-HA, pCAGGS-Flag-gH et pCAGGS-ORF9p du WT ou des mutants) a permis de réaliser des tests de co-IP en transfection transitoire dans des cellules lentiX-293. Même si l'IP flag révèle un signal pour flag-gH lors de la révélation par WB, il n'y a peu, voire pas de différence d'interaction gH-ORF9p entre le WT et les mutants. L'IP du complexe par la sous-unité gL confirme l'existence d'un complexe gB/gH/gL/ORF9p même si dans ces conditions, peu de flag-gH est immunoprécipité. La membrane a ensuite subi un *stripping* pour pouvoir révéler la glycoprotéine gB. La proportion entre les formes mature et immature de gB est plus ou moins conservée par rapport à l'infection, mais dans l'IP, seule la forme immature de la protéine domine. Les résultats diffèrent des résultats obtenus lors des IP en infection. Il aurait peut-être fallu déposer des extraits infectés et transfectés en parallèle sur le même gel pour savoir si les protéines migrent à la même taille, ce qui pourrait indiquer que le taux de glycosylation n'est pas fort différent. Il aurait aussi peut-être fallu tenter de faire une IP avec toutes les glycoprotéines gB/gE/gI/gH/gL. Une autre approche pour tenter de visualiser gH dans les co-IP a été d'insérer un tag flag ou un tag lié à un *linker* dans la région N-terminale de la séquence de gH dans le BAC-VZV-WT/mutants. Les cellules MeWo ont été transfectées, donnant lieu à des infections productives pour chaque construction. Il faudrait réaliser une IP flag ou gH en infection.

La troisième étape a été d'étudier la colocalisation d'ORF9p et ses partenaires, AP-1 et les glycoprotéines de VZV. Chez PRV, l'exocytose des glycoprotéines seules, des virions complets et des *lights particles* dépend de rab6, rab8 et rab11, ce qui correspond à deux cheminements différents (*pathway* constitutif d'exocytose via le complexe rab6-rab8 et *pathway* des endosomes de recyclage via rab8-rab11) [62]. Or, VZV ne produit presque pas de particules virales dans le surnageant, donc le cheminement pourrait être différent. En effet, dans la littérature, il y aurait pour VZV deux voies de production des particules virales distinctes. La première génère de petites vésicules de transport contenant une particule virale unique, et la seconde génère de larges vésicules de l'endosome qui vont transporter les particules jusqu'à la membrane plasmique via une liaison de gE au récepteur mannose-6-phosphate (M6PR) présent dans ces vésicules [63].

Des expériences en immunofluorescence, réalisées sur des cellules infectées fixées après 48h d'infection via le microscope confocal à haute résolution Zeiss LSM880, ont tout d'abord montré que la mutation ORF9p-F181A entraîne un défaut d'expression de ces glycoprotéines en surface, contrairement à la mutation ORF9p-F181W qui semble globalement exprimer plus de glycoprotéines que le virus sauvage. Ces expériences ont montré que la mutation ORF9p-F181A provoque une accumulation des glycoprotéines dans des vésicules proches du noyau en absence d'ORF9p. Comme perspectives, il faudrait tout d'abord étudier la colocalisation entre gB/gE/gH/ORF9p et différents marqueurs cellulaires pour les différentes vésicules de transport (rab6, rab11 et M6PR) pour savoir s'il est possible de détecter les différentes voies d'export des particules virales sur le WT, puis pour savoir où sont potentiellement bloquées les glycoprotéines dans le mutant ORF9p-F181A puis éventuellement dans le mutant ORF9p-W201F. Il faudrait aussi savoir où sont accumulées les glycoprotéines qui ne sont visiblement pas toutes au même endroit dans les foyers viraux, et savoir si ces glycoprotéines transitent encore par la surface des cellules. Pour ce faire, une expérience serait de placer les AC directement couplés à un fluorochrome dans le milieu de culture, et de remettre les cellules dans l'incubateur à des temps croissants, puis de fixer les lames et réaliser une IF sur des endosomes précoces, tardifs, et de recyclage. Une autre expérience serait d'infecter des cellules MRC5 pour pouvoir évaluer au FACS la quantité de gB, gE et gH en surface.

Des immunofluorescences réalisées pour étudier la colocalisation entre ORF9p et AP-1 ont révélé que la mutation ORF9p-F181A mène à une perte de colocalisation, alors que la mutation F181W l'augmente. Il faudrait étudier la localisation d'ORF9p et des glycoprotéines en transfection pour voir si la présence de l'une, influence la localisation de l'autre. Il faut ensuite réaliser une CO-IP entre ORF9p, AP-1 et les glycoprotéines en infection et des IF pour pouvoir affirmer si oui ou non l'interaction directe ORF9p-AP-1 est cruciale pour la fusion.

Enfin, la quatrième et dernière étape a consisté en l'identification des mutations spontanées compensatoires apparues dans l'ADN génomique viral chez les mutants après un grand nombre de passages en culture par séquençage à haut débit. Ces mutations apparaissent pour pallier au manque de croissance/fusion, et ont été identifiées principalement dans la séquence des gènes codant pour les glycoprotéines gB, gE et gH chez le mutant F181A. L'idée serait d'envoyer au moins dix échantillons d'ADN génomique viral provenant de réversions distinctes du mutant ORF9p-F181A et du mutant ORF9p-W201F, ainsi que du mutant F181W à passage très élevé qui ne semble pas changer de phénotype au cours des passages mais pourrait tout de même accumuler des mutations. Cela permettrait de cibler les mutations qui apparaissent le plus fréquemment pour choisir celles qui sont potentiellement responsables de la réversion phénotypique. Ces mutations seront alors introduites dans les BAC-VZV-ORF9p-F181A ou W201F afin de voir si ce sont bien ces mutations qui révertent le phénotype. Suite à cela, des tests des co-IP de gE et de gH en infection et des immunofluorescences pourront être effectués afin de savoir si le mutant F181A récupère son interaction avec les glycoprotéines et l'expression de ces dernières en surface.

# ANNEXES

Figure S1 : Template pEP-Kan S2

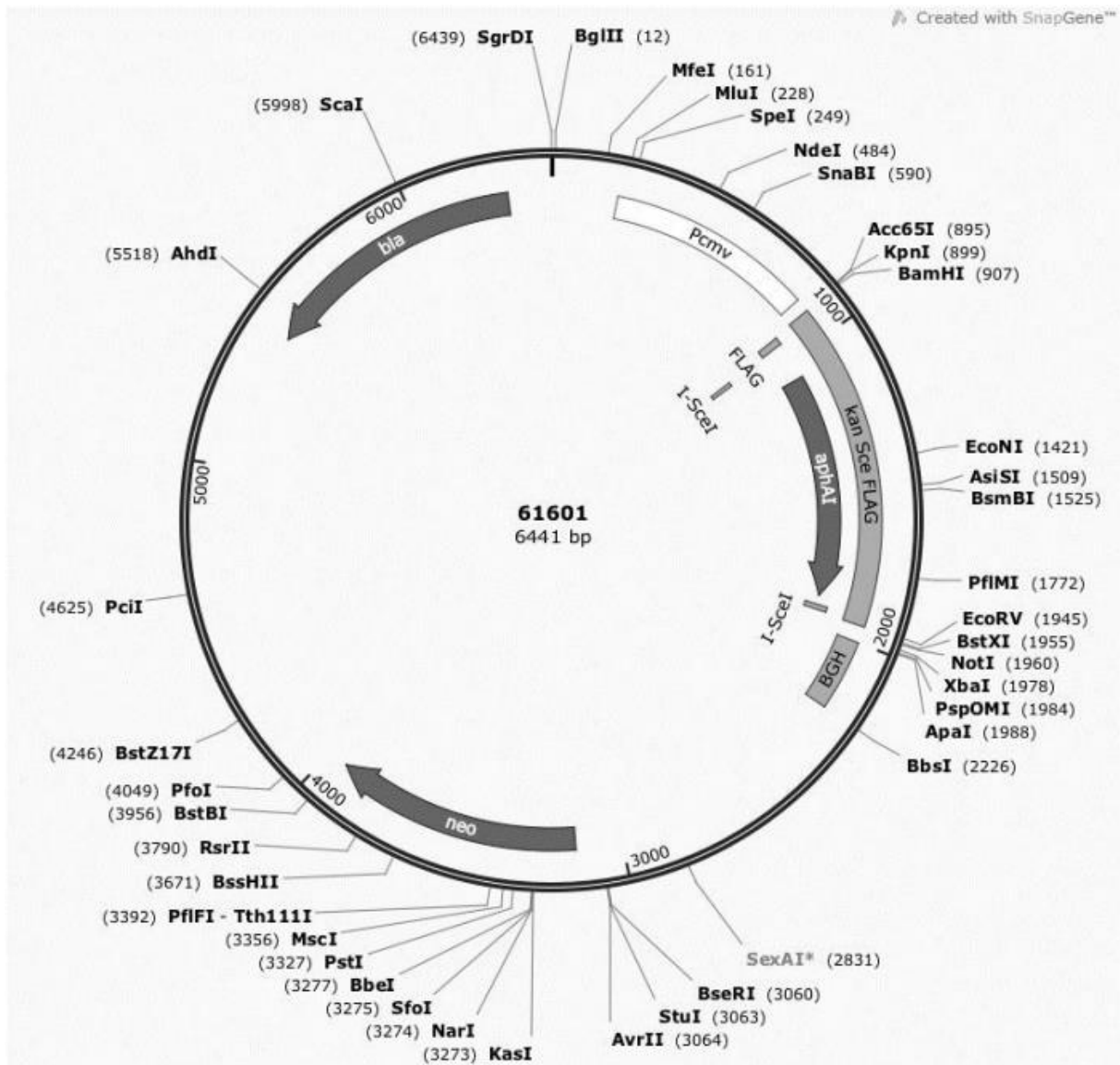
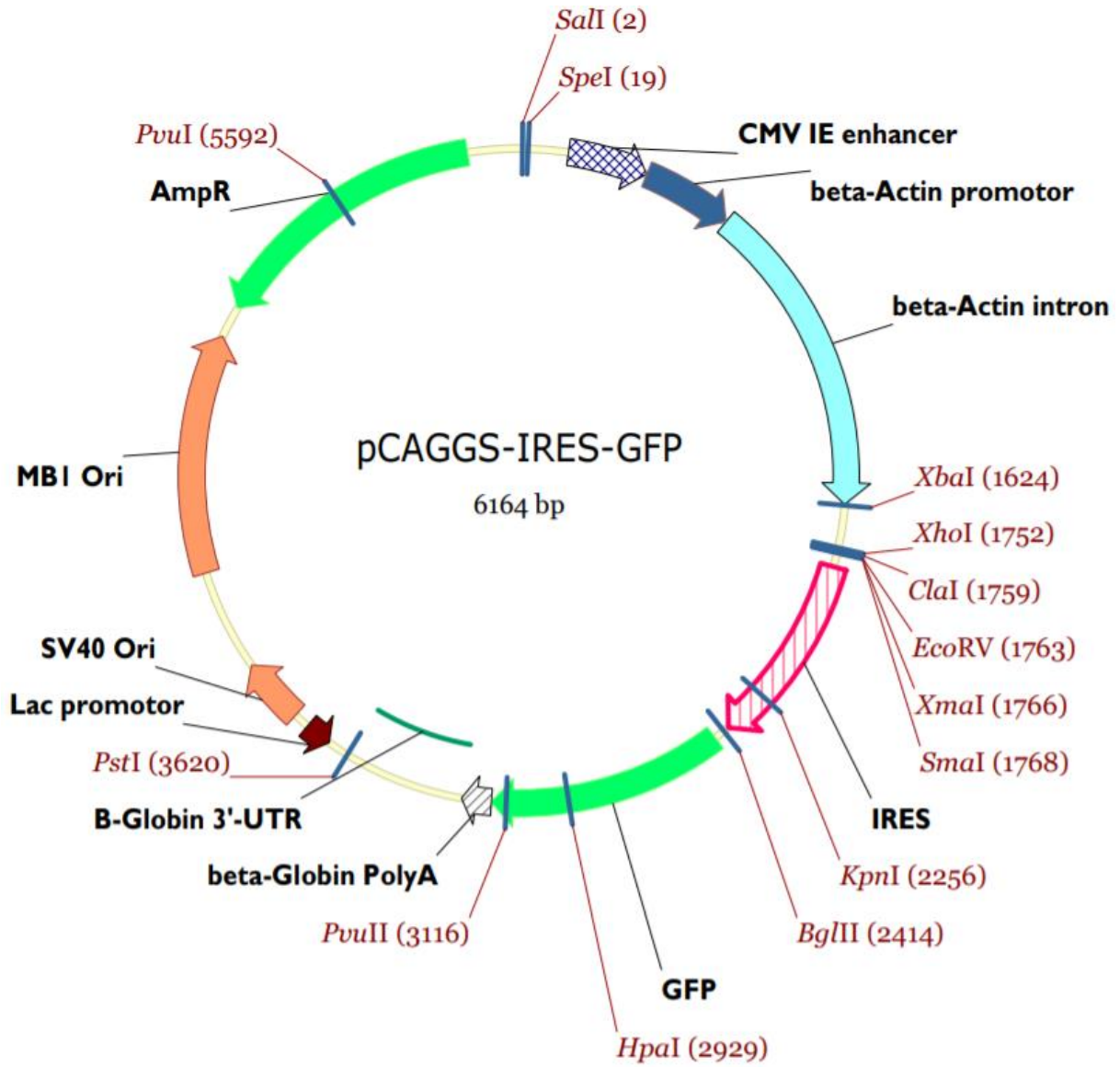




Figure S2 : Carte du vecteur pCAGGS



**Figure S3 : Photographie d'un puits prise par l'automate IncuCyte® brute (à gauche) et après traitement par une macro de comptage et mesure des foyers viraux**

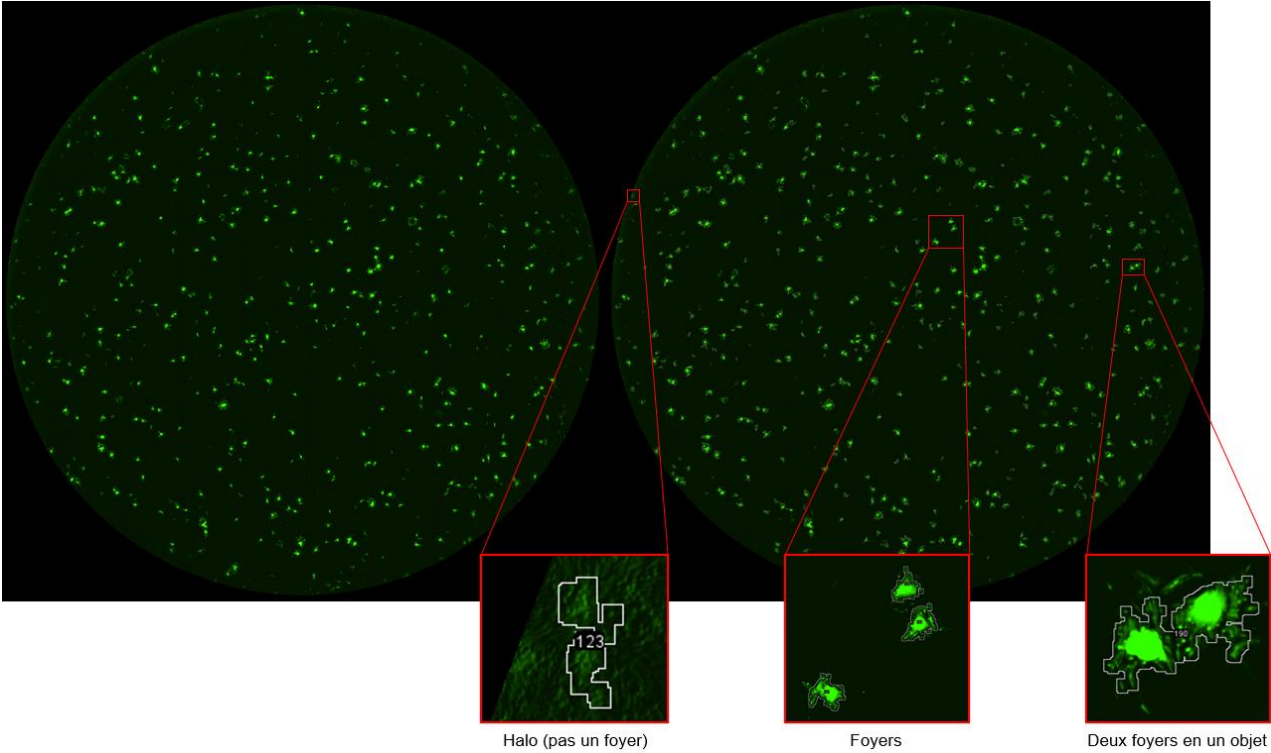


Figure S4 : Calculs des paramètres statistiques pour réaliser le *box-plot*

Nombre de foyers bruts n			
WT	F181A	F181W	W201F
1004	2113	657	1619

Calculs des moyennes des données brutes (48h)			
WT	F181A	F181W	W201F
70226,7261	37909,9102	80053,3316	66287,13012

Calculs des quartiles des données brutes				
WT	F181A	F181W	W201F	
20102,973	20007,282	20645,219	20166,767	VAL MIN
42077,891	25792,569	47470,447	43726,5575	QT 1
63255,388	33360,09	70157,063	60707,629	MEDIANE
92333,3293	45132,0115	102723,72	84183,691	QT 2
258962,335	137124,444	410743,368	230901,104	VAL MAX

Calculs des écart-types des données brutes (48h)			
WT	F181A	F181W	W201F
38900027,8	16154,3852	43790,9419	29025,53931

**Figure S5 : Etudes statistiques de la surface des foyers viraux après 48h d'infection**

1way ANOVA		
1	Table Analyzed	Data 1
2		
3	Kruskal-Wallis test	
4	P value	P<0.0001
5	Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
6	P value summary	***
7	Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes
8	Number of groups	5
9	Kruskal-Wallis statistic	1671

Mann-Whitney test								
1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1	Table Analyzed	Data 1		
2								
3	Column B	F181A	Column C	F181W	Column D	W201F		
4	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.		
5	Column A	WT	Column A	WT	Column A	WT		
6								
7	<b>Mann Whitney test</b>		<b>Mann Whitney test</b>		<b>Mann Whitney test</b>			
8	P value	<0.0001	P value	<0.0001	P value	0.1899		
9	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate	Exact or approximate P value?	Approximate		
10	P value summary	****	P value summary	****	P value summary	ns		
11	Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Significantly different (P < 0.05)?	No		
12	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
13	Sum of ranks in column A,B	2183529 , 2666526	Sum of ranks in column A,C	787758 , 584239	Sum of ranks in column A,D	1333625 , 2092029		
14	Mann-Whitney U	430971	Mann-Whitney U	287258	Mann-Whitney U	783876		
15								
16	<b>Difference between medians</b>		<b>Difference between medians</b>		<b>Difference between medians</b>			
17	Median of column A	63120, n=1000	Median of column A	63120, n=1000	Median of column A	63120, n=1000		
18	Median of column B	33360, n=2114	Median of column C	70149, n=656	Median of column D	60397, n=1617		
19	Difference: Actual	-29760	Difference: Actual	7029	Difference: Actual	-2723		
20	Difference: Hodges-Lehmann	-26873	Difference: Hodges-Lehmann	7464	Difference: Hodges-Lehmann	-1579		

**Figure S6 : Etudes statistiques de la moyenne des ratios ORF9p/gE des sept IP gE**

Table Analyzed	Data 2
<b>Kruskal-Wallis test</b>	
P value	0.0018
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	4
Kruskal-Wallis statistic	15.04
<b>Data summary</b>	
Number of treatments (columns)	4
Number of values (total)	28

Table Analyzed	Data 2	Table Analyzed	Data 2	Table Analyzed	Data 2
Column B	F181W	Column C	F181A	Column D	W201F
vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
Column A	WT	Column A	WT	Column A	WT
<b>Mann Whitney test</b>		<b>Mann Whitney test</b>		<b>Mann Whitney test</b>	
P value	0.0111	P value	0.0070	P value	0.5350
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*	P value summary	**	P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	33 , 72	Sum of ranks in column A,C	73 , 32	Sum of ranks in column A,D	47 , 58
Mann-Whitney U	5	Mann-Whitney U	4	Mann-Whitney U	19
<b>Difference between medians</b>		<b>Difference between medians</b>		<b>Difference between medians</b>	
Median of column A	0.1447, n=7	Median of column A	0.1447, n=7	Median of column A	0.1447, n=7
Median of column B	0.3280, n=7	Median of column C	0.05295, n=7	Median of column D	0.1946, n=7
Difference: Actual	0.1833	Difference: Actual	-0.09178	Difference: Actual	0.04990
Difference: Hodges-Lehmann	0.1571	Difference: Hodges-Lehmann	-0.09090	Difference: Hodges-Lehmann	0.04990

Figure S7 : Calculs des ratios ORF9p/gE des sept IP gE, de la moyenne et de l'écart-type pour réaliser des statistiques

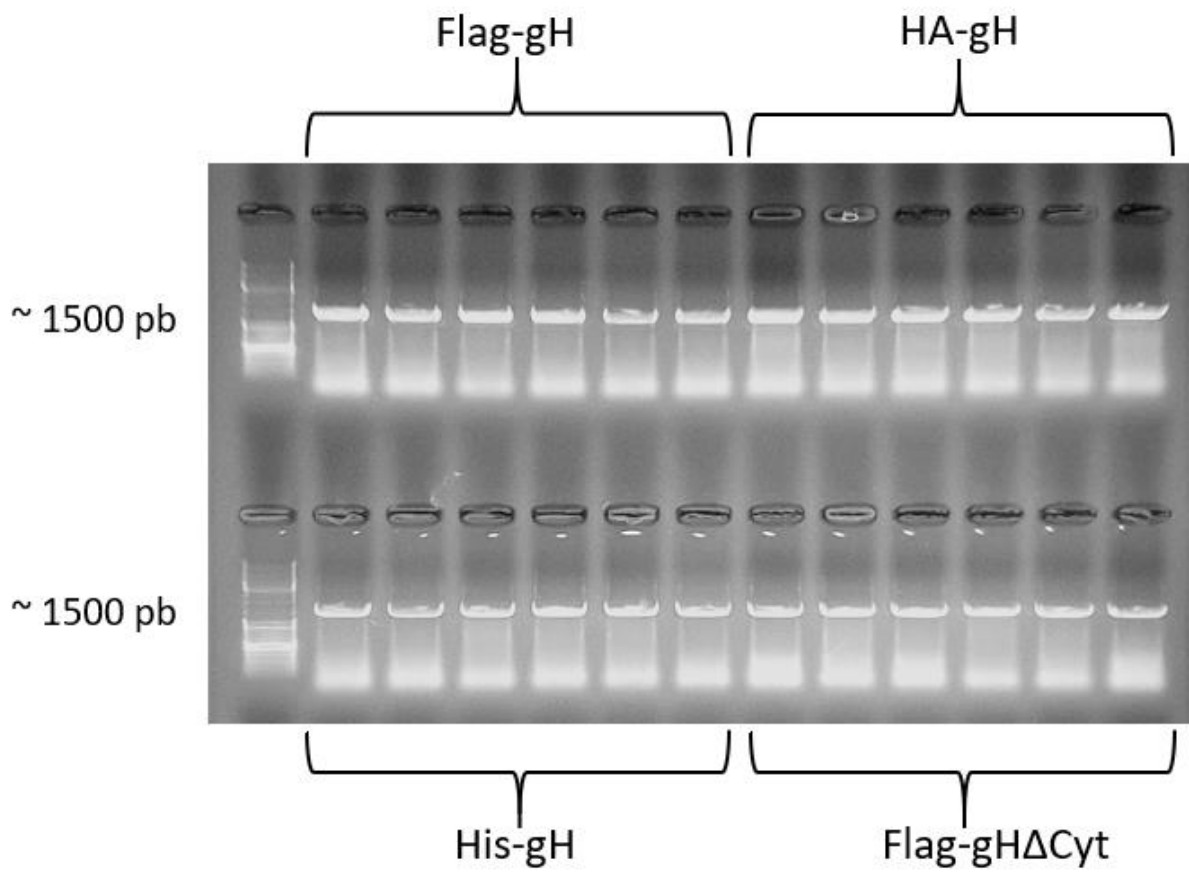
Ratio 9/gE des IP				
	WT	F181W	F181A	W201F
	0,1053638	0,23090633	/	0,19464175
	0,1193972	0,20254667	0,052954011	0,08396069
	0,12502793	0,32802033	0,110070755	0,16366322
	0,14473808	0,36987854	0,130565024	0,08178571
	0,37279774	0,55953479	0,075284489	0,84861043
	0,19477391	0,37735704	0,026701186	0,78905899
	0,1761301	0,27645651	0,034129436	0,40227207
Moyenne et écart-type des ratios 9/gE des IP				
	WT	F181W	F181A	W201F
Moyenne	0,17688983	0,33495717	0,065673129	0,3662847
Ecart-type	0,09205532	0,11922103	0,041275802	0,32757559



**Figure S8 : Liste des tags et des amorces PCR pour le clonage dans le vecteur pCAGGS ou dans le BAC**

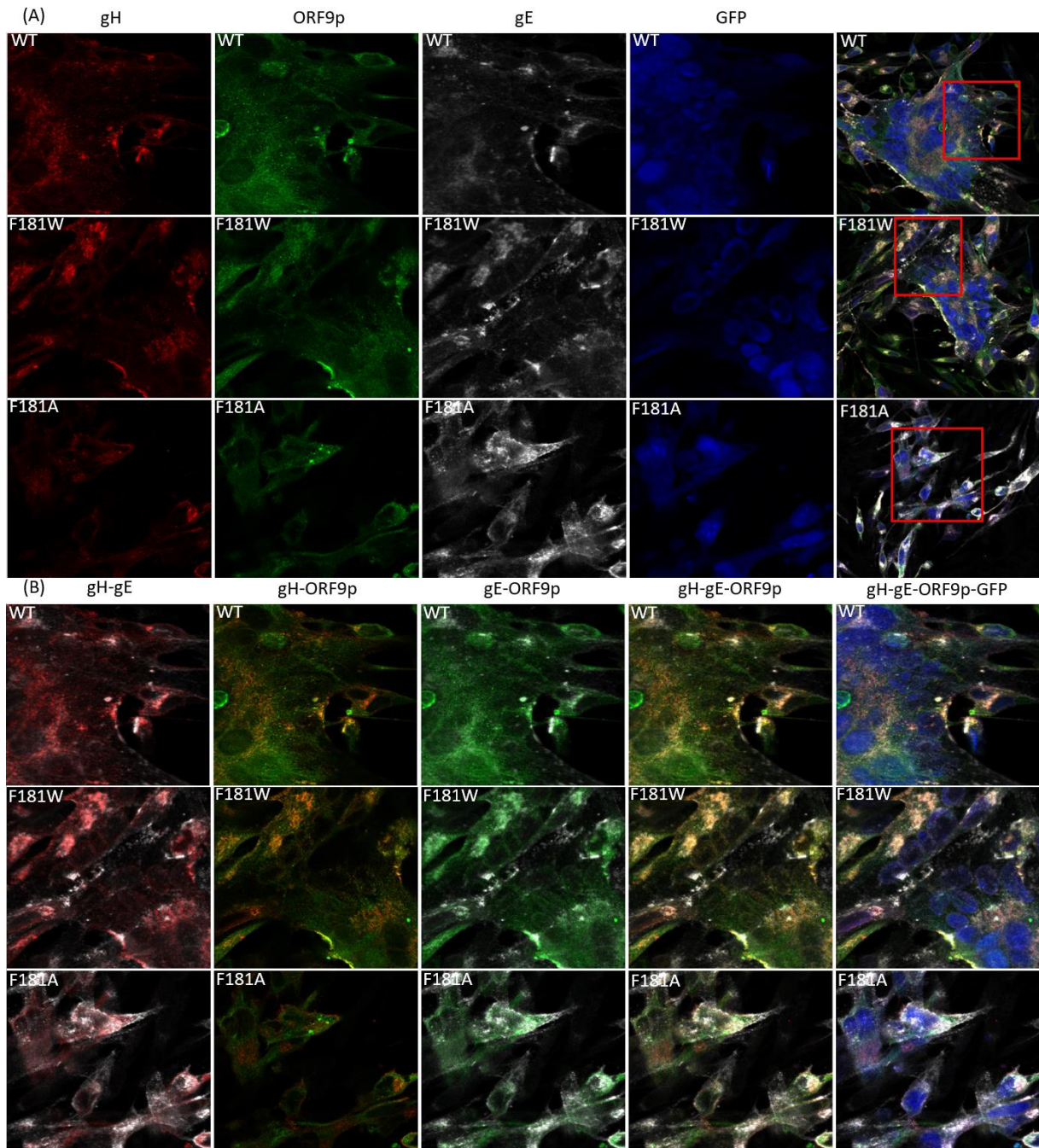
Nom	Séquence (5'P-3'OH)
Flag (tag)	GACTACAAAGACGATGACGACGAC
HA (tag)	TACCCATACGAT
His (tag)	CATCATCACCATCACCAC
gH_middle reverse	GGCTAGGTAGCGTCTGAAGTAC
gH_middle forward	CCGATCCATCGCAGCTTCATG
gHstartRv	CGTCTCCTTCGTGTGTTGTAGGG
SeqKanF	AGGATGACGACGATAAGTAGGG
SeqKanR	GCCAGTGTTACAACCAATTAACC
pCAGGS_gH_RV	CATGCCATGTGTAATCCCAGCAGTTATGTCAGAGGTATTTTATTATATTCTCG
pCAGGS_gH_Δyt_Rv	CATGCCATGTGTAATCCCAGCAGTTATCGAAGGCGGGAATTTCCACATAAC
pCAGGS_gH_Fw	TCACTATAGGGCTCGAGATCGATATGTTTGCGCTAGTTTTAGCGGTGG
pCAGGS_gH-Flag_Fw_signal peptide-Flag	TCACTATAGGGCTCGAGATCGATATGTTTGCGCTAGTTTTAGCGGTGGTAATTCTTCTCTTTGGACCACGGCTGATTACAAGGATGACGATGACAAAAATAAATCTTACGTAACACCAACCCCTGC
pCAGGS_gH-HA_Fw_signal peptide-HA	TCACTATAGGGCTCGAGATCGATATGTTTGCGCTAGTTTTAGCGGTGGTAATTCTTCTCTTTGGACCACGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAATAAATCTTACGTAACACCAACCCCTGC
pCAGGS_gH-His_Fw_signal peptide-His	TCACTATAGGGCTCGAGATCGATATGTTTGCGCTAGTTTTAGCGGTGGTAATTCTTCTCTTTGGACCACGGCTCATCATCACCATCACCATAATAAATCTTACGTAACACCAACCCCTGC
pCAGGS_gL-HA_Fw_signal peptide-HA	TCACTATAGGGCTCGAGATCGATATGGCATCACATAAATGGTTACTGCAGATGATAGTTTTTTAAAACTATCACAATCGCGTATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTGTCCTTCATCTCCAAGACGACACTCC
pCAGGS_gL-HA_Rv	CATGCCATGTGTAATCCCAGCAGTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTGGCATAACGCGTTGGAACAAACG
Flag-gH-Kanamycine forward	CGACTATGTTTGCGCTAGTTTTAGCGGTGGTAATTCTTCTCTTTGGACCACGGCTGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAGGG
Flag-gH-Kanamycine reverse 1	TAGAGCGAGTCGCAGGGGTTGGTGTACGTAAGATTTATTCTTATCGTCGTCATCC TTGTAATCAGCCGTGGTCCAAAGAGCCAGTGTACAACCAATTAACC
Flag-linker-gH-Kanamycine reverse 2	TAGAGCGAGTCGCAGGGGTTGGTGTACGTAAGATTTATTAGAACCACCTCCGCCCTTATCGTCGTCATCCCTTGTAAATCAGCCGTGGTCCAAAGAGCCAGTGTACAACCAATTAACC

Figure S9 : Photo du gel réalisé lors du *screening* des colonies bactériennes par PCR (~ 1500 pb) où tous les clones tag-gH du WT sont positifs

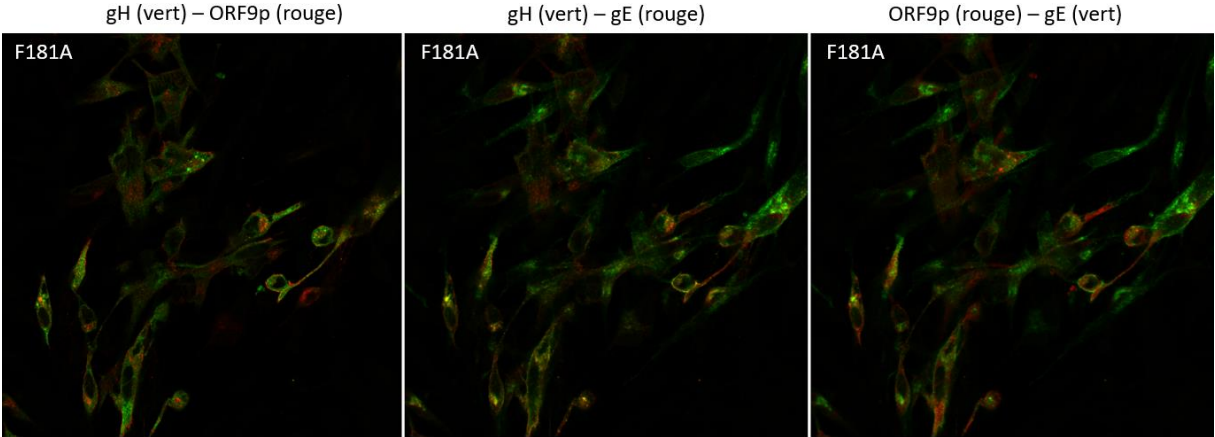




**Figure S10 : Immunofluorescences zoomées de gE, gH et ORF9p étudiées dans des cellules perméabilisées après 48h d'infection du WT et des mutants F181W et F181A**

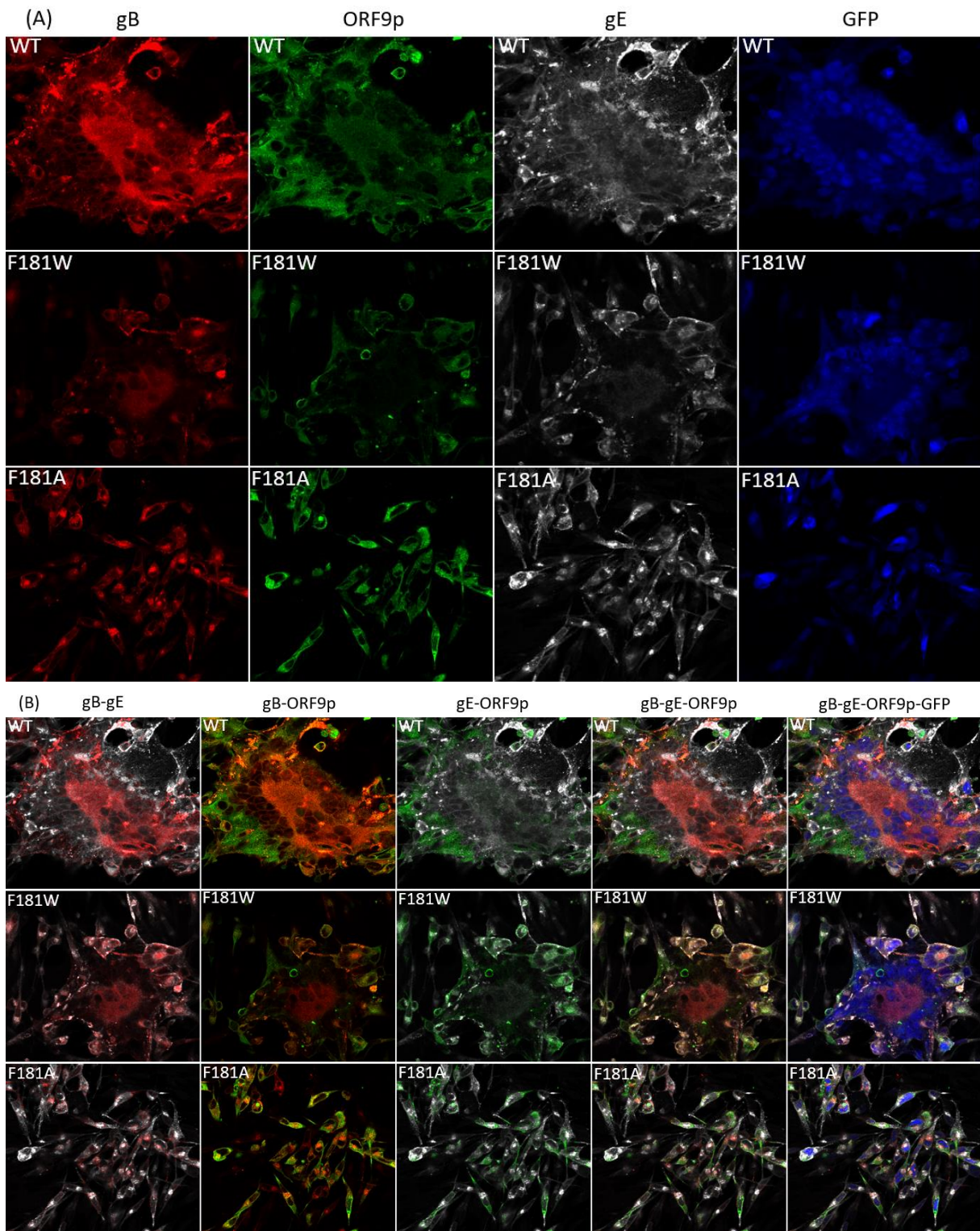


**Figure S11 : Immunofluorescences de gE, gH et ORF9p étudiées dans des cellules perméabilisées après 48h d'infection du mutant F181A (overlays)**

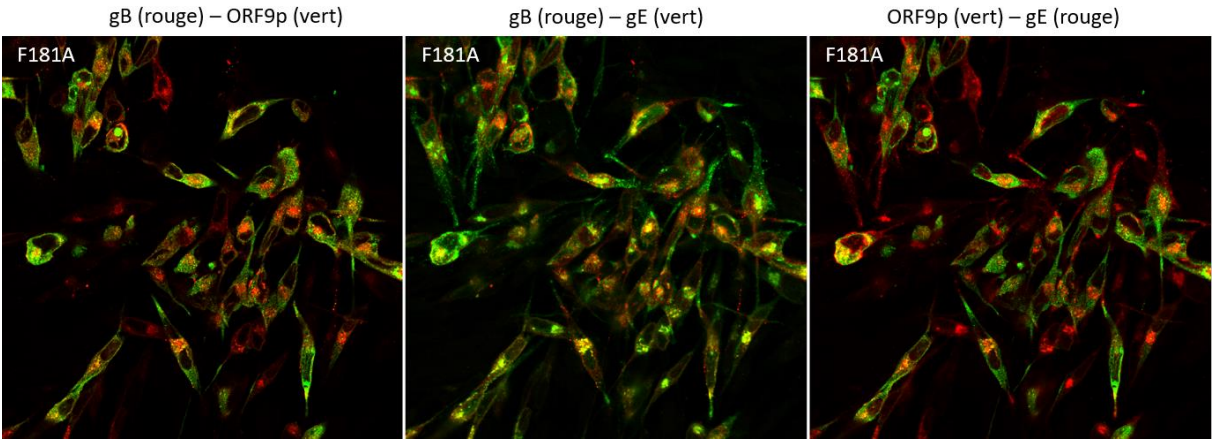




**Figure S12 : Immunofluorescences totales de gB, gE et ORF9p étudiées dans des cellules perméabilisées après 48h d'infection du WT et des mutants F181W et F181A**



**Figure S13 : Immunofluorescences de gE, gB et ORF9p étudiées dans des cellules perméabilisées après 48h d'infection du mutant F181A (overlays)**



## **BIBLIOGRAPHIE**

- [1] “Varicella-Zoster Virus: Virology and Clinical Management,” 2000, doi: 10.1017/CBO9780511601194.
- [2] A. J. Davison and J. E. Scott, “The complete DNA sequence of varicella-zoster virus,” *J. Gen. Virol.*, vol. 67, no. 9, pp. 1759–1816, 1986, doi: 10.1099/0022-1317-67-9-1759.
- [3] S. L. Tillieux, W. S. Halsey, E. S. Thomas, J. J. Voycik, G. M. Sathe, and V. Vassilev, “Complete DNA sequences of two oka strain varicella-zoster virus genomes,” *J. Virol.*, vol. 82, no. 22, pp. 11023–11044, 2008, doi: 10.1128/JVI.00777-08.
- [4] T. Vergou, *Varicella*. 2015.
- [5] J. Moffat, C.-C. Ku, L. Zerboni, M. Sommer, and A. Arvin, *VZV: Pathogenesis and the disease consequences of primary infection*. 2007.
- [6] A. A. Gershon *et al.*, “Varicella zoster virus infection,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 1, 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.16.
- [7] L. Zerboni, N. Sen, S. L. Oliver, and A. M. Arvin, “Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, no. 3, pp. 197–210, 2014, doi: 10.1038/nrmicro3215.
- [8] A. A. Gershon *et al.*, “Latency of varicella zoster virus in dorsal root, cranial, and enteric ganglia in vaccinated children,” *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, vol. 123, 2012.
- [9] G. L. W. M, C. JJ, G. MD, and G. AA, “Infected peripheral blood mononuclear cells transmit latent varicella zoster virus infection to the guinea pig enteric nervous system,” *J. Neurovirol.*, vol. 20, no. 5, pp. 442–456, Oct. 2014, doi: 10.1007/S13365-014-0259-1.
- [10] I. Staikov, N. Neykov, B. Marinovic, J. Lipozenčić, and N. Tsankov, “Herpes zoster as a systemic disease,” *Clin. Dermatol.*, vol. 32, no. 3, pp. 424–429, 2014, doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.11.010.
- [11] P. G. E. Kennedy and A. A. Gershon, “Clinical features of varicella-zoster virus infection,” *Viruses*, vol. 10, no. 11, 2018, doi: 10.3390/v10110609.
- [12] R. Kofahi, B. Aldabbour, and M. Aljezawi, “A rare case with new insights: Pure sensory Guillain Barre syndrome with axonal features,” *Int. Med. Case Rep. J.*, vol. 13, pp. 543–549, 2020, doi: 10.2147/IMCRJ.S280255.
- [13] “Genome List - Genome - NCBI.”  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/proteins/5313/890979%7CHuman alphaherpesvirus 3/viral segment Unknown/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/proteins/5313/890979%7CHuman%20alphaherpesvirus%203/viral%20segment%20Unknown/) (accessed Feb. 28, 2021).
- [14] V. Chaudhuri, M. Sommer, J. Rajamani, L. Zerboni, and A. M. Arvin, “Functions of varicella-zoster virus ORF23 capsid protein in viral replication and the pathogenesis of skin infection,” *J. Virol.*, vol. 82, no. 20, pp. 10231–10246, 2008, doi: 10.1128/JVI.01890-

- [15] “Varicellovirus ~ ViralZone.” <https://viralzone.expasy.org/179> (accessed Feb. 28, 2021).
- [16] M. M. Albà, R. Das, C. A. Orengo, and P. Kellam, “Genomewide function conservation and phylogeny in the Herpesviridae [2],” *Genome Research*, vol. 11, no. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 43–54, 2001, doi: 10.1101/gr.149801.
- [17] “Human herpesviridae (HHV) and its classification. | Download Scientific Diagram.” [https://www.researchgate.net/figure/Human-herpesviridae-HHV-and-its-classification\\_tbl1\\_326038063](https://www.researchgate.net/figure/Human-herpesviridae-HHV-and-its-classification_tbl1_326038063) (accessed Feb. 28, 2021).
- [18] “Herpesviridae - dsDNA Viruses - dsDNA Viruses (2011) - ICTV.” [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/91/herpesviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae) (accessed Feb. 28, 2021).
- [19] F. Pfaff *et al.*, “Full genome sequence of bovine alphaherpesvirus 2 (BoHV-2),” *Arch. Virol.*, vol. 166, no. 2, pp. 639–643, 2021, doi: 10.1007/s00705-020-04895-x.
- [20] “Human alphaherpesvirus 3 (ID 5313) - Genome - NCBI.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=vzv> (accessed Mar. 01, 2021).
- [21] R. J. Cohrs, M. P. Hurley, and D. H. Gilden, “Array Analysis of Viral Gene Transcription during Lytic Infection of Cells in Tissue Culture with Varicella-Zoster Virus,” *J. Virol.*, vol. 77, no. 21, pp. 11718–11732, 2003, doi: 10.1128/JVI.77.21.11718-11732.2003.
- [22] J. I. Cohen, “The Varicella-Zoster Virus Genome,” 2010, pp. 1–14.
- [23] F. J. Ibáñez *et al.*, “Experimental dissection of the lytic replication cycles of herpes simplex viruses in vitro,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. OCT, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02406.
- [24] Q. Li *et al.*, “Insulin degrading enzyme induces a conformational change in varicella-zoster virus gE, and enhances virus infectivity and stability,” *PLoS One*, vol. 5, no. 6, 2010, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0011327.
- [25] S. L. Oliver, E. Yang, and A. M. Arvin, “Varicella-Zoster Virus Glycoproteins: Entry, Replication, and Pathogenesis,” *Curr. Clin. Microbiol. Reports*, vol. 3, no. 4, pp. 204–215, 2016, doi: 10.1007/s40588-016-0044-4.
- [26] T. Sadaoka, T. Yanagi, K. Yamanishi, and Y. Mori, “Characterization of the varicella-zoster virus ORF50 gene, which encodes glycoprotein M,” *J. Virol.*, vol. 84, no. 7, pp. 3488–3502, 2010, doi: 10.1128/JVI.01838-09.
- [27] T. Suenaga, T. Satoh, P. Somboonthum, Y. Kawaguchi, Y. Mori, and H. Arase, “Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 2, pp. 866–871, 2010, doi: 10.1073/pnas.0913351107.

- [28] S. Hambleton, S. P. Steinberg, M. D. Gershon, and A. A. Gershon, "Cholesterol dependence of varicella-zoster virion entry into target cells," *J. Virol.*, vol. 81, no. 14, pp. 7548–7558, 2007, doi: 10.1128/JVI.00486-07.
- [29] K. Radtke *et al.*, "Plus-and Minus-End Directed Microtubule Motors Bind Simultaneously to Herpes Simplex Virus Capsids Using Different Inner Tegument Structures," doi: 10.1371/journal.ppat.1000991.
- [30] M. Quinlivan and J. Breuer, "Molecular studies of Varicella zoster virus," *Rev. Med. Virol.*, vol. 16, no. 4, pp. 225–250, 2006, doi: 10.1002/rmv.502.
- [31] M. Lebrun *et al.*, "Varicella-zoster virus induces the formation of dynamic nuclear capsid aggregates," *Virology*, vol. 454–455, no. 1, 2014, doi: 10.1016/j.virol.2014.02.023.
- [32] S. Häge *et al.*, "Patterns of autologous and nonautologous interactions between core nuclear egress complex (NEC) proteins of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -herpesviruses," *Viruses*, vol. 12, no. 3, 2020, doi: 10.3390/v12030303.
- [33] L. Riva, M. Thiry, M. Lebrun, L. L'homme, J. Piette, and C. Sadzot-Delvaux, "Deletion of the ORF9p Acidic Cluster Impairs the Nuclear Egress of Varicella-Zoster Virus Capsids," *J. Virol.*, vol. 89, no. 4, 2015, doi: 10.1128/jvi.03215-14.
- [34] M. Lebrun *et al.*, "Varicella-zoster virus ORF9p binding to cellular adaptor protein complex 1 is important for viral infectivity," *J. Virol.*, vol. 92, no. 15, 2018, doi: 10.1128/JVI.00295-18.
- [35] W. Wang *et al.*, "Outer nuclear membrane fusion of adjacent nuclei in varicella-zoster virus-induced syncytia," *Virology*, vol. 512, pp. 34–38, 2017, doi: 10.1016/j.virol.2017.09.002.
- [36] D. C. Johnson and J. D. Baines, "Herpesviruses remodel host membranes for virus egress," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no. 5, pp. 382–394, 2011, doi: 10.1038/nrmicro2559.
- [37] I. Ahmad and D. W. Wilson, "Hsv-1 cytoplasmic envelopment and egress," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 17, pp. 1–34, 2020, doi: 10.3390/ijms21175969.
- [38] M. Cai, S. Wang, J. Xing, and C. Zheng, "Characterization of the nuclear import and export signals, and subcellular transport mechanism of varicella-zoster virus ORF9," *J. Gen. Virol.*, vol. 92, no. 3, pp. 621–626, 2011, doi: 10.1099/vir.0.027029-0.
- [39] L. Riva *et al.*, "ORF9p phosphorylation by ORF47p Is crucial for the formation and egress of varicella-Zoster virus viral particles," *J. Virol.*, vol. 87, no. 5, pp. 2868–2881, 2013, doi: 10.1128/JVI.02757-12.
- [40] X. Che, M. Reichelt, M. H. Sommer, J. Rajamani, L. Zerboni, and A. M. Arvin, "Functions of the ORF9-to-ORF12 Gene Cluster in Varicella-Zoster Virus Replication and in the Pathogenesis of Skin Infection," *J. Virol.*, vol. 82, no. 12, 2008, doi:

10.1128/jvi.00303-08.

- [41] S. Y. Park and X. Guo, “Adaptor protein complexes and intracellular transport,” *Bioscience Reports*, vol. 34, no. 4. Portland Press Ltd, pp. 381–390, 2014, doi: 10.1042/BSR20140069.
- [42] X. Christopher *et al.*, “Adaptor protein complex-1 (AP-1) is recruited by the HEATR5 protein Laa1 and its co-factor Laa2 in yeast,” 2019, doi: 10.1074/jbc.RA118.005253.
- [43] B. Berarducci, J. Rajamani, L. Zerboni, X. Che, M. Sommer, and A. M. Arvin, “Functions of the unique N-terminal region of glycoprotein E in the pathogenesis of varicella-zoster virus infection,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 1, pp. 282–287, 2010, doi: 10.1073/pnas.0912373107.
- [44] Z.-H. Wang, M. D. Gershon, O. Lungu, Z. Zhu, and A. A. Gershon, “Trafficking of Varicella-Zoster Virus Glycoprotein gI: T338-Dependent Retention in the trans-Golgi Network, Secretion, and Mannose 6-Phosphate-Inhibitable Uptake of the Ectodomain,” *J. Virol.*, vol. 74, no. 14, pp. 6600–6613, 2000, doi: 10.1128/jvi.74.14.6600-6613.2000.
- [45] B. Berarducci, J. Rajamani, M. Reichelt, M. Sommer, L. Zerboni, and A. M. Arvin, “Deletion of the first cysteine-rich region of the varicella-zoster virus glycoprotein E ectodomain abolishes the gE and gI interaction and differentially affects cell-cell spread and viral entry,” *J. Virol.*, vol. 83, no. 1, pp. 228–240, 2009, doi: 10.1128/JVI.00913-08.
- [46] J. Moffat *et al.*, “Functions of the C-terminal domain of varicella-zoster virus glycoprotein E in viral replication in vitro and skin and T-cell tropism in vivo,” *J. Virol.*, vol. 78, no. 22, pp. 12406–12415, 2004, doi: 10.1128/JVI.78.22.12406-12415.2004.
- [47] S. L. Oliver *et al.*, “Mutagenesis of varicella-zoster virus glycoprotein I (gI) identifies a cysteine residue critical for gE/gI heterodimer formation, gI structure, and virulence in skin cells,” *J. Virol.*, vol. 85, no. 9, pp. 4095–4110, 2011, doi: 10.1128/JVI.02596-10.
- [48] S. Mallory, M. Sommer, and A. M. Arvin, “Mutational analysis of the role of glycoprotein I in varicella-zoster virus replication and its effects on glycoprotein E conformation and trafficking,” *J. Virol.*, vol. 71, no. 11, pp. 8279–8288, 1997, doi: 10.1128/jvi.71.11.8279-8288.1997.
- [49] E. Yang, A. M. Arvin, and S. L. Oliver, “The Cytoplasmic Domain of Varicella-Zoster Virus Glycoprotein H Regulates Syncytia Formation and Skin Pathogenesis,” *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 5, 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004173.
- [50] T. J. Pasiaka, L. Maresova, K. Shiraki, and C. Grose, “Regulation of Varicella-Zoster Virus-Induced Cell-to-Cell Fusion by the Endocytosis-Competent Glycoproteins gH and gE,” *J. Virol.*, vol. 78, no. 6, 2004, doi: 10.1128/jvi.78.6.2884-2896.2004.
- [51] S. E. Vleck *et al.*, “Structure-function analysis of varicella-zoster virus glycoprotein H



- identifies domain-specific roles for fusion and skin tropism,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 45, 2011, doi: 10.1073/pnas.1111333108.
- [52] E. Yang, A. M. Arvin, and S. L. Oliver, “The glycoprotein B cytoplasmic domain lysine cluster is critical for varicella-zoster virus cell-cell fusion regulation and infection,” *J. Virol.*, vol. 91, no. 1, 2017, doi: 10.1128/JVI.01707-16.
- [53] S. L. Oliver, E. Yang, and A. M. Arvin, “Dysregulated glycoprotein B-mediated cell-cell fusion disrupts varicella-zoster virus and host gene transcription during infection,” *J. Virol.*, vol. 91, no. 1, 2017, doi: 10.1128/JVI.01613-16.
- [54] L. Maresova, T. J. Pasioka, E. Homan, E. Gerday, and C. Grose, “Incorporation of Three Endocytosed Varicella-Zoster Virus Glycoproteins, gE, gH, and gB, into the Virion Envelope,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 2, 2005, doi: 10.1128/jvi.79.2.997-1007.2005.
- [55] S. L. Oliver *et al.*, “The N-terminus of varicella-zoster virus glycoprotein B has a functional role in fusion,” *PLoS Pathog.*, vol. 17, no. 1, 2021, doi: 10.1371/journal.ppat.1008961.
- [56] J. Govero, S. Hall, and T. C. Heineman, “Intracellular localization of varicella-zoster virus ORF39 protein and its functional relationship to glycoprotein K,” *Virology*, vol. 358, no. 2, pp. 291–302, 2007, doi: 10.1016/j.virol.2006.08.055.
- [57] S. L. Hall, J. L. Govero, and T. C. Heineman, “Intracellular transport and stability of varicella-zoster virus glycoprotein K,” *Virology*, vol. 358, no. 2, pp. 283–290, 2007, doi: 10.1016/j.virol.2006.08.021.
- [58] S. Gharavi, M. Sadeghizadeh, S. Hosseinkhani, and F. Sabahi, “A study of varicella zoster virus glycoprotein C regulatory region response to viral activators in vitro,” *Pakistan J. Biol. Sci.*, vol. 10, no. 13, pp. 2140–2145, 2007, doi: 10.3923/pjbs.2007.2140.2145.
- [59] K. J. O’Regan, M. J. Brignati, M. A. Murphy, M. A. Bucks, and R. J. Courtney, “Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is facilitated by trans-Golgi network localization and is independent of interaction with glycoprotein E,” *Virology*, vol. 405, no. 1, pp. 176–192, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.virol.2010.06.007.
- [60] O. SL, Z. M, and A. AM, “Varicella-zoster virus: molecular controls of cell fusion-dependent pathogenesis,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 48, no. 6, pp. 2415–2435, Dec. 2020, doi: 10.1042/BST20190511.
- [61] Q. Li, T. Krogmann, M. A. Ali, W.-J. Tang, and J. I. Cohen, “The Amino Terminus of Varicella-Zoster Virus (VZV) Glycoprotein E Is Required for Binding to Insulin-Degrading Enzyme, a VZV Receptor,” *J. Virol.*, vol. 81, no. 16, p. 8525, Aug. 2007, doi: 10.1128/JVI.00286-07.
- [62] I. B. Hogue, J. B. Bosse, J.-R. Hu, S. Y. Thiberge, and L. W. Enquist, “Cellular

Mechanisms of Alpha Herpesvirus Egress: Live Cell Fluorescence Microscopy of Pseudorabies Virus Exocytosis,” *PLOS Pathog.*, vol. 10, no. 12, p. e1004535, Dec. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1004535.

- [63] G. JH, J. W, C. JE, M. TO, J. KW, and G. C, “Exocytosis of Progeny Infectious Varicella-Zoster Virus Particles via a Mannose-6-Phosphate Receptor Pathway without Xenophagy following Secondary Envelopment,” *J. Virol.*, vol. 94, no. 16, Jul. 2020, doi: 10.1128/JVI.00800-20.

## Etude du rôle de la protéine ORF9p du virus de la varicelle et du zona dans la fusion cellulaire

Le virus de la varicelle et du zona (**VZV** ou HHV-3) est un Alphaherpesvirus humain à l'origine de deux pathologies, la varicelle (*chickenpox*) et le zona (*shingles*). La propagation du VZV est assez différente de celle d'HSV-1 qui génère beaucoup de particules virales infectieuses en suspension dans le surnageant. Le VZV, lui, se propage presque exclusivement par contact cellule à cellule, et provoque une fusion massive des cellules entre elles, menant *in vivo* comme *in vitro* à l'apparition de cellules géantes plurinucléées, les *syncytia*. Ce processus est encore mal compris, mais fait intervenir les mêmes protéines que celles impliquées dans l'entrée du virus, la glycoprotéine gB, comportant des boucles de fusion caractéristiques qui doit être activée par le complexe gH/gL, mais aussi la glycoprotéine gE qui a été montrée très importante pour la propagation virale notamment via un motif d'interaction avec la protéine cellulaire IDE (*insulin-degrading enzyme*) et un motif d'interaction avec gI. L'ORF9p, la protéine tégumentaire majeure du VZV, intervient dans l'enveloppement secondaire et interagit avec le complexe cellulaire AP-1 qui régit le trafic protéique et vésiculaire entre la partie trans de l'appareil de Golgi et l'endosome de recyclage. Des études menées dans notre laboratoire ont permis de démontrer qu'un virus portant une mutation ponctuelle sur ORF9p (L231A), empêchant sa liaison avec AP-1, présente un gros défaut de croissance et des foyers d'infection totalement dépourvus de *syncytium*. Après une dizaine de passages en culture, ce mutant se caractérise par une réversion phénotypique avec une réapparition des *syncytia*. Le but de travail est d'étudier le rôle d'ORF9p dans la fusion cellule-cellule pour permettre la propagation du VZV dans les tissus.

Une analyse des foyers viraux en microscopie à fluorescence a montré que la mutation ORF9p-F181A **diminue la réplication virale et la fusion cellule-cellule**, à l'inverse de la mutation F181W qui la favorise. Ensuite, des expériences en co-immunoprécipitation ont permis de démontrer que la mutation **ORF9p-F181A perturbe** la liaison d'ORF9p avec gE et gH, mais aussi la liaison entre gB et gH. Enfin, des immunofluorescences ont permis de montrer que la mutation F181A provoque un **défaut d'expression** des glycoprotéines en **surface** des foyers viraux. Nous avons également observé, lorsque les mutants de la protéine ORF9p sont maintenus pendant un grand nombre de passages en culture, une **réversion phénotypique**, avec réapparition de *syncytia* pour le mutant ORF9p-F181A. Des analyses par séquençage à haut débit ont montré que des **mutations spontanées compensatoires** apparaissent dans la séquence codant pour les glycoprotéines gE, gB et gH.

En conclusion, ORF9p est une protéine du VZV très importante qui intervient dans le trafficking des glycoprotéines permettant, *in fine*, la fusion cellule-cellule.

Ce mémoire a été rédigé par JASSIN Mégane, en vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, à finalité approfondie, durant l'année scolaire 2020-2021 au laboratoire d'Immunologie & Virologie (GIGA-13), sous la direction du Dr. M. LEBRUN et du Prof. C. SADZOT.