

## Mémoire

**Auteur :** Koumoth, Manon

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

**Faculté :** Faculté des Sciences

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

**Année académique :** 2023-2024

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/20985>

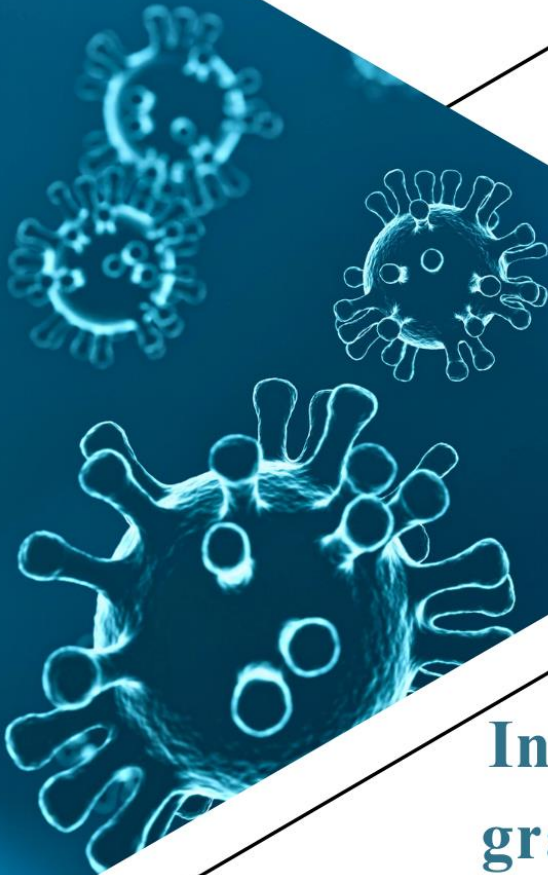
---

### *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.*

---



# Inhibition de la formation des granules de stress par le Virus de la Varicelle et du Zona

**Laboratoire d'Immunologie et de Virologie**

Promotrice : Dr. LEBRUN Marielle

Co-promotrice : Pr. SADZOT-DELVAUX Catherine

Mémoire de fin d'études rédigé par

**KOUMOTH Manon**

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

## Résumé

Lorsque les cellules eucaryotes se retrouvent confrontées à des conditions de stress environnementales ou intracellulaires, la réponse intégrée au stress (ISR) se déclenche afin d'y faire face. L'ISR est déclenchée par la perception de différents stress via les kinases eIF2 $\alpha$ , ce qui engendre l'activation de plusieurs mécanismes de défense cellulaire dont la formation de biocondensats cytoplasmiques dynamiques appelés granules de stress (GS). Parmi les différentes fonctions attribuées aux GS, nous retrouvons, entre autres, un rôle dans la réponse antivirale. De nombreux virus ont développé des mécanismes d'inhibition afin de contrer la formation de ces granules et assurer leur réplication dans les cellules qu'ils infectent.

Le virus de la Varicelle et du Zona (VZV) est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des *Herpesviridae*. Des résultats préliminaires réalisés au laboratoire ont montré que VZV était capable d'inhiber la formation des GS lorsque celles-ci étaient induites par un traitement à l'arsenite ciblant une des kinases eIF2 $\alpha$ , et ce dans plusieurs lignées cellulaires. Nous avons voulu investiguer si, lors d'autres stress chimiques et physiques, VZV possédait toujours la capacité d'inhiber la formation des GS. Pour cela, nous avons induit des stress ciblant différentes kinases eIF2 $\alpha$  afin de constater si l'inhibition par VZV était kinase-dépendante ou non. L'objectif final étant d'identifier par quel(s) mécanisme(s) VZV arrive à inhiber la formation des GS.

Ainsi, nous avons traité différents types cellulaires (ARPE-19, A549 et MCF7) à 44° pendant 45 minutes afin d'induire un choc thermique. Ce traitement a bel et bien induit la formation de GS dans le cytoplasme des cellules, formation que VZV arrive à inhiber dans les cellules infectées. Par western blot, aucune différence majeure dans l'activation des kinases et de leur substrat eIF2 $\alpha$  entre les puits infectés et les puits non infectés a pu justifier l'inhibition observée par immunofluorescence (IF) dans les cellules infectées. Cela suggère que le virus inhiberait la formation des GS en aval de l'étape de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et de la voie signalétique de l'ISR.

Nous avons également transfecté les mêmes lignées cellulaires avec du poly(I:C), un analogue synthétique de l'ARN double brin qui mime une infection virale. Ce traitement a également induit la formation de GS visibles par IF mais n'était pas inhibée par VZV dans les cellules infectées. Nous suggérons que l'absence d'inhibition après ce traitement pourrait être liée à l'activation de mécanismes de l'immunité innée. En effet, en plus d'activer l'ISR, le poly(I:C) est détecté par les senseurs cytosoliques RIG-I/MDA5. L'activation en parallèle de ces deux voies signalétiques pourrait justifier que VZV soit incapable d'inhiber la formation des GS dans ces conditions.

Les mécanismes d'inhibition de la formation des GS par VZV restent encore incompris. En effet, la ou les protéines virales impliquée(s) dans ce processus sont encore à découvrir.

Inhibition de la formation des granules de stress par le Virus de la Varicelle et du Zona

Promoteur : Marielle Lebrun

Laboratoire de Virologie et Immunologie (GIGA-I3)

Année académique 2023-2024

Mémoire de KOUMOTH Manon

## Remerciements

Dans un premier temps, je souhaiterais remercier ma doctorante, Victoire Mouton avec qui j'ai travaillé tout au long de mon mémoire. Je tiens sincèrement à mettre en avant sa patience, sa pédagogie et sa disponibilité qui m'ont été d'une aide précieuse durant ces 7 mois. Travailler en équipe avec elle fut une expérience extrêmement enrichissante tant sur les techniques qu'elle m'a apprises que sur la réflexion et la stimulation intellectuelle engendrées par nos discussions ! Malgré notre travail en duo, Victoire a su me donner de l'indépendance tout en me conseillant, ce qui m'a permis de prendre confiance en moi et d'approfondir mes connaissances grâce à son savoir. Plus qu'une encadrante, Victoire est devenue une réelle personne de confiance pour moi. Son soutien, sa bonne humeur et son écoute ont été une source de motivation lors de mes moments de doutes et de remises en question.

Je tiens également à exprimer un remerciement tout particulier au Dr. Marielle Lebrun, ma promotrice qui nous a conseillées et aidées durant ces derniers mois. Malgré son emploi du temps souvent bien chargé, elle a toujours su trouver du temps pour nous aiguiller dans nos recherches à l'aide de ses connaissances. Ses avis et ses remarques lors de nos réunions étaient toujours pertinents et nous ont permis d'éclairer plusieurs de nos résultats. Sa bonne humeur, son dynamisme et sa positivité à toute épreuve sont de réelles sources d'inspiration au quotidien !

Je voudrais adresser un remerciement spécial au Pr. Catherine Sadzot-Delvaux pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire dans son Laboratoire de Virologie & Immunologie. De plus, je voulais vous remercier pour la confiance octroyée lors de l'encadrement des travaux pratiques de virologie de 3<sup>ème</sup> BAC. En tant que professeure, vous avez su m'aiguiller quant au domaine scientifique qui m'intéressait le plus et dans lequel je souhaite engager mon avenir professionnel.

Je souhaiterais aussi exprimer ma plus profonde gratitude à toute l'équipe du Laboratoire de Virologie & Immunologie. Je tiens à remercier Cédric Lassence pour son humour, ses conseils avisés. Je remercie également son acolyte, Maxime Dubois, pour son aide lors des analyses FACS et la bonne humeur mise au laboratoire. Je voudrais adresser un remerciement tout particulier aux autres mémorantes du laboratoire, Lola Adam, Florine Pitti et Marion Bruneteaux pour nos repas de midi partagés et le soutien mutuel dont nous avons fait preuve entre nous.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire d'immunométabolisme de Sylvie Legrand, notamment Chloé Wilkin pour son aide avec les expériences du FACS mais également toute l'équipe du laboratoire PSI de Franck Dequiedt, pour leur gentillesse et entraide !

Enfin, je souhaiterais remercier ma famille pour son soutien infaillible depuis le début de mes études universitaires et pour n'avoir jamais cessé de croire en moi et en mes capacités. Un grand merci également à mes amis pour leur soutien et leurs encouragements lors de la réalisation de ce mémoire.

## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique	L : <i>late</i>
ARN : acide ribonucléique	MDA-5 : <i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
ARPE-19 : Arising Retinal Pigment Epithelia-19	MEM : Minimum essential medium
BAC : Bacterial artificial chromosome	NI : Non infecté
BSA : Bovine serum albumin	ORF : <i>Open reading frame</i>
CDS : <i>coding sequence</i>	PAF : Paraformaldéhyde
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium	PAMPs : <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
DMSO : Diméthylsulfoxyde	PBS : Phosphate buffer saline
E : <i>early</i>	PEI : Poly-éthylène imine
EMEM : Eagle's minimal essential medium	PERK : <i>protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase</i>
FACS : Fluorescence-activated cell sorting	PFU : <i>plaque-forming unit</i>
FBS : Fetal Bovine Serum	PKR : <i>Protein kinase R</i>
G3BP1 : <i>Ras GTPase-activating protein-binding protein 1</i>	PRR : <i>Pattern recognition receptor</i>
GCN2 : <i>general control nonderepressible 2</i>	RIG-I : <i>retinoic acid-inducible gene I</i>
GS : granules de stress	ROS : reactive oxygen species
HRI : <i>heme-regulated inhibitor</i>	RT : Room Temperature
HSV : Herpes simplex virus	TBS : Tris-buffered saline
IE : <i>immediate-early</i>	VZV : Varicella zoster virus
IF : Immunofluorescence	WB : Western blot
IFN : Interferon	WT : <i>wild-type</i>
ISG : <i>interferon stimulated gene</i>	
ISR : <i>integrated stress response</i>	

# Table des matières

<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Généralités sur les virus .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Le Virus de la Varicelle et du Zona .....</b>	<b>2</b>
1.2.1.	Classification .....	2
1.2.2.	Pathogenèse et pathologies associées .....	3
1.2.3.	Génome et caractéristiques structurales .....	6
1.2.4.	Cycle infectieux.....	7
<b>1.3.</b>	<b>Réponse immunitaire antivirale .....</b>	<b>10</b>
1.3.1.	Réponse immunitaire innée .....	10
1.3.2.	Voies immunitaires activées et contrées lors d'une infection par VZV .....	12
<b>1.4.</b>	<b>Les granules de stress.....</b>	<b>14</b>
1.4.1.	Réponse intégrée au stress (ISR) .....	14
1.4.2.	Les kinases eIF2 $\alpha$ .....	14
1.4.3.	Les conséquences de l'activation de l'ISR.....	17
1.4.4.	Les granules d'ARN .....	21
1.4.5.	Nature et assemblage des GS .....	21
1.4.6.	Désassemblage des GS .....	24
1.4.7.	Les fonctions des GS .....	24
<b>2.</b>	<b>But et objectif de travail.....</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>Relevé de la littérature.....</b>	<b>26</b>
<b>4.</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.</b>	<b>Culture des cellules .....</b>	<b>28</b>
4.1.1.	Lignées cellulaires.....	28
4.1.2.	Cellules infectées.....	28
4.1.3.	Production virale et titration .....	28
<b>4.2.</b>	<b>Traitement par l'arsenite et la thapsigargin .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3.</b>	<b>Traitement par choc thermique .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.</b>	<b>Transfection des cellules au poly(I:C) .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5.</b>	<b>Immunofluorescence (IF).....</b>	<b>30</b>
<b>4.6.</b>	<b>RT-qPCR.....</b>	<b>31</b>
<b>4.7.</b>	<b>Western Blot (WB) .....</b>	<b>33</b>
<b>4.8.</b>	<b>Fluorescence-activated cell sorting (FACS) .....</b>	<b>34</b>
<b>5.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1.</b>	<b>Traitement par choc thermique .....</b>	<b>36</b>
5.1.1.	Induction des granules de stress et inhibition par le virus VZV .....	36
5.1.2.	Kinases eIF2 $\alpha$ activées par le traitement.....	38
<b>5.2.</b>	<b>Traitement par le poly(I:C) .....</b>	<b>40</b>
5.2.1.	Induction des granules de stress et incapacité d'inhibition par le virus VZV WT .....	41
5.2.2.	Kinases eIF2 $\alpha$ activées par le traitement.....	43
5.2.3.	Influence sur la réponse immunitaire innée.....	44
<b>5.3.</b>	<b>Phosphorylation d'eIF2a parmi les différentes populations de cellules exposées à plusieurs stress ..</b>	<b>47</b>
<b>5.4.</b>	<b>Induction des granules de stress sur cellules primaires infectées et non infectées.....</b>	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>61</b>
<b>7.1.</b>	<b>Amorces de qPCR.....</b>	<b>61</b>

7.2. Absence de GS lors d'une infection par VZV -WT .....	61
7.3. Formation des GS dans des fibroblastes oraux .....	62
7.4. Sous-populations de cellules du puits traité au poly(I:C).....	62
<i>Bibliographie</i> .....	<i>63</i>

## 1. Introduction

---

### 1.1. Généralités sur les virus

---

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui dépendent de la cellule hôte qu'ils détournent afin de garantir l'invasion de l'organisme hôte [1][2]. En effet, les virus ne possèdent pas toute la machinerie nécessaire pour accomplir leur cycle de réplication et dépendent donc de l'environnement interne cellulaire [1][2][3]. L'infection et la propagation virale reposent principalement sur la transcription des ARNm viraux, la traduction des protéines virales mais également sur la réplication du génome et la production de nouvelles particules virales ou virions [1][2]. Les virus sont ainsi capables d'infecter tout être vivant, de la bactérie en passant par les plantes jusqu'aux mammifères dont l'Homme. Ils peuvent atteindre de nombreux tissus et organes comme le foie, le côlon, les voies respiratoires, les poumons, etc [4].

La taille des virus infectant l'Homme se situe généralement entre 20 et 200 nm, soit un diamètre entre 100 et 1000 fois inférieur à celui de la cellule humaine qu'ils infectent [1]. Cependant, certains virus peuvent atteindre des tailles bien plus importantes comme les pandoravirus qui approchent les 1000 nm de diamètre [1]. Contrairement aux génomes des cellules qui sont composés exclusivement d'ADN double brin, les virus peuvent présenter des génomes contenant soit de l'ADN soit de l'ARN [5]. De plus, leur génome peut être présent sous forme simple ou double brin et avoir une structure linéaire, circulaire, segmentée ou non segmentée [1][6]. En plus d'une forte diversité structurelle, les génomes viraux varient également énormément en taille. La taille moyenne des génomes viraux se situe le plus souvent entre 7 et 20 mille paires de bases (kb) mais ceux-ci peuvent mesurer entre 1,7 kb et 1,2 Mb [1][6]. Les plus petits virions ne peuvent renfermer qu'un seul gène alors que les plus gros génomes peuvent coder pour plusieurs centaines de protéines [6]. Par exemple, le circovirus porcin possède un génome de 2000 paires de base n'hébergeant que deux gènes alors que le génome du pandoravirus salinus contient 2 Mb et code pour 2541 protéines [7].

Afin d'empêcher la dégradation de leur matériel génomique, les virus protègent leur génome de l'environnement extérieur grâce à une capsid [1]. Celle-ci se compose d'un ou de plusieurs types de protéines différentes qui se répètent constamment jusqu'à l'obtention d'une capsid solide [1]. En plus de cette capsid, certains virus arborent une enveloppe qui permet de distinguer les virus enveloppés des virus nus ou non enveloppés [1]. Cette enveloppe se compose d'une bicouche lipidique dérivée d'une membrane de la cellule hôte [6].



Comme précédemment évoqué, les virus dépendent de l'environnement interne cellulaire afin d'assurer l'infection de l'hôte. Cependant, cette dépendance varie énormément entre les différents groupes de virus et est intimement liée au degré de complexité du génome viral [2]. Étant donné la forte hétérogénéité de structure et de taille retrouvée parmi les génomes viraux, les stratégies développées par les virus afin de se répliquer varient considérablement. Généralement, les virus humains à ADN double brin se répliquent dans le noyau de la cellule hôte (à l'exception des poxvirus) tandis que les virus à ARN effectuent leur réplication dans le cytoplasme (à l'exception des Orthomyxoviridae et des Retroviridae) [7][8]. De plus, certains virus codent et/ou transportent le bagage enzymatique nécessaire à la réplication et/ou à la transcription du génome, tandis que d'autres nécessitent les polymérases cellulaires [2]. Cette variabilité génomique rencontrée au sein du monde des virus justifie ainsi la diversité des stratégies infectieuses mises en place par ceux-ci. Les organismes hôtes ont donc dû s'adapter aux différentes méthodes d'infection développées par les virus.

## 1.2. Le Virus de la Varicelle et du Zona

---

### 1.2.1. Classification

---

Le Virus de la Varicelle et du Zona (VZV) ou Human Herpesvirus 3 (HHV-3) appartient à l'ordre des Herpesvirales, à la famille des Herpesviridae et à la sous-famille des Alphaherpesvirinae [9]. Selon le système de classification de Baltimore qui repose sur la nature du génome viral, sur la voie moléculaire menant à la synthèse des molécules d'ARNm et sur le schéma de réplication virale, les Herpesviridae appartiennent à la première classe [6][7]. Cette classe se compose des virus ayant un génome composé d'ADN double-brin transcrit directement en ARNm [10].

Les herpesvirus sont notamment connus pour infecter les mammifères, les poissons et les oiseaux [11]. Cette famille de virus se subdivise en trois sous-familles distinctes : les Alphaherpesvirinae, les Betaherpesvirinae et les Gammaherpesvirinae. Cette division repose sur des différences au niveau du tropisme cellulaire, de l'organisation du génome et du contenu des gènes [11]. Les caractéristiques communes aux membres de cette famille sont un génome d'une seule copie d'ADN linéaire double brin, une capsidie icosaédrique, une couche tégmentaire entourant la capsidie et comprenant de nombreuses protéines virales mais aussi des protéines cellulaires et enfin une enveloppe lipidique dans laquelle sont ancrées des glycoprotéines virales nécessaires pour l'entrée du virus dans les cellules hôtes [12]. La composition protéique du tégment et de l'enveloppe varie d'une sous-famille de virus à l'autre.

Il existe plus d'une centaine d'herpèsvirus différents, cependant, seulement 8 d'entre eux peuvent infecter l'Homme et causer des pathologies variées [13] : l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), l'herpès simplex de type 2 (HSV-2), le virus de la varicelle et du zona (VZV), le cytomégalovirus (CMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV), les herpèsvirus humains 6 et 7 et enfin l'herpèsvirus du sarcome de Kaposi (KSHV) [14][15] (Tableau 1).

Sous-famille	Type	Nom	Pathologies associées
Alpha-herpesvirinae	HHV-1	Herpès simplex virus-1 (HSV-1)	Herpès de la bouche, des lèvres et de la gorge Encéphalite herpétique néonatale
	HHV-2	Herpès simplex virus-2 (HSV-2)	Herpès génital
	HHV-3	Varicella zoster virus (VZV)	Varicelle et zona
Béta-herpesvirinae	HHV-5	Cytomegalovirus (CMV)	Mononucléose infectieuse, infection congénitale, rétinite, hépatite
	HHV-6	Roseolovirus	Exanthème subit/Roséole infantile
	HHV-7	Roseolovirus	Exanthème subit/Roséole infantile
Gamma-herpesvirinae	HHV-4	Epstein–Barr virus (EBV)	Mononucléose infectieuse, lymphome de Burkitt, cancer du nasopharynx et lymphome infantile
	HHV-8	Kaposi's sarcoma- associated herpesvirus (KSHV)	Sarcome de Kaposi, lymphome à effusion primaire, maladie de Castleman multicentrique

**Tableau 1. Tableau récapitulatif des 8 herpèsvirus pouvant infecter l'Homme.** Le VZV provoque la Varicelle et le Zona et fait partie de la sous famille des alpha-herpesvirinae.

Les alpha-herpèsvirus se caractérisent par un spectre d'hôtes assez restreint et par leur prédilection à établir une infection latente à vie dans le système nerveux périphérique puis à se réactiver [13][16]. Parmi ces Alphaherpesvirinae, se retrouvent HSV-1 ainsi que VZV étudié dans le cadre de ce mémoire. Ceux-ci sont connus pour partager de nombreuses caractéristiques structurales et moléculaires dont des similitudes dans leurs génomes [17]. Leurs divergences se situent notamment dans les mécanismes moléculaires régissant la période de latence mais également au niveau clinique [13]. En effet, dans les climats tempérés, le VZV cause la varicelle, maladie contractée rapidement pendant l'enfance et dont la réactivation du virus, si elle se produit, s'observe généralement chez les personnes plus âgées. A contrario, le HSV-1 est responsable d'une infection primaire touchant généralement les adultes et sa fréquence de réactivation est plus périodique mais diminue avec l'âge [13].

### 1.2.2. Pathogenèse et pathologies associées

VZV est un virus au tropisme restreint qui infecte uniquement l'espèce humaine et qui cause la Varicelle et le Zona. Une fois dans le corps humain, plusieurs étapes se succèdent et sont nécessaires pour que le virus établisse la latence caractéristique des alpha-herpèsvirus.

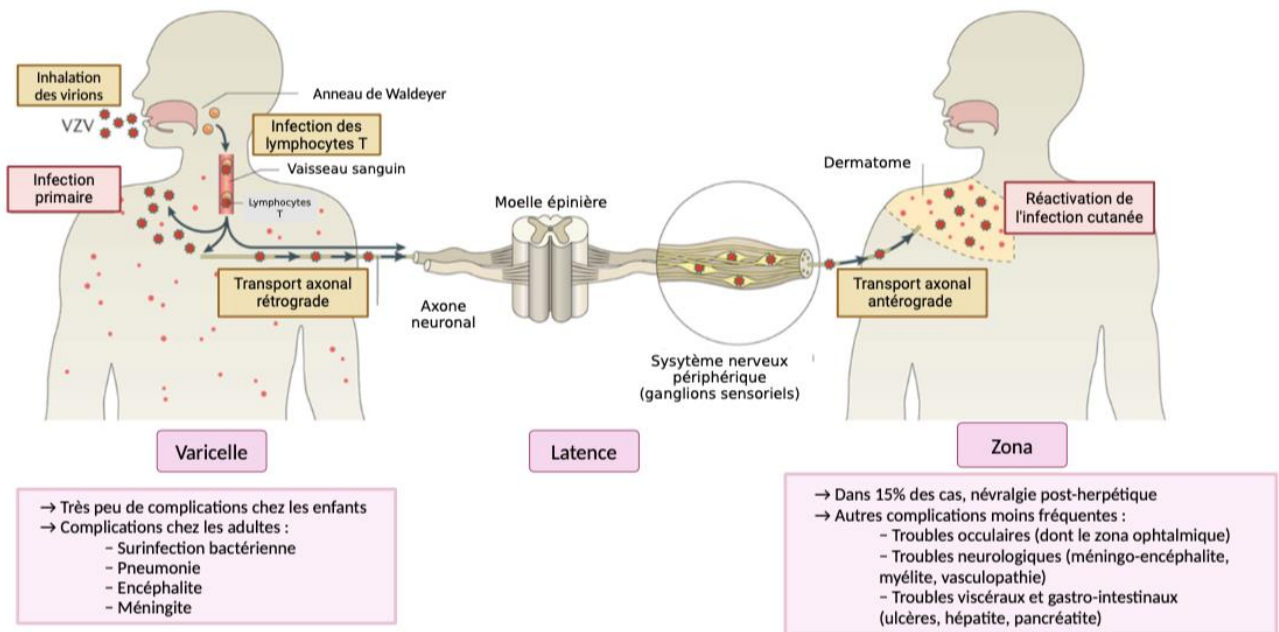
Tout d'abord, l'infection primaire cause la varicelle, maladie présente dans le monde entier et endémique dans les populations de taille suffisante pour garantir une propagation tout au long de l'année [18][19]. Dans les climats tempérés, plus de 90% des personnes contractent la maladie avant l'adolescence et seul un faible pourcentage d'adultes (entre 5 et 10%) reste sensible [19]. Cependant, dans les climats tropicaux, l'âge moyen des personnes infectées est plus élevé et il existe une plus grande proportion de cas chez les adultes [19]. Cette maladie peut s'avérer sévère chez les personnes immunodéprimées, les femmes enceintes, les personnes âgées ou les personnes non immunisées [18]. Chez l'enfant, la varicelle est considérée comme une maladie courante qui engendre rarement de lourdes complications. Si la varicelle est contractée tardivement, elle peut être plus dangereuse. Les complications les plus couramment rencontrées sont dues à une surinfection bactérienne, mais la varicelle peut également être à l'origine de complications graves telles que la pneumonie, l'encéphalite, la méningite et peut même se montrer létale dans de plus rares cas (figure 1)[13][19]. Dans les pays développés, environ 5 personnes sur 1 000 atteintes de varicelle sont hospitalisées et 2 à 3 patients sur 100 000 décèdent à la suite de cette maladie [19].

La varicelle est une maladie extrêmement contagieuse. Les deux principales sources de contagion sont le contact avec les lésions cutanées vésiculeuses qui contiennent de nombreuses particules virales et l'inhalation d'aérosols contenant des virions libérés par ces mêmes lésions [18]. Après une période d'incubation de 14 à 16 jours, l'éruption cutanée caractéristique de la maladie apparaît. Celle-ci est, dans la plupart des cas, rapidement contrôlée par le système immunitaire [13].

La première barrière rencontrée par le virus est l'épithélium des voies respiratoires supérieures où il va pouvoir infecter plusieurs types cellulaires [13][18]. Le VZV se réplique localement dans les cellules épithéliales respiratoires et est transféré aux lymphocytes T au niveau des organes lymphoïdes secondaires dont l'anneau de Waldeyer qui regroupe les amygdales pharyngées, palatines, tubaires et linguales [13][19]. Les nombreux lymphocytes présents sont infectés soit directement par les particules virales, soit par l'intermédiaire de cellules dendritiques (DC) infectées par le virus (figure 1)[20].

Une fois infectés, les lymphocytes T se retrouvent dans la circulation sanguine permettant au virus de se propager dans tout le corps. Le virus se réplique alors dans l'épiderme et provoque des éruptions et lésions cutanées qui sont remplies de particules virales infectieuses [18]. Dans l'épiderme, le virus peut accéder aux terminaisons nerveuses des nerfs sensoriels et, par transport axonal rétrograde, atteindre ainsi les corps cellulaires des neurones où il pourra y établir un cycle latent (figure 1) [21][22]. Le virus se retrouve principalement dans les ganglions sensoriels du système nerveux périphérique, y compris dans le ganglion trijumeau [22]. Une période de latence s'y établit alors pour la vie. Durant cette période, aucune particule virale n'est produite par les cellules infectées. Cependant, le génome viral est bien présent, le plus souvent sous forme épisomale, et certaines protéines virales sont exprimées [13] [23].

Lorsque l'immunité cellulaire contre VZV diminue avec l'âge ou chez les personnes immunodéprimées, il se peut que le virus se réactive et atteigne la peau par transport axonal antérograde (figure 1) [19]. Cette réactivation correspond à une reprise du cycle infectieux et de nouvelles particules virales sont donc produites. Ce phénomène provoque dès lors la maladie du zona, infection cutanée le plus souvent limitée à un seul dermatome [13]. En effet, le zona provoque des lésions cutanées synchrones et localisées au dermatome correspondant au territoire d'innervation du ganglion à partir duquel le virus s'est réactivé [23].



**Figure 1. Modèle de l'infection par VZV chez l'homme.** Les particules virales ou virions sont inhalés par l'individu naïf et le virus rencontre l'épithélium des voies respiratoires supérieures. VZV s'y réplique localement et infecte les lymphocytes T présents en nombre dans les organes lymphoïdes secondaires dont l'anneau de Waldeyer. Les lymphocytes T infectés se retrouvent dans la circulation sanguine et pourront transmettre le virus au niveau de la peau. Il s'y forme alors des éruptions caractéristiques de la varicelle contenant de grandes quantités de particules virales [19][21]. Par transport axonal rétrograde, le virus remonte les axones des nerfs sensoriels et établit une latence dans les ganglions sensoriels. Lors de la réactivation du virus, celui-ci atteint la peau par transport axonal antérograde et provoque le zona, infection cutanée souvent limitée à un seul dermatome [19][21]. Image modifiée de Leigh Zerboni et al. (2014).

Dans les pays développés, l'incidence et la gravité du zona augmentent avec l'âge et à partir de 85 ans, une personne sur deux contracte la maladie [19]. La complication la plus fréquente du zona est la névralgie post-herpétique qui survient en moyenne dans 15% des cas [19]. Alors que la douleur habituelle engendrée par le zona dure entre 2 et 4 semaines, la névralgie post-herpétique consiste en une douleur intense qui persiste pendant 1 à 3 mois [24]. Le zona peut également entraîner des complications comme de graves troubles viscéraux et gastro-intestinaux, tels que des ulcères, une hépatite ou une pancréatite [19]. De plus, il peut engendrer des troubles neurologiques (méningo-encéphalite, myélite, vasculopathies cérébrales) et oculaires. En effet, le zona ophtalmique est la réactivation d'une infection à VZV avec une atteinte oculaire et pour laquelle environ 50 à 85% des cas présentent des troubles

oculaires tels qu'une conjonctivite, une uvéite, une épisclérite, une kératite ou une rétinite et qui peut également mener à la cécité dans de plus rares cas (figure 1)[24].

Des vaccins contre la varicelle et le zona existent et montrent une efficacité élevée. Les vaccins contre la varicelle ont été produits à partir de la souche Oka et ont d'abord été introduits en 1995 aux États-Unis avant d'être homologués dans plusieurs pays [18]. Ces vaccins atténués sont devenus des vaccins de routine pour les enfants aux États-Unis, au Canada, en Australie, au Japon et dans certains pays d'Europe et du Moyen-Orient [9]. Chez nous, la vaccination universelle des enfants n'est pas recommandée. En revanche, le vaccin est préconisé pour les adolescents et adultes dépourvus d'immunité contre la maladie, les travailleurs dans le secteur des soins de santé et les femmes non immunisées désireuses de grossesse (<https://www.vaccination-info.be/maladie/varicelle/>). Les vaccins préviennent non seulement la maladie mais ils en réduisent également la gravité et créent une immunité durable contre le virus [18]. En effet, ils ont permis de réduire l'incidence de la varicelle de plus de 90%, les complications associées de 57 à 90% et les hospitalisations de 75 à 88% selon les régions [9].

Deux vaccins contre le zona ont été développés : le premier est un vaccin atténué dérivé de la même souche Oka que celle exploitée pour les vaccins contre la varicelle et le second est un vaccin composé de la forme recombinante de la glycoprotéine gE du virus et de l'adjuvant ASO3 [9]. Alors que l'efficacité du premier vaccin diminue considérablement avec l'âge, le second vaccin réduit l'incidence du zona de 97% chez les personnes âgées de 50 à 69 ans et de 90% chez les personnes âgées de 70 ans et plus [9]. Pour cette tranche d'âge, le vaccin réduit également fortement les risques de névralgie post-herpétique [9].

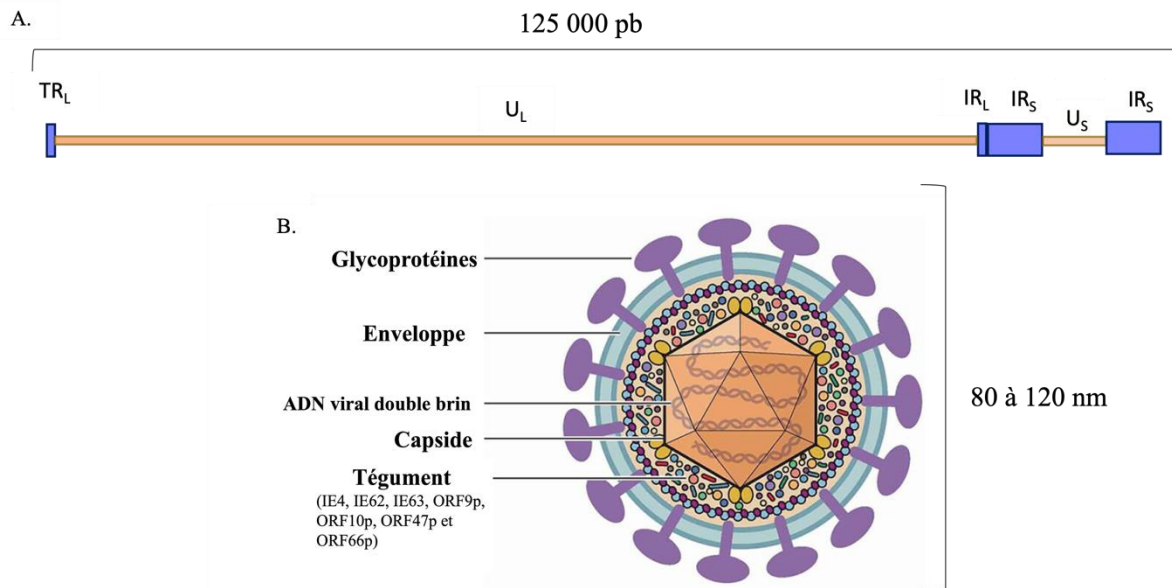
### 1.2.3. Génome et caractéristiques structurales

---

Le génome de VZV, constitué d'ADN double brin est composé d'approximativement 125 000 paires de bases (pb) et contient au moins 71 cadres de lecture ouverts (*Open Reading Frames*, ORF) dont trois sont présents en double copie (ORF62/71, 63/70 et 64/69) [9][13]. Ce génome, pleinement séquencé en 1986 par Davison et Scott, se compose d'une région longue unique (UL) d'environ 105 000 pb, d'une région courte unique (US) d'environ 5 232 pb et de régions répétitives internes (IR) et terminales (TR) (figures 2A) [13][21].

Les particules de VZV possèdent un diamètre de 80 à 120 nm et sont composées d'une capsidie icosaédrique et d'une enveloppe riche en lipides et en glycoprotéines assurant l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte (figure 2B) [9]. La capsidie est entourée d'une couche tégumentaire composée de protéines régulatrices dont notamment les facteurs de transactivation viraux à action immédiate et les deux kinases virales ORF47p et ORF66p [21]. Ces dernières sont d'importantes sérine/thréonine kinases qui s'autophosphorylent et phosphorylent les facteurs de transcription viraux et

d'autres protéines de VZV [21]. En plus de ces deux kinases, les protéines IE4, IE62, IE63, ORF9p, ORF10p codées respectivement par les ORF 4, 62/71, 63/70, 9 et 10 ont été identifiées dans le tégument [13].



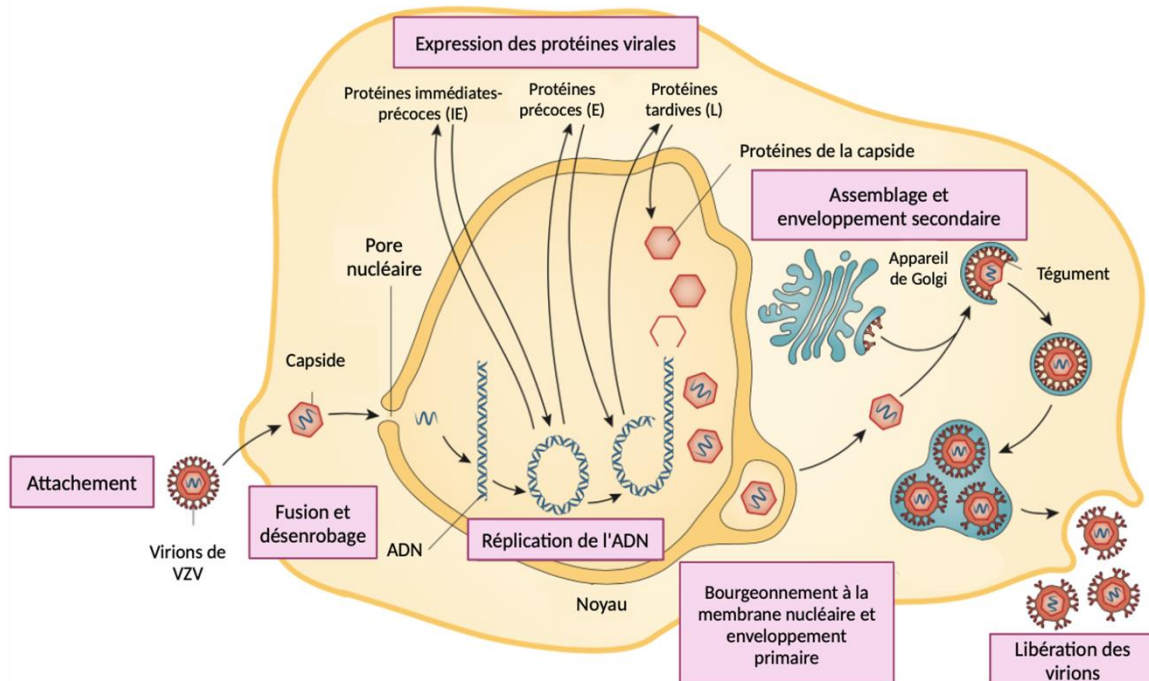
**Figure 2. Schéma reprenant la structure du virus VZV et l'organisation de son génome.** A. Le génome viral est composé de 125 000 pb et consiste en 2 segments joints : un long segment ( $U_L$ ) et un segment court ( $U_S$ ), tous deux limités par des séquences d'ADN répétées inversées terminales et internes ( $TR_L$  /  $IR_L$  et  $IR_S$  /  $TR_S$ ). B. VZV possède un génome linéaire d'ADN double brin protégé dans une capside. Celle-ci est contenue dans une couche tégumentaire renfermant des protéines virales. Enfin, le tout est protégé par une enveloppe lipidique contenant des glycoprotéines virales [12][13][21][26]. Image modifiée de Shuyong Zhu et al. (2021).

#### 1.2.4. Cycle infectieux

Comme chez d'autres herpèsvirus, les particules de VZV entrent dans la cellule hôte grâce à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique ou après endocytose, et fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome [25][26]. Cette fusion est possible grâce au complexe de fusion minimum composé de 3 glycoprotéines virales : gB, gH et gL [9]. Cependant, d'autres protéines accessoires virales contribuent sûrement à la reconnaissance et à l'interaction avec les récepteurs se trouvant à la surface des cellules cibles [21]. Parmi les récepteurs cellulaires potentiels, on retrouve le récepteur du mannose-6-phosphate ou la glycoprotéine associée à la myéline qui interagissent avec des protéines de l'enveloppe virale [27][28]. Débarrassée de l'enveloppe virale, la capside se dirige vers le noyau et s'ancre au niveau d'un pore nucléaire (figure 3). Une fois injecté dans le noyau de la cellule hôte, le génome ADNdb viral se circularise (figure 3) [21]. Simultanément, les protéines régulatrices se trouvant dans le tégument migrent dans le noyau afin de procéder à la transcription des ORF viraux.

Les gènes de VZV sont subdivisés en trois classes distinctes selon leur cinétique d'expression : les gènes immédiats-précoces (*immediate early*, IE), précoces (*early*, E) et tardifs (*late*, L) (figure 3) [13]. Dans un premier temps, les gènes IE sont transcrits par l'ADN polymérase cellulaire et codent pour des régulateurs clés qui permettront l'expression de la deuxième vague de gènes. Le VZV code au

moins quatre protéines régulatrices de la transcription virale : IE4, IE61, IE62 et IE63. Toutes ces protéines, à l'exception de la protéine IE61, font partie du virion du VZV [29]. IE62 constitue la principale protéine régulatrice fonctionnant comme facteur de transcription pour de nombreux gènes viraux appartenant à chacune des trois classes [13][21]. L'expression des gènes viraux dépend autant des facteurs de transcription viraux que des facteurs de transcription de la cellule hôte et de la machinerie de traduction cellulaire [21]. IE62 va notamment interagir avec des facteurs cellulaires comme la protéine de spécificité du facteur de transcription 1 (Sp1), qui possède des sites de liaison dans de nombreux promoteurs viraux, afin de former des complexes régulateurs et transactiver les gènes de VZV [21].



**Figure 3. Schéma du cycle réplcatif de VZV dans la cellule hôte.** Les particules virales ou virions de VZV fusionnent à la membrane cellulaire et libèrent les protéines du tégument et la capside. Une fois débarrassées de l'enveloppe virale, les capsides se dirigent vers les pores nucléaires et le génome viral est injecté dans le noyau où les gènes viraux sont transcrits en vagues successives. En premier lieu, ce sont les gènes immédiats-précoces (IE) qui sont exprimés suivis des gènes précoces (E) et enfin des gènes tardifs (L). La première vague de transcription génique permet la production des protéines IE dont les fonctions régulatrices permettent l'expression de la seconde vague génique codant pour les protéines E, essentielles pour la réplication de l'ADN viral. Enfin, la troisième vague de gènes permet l'expression des protéines L dont les protéines structurales de la capside et de l'enveloppe virale. Les capsides, dans lesquelles l'ADN viral nouvellement synthétisé est empaqueté, bourgeonnent à travers la membrane nucléaire et se retrouvent dans le cytoplasme. Les capsides se concentrent proche de l'appareil de Golgi où sont également présentes les glycoprotéines virales et les protéines tégumentaires. Le tout s'assemble et les capsides subissent un enveloppement secondaire où elles acquièrent leur bicouche lipidique à partir des membranes cellulaires au niveau du réseau trans-golgien. Enfin, les nouvelles particules virales sont transportées à la surface des cellules et les virions sont libérés dans l'espace extracellulaire [9][13][21][22]. Image modifiée de Anne A. Gershon et al. (2015).

Une fois traduites, les protéines IE se rendent dans le noyau et régulent l'expression des gènes précoces qui sont principalement impliqués dans la réplication du génome viral [13]. VZV code notamment pour une ADN polymérase virale et pour plusieurs autres protéines accessoires [30][31]. Parmi ces dernières se trouvent au moins deux protéines de liaison à l'ADN : la protéine ORF29 qui est une protéine de liaison à l'ADN simple brin et la protéine ORF51 qui se lie à l'origine de réplication de

l'ADN [30]. L'ADN polymérase virale se compose quant à elle de deux sous-unités : la protéine ORF28 qui constitue la sous-unité catalytique et la protéine ORF16 qui est un facteur de processivité [30][31]. Finalement, on retrouve encore trois protéines impliquées dans la réplication du génome viral : ORF6 (primase), ORF52 (facteur associé à la primase) et ORF55 (hélicase) [31].

Une fois l'ADN viral répliqué, les gènes tardifs sont exprimés, toujours sous la régulation des protéines IE et E, et codent pour des protéines structurales [13]. Parmi celles-ci, on retrouve notamment les protéines de la capsidie et les glycoprotéines de l'enveloppe virale qui serviront à la construction de nouvelles particules virales [22][23]. En effet, une fois synthétisées, ces protéines se retrouvent dans le noyau, s'assemblent et forment de nouvelles capsides renfermant une copie du génome viral [13][22].

Les capsides subissent un enveloppement primaire en bourgeonnant à travers la membrane nucléaire interne et se retrouvent, temporairement, dans l'espace périnucléaire. Ce phénomène est suivi d'un dé-enveloppement et d'une fusion de l'enveloppe primaire avec la membrane nucléaire externe, qui aboutissent au transfert des capsides dans le cytoplasme (figure 3) [21]. L'enveloppement secondaire se produit au niveau de l'appareil de Golgi où la capsidie acquiert ses protéines de tégument et sa bicouche lipidique à partir de petites vésicules dérivées du réseau trans-golgien (figure 3) [9][21]. Les particules virales se retrouvent alors elles-mêmes dans des vésicules du compartiment post-Golgi [21][22]. Ces vésicules de transport fusionnent entre elles et migrent vers la surface cellulaire [22]. Les virions sont finalement libérés dans l'espace extracellulaire, prêts à infecter d'autres cellules (figure 3) [9]. En culture, les virions de VZV restent fortement associés aux cellules et le contact entre les cellules est indispensable pour la propagation de l'infection. Les virions libérés par les cellules infectées peuvent dès lors pénétrer dans les cellules adjacentes par endocytose ou par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte [21][25]. Par rapport à une infection par HSV-1 ou d'autres herpèsvirus, la production de particules virales est très faible lors d'une infection par VZV [25].

La fusion des cellules infectées entre elles conduit à la formation de *syncytia* (polycaryocytes multinucléés), caractéristiques de la réplication du VZV et contribuant à sa propagation [21][25]. Les protéines gB, gH et gL, délivrées à la membrane cellulaire lors de la fusion, sont présentes à la surface des cellules infectées et leur interaction avec des récepteurs membranaires des cellules adjacentes initient probablement la formation de pores de fusion entre les deux cellules [9].



### 1.3. Réponse immunitaire antivirale

---

#### 1.3.1. Réponse immunitaire innée

---

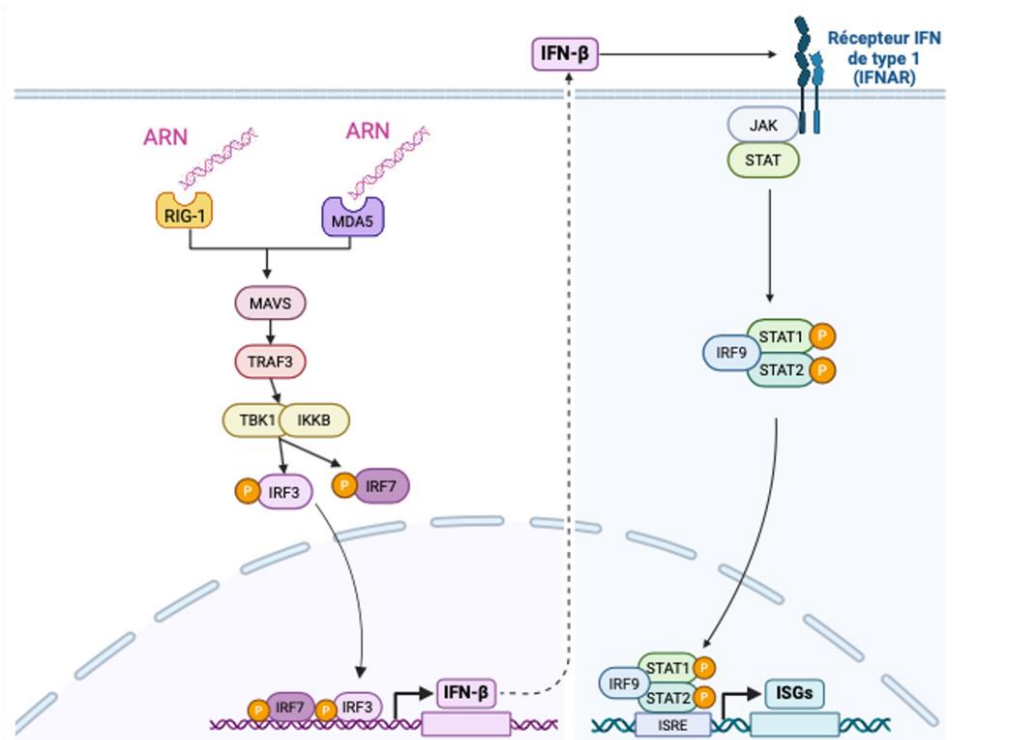
La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense mise en place pour freiner la propagation d'un pathogène chez les organismes multicellulaires [23][32]. Il s'agit d'un mécanisme non spécifique rapide qui vise à prévenir l'infection, à attaquer les agents pathogènes envahissants et enfin à activer la réponse immunitaire adaptative [32]. L'immunité innée englobe de nombreux composants dont des barrières physiques et anatomiques (peau, muqueuses), des cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages), des peptides antimicrobiens (défensines), des médiateurs solubles (cytokines, protéines sériques) et des récepteurs cellulaires [32].

La réponse immunitaire innée se caractérise par sa capacité à reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), partagés par de nombreux microorganismes mais non exprimés par l'hôte. Cette reconnaissance des composants structurels des microorganismes est permise grâce à une variété de protéines présentes dans les cellules de l'hôte [32]. Parmi celles-ci, on retrouve les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ou PRR, protéines conservées au cours de l'évolution et qui sont présentes dans les principales cellules de l'immunité innée (macrophages, monocytes, natural killer cells, cellules dendritiques...) et les cellules épithéliales. Aux vues de leur localisation au sein de la cellule (cytoplasmique ou membranaire) et de leur motif de liaison (protéines ou acides nucléiques), la diversité de ces capteurs permet la détection d'un large panel de PAMPs [3]. Les PRR comprennent de nombreuses familles : les récepteurs cytosoliques de type RIG-I (RLR), notamment le *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) et la *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5), les récepteurs de type Toll (TLR), les récepteurs de type C-lectine, les récepteurs de type AIM2 et les capteurs d'ADN cytosoliques (CDS) tels que ZBP-1 et la *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) [3].

Une fois le ligand reconnu, les récepteurs déclenchent des cascades de signalisation intracellulaires spécifiques par l'intermédiaire de différents adaptateurs de signalisation. Par exemple, les RLR signalent via la protéine adaptatrice *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS), les CDS via la molécule adaptatrice *Stimulator of interferon response CGAMP interactor* (STING), et les TLR endosomaux via TRIF et MyD88 [3]. Ces voies de signalisation convergent vers la phosphorylation des *interferon-regulatory factors* (IRF) 3 et 7 par la *TANK-binding kinase 1* (TBK1) et vers la libération du *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) [3]. En temps normal, NF- $\kappa$ B forme un hétérodimère cytoplasmique, retenu dans le cytoplasme par liaison avec l'*inhibitor of nuclear factor kappa B* (I $\kappa$ B $\alpha$ ). Lorsqu'un PAMP est reconnu, l'activation du complexe I $\kappa$ B kinase (IKK) conduit à la phosphorylation, la polyubiquitination et/ou la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  permettant ainsi la libération et la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B [3][23]. Une fois dans le noyau, NF- $\kappa$ B initie la transcription de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires ainsi que celle de protéines anti-apoptotiques qui

favorisent la survie des cellules [3]. Parallèlement, la translocation nucléaire des formes phosphorylées d'IRF3/7 conduit à l'induction des gènes interféron (IFN) de type I.

Lors d'une infection virale, ce sont les motifs moléculaires associés aux virus qui sont reconnus par les PRR [33]. Les principaux motifs antiviraux reconnus sont les acides nucléiques viraux, tels que l'ARN simple et double brin ou l'ADN double brin. De plus, les modifications post-traductionnelles de certains composants viraux tels que l'ADN CpG hypométhylé et la glycosylation de protéines virales constituent également des motifs moléculaires reconnus [34]. Enfin, certains PRR peuvent aussi détecter des glycoprotéines de l'enveloppe virale [23]. Les TLR transmembranaires endosomaux, notamment TLR3, TLR7 et TLR8, reconnaissent les ARN dans la lumière de l'endosome. La protéine cGAS est, quant à elle, considérée comme le principal senseur d'ADN viral cytosolique. Enfin, les RLR, notamment RIG-I et MDA5 détectent les motifs viraux d'ARN double brin dans le cytosol [33]. Ces deux récepteurs reconnaissent différemment l'ARN viral mais tous les deux possèdent deux domaines amino-terminaux d'activation et de recrutement des caspases (CARD) permettant la transmission du signal d'activation en aval (figure 4) [35]. Après la liaison de l'ARN et l'oligomérisation, les domaines CARD de RIG-I ou de MDA5 interagissent avec le domaine CARD de MAVS ce qui conduit à son activation. Par la suite, MAVS active notamment TBK1 et la kinase IKKε, qui à leur tour phosphorylent IRF3 et IRF7. Ceux-ci migrent dans le noyau et induisent la transcription des gènes codant les IFN de type I (figure 4) [35].



**Figure 4. Schéma de la détection d'ARN par les récepteurs cytosoliques RIG-I et MDA5.** Voie signalétique centrée sur l'induction des IFN de type 1 dont l'IFN-β et sur l'expression des ISG qui en découle grâce à la voie JAK-STAT. Image effectuée sur Biorender.

Une fois le virus détecté par le PRR adéquat, un état antiviral est dès lors mis en place grâce à une reprogrammation transcriptionnelle de la cellule hôte infectée [33]. La réponse immunitaire cellulaire de l'hôte à l'infection virale est dominée par les IFN qui sont divisés en trois familles, à savoir les types I, II et III [36]. Parmi les IFN de type I, les sous-types  $\alpha$  et  $\beta$  jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire innée antivirale et le freinage de la propagation du virus [36]. De plus, ces interférons constituent un lien important entre les réponses immunitaires innées et adaptatives [23]. En parallèle de l'expression d'IFN de type I, la détection des virus par les TLR et les RLR entraîne l'expression de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires [23][34]. Ces cytokines sont essentielles pour le recrutement et l'activation des cellules effectrices immunitaires dont les neutrophiles, les lymphocytes B et les lymphocytes T sur le site de l'infection [23].

L'IFN- $\beta$  est responsable de l'induction des gènes stimulés par l'interféron (ISG) codant pour des protéines antivirales importantes. Une fois sécrété, il peut se lier au récepteur de l'IFN de type I à la fois sur les cellules infectées, de façon autocrine et sur les cellules voisines non infectées, de façon paracrine [36]. En effet, la liaison de l'IFN- $\beta$  au récepteur IFNAR1 active la voie de signalisation JAK-STAT (figure 4). Celle-ci entraîne l'expression de centaines d'ISG et des protéines correspondantes qui inhibent la croissance du virus et limitent sa propagation [23][36]. Parmi les protéines antivirales produites, on retrouve notamment la protéine kinase R (PKR) et la 2-5 oligoadénylate synthétase (2-5 OAS), dont les fonctions respectives sont l'inhibition de la traduction et la dégradation de l'ARN viral [33][37].

### 1.3.2. Voies immunitaires activées et contrôlées lors d'une infection par VZV

La réponse immunitaire innée déclenchée lors d'une infection par VZV met en jeu de nombreux types cellulaires dont les cellules NK, les cellules dendritiques et les cellules dotées de PRR qui sont cruciales dans la gestion de l'infection et de la maladie [13].

Peu de TLR jouent un rôle dans la reconnaissance des virus à ADN et seuls les TLR-2, -3 et -9 se sont révélés capables de détecter les herpèsvirus humains [23]. Il a été démontré que VZV active l'expression de cytokines pro-inflammatoires de manière dépendante de TLR2. Il s'agit d'un récepteur transmembranaire reconnaissant probablement des glycoprotéines de l'enveloppe du virion [13][23][38]. Ces récepteurs sont fortement exprimés dans les leucocytes du sang périphérique, notamment dans les monocytes, dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/O60603/entry>). Il a été démontré que VZV induit spécifiquement la production d'interleukine-6 (IL-6) via l'activation de NF- $\kappa$ B dépendante de TLR2 dans des monocytes humains, et qu'un petit ARN interférent conçu pour supprimer l'ARNm de TLR2 a réduit cette réponse IL-6 dans des macrophages humains dérivés de monocytes en présence de VZV [37].

La principale voie signalétique du système immunitaire inné impliquée lors d'une infection par VZV est la voie cGAS-STING. cGAS est un récepteur d'acide nucléique intracellulaire qui peut détecter l'ADN double brin étranger [14]. STING est, quant à lui, une molécule qui se localise au niveau du réticulum endoplasmique [14]. Une fois lié à l'ADN, cGAS dimérise, s'active et promeut la synthèse du messenger cGAMP (GMP-AMP cyclique) à partir des substrats ATP et GTP [14][34]. À son tour, cGAMP se lie à STING et provoque la formation de dimères, de tétramères et d'oligomères d'ordre supérieur. Une fois activé, STING migre jusqu'à l'appareil de Golgi et en chemin, recrute TBK1. Phosphorylé, TBK1 active à son tour IRF3 qui transloque dans le noyau et permet l'expression d'IFN de type I [14]. De plus, STING active les kinases IKK qui phosphorylent I $\kappa$ B permettant la libération et la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau afin d'induire l'expression des IFN et des cytokines pro-inflammatoires [14]. Il a été démontré que l'induction de l'IFN de type I pendant l'infection par VZV dépend de la voie de détection de l'ADN cGAS/STING et que la reconnaissance de VZV par cGAS limite sa réplication [14] [39]. Il a été également montré que STING joue un rôle de médiateur dans la défense des cellules dermiques contre l'infection par VZV [14]. Afin d'échapper à cette voie immunitaire, la protéine tégumentaire ORF9p de VZV inhibe la production de cGAMP en fonctionnant comme antagoniste de cGAS, entraînant ainsi une réponse atténuée des IFN de type I [14].

Il a été démontré que VZV diminue l'expression des protéines du CMH de classe I et II à la surface des cellules [23]. En effet, VZV induit la rétention des molécules de CMH de classe I dans l'appareil de Golgi, ce qui a pour conséquence une diminution de leur expression [23]. De plus, lors de l'infection, les cellules deviennent réfractaires à l'IFN- $\gamma$  [13]. Cet IFN induit l'expression de certains gènes dont ceux du CMH II via une voie de signalisation impliquant les protéines JAK et STAT. Dès lors, l'incapacité des cellules infectées à répondre à l'IFN- $\gamma$ , et donc d'exprimer des protéines membranaires telles que CMH II, pourrait permettre au virus d'échapper momentanément aux lymphocytes T [13]. Par exemple, dans les cellules dendritiques matures infectées, l'expression des molécules CMH I, CD80 et CD86 est diminuée, altérant leur capacité à activer les lymphocytes T naïfs [13].

Une des stratégies les plus efficaces développées par le virus est l'interférence avec les réponses médiées par l'IFN dans les cellules infectées [21]. Il a été démontré que plusieurs protéines virales de VZV participent à ce phénomène. Tout d'abord, la protéine IE62 seule antagonise l'induction de l'IFN- $\beta$  en interférant avec la phosphorylation des résidus sérine d'IRF3 [40]. Par ailleurs, la kinase virale ORF47p est responsable d'une phosphorylation inhibitrice d'IRF3 qui entrave son homodimérisation et l'induction de gènes cibles tels que l'IFN- $\beta$  et l'ISG15 [41]. Enfin, la protéine IE63 réduit le niveau de phosphorylation de eIF2 $\alpha$  (*eucaryote Initiation Factor 2 alpha*), et est nécessaire à la croissance du virus. En effet, le VZV dont l'ORF63 a été délété se retrouve hypersensible aux IFN- $\alpha$  produits par les cellules infectées et montre des niveaux de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  plus élevés que ceux observés dans

les cellules infectées par le VZV sauvage [42]. La protéine précoce immédiate ORF61, quant à elle, élimine la réponse immunitaire naturelle en dégradant IRF3 activé et en régulant à la baisse la voie de l'IFN- $\beta$  médiée par IRF3 [14]. Ces processus ont une répercussion directe sur l'induction des ISG. Étant donné que les protéines IE62, ORF47 et ORF61 de VZV ciblent toutes l'induction de l'IFN- $\beta$  par IRF3, cela impacte l'expression des gènes ISG, tels que ISG15, ISG54 et IS56 [36].

## 1.4. Les granules de stress

---

### 1.4.1. Réponse intégrée au stress (ISR)

---

Lorsque les cellules eucaryotes sont exposées à divers stress internes ou environnementaux, la réponse intégrée au stress (ISR) se déclenche afin de faire face à ces conditions et restaurer l'homéostasie cellulaire. Cette réponse peut être provoquée par des événements extrinsèques tels que l'hypoxie, la privation en acides aminés ou en glucose, l'infection virale et les chocs thermiques [43]. Les stress intrinsèques cellulaires tels que le stress du réticulum endoplasmique (RE) ou l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent également activer cette voie d'adaptation [43].

L'ISR aboutit à deux phénomènes : une réduction de l'initiation globale de la traduction et une induction de gènes spécifiques impliqués dans la survie et le rétablissement cellulaire [43][44]. Le programme d'expression génique induit par l'ISR dépend du contexte cellulaire, ainsi que de la nature, de la fréquence et de l'intensité du stress. Si l'intensité ou la durée du stress est trop importante, cette réponse est insuffisante et d'autres acteurs moléculaires sont activés afin d'entraîner la mort cellulaire [43].

La perception de ces différents stress s'effectue grâce à quatre kinases spécialisées : PKR (*protein kinase R*), PERK (*protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*), HRI (*heme-regulated inhibitor*) et GCN2 (*General Control Non Derepressible 2*) (figure 5) [43]. Ces kinases aboutissent à la phosphorylation de la sérine 51 du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ , point de départ de l'arrêt traductionnel global observé [43].

### 1.4.2. Les kinases eIF2 $\alpha$

---

Les kinases eIF2 $\alpha$  sont les senseurs précoces des différents stress induisant l'ISR. Alors que les levures possèdent uniquement la kinase ancestrale GCN2, les métazoaires bénéficient de trois kinases supplémentaires à savoir, PKR, HRI et PERK. Leur implication commune dans la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  justifie la similarité de séquence retrouvée dans le domaine catalytique de ces quatre kinases [44][45]. De par leur fonction redondante, les différentes kinases eIF2 $\alpha$  peuvent être activées par un même stimulus et agir de manière coopérative pour ajuster spécifiquement l'ISR [43]. Néanmoins, elles

disposent de domaines régulateurs uniques qui leur permettent, dans la majorité des cas, de répondre à des stimuli distincts [43][44][45].

GCN2 (ou EIF2AK4) est hautement conservé de la levure à l'homme et constitue principalement un capteur de la disponibilité en acides aminés [43][45]. Plusieurs articles indiquent que GCN2 serait également activé par la privation de glucose et l'irradiation aux UV mais les mécanismes exacts d'activation restent à définir [43][44][45]. En plus d'un domaine kinase, GCN2 comporte un domaine pseudo-kinase et un domaine lié à l'histidyl-ARNt synthétase, qui lie les ARNt non chargés avec une plus grande affinité que les ARNt chargés (figure 5) [45]. Lorsque les acides aminés sont rares, la liaison du domaine lié à l'histidyl-ARNt synthétase aux ARN de transfert désacylés active GCN2 [43][44].

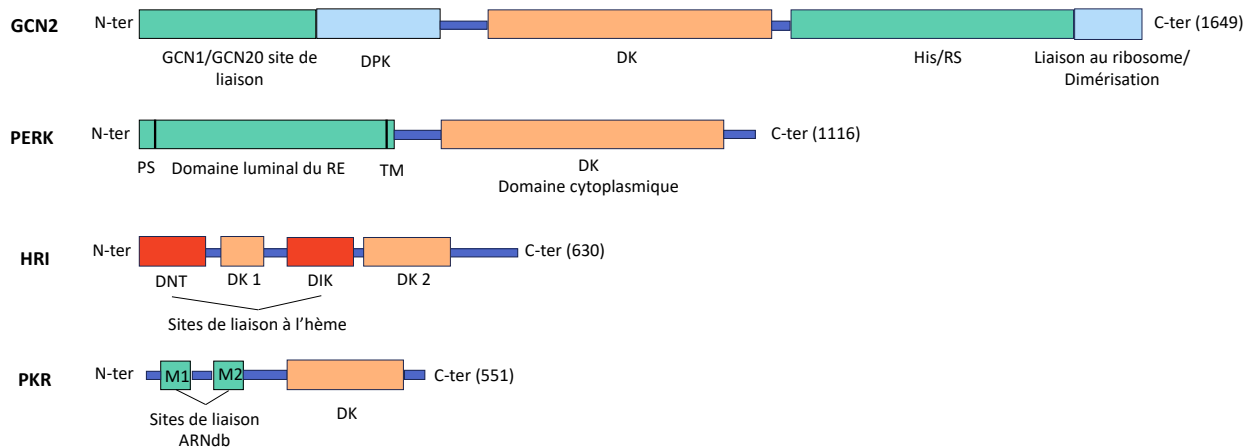
PERK (ou EIF2AK3) est une protéine transmembranaire, dont la région N-terminale se trouve dans la lumière du RE et contient les régions importantes pour la dimérisation, la régulation et l'association à la chaperonne BiP (*binding immunoglobulin protein*) de la famille Hsp70 (GRP78) [44][45]. Sa région C-terminale est cytosolique et comprend le domaine kinase et les sites d'autophosphorylation (figure 5) [45]. Cette kinase est principalement activée par l'accumulation de protéines mal repliées ce qui contribue au stress du RE [45]. Le stress du RE peut également être engendré par des perturbations de l'énergie cellulaire, de l'homéostasie calcique ou de l'état d'oxydoréduction [43].

L'activation de la kinase PERK n'est pas encore pleinement élucidée mais la dimérisation de la protéine semble être essentielle [45]. Le modèle classique propose qu'en cas d'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, ces dernières entrent en compétition avec PERK pour la liaison à BiP [43][45]. Cela provoque alors la dissociation des deux protéines, entraînant *in fine* l'autophosphorylation et l'activation de PERK [45]. Des études soutiennent que PERK fonctionne également comme un senseur des niveaux de calcium. En effet, la privation de glucose, l'inhibition de la pompe SERCA ou des niveaux élevés d'acide gras affectent la concentration calcique luminale du RE et réduisent la capacité de BiP à maintenir PERK dans son état inactif [45][46][47].

HRI (ou EIF2AK1) possède deux sites distincts de liaison à l'hème, un domaine N-terminal de liaison à l'hème (DNT) et un domaine d'insertion kinase unique de liaison à l'hème (DIK) flanqué par deux domaines kinase (DK1 et DK2) (figure 5) [45][48]. La liaison de l'hème à l'extrémité N-terminale est stable et nécessaire à la régulation d'HRI par l'hème [43][45]. La liaison de l'hème au DIK est, quant à elle, réversible et inhibe l'activité kinase d'HRI [43]. Dans des conditions homéostatiques normales, l'hème inhibe l'activité kinase d'HRI en se liant au DIK ce qui maintient HRI dans une conformation dimérique inactive [43][48]. Lorsque les niveaux d'hème sont faibles, des interactions non covalentes se forment entre les molécules d'HRI et la perte de la liaison de l'hème au DIK engendre un dimère HRI actif qui subit une autophosphorylation et s'active [43][48].

Le rôle le plus caractérisé d'HRI est celui exercé dans les cellules érythroïdes qui regroupent les réticulocytes et les globules rouges. Il s'assure que la production des chaînes  $\alpha$ - et  $\beta$ -globine est proportionnelle à la quantité d'hème disponible pour la cellule [45]. En phosphorylant eIF2 $\alpha$ , HRI réduit la synthèse protéique et prévient l'accumulation des agrégats de globines toxiques qui sont normalement très fortement exprimées dans les globules rouges [43][45][48]. Bien que l'on ait longtemps considéré que l'expression d'HRI était limitée aux érythrocytes, plusieurs études démontrent qu'HRI est plus largement exprimée y compris dans le foie et les macrophages [44][45][48].

HRI répond également à de multiples stress, notamment le stress oxydatif induit par l'arsénite, le choc thermique, le stress osmotique et l'inhibition du protéasome [43][44]. Les mécanismes d'activation de la kinase HRI par ces divers stress sont encore à élucider. Cependant, on sait que celle-ci est indépendante de l'hème et que les protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 participent à l'activation de la kinase [49].



**Figure 5. Organisation des différents domaines des kinases eIF2 $\alpha$  retrouvées chez les Mammifères.** Le nombre d'acides aminés composant la protéine est indiqué du côté C-terminal. Les domaines kinases sont en orange et les domaines de détection des stress/d'activation sont en vert. Les autres domaines sont en bleu ou en rouge. DPK domaine pseudo kinase, DK domaine kinase, His/RS domaine lié à l'histidyl ARNt synthétase, PS peptide signal, TM domaine transmembranaire, DNT domaine N-terminal de liaison à l'hème, DK1 domaine kinase 1, DIK domaine insert kinase, DK2 domaine kinase 2, M1 motif 1 de liaison à l'ARN double brin, M2 motif 2 de liaison à l'ARN double brin [45].

PKR (ou EIF2AK2) se compose de deux domaines N-terminaux de liaison à l'ARN double brin (ARNdb), reliés à un domaine C-terminal kinase crucial pour son activation [45][48]. Ce domaine assure les fonctions catalytiques de la protéine en permettant la dimérisation de PKR, son autophosphorylation au niveau de la thréonine 446 et son activation fonctionnelle (figure 5) [45][48]. La kinase PKR est principalement activée lors de la détection d'ARNdb viral bloquant ainsi la traduction des ARNm viraux [43][45]. Exprimée de manière ubiquitaire à des niveaux basaux, cette kinase se localise principalement dans le cytoplasme mais également dans le noyau des cellules [45][48].

Deux modèles existent pour l'activation de PKR par l'ARNdb : le modèle de l'auto-inhibition et le modèle de dimérisation [50]. Le premier modèle propose qu'en absence d'ARNdb, le motif 2 de liaison à l'ARNdb interagirait avec le domaine kinase créant une structure fermée inactive qui bloque

l'accès au substrat [45]. Cependant, des données ont contredit ce modèle et un second modèle d'activation a donc été proposé [50]. Le deuxième modèle, soutenu par de nombreuses données structurales et biophysiques, suggère que la dimérisation constitue une étape essentielle pour l'activation de la kinase. Bien que la dimérisation puisse s'effectuer en absence d'ARNdb et suffise à activer PKR, cet évènement est peu probable dans des conditions physiologiques [51]. La liaison de l'ARNdb renforce la dimérisation fonctionnelle de la kinase et l'autophosphorylation qui s'ensuit [51] et ce, en fonction de la longueur de l'ARNdb et de sa concentration. En effet, de faibles concentrations en ARNdb activent PKR, tandis que des concentrations plus élevées sont inhibitrices et, bien que PKR s'active par la détection d'ARNdb aussi courts que 30 pb, la taille optimale est de 85 pb [51]. Ce second modèle suggère que la liaison séquentielle de deux monomères PKR ou plus sur un seul ARNdb conduit à la dimérisation par le biais du domaine kinase et à l'activation de la kinase [50]. Dans ce modèle, l'activation par dimérisation se base sur le rapprochement et l'accumulation de monomères de PKR sur l'ARNdb et cette activation sera proportionnelle à la quantité d'ARNdb étranger présent dans la cellule.

Une fois activées, les quatre kinases eIF2 $\alpha$  ont pour fonction commune de phosphoryler le facteur eIF2 $\alpha$  sur la sérine 51 et activer l'ISR [44]. Cette réponse engendre de nombreuses modifications cellulaires dont une reprogrammation transcriptionnelle, traductionnelle mais aussi des changements biophysiques.

Notons également que, dans les cellules de mammifère, le processus de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est rigoureusement contrôlé. En plus des quatre kinases eIF2 $\alpha$ , deux phosphatases spécialisées contrecarrent cette réaction et déphosphorylent eIF2 $\alpha$  une fois le stress cellulaire résolu [48]. Celles-ci contiennent une sous-unité catalytique commune, la protéine phosphatase 1 (PP1), et une sous-unité régulatrice qui agit soit en faveur (GADD34) soit en défaveur (CReP) de l'activité phosphatase [44].

### 1.4.3. Les conséquences de l'activation de l'ISR

---

Une première conséquence de l'activation de l'ISR est une reprogrammation du protéome en sélectionnant les transcrits cellulaires qui seront préférentiellement traduits afin de garantir la survie cellulaire. Ainsi, la traduction des ARNm non essentiels aux cellules comme les ARNm ubiquistes codant pour la GAPDH est fortement réprimée [52]. Cela permet donc à un sous-ensemble de transcrits codant pour des facteurs de survie, des enzymes de réparation ou des protéines régulatrices du stress telles que HSP90 ou HSP70 d'être traduits afin de répondre au stress détecté [3][53][54]. Ces ARNm sélectionnés contiennent soit des courts cadres de lecture ouverts en amont (uORF) dans leur région 5' non traduite soit des sites d'entrée internes du ribosome (IRES) [3][44], ce qui leur permet d'être traduits. Alors que les uORF sont de petites régions traduites (~30 codons) se situant en amont d'environ la moitié de tous les gènes des mammifères, seulement environ 10% des ARNm cellulaires possèdent des IRES [3][45]. On y retrouve notamment les gènes impliqués dans l'apoptose tels que la protéine inhibitrice de



l'apoptose liée au chromosome X (XIAP) et le lymphome B-cell-2 (Bcl-2) (figure 6) [3]. Les uORF sont généralement considérés comme inhibiteurs de l'ORF principal en engageant les ribosomes initiateurs, mais dans des conditions de stress cellulaires, les uORF peuvent devenir essentiels pour activer la traduction de la séquence codante principale [55]. Parmi les transcrits préférentiellement traduits qui contiennent des uORF, on retrouve notamment le *activating transcription factor 4* (ATF4), facteur de transcription le mieux caractérisé de l'ISR (figure 6) [45]. ATF4 joue un rôle déterminant dans l'expression génique en réponse au stress et est soumis à une régulation aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel [48]. Une fois induit, ATF4 est un régulateur clé intervenant dans diverses réponses au stress, notamment l'apoptose, le métabolisme des acides aminés, l'homéostasie redox, les réponses antivirales et le repliement des protéines [45][48]. ATF4 va notamment réguler à la hausse plusieurs gènes dont celui codant pour la *C/EBP homologous protein* (CHOP) qui constitue un facteur de transcription pro-apoptotique et celui codant pour GADD34, protéine favorisant la déphosphorylation de eIF2 $\alpha$  [45].

La seconde conséquence majeure de l'activation de l'ISR est l'atténuation de l'étape d'initiation de la traduction qui permet des changements rapides et réversibles de la production protéique [3]. De plus, cette régulation permet d'économiser de l'énergie pour les autres acteurs de la réponse cellulaire au stress et la réparation des dommages moléculaires engendrés [54][56].

L'ISR induit cette atténuation soit en contrôlant le complexe de liaison à la coiffe soit par la modulation de la concentration du complexe ternaire (TC) [3][44].

Ce TC est composé du méthionyl-ARNt initiateur (Met-tRNA<sub>i</sub>), de GTP et du facteur d'initiation de la traduction eucaryote hétérotrimérique eIF2 composé lui-même de 3 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) (figure 6) [48]. Le TC se lie à la petite sous-unité ribosomique 40S et aux facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF5, eIF3. Ensemble, ils forment le complexe de pré-initiation (PIC) 43S qui s'associe ensuite à la coiffe 5' de l'ARNm (figure 6) [48]. La plupart des ARNm cellulaires contiennent une coiffe à leur extrémité 5' qui est liée par le complexe eIF4F se composant lui-même de la protéine de liaison à la coiffe eIF4E, de l'hélicase à ARN eIF4A et de la protéine d'échafaudage eIF4G (figure 6) [3]. L'interaction entre eIF4G et eIF3 stabilise davantage le nouveau complexe formé entre l'ARNm coiffé, le complexe eIF4F et le complexe 43S (figure 6) [43]. Ce nouveau complexe d'initiation de la traduction 48S scanne ensuite l'UTR 5' de l'ARNm jusqu'à ce qu'il reconnaisse un codon d'initiation, ce qui conduit à l'hydrolyse du GTP en GDP sur le complexe ternaire [3][48]. Cette étape entraîne la libération de eIF2-GDP et l'initiation de la traduction [3].

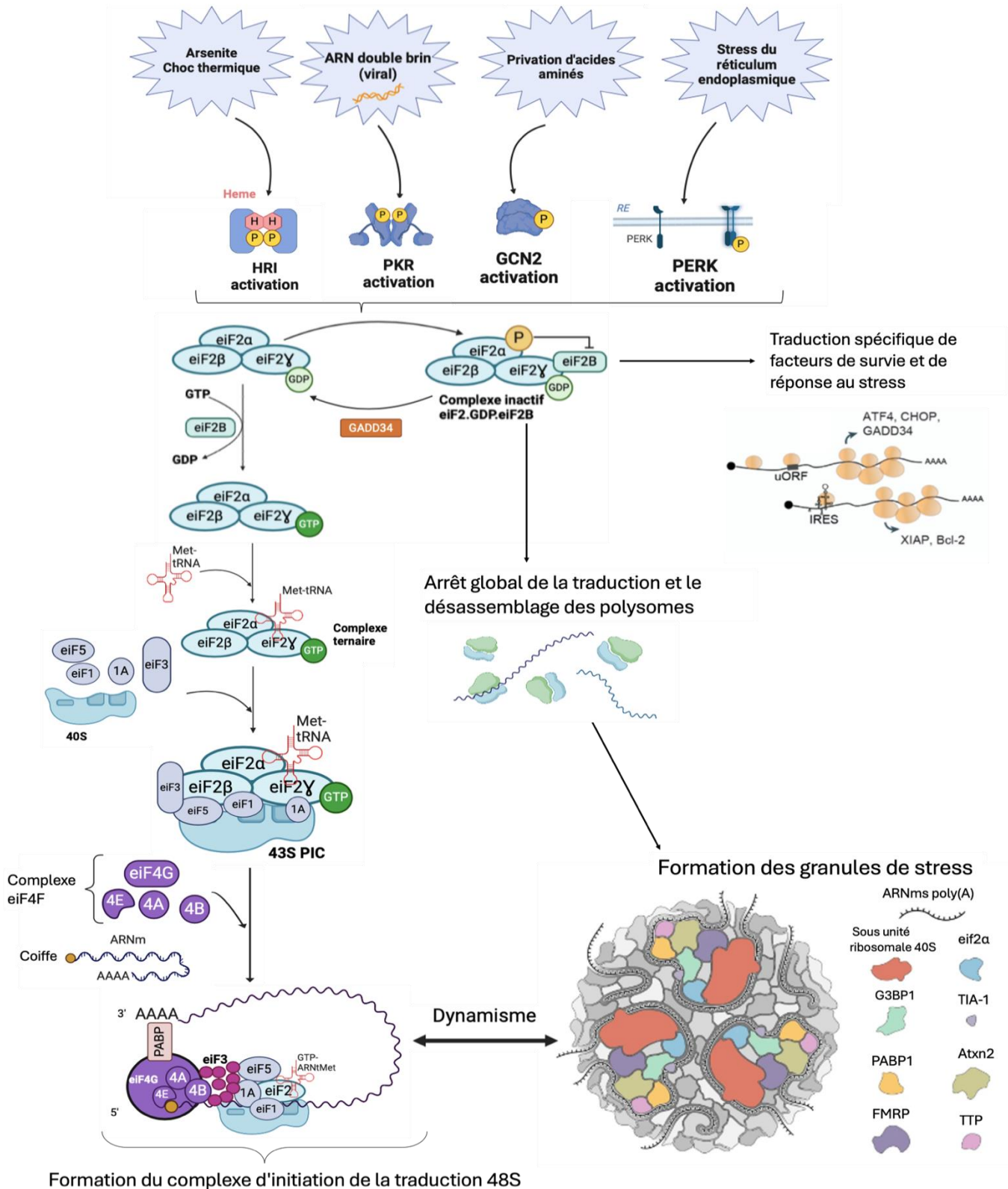
En phosphorylant la sérine 51 de la sous-unité  $\alpha$  du facteur eIF2, les kinases eIF2 $\alpha$  provoquent la liaison d'eIF2 avec le facteur d'échange GTP-GDP (eIF2B) (figure 6). Cette interaction empêche l'échange de GDP contre GTP catalysé par l'eIF2B, la régénération du TC et l'initiation de la traduction

[3][43]. La conséquence de cette phosphorylation est donc une diminution globale de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe [48].

Le blocage de l'initiation de la traduction peut également survenir par l'inhibition de la phosphorylation de 4E-BP médiée par le complexe mTOR1 (mTORC1). La *mammalian target of rapamycin* (mTOR) est une sous-unité kinase de mTORC1, un régulateur principal du métabolisme cellulaire qui réagit à la disponibilité des nutriments et à la stimulation des facteurs de croissance [57]. Certains stress liés à l'insuffisance de nutriments, d'énergie, d'oxygène ou de facteurs de croissance entraînent l'inhibition de mTORC1 et empêchent donc mTOR de phosphoryler ses protéines cibles telles les protéines de liaison 4E-BP [57]. Non phosphorylées, les protéines 4E-BP présentent une affinité accrue pour la protéine de liaison à la coiffe eIF4E et inhibent de manière compétitive son association avec eIF4G, empêchant la formation du complexe eIF4F [3][58].

D'autres mécanismes indépendants de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  peuvent conduire à une inhibition de la traduction et font appel à des facteurs pharmacologiques comme la pateamine A ou l'hippuristanol [53]. Ces substances sont des inhibiteurs de eIF4A qui vont perturber l'association entre eIF4A et eIF4G entravant ainsi la formation du complexe eIF4F et empêchant le complexe d'initiation 48S de parcourir l'ARNm à la recherche du codon initiateur [53]. Il est intéressant de noter que parmi ces nombreux moyens d'inhiber la traduction, c'est la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  qui est majoritaire [53].

Une des conséquences de l'inhibition de l'initiation de la traduction est l'accumulation de complexes de pré-initiation bloqués et le désassemblage des polysomes. Cela induit une condensation de facteurs de transcription, de petites sous-unités ribosomiques, d'ARNm non traduits et enfin de protéines de liaison à l'ARN (RBP) dans des organelles cytosoliques dépourvus de membrane appelés granules de stress (GS). La formation de ces granules est une conséquence de l'ISR et est plus rapide que les changements de transcription ou de traduction provoqués par les facteurs de stress cellulaires [56].



**Figure 6. Schéma global reprenant la formation du complexe d'initiation de la traduction en conditions normales et la formation des granules de stress à partir de l'activation des kinases eIF2 $\alpha$  lors de conditions de stress.** Les kinases eIF2 $\alpha$  s'activent via des stress spécifiques mais parfois, un même stress peut activer plusieurs kinases. Une fois activée par autophosphorylation, les kinases phosphorylent à leur tour la sous unité  $\alpha$  du facteur eIF2 provoquant ainsi la liaison d'eIF2 avec le facteur d'échange GTP-GDP (eIF2B) et l'inactivation du complexe eIF2.GDP.eIF2B. Par conséquent, la formation du complexe ternaire n'est plus possible et l'initiation de la traduction est inhibée. Les polysomes se désassemblent et les GS se forment afin de s'adapter aux conditions de stress. Une autre conséquence de ces conditions inhabituelles est la traduction d'une sélection d'ARNm spécifiques afin d'assurer la survie cellulaire (ATF4, GADD34, CHOP,...). La formation des GS est un phénomène très dynamique et des échanges constants entre les polysomes présents dans le cytoplasme ont lieu. Image modifiée de Nina Eiermann et al (2020) et de Adriana Marcelo et al (2021).

#### 1.4.4. Les granules d'ARN

---

Les ARNm cellulaires se retrouvent souvent associés à des RBP et forment des complexes de ribonucléoprotéines messagers (mRNP). La composition protéique de ces mRNP détermine certaines caractéristiques de l'ARNm lié comme son transport, sa dégradation et intervient dans la régulation traductionnelle des transcrits. Les ARNm qui sont directement traduits sont ensuite déadénylés et en fonction des besoins de la cellule sont soit dégradés, soit stockés [59]. D'autres ARNm sont programmés pour une traduction différée et sont donc transportés et stockés jusqu'à ce qu'un signal spécifique exige leur traduction [59]. Dans le cytoplasme des cellules, les ARNm dont la traduction est arrêtée, forment différents types de granules d'ARN visibles au microscope. Les plus étudiés à ce jour sont les granules de stress (GS) et les corps de traitement (*P bodies*) qui partagent certains composants et caractéristiques mais diffèrent néanmoins sur plusieurs aspects dont leur fonction, leur régulation et leur dynamisme [53][60]. Par exemple, les GS et P bodies sont tous deux des structures dynamiques dépourvues de membranes qui échangent constamment des ARNm avec le cytosol, les polysomes et d'autres granules d'ARN mais les P bodies sont très mobiles dans le cytoplasme alors que les GS restent relativement fixes [53][59].

Chez les eucaryotes, la formation de ces organelles sans membranes survient grâce à un phénomène appelé la séparation de phase liquide-liquide (LLPS). Cette séparation se produit dans un cytoplasme encombré et s'effectue grâce à des interactions macromoléculaires multivalentes qui entraînent la transition de certaines protéines vers une autre phase avec des propriétés physicochimiques différentes [53][61]. Cela induit la formation d'organelles sans membranes qui présentent une densité protéique plus élevée et des caractéristiques liquides les définissant comme des corps, des points, des granules, des gouttelettes et des condensats [61]. Deux types d'interactions multivalentes contribuent au LLPS à savoir les interactions entre différentes macromolécules (protéine-protéine, protéine-ARN et ARN-ARN) et les interactions multivalentes faibles et transitoires entre les régions intrinsèquement désordonnées (IDR), y compris les interactions  $\pi$ - $\pi$ , les interactions cation-anion, les interactions dipôle-dipôle et les interactions  $\pi$ -cation [53][61].

#### 1.4.5. Nature et assemblage des GS

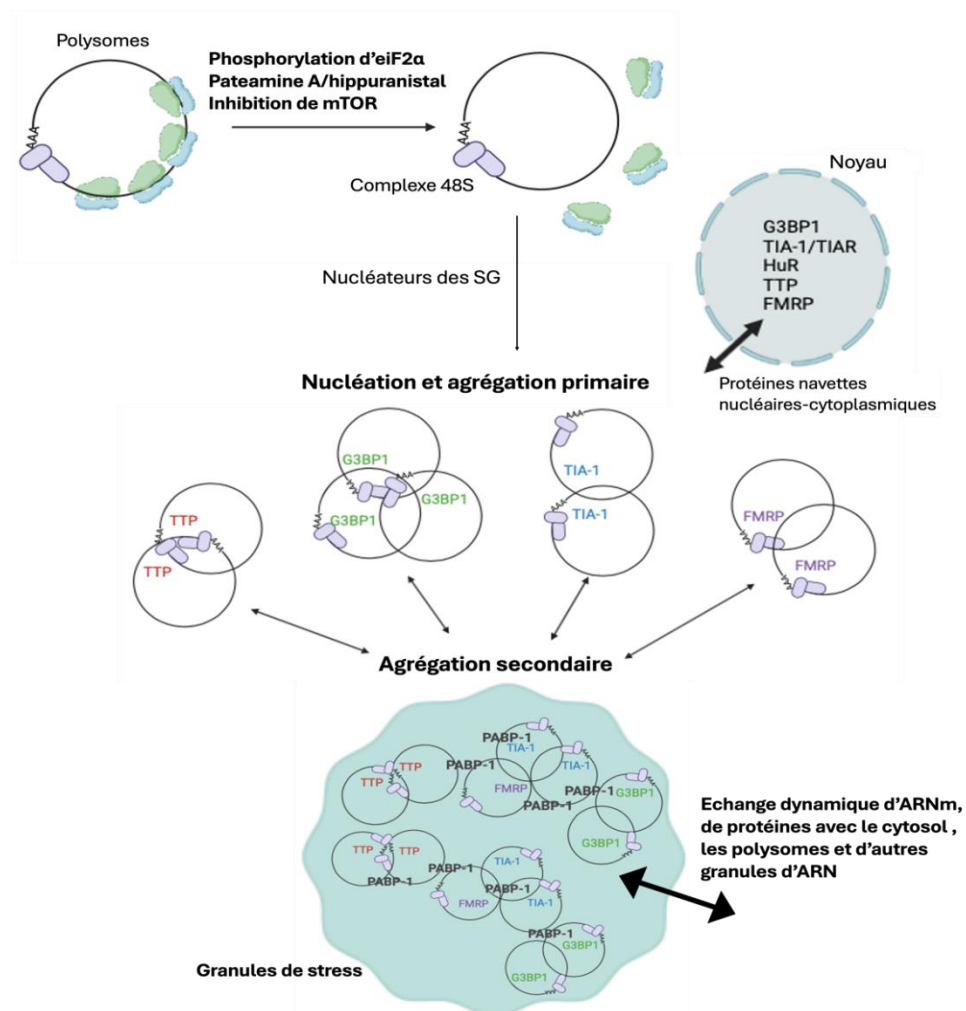
---

En conditions de stress, l'assemblage des GS est un phénomène complexe et commun retrouvé chez toutes les cellules eucaryotes [62]. Les GS sont des foyers cytoplasmiques qui peuvent contenir plus d'une centaine de protéines cellulaires et dont la taille varie de 100 à 2000 nm [53][63]. La formation de ces organelles cellulaires sans membranes est au moins biphasique et est médiée en partie par la LLPS [53][64]. Elle est déclenchée par l'inhibition de la traduction et le désassemblage des polysomes qui provoquent successivement l'accumulation de mRNP dans le cytoplasme et leur condensation en foyers cytoplasmiques distincts [53][54][64]. Ces phénomènes découlent de l'action des kinases eIF2 $\alpha$  ou d'une des voies indépendantes de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  suite à la perception

d'un stress. On retrouve donc comme déclencheurs initiaux de la formation des GS le stress du RE, le stress oxydatif, le choc thermique, l'hypoxie, la privation en acides aminés, le choc osmotique, l'infection virale ou l'irradiation aux UV (figure 6) [53][56]. Les GS sont principalement composées de complexes de pré-initiation 48S c'est-à-dire de sous-unités ribosomiques 40S, de facteurs d'initiation de la traduction tels que eIF4G, eIF4A et eIF3, d'ARNm polyadénylés et de protéines de liaison à l'ARN telles que la protéine liant la queue PolyA (PABP), la protéine de liaison RasGAPSH3 (G3BP) et l'antigène intracellulaire de cellule T-1 (TIA-1), dont les fonctions sont discutées plus loin (figure 6) [53][56][62]. Cependant, leur composition varie en fonction de l'étape du cycle de traduction de l'ARNm à laquelle se produit l'arrêt mais aussi de la nature du stress, de son intensité et de sa durée [53][56]. Une des principales caractéristiques de ces GS est leur dynamisme, autant au niveau de leur rapidité de formation qu'au niveau des échanges de leurs composants individuels avec le cytoplasme (figure 6) [53][56].

L'assemblage des GS comprend plusieurs phases dont la nucléation, l'agrégation primaire et secondaire et enfin une étape de croissance ou de fusion (figure 7) [60]. La nucléation est régulée par une variété de protéines appelées nucléateurs de GS, car leur surexpression induit la formation de GS même en l'absence de stress [53]. Les nucléateurs de GS sont des protéines à multidomaines qui contiennent généralement des IDR combinées avec des domaines de liaison à l'ARN [53][63]. Parmi ces IDR, on retrouve des séquences de faible complexité (LC) et des domaines de type prions (PLD) [63]. Grâce à ces domaines, la plupart des nucléateurs de GS sont enclins à l'auto-agrégation. De plus, ils effectuent la navette entre le noyau et le cytoplasme (figure 7) [53][63]. Par exemple, G3BP1 détecte l'augmentation d'ARNm libre et agit comme un interrupteur moléculaire pour activer l'assemblage des GS par LLPS dépendant de l'ARN [62]. D'autres nucléateurs de GS sont également connus tels que TIA-1, TTP et FMRP (figure 7) [54]. Lors de cette étape de nucléation et d'agrégation primaire, les transcrits hétérogènes associés au 48S voient leur concentration cytoplasmique augmenter et sont immédiatement liés par ces nucléateurs de GS. Ces protéines de liaison à l'ARNm « s'échangent » constamment jusqu'à reconnaître leurs séquences de liaison optimales [63]. Le recrutement de ces protéines associées aux GS contribue à atteindre un seuil de concentration de saturation, appelé seuil de percolation [62]. Ce seuil est défini par le réseau d'interactions protéine-protéine, protéine-ARN et ARN-ARN qui entraîne la LLPS [62]. De plus, des modifications post-traductionnelles des protéines associées aux GS telles que des phosphorylations ou la O-N-acétylglucosaminylation sont nécessaires afin d'assurer la formation des granules [53][63]. Ces multiples interactions de faible affinité avec les protéines contenant des IDR/LC compartimentent les mRNP en entités cytoplasmiques physiquement discrètes que sont les GS [63].

Une fois la nucléation initiée, les GS s'assemblent avec une composition protéique assez uniforme, c'est-à-dire qu'elles contiennent un noyau stable composé principalement par les RBPs, les ARNm et les sous unités ribosomales 40S [53][54]. Ce noyau est, dans un second temps, recouvert par une enveloppe ou coque protéique dans laquelle les composants sont en équilibre dynamique avec les polysomes [53][56]. Ces propriétés dynamiques sont mises en évidence par l'échange rapide et constant de protéines et d'ARN avec le cytoplasme environnant ou d'autres compartiments, tels que les *P-bodies* (figure 7) [65]. Lors de cette agrégation secondaire, les nucléateurs s'engagent dans des associations hétérotypiques d'ordre supérieur et leurs PLD ou IDR fournissent des échafaudages qui facilitent le recrutement d'autres protéines [65]. De plus, la réticulation se produit lorsque la protéine PABP-1, liée à tous les transcrits contenant du poly(A), réticule les oligomères plus petits pour assembler des agrégats de plus grande taille visibles au microscope (figure 7) [54]. Il a été observé que les GS restent relativement fixes dans le cytoplasme, mais changent constamment de forme, fusionnent et se divisent [54].



**Figure 7. Schéma représentant les étapes de formations des GS.** Tout d'abord, l'initiation de la traduction est inhibée de manière dépendante ou indépendante de la phosphorylation d'eIF2α. Ensuite, les polysomes sont désassemblés et les nucléateurs des GS qui sont soit cytoplasmiques soit des protéines navettes nucléaires-cytoplasmiques déclenchent la nucléation et l'agrégation primaire. Des associations d'ordre supérieur engendrent l'agrégation secondaire et la formation des GS. Image modifiée de Paul Anderson et al. (2007) réalisée sur Biorender.

#### 1.4.6. Désassemblage des GS

---

Lorsque le stress s'est atténué, le désassemblage des GS est essentiel au rétablissement des fonctions cellulaires [64]. Les mécanismes de désassemblage des GS sont moins bien étudiés que les processus d'assemblage. La récupération après un stress induit par l'arsénite ou par le choc thermique s'accomplit entre 60 et 120 minutes [53]. Les GS auraient plutôt tendance à se disperser de façon synchrone plutôt qu'à se fragmenter en plus petites granules [54]. Le désassemblage serait médié par plusieurs phénomènes, dont les modifications post-traductionnelles des nucléateurs qui joueraient un rôle non négligeable. Par exemple, la méthylation de l'arginine pourrait entraîner une diminution de la liaison de l'ARN et/ou des modifications conformationnelles des nucléateurs comme G3BP1 [53]. Cela diminuerait les interactions protéines-protéines, protéines-ARN et ARN-ARN et engendrerait le mélange des composants des granules dans le cytoplasme. La LLPS serait donc inversée et une reprise des événements de traduction aurait lieu [53]. De plus, les chaperonnes moléculaires telles que VCP et HSP70 se révéleraient importantes en assurant la dégradation des composants aberrants des GS et un désassemblage fluide des granules [53]. Une dysfonction du désassemblage engendre des agrégats protéiques chroniques qui peuvent être impliqués dans une série de maladies neurodégénératives telles que Parkinson ou Alzheimer [53].

#### 1.4.7. Les fonctions des GS

---

L'hétérogénéité des protéines et mRNP localisés à l'intérieur des GS suggère que ces organelles peuvent avoir des fonctions spécialisées et multiples, cependant leur nature reste ambiguë [62].

Lorsqu'un stress est perçu, de nombreuses protéines qui, d'ordinaire, font la navette entre le noyau et le cytoplasme se retrouvent séquestrées dans les GS et voient leurs fonctions nucléaires telles que l'épissage alternatif et la régulation transcriptionnelle de l'ARNm altérées [53]. Ces protéines telles que TIA-1/TIAR ou HuR sont dès lors poussées à exercer des fonctions secondaires dites « d'urgence » [54]. Elles vont notamment provoquer un phénomène de sélection moléculaire dans lequel l'ARNm résultant du désassemblage des polysomes est trié [54]. Le devenir de ces transcrits individuels est alors déterminé et ceux-ci sont acheminés soit vers une réinitiation, soit une dégradation, soit un conditionnement dans des RNP stables [53][54]. Se retrouvent ainsi dans les GS, des transcrits sélectionnés pour la désintégration par des protéines déstabilisantes telles que TTP ou BRF1 et des transcrits destinés à l'export ou au stockage grâce à leur liaison avec des protéines stabilisantes telles que HuR [54].

En plus de leurs rôles bien connus dans le stockage et le tri des ARNm, les GS constituent des plateformes de signalisation influençant plusieurs processus cellulaires. En séquestrant certaines protéines, les GS vont altérer la concentration et la composition protéique dans le cytosol modifiant ainsi

plusieurs réactions biologiques s'y déroulant [53]. Cela va notamment moduler plusieurs voies de signalisation dont celles impliquées dans la survie et l'apoptose, le métabolisme et la croissance cellulaire ainsi que la défense antivirale [3][54][56]. Par exemple, les GS peuvent inhiber la signalisation de la croissance en détournant TORC1 de son emplacement actif dans les lysosomes réduisant ainsi la synthèse peptidique et favorisant le processus catabolique d'autophagie [63]. De plus, lors de stress légers, les GS peuvent empêcher l'apoptose en séquestrant la protéine pro-apoptotique RACK1 et en inhibant donc la cascade de signalisation p38/c-Jun N-terminal kinase (JNK) [53][63]. Si le stress se montre trop sévère, il n'y a pas de séquestration de RACK1 et le processus de mort cellulaire s'enclenche.

En plus de ces fonctions majeures, d'autres rôles plus hypothétiques sont attribués aux GS. Ainsi, les GS constitueraient des sites de stockage pour les complexes d'initiation pré-assemblés, permettant de disposer de protéines et d'ARNm prêts à être utilisés rapidement une fois le stress atténué [3]. De plus, elles joueraient un rôle de plateforme qui relie les senseurs de stress et les effecteurs de la réponse immunitaire, notamment lors d'une infection virale, afin d'accélérer et potentialiser cette réponse [3].

## 2. But et objectif de travail

---

Au-delà de l'arrêt de la traduction médié par la perception du stress infectieux, les GS affectent l'expression des gènes viraux et la réplication virale en séquestrant des facteurs d'initiation de la traduction de l'hôte et les sous-unités du ribosome 40S [57][66]. En effet, la séquestration de plusieurs éléments du complexe d'initiation de la traduction empêche l'expression de protéines virales essentielles à la réplication des virus [67]. Comme précédemment évoqué, les GS possèdent un rôle de plateforme de signalisation et interviennent dans la régulation des voies de réponse au stress, y compris la réponse immunitaire innée antivirale [57]. En effet, lors d'une infection virale, les GS mobilisent certaines protéines de l'immunité innée et servent alors de plateforme pour l'activation de composants essentiels de la réponse antivirale tels que PKR et RIG-I [56][57]. De plus, plusieurs virus comme le virus Vaccinia et le virus de la dengue voient leur réplication altérée lorsque la protéine G3BP1 est concentrée à l'intérieur des GS. En effet, celle-ci leur est nécessaire pour leur réplication autour du complexe de réplication virale [67]. Au cours de leur évolution, certains virus ont développé des mécanismes leur permettant d'échapper à la répression traductionnelle, notamment grâce aux éléments IRES compris dans leur génome et à la traduction indépendante de la coiffe [3]. De plus, les virus ont développé des stratégies leur permettant d'interférer avec l'assemblage des GS, d'empêcher la séquestration des facteurs viraux et de réutiliser les protéines associées aux GS pour leur propre réplication [3][57].



Des résultats préliminaires ont montré que VZV a lui aussi acquis des mécanismes pour contrer la formation des GS dans les cellules infectées. La question de recherche est donc de comprendre la ou les stratégies mise(s) en place par VZV pour inhiber la formation des GS et ainsi contourner leur(s) fonction(s) antivirale(s).

Ce travail s'est concentré sur la mise au point expérimentale de différentes conditions de stress ciblant l'activation des kinases eIF2 $\alpha$  et la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  déclenchant ainsi la formation de GS. Pour chaque condition de stress ayant permis la formation de GS, nous avons jugé la capacité ou l'incapacité de VZV à inhiber la formation des granules de stress dans les cellules infectées. Ces expériences permettent de fournir des informations essentielles quant aux voies signalétiques potentiellement inhibées par l'infection. En ciblant des senseurs distincts, nous cherchons à élucider si le mécanisme d'inhibition est partagé par les 4 kinases eIF2 $\alpha$  et s'il est kinase-dépendant ou non. Ces expériences ont été réalisées sur différentes lignées cellulaires afin d'évaluer si le type cellulaire pouvait influencer le potentiel inhibiteur de VZV. Les expériences d'inhibition des GS par VZV ont également été réalisées sur des cellules primaires afin d'avoir une approche plus physiologique.

À mon arrivée au laboratoire, plusieurs conditions de stress avaient déjà été testées et ont montré des résultats confirmant le potentiel inhibiteur de VZV. Des GS ont été obtenues dans plusieurs types cellulaires traités à l'arsénite et à la thapsigargin dont les lignées cancéreuses A549 et MCF7. La lignée ARPE-19 ne s'est montrée sensible à la formation des GS uniquement lorsqu'elles étaient traitées à l'arsénite. Une inhibition des granules de stress a été observée dans chacune de ces lignées lorsque celles-ci étaient infectées par VZV.

### 3. Relevé de la littérature

---

Dans la littérature, différents mécanismes d'inhibition de la formation des GS ont déjà été identifiés. Lors d'une infection virale, des acides nucléiques tels que de l'ARN, de l'ADN ou encore des intermédiaires de réplication se retrouvent dans le cytoplasme des cellules [62]. Il est connu que l'ARNdb viral qui s'accumule active la kinase PKR et lorsqu'une grande quantité de protéines virales est synthétisée, les protéines dépliées ou mal repliées engendrent un stress du RE et l'activation de la kinase PERK [62][68]. Ces kinases déclenchent l'ISR en phosphorylant le facteur eIF2 $\alpha$  conduisant ainsi à la formation des GS. Les stratégies virales mises en place pour contrer l'ISR comprennent des antagonismes de l'axe PKR/PERK-eIF2 $\alpha$ , le clivage ou la séquestration de composants essentiels des GS et la redistribution de certains composants des GS [62]. Les antagonistes de l'ISR sont répartis en 4 classes distinctes en fonction du mécanisme utilisé. Les antagonistes de classe I bloquent ou séquestrent le facteur de stress et empêchent ainsi l'activation de la kinase eIF2 $\alpha$ . Les antagonistes de classe II se lient à la kinase activée par le stress et l'inhibe, ce qui contre la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Les antagonistes de classe III induisent la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  en activant la phosphatase PP1. Enfin,

les antagonistes de classe IV empêchent l'interaction entre phospho-eIF2 $\alpha$  et eIF2B, ce qui permet la formation ininterrompue du complexe ternaire et une traduction protéique sans entrave [44][69].

Les connaissances sur les mécanismes d'interférence avec l'ISR et sur l'inhibition de la formation des GS développés par les *Herpesvirales* sont encore limitées. Certaines protéines d'HSV-1 ont la capacité d'empêcher l'accumulation du facteur d'eIF2 $\alpha$  phosphorylé. Par exemple, la protéine  $\gamma$ 34.5 est une sous-unité régulatrice qui va se lier au motif RVxF de PP1 médiant ainsi la déphosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  [62] [70]. De plus, le gène Us11 code pour une protéine de liaison à l'ARNdb qui entre en compétition et empêche l'activation de PKR et donc la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  [70]. Enfin, une étude a montré que l'expression de la protéine IE63 de VZV en absence de toute autre protéine virale inhibe la phosphorylation de l'eIF2 $\alpha$  dans des fibroblastes dérivées de tissu rénal de singe [42].

D'autres protéines virales visent à un blocage de l'expression des gènes de l'hôte et donc à une diminution de la synthèse protéique cellulaire soit par dégradation des ARNm cellulaires soit en interférant avec le phénomène d'épissage des ARNm. La protéine VHS (*virion host shutoff*) codée par le gène UL41 de HSV-1/2 et la protéine SOX codée par l'ORF37 de KSHV présentent une activité endoribonucléasique et dégradent massivement les ARNm cellulaires [71][72]. Il a été montré que dans des cellules infectées par une souche de HSV-2 exprimant une forme défectueuse de la protéine VHS, la capacité à perturber la formation des GS induites par l'arsenite est fortement réduite [73]. De plus, l'expression ectopique de VHS suffit à inhiber la formation des GS lorsqu'elles sont induites par un traitement à l'arsenite [73]. L'ORF37 de KSHV codant pour la protéine SOX inhibe également la formation de GS induites par l'arsenite dans les cellules HEK293, de manière similaire à la protéine VHS, c'est-à-dire par dégradation de l'ARN [72]. D'autre part, la protéine régulatrice précoce et immédiate ICP27 de HSV-1 interagit avec la protéine SRPK1 (*cytoplasmic kinase SR protein kinase 1*) et migre dans le noyau afin d'inhiber l'épissage du pré-ARNm cellulaire. Les ARNm non épissés sont donc incapables d'être exportés dans le cytoplasme afin d'être traduits. La protéine ICP27 contribue ainsi à l'arrêt de la synthèse protéique de l'hôte et son expression réduit les taux de phosphorylation de PKR et du facteur eIF2 $\alpha$  inhibant ainsi la formation des GS induites par l'arsenite [71][72][74]. Ces mêmes résultats sont obtenus lorsque les cellules expriment la protéine homologue ORF57 de KSHV, qui, en interagissant directement avec PACT (*protein activator of PKR*) et PKR empêche la phosphorylation de PKR et d'eIF2 $\alpha$ . Ces données indiquent que la capacité à inhiber la formation des GS est conservée entre les deux herpesvirus [72]. Enfin, la protéine TRS1 de HCMV est un antagoniste de PKR et est nécessaire et suffisante pour inhiber la formation de GS induites par l'arsenite [75].

## 4. Matériels et méthodes

---

### 4.1. Culture des cellules

---

#### 4.1.1. Lignées cellulaires

---

Les cellules ARPE-19 et A549 sont cultivées dans du milieu DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) complétement avec des acides aminés non essentiels, 10% de Fetal Bovine Serum (FBS) et 1% de solution pénicilline/streptomycine (ThermoFisher, Waltham, USA). Les cellules MCF7 sont cultivées dans du milieu DMEM complétement de la même manière. La lignée cellulaire A549 et MCF7 sont respectivement des lignées cancéreuses de poumons et de seins. Les cellules primaires de fibroblastes oraux (P10868 Innoprot) ont d'abord été cultivées dans un milieu spécifique (P60108 Fibroblast Medium Kit, Innoprot) puis dans du milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) complétement avec 10% de FBS et 1% de solution pénicilline/streptomycine. Toutes les cellules sont maintenues à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.1.2. Cellules infectées

---

L'infection des lignées cellulaires utilisées par le VZV sauvage est réalisée par co-culture entre des cellules MeWo infectées et les cellules souhaitées (ARPE-19 ou A549 ou MCF7). Après une première infection réalisée en MeWo, les cellules sont passées jusqu'à ce que des foyers caractéristiques de la lignée cellulaire apparaissent. Ensuite, la co-culture a été réalisée et les cellules MeWo ont été utilisées afin d'infecter des ARPE-19, des A549 et des MCF7. Une boîte de cellules infectées par lignée a alors été obtenue.

#### 4.1.3. Production virale et titration

---

L'infection des fibroblastes oraux a été réalisée à l'aide de particules virales de VZV-WT isolées à partir de cellules infectées. Pour cela, une production virale a dû être préalablement effectuée. Une flasque T80 de ARPE-19 a été ensemencée afin d'obtenir une confluence de 80%. Une fois la confluence souhaitée atteinte dans la flasque, les cellules ont alors été trypsinisées et infectées avec des ARPE-19-WT-GFP à un taux de 25% de la surface de la flasque T80. 48h après l'infection, le surnageant de culture a été retiré et les cellules ont été grattées dans 3 mL de tampon de PBS-sucrose-glutamate-sérum (sucrose 0,146 M, sodium de glutamate 5,91 mM, 10% de PBS et 10% de sérum de veau foetal). La suspension cellulaire obtenue a été soniquée par 3 cycles de 15 secondes à l'aide d'un microtip de 3mm et à amplitude minimale de 20% (VibraCell 75041 – Bioblock Scientific). La suspension a été centrifugée à 1000g pendant 15 minutes à 4°C et les aliquots du surnageant en cryotubes ont ensuite été placés au -80°C pendant 24h avant d'être stockés à l'azote liquide. Avant utilisation, le titre viral de la production a été estimé. Des cellules ARPE-19 ont été ensemencées en plaque 24 puits, le matin de la production virale et infectées le soir même. Une dilution en série de la solution contenant les particules virales a été réalisée et 50 µL de ces dilutions ont été ajoutés dans chaque puit. Cette opération a été réalisée en duplicat. 48h après l'infection, la plaque a été placée dans l'automate de photographie

IncuCyte® S3 (Sartorius, Göttingen, Allemagne) et le nombre de foyers par puits comptés sur QuPath (version 0.4.3). Le nombre de foyers comptés dans un puits a été multiplié par le facteur de dilution de la solution initiale dans le même puits. Le titre viral de la production est une moyenne des titres calculés sur au moins quatre puits.

#### 4.2. Traitement par l'arsenite et la thapsigargin

---

Afin d'obtenir des contrôles d'activation des kinases PERK et HRI, des traitements à la thapsigargin et à l'arsenite ont été respectivement effectués. La thapsigargin (réf. T9033, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) a été diluée dans du milieu de culture à une concentration de 0,25  $\mu\text{M}$  pour les MCF7 et de 1  $\mu\text{M}$  pour les A549 et les fibroblastes oraux, pendant 2 heures. Une solution aqueuse d'arsenite (réf. S7400, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) a été diluée dans du milieu de culture à une concentration finale de 1 mM pour toutes les lignées cellulaires testées (MCF7, ARPE-19, A549 et fibroblastes oraux) pendant 30 minutes. Pour les puits non traités, le milieu est remplacé par du milieu de culture frais le temps du traitement.

#### 4.3. Traitement par choc thermique

---

Afin d'activer la kinase HRI, les cellules ont été traitées par un choc thermique. Pour cela, les cellules sont placées pendant 45 minutes dans un incubateur préalablement chauffé à 44°C.

#### 4.4. Transfection des cellules au poly(I:C)

---

Afin d'activer la kinase PKR, les cellules ont été transfectées avec un analogue synthétique de l'ARN double brin utilisé comme modèle moléculaire associé à l'infection virale. L'acide polyinosinique-polycytidylique (poly(I:C)) de faible poids moléculaire (LMW, *Low Molecular Weight*) (réf. tlr-picw, Invivogen, San Diego, USA) est composé de brins courts d'homopolymère d'inosine poly(I) appariés sur des brins d'homopolymère de cytidine poly(C) et sa taille est de 0,2 kb à 1 kb. L'agent de transfection jetPEI est un dérivé linéaire de la polyéthylèneimine (PEI) (réf. 101000053, Polyplus, Illkirch-Graffenstaden, France).

Les cellules ont été ensemencées à une confluence variable selon les lignées cellulaires utilisées (40% pour les A549 et entre 50 et 70% pour les MCF7 et les ARPE-19). Les puits infectés ont été ensemencés en même temps que les cellules non infectées et à un taux se situant entre 5 et 10% de la surface du puits. Le lendemain, les transfections ont été réalisées sur cellules adhérentes et présentant une confluence entre 60% et 80%. Les différentes quantités de poly(I:C) utilisées sont reprises dans le tableau 2. La solution de transfection a été réalisée en préparant 2 mélanges. D'une part, x  $\mu\text{L}$  de la solution stock de poly(I:C) à 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ont été complétés à 100  $\mu\text{L}$  avec du NaCl 150 mM et d'autre part, y  $\mu\text{L}$  de jetPEI ont été complétés à 100  $\mu\text{L}$  avec du NaCl 150 mM. Le mélange jetPEI a été ajouté au mélange poly(I:C) avec un volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Un ratio poly(I:C):jetPEI de 1:2 ou de 1:1,5 est utilisé en fonction des expériences. Après avoir été tapoté, le mix a été incubé entre 15 et 20 minutes à température ambiante.

200 µl du mélange ou de NaCl ont été répartis au goutte à goutte dans les puits en fonction des conditions testés. Les cellules ont été traitées pendant 24h à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

Expériences	Concentrations en polyI:C (en µg/10 <sup>6</sup> cellules)	Quantités de polyI:C déposées par puits (µg)	Ratio (poly(I:C):jetPEI)	Plaques utilisées
Immunofluorescence	8,1	2	1:2	24 wp
Western Blot RT-qPCR	1,6 ou 8,1	0,41 ou 2	1:1,5	6 wp

**Tableau 2. Concentrations et quantités de poly(I:C) et ratios utilisés selon le type d'expériences réalisées et le type de plaques utilisées.**

#### 4.5. Immunofluorescence (IF)

##### • Préparation de la plaque 24 puits

Afin d'observer les cellules au microscope confocal, des lames en verre ont été déposées stérilement dans le fond de chaque puits d'une plaque 24 puits. Chaque lame a été lavée avec de l'éthanol, séchée sous hotte pendant quelques minutes puis rincée au PBS. Les cellules (ARPE-19, MCF7 ou A549) non infectées ainsi que les cellules ARPE-19, MCF7 et A549 infectées par le virus VZV WT ont été trypsinisées, mélangées dans un rapport 10:1 et ensemencées dans les puits souhaités. Des puits non infectés ont également été ensemencés à la confluence souhaitée selon la lignée cellulaire utilisée. Les fibroblastes ont été ensemencés à une confluence de 40%. Pour l'infection des fibroblastes, 200 PFU (*Plaque Forming Unit*) ont été déposés par puits infecté.

##### • Fixation et perméabilisation

24h ou 48h après l'infection et lorsque l'infection des cellules est jugée suffisante pour obtenir 150 cellules infectées à compter, les différents traitements ont été effectués (voir section 4.2, 4.3 et 4.4). A l'issue des traitements, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été fixées avec de la PAF 4% pendant 10 minutes sous agitation à température ambiante (RT). Les cellules ont ensuite été perméabilisées et saturées avec une solution de PBS + 0,1% Triton X-100 + 5% BSA pendant 30 minutes à RT, également sous agitation.

##### • Immunomarquage

Les cellules ont été marquées avec une solution PBS + 0,1% Triton X-100 + 5% BSA contenant les anticorps primaires et incubées à température ambiante sur la nuit et sous agitation (tableau 3). Le lendemain, les cellules ont été lavées 2 fois pendant 5 minutes avec du PBS avant de procéder à l'incubation des anticorps secondaires, dans une solution de PBS + 0,1% Triton X-100 + 5% BSA, pendant 1h20 sous agitation et à l'abri de la lumière (tableau 3).

Anticorps	Firme	Origine	Dilution	Référence	Longueur d'onde du fluorochrome (nm)
<b>Primaires :</b>					
Anti-IE63	Produit au laboratoire	Lapin	1/1000	/	
Anti-G3PB1	ProteinTech	Souris	1/2000	66486-1-Ig	
<b>Secondaires :</b>					
Anti-Lapin	Sigma-Aldrich	Âne	1/2000	SAB4600132-250UL	CF633
Anti-Souris 568	Invitrogen	Âne	1/2000	A10037	AlexaFluor 568

**Tableau 3. Anticorps primaires et secondaires utilisés lors de l'immunomarquage des cellules.**

Après un premier lavage de 5 minutes au PBS et un deuxième lavage rapide à l'eau désionisée, le marquage des noyaux a été effectué avec une solution de Hoechst 1 µg/mL (réf. 14533, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) pendant 5 minutes sous agitation et à l'abri de la lumière. Les cellules ont ensuite été rincées par 3 lavages de 5 minutes à l'eau désionisée.

#### • Montages des lames

Les lames ont été montées sur lame porte-objet dans une goutte de Mowiol préalablement chauffé à 60°C. Après 24h de séchage à RT et à l'abri de la lumière, les cellules immunomarquées peuvent être observées au microscope. Les lames montées ont été conservées à RT et à l'abri de la lumière.

#### • Imagerie confocale et acquisition des images

Les cellules immunomarquées ont été observées à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM980 utilisé soit avec un objectif 40x à immersion soit avec un objectif 63x à immersion. Pour chaque condition (cellules infectées ou cellules non infectées), un minimum de 150 cellules individualisées ont été prises en photo sur plusieurs couches (*Z-stacking*) et une projection orthogonale a été effectuée grâce au logiciel ZEN (version 3.10). Le comptage des cellules positives aux GS a été réalisé sur les projections à l'aide du logiciel QuPath (version 0.4.3). Pour chaque condition, le pourcentage de cellules positives au GS a été calculé et porté en graphique sur GraphPad Prism (version 10.2.3). L'analyse statistique effectuée est un t-test non pairé.

## 4.6. RT-qPCR

### • Préparation des échantillons

L'extraction et la purification des ARNs ont été réalisés sur environ  $1.10^6$  cellules à l'aide du kit NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). La concentration en ARN des échantillons a été dosée au NanoPhotometer® N60/N50 (Implen, Munich, Allemagne) contre un blanc réalisé avec de l'eau pure.

La transcription inverse a été réalisée à l'aide du kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher, Waltham, USA). Les échantillons de cDNA ont été dilués à une concentration de 2,5 ng/μl et de 0,25 ng/μl. Ces mêmes dilutions ont été effectuées pour les échantillons d'ARN. Le milieu réactionnel de la qPCR est composé de 6 μL de mélange SYBR-amorces et 4 μL de cDNA. La quantité totale de cDNA est donc de 1 ng par puits. Pour chaque gène testé, un stock de mélange d'amorces a été réalisé, celui-ci contient 10 μL d'amorce sens, 10 μL d'amorce anti-sens et 230 μL d'eau distillée. Par gène testé, la proportion du mélange SYBR-amorces est d'1 μl d'amorce pour 5 μL de SYBR (réf. UF-NSMT-B0701, Eurogentec, Belgique). Les amorces utilisées (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) sont reprises en annexe (figure S1).

#### • Quantification

Par gène analysé, chaque échantillon a été quantifié en triplicats. Avant le démarrage du cycle, la plaque a été centrifugée à 1000 rpm pendant 1 minute. La PCR a été réalisée par le Light Cycler 480® II (Roche Diagnostics, Bâle, Suisse) selon le programme repris dans le tableau 4.

Étapes	Cycles	Analyses	Temps	Températures
Pré-incubation	1	Aucune	10 minutes	95°
Amplification	45	Quantification	10 secondes 45 secondes	95° 60°
Melting curves	1	Melting Curves	15 secondes 30 secondes Continu	95° 60° 97°
Cooling	1	Aucune	10 secondes	40°

**Tableau 4. Programme utilisé pour la quantification des échantillons par qPCR.**

#### • Analyses des résultats

Les résultats ont été analysés sur le programme LightCycler® 480 Software (version 1.5.0). Dans un premier temps, la courbe de dissociation de chaque cDNA amplifié a été vérifiée, c'est-à-dire voir si elle est unique et à hauteur de la température de dissociation du produit d'amplification. Dans un second temps, pour chaque triplicat, la valeur des cycles seuils (Ct) a été vérifiée, c'est-à-dire voir si ces valeurs sont égales ou proches. Ensuite, la valeur corrigée du Ct de tous les échantillons pour chaque gène testé a été calculée et correspond à la différence entre le Ct de l'échantillon et le Ct du gène rapporteur/domestique. Enfin, par échantillon et par gène testé, la moyenne des Ct corrigées entre les triplicats a été calculée et est portée en graphique sur GraphPad Prism (version 10.2.3). Pour chaque échantillon, les gènes de l'immunité innée testés sont ISG15 et IFN-β et les gènes rapporteurs utilisés

sont RPL32 et Ub-C (tableau S1). Les expériences de qPCR ont été réalisées en duplicat ou en triplicat selon la lignée cellulaire utilisée.

#### 4.7. Western Blot (WB)

---

##### • Préparation des extraits protéiques

Pour les expériences de WB, les cellules ARPE-19, MCF7 ou A549 non infectées ainsi que les cellules ARPE-19, MCF7 et A549 infectées par le virus VZV-WT ont été trypsinisées, mélangées dans un rapport 10:1 et ensemencées dans des plaques 6 puits. Des puits non infectés ont également été ensemencés à la confluence souhaitée selon la lignée cellulaire utilisée. Les fibroblastes oraux ont été ensemencés à 40% de confluence dans des puits de plaque 6 puits et certains puits ont été infectés en déposant 660 PFU de suspension de virus WT par puits. Après traitement (poly(I:C), choc thermique, arsenite ou thapsigargin), le milieu des puits a été retiré. Ensuite, une lyse directe au bleu dénaturant a été réalisée en ajoutant entre 150 et 200  $\mu$ L de TR 1X (Tris HCl 60 mM, Glycérol 10%, SDS 2,5%, B-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,001%)

Chaque puits a été gratté et les cellules ont été transvasées dans des Eppendorfs 1.5 mL. Les échantillons ont ensuite été traités à la benzonase (réf. 70746, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) et laissés sur glace pendant 30 minutes avant d'être chargés sur gel.

##### • Coulage des gels

Le western blot comprend un gel de séparation de polyacrylamide (Acryl 40 %, Tris HCl pH 8.8, H<sub>2</sub>O, Glycérol 50 %, SDS 10 %, APS 10 %, TEMED) et un gel de concentration (Acryl 40 %, Tris HCl pH 6.8, H<sub>2</sub>O, SDS 10 %, APS 10 %, TEMED). Pour les expériences de poly(I:C), des gels de séparation 10% ont été utilisés alors que pour les expériences d'activation des kinases, des gels de séparation 9% ont été réalisés et enfin, pour l'observation d'HRI activée par le choc thermique, les gels de séparation utilisés étaient des 7%.

##### • Chargement, migration et transfert

Entre 45 et 50  $\mu$ L de chaque échantillon protéique ont été chargés dans les puits sauf pour l'expérience de l'influence de la concentration en poly(I:C) sur les A549 où seulement 25  $\mu$ L ont été chargés. Une migration à 70 V dans le tampon de migration SDS 1X (30 g Tris, 72 g Glycine, 5 g SDS) a été réalisée. Le voltage a été augmenté entre 100 et 120 V une fois les échantillons dans le gel de séparation. Le transfert des protéines sur membrane PVDF a été effectué dans le tampon de transfert (Méthanol, Tris, Glycine) à 70 V en chambre froide ou à 400 mA pendant 1h15 dans un bac rempli de glace. Les membranes ont ensuite été lavées à l'eau désionisée avant coloration au rouge Ponceau pour vérifier la qualité du transfert.



### • Saturation, incubations et révélation

Les membranes ont été saturées dans du TBS-Tween (Tris, NaCl, Tween, pH 7.6) + lait écrémé 3% pendant 1h. Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires souhaités dans du TBS-Tween-lait 3% ou dans de la BSA 3% et agitées pendant un temps variable selon l'anticorps utilisé (tableau 5). Deux lavages de 5 minutes avec du TBS-Tween ont été effectués avant l'incubation des anticorps secondaires dans du TBS-Tween-lait 3% pendant 1h sous agitation constante.

Les membranes ont été lavées 3 fois pendant 5 minutes avec du TBS-Tween et ensuite révélées avec un mélange de 3 solutions réalisé extemporanément. Ce mélange est constitué d'une solution A (Tris HCl 0,1 M pH 8.6, Luminol), d'une solution B (DMSO, acide para-hydroxycoumarique) et d'une solution C (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La machine de révélation est le système d'imagerie ImageQuant LAS4000.

Anticorps	Firme	Origine	Dilution	Référence	Remarques
<b>Primaires :</b>					
IE62	Produit par le laboratoire	Lapin	1/2000	/	Incubation 2h à RT dans du lait 3%
PERK	Cell Signaling	Lapin	1/1000	3192s	Incubation 2h à RT dans du lait 3%
HRI	ProteinTech	Lapin	1/1000	20499-1-AP	Incubation 2h à RT dans du lait 3%
P-PKR	Bio-Connect	Lapin	1/1000	GTX636912	Utilisé pour les expériences de polyI:C (ARPE-19 et A549) Incubation 4h à RT dans du lait 3%
P-PKR	Sigma Aldrich	Lapin	1/1000	SAB5701903	Utilisé pour les expériences d'activation des kinases (choc thermique et polyI:C) Incubation 4h à RT dans de la BSA 3%
PKR	ProteinTech	Lapin	1/2000	18244-1-AP	Incubation 2h à RT dans du lait 3%
P-eiF2 $\alpha$	ProteinTech	Souris	1/1000	68023-1-Ig	Incubation 4h à RT dans du lait 3%
eiF2 $\alpha$	DSHB	Souris	1/2000	PCRP-EIF2S1-2A10	Incubation 2h à RT dans du lait 3%
$\beta$ -tubuline	DSHB	Souris	1/5000	E7-c	Incubation 2h à RT dans du lait 3%
HSP27	DSHB	Souris	1/1000	CPTC-HSPB1-1-s	Incubation 2h à RT dans du lait 3%
<b>Secondaires :</b>					
Anti-lapin	Cell Signaling	Chèvre	1/4000	7074	Incubation 1h à RT dans du lait 3%
Anti-souris	Cell Signaling	Cheval	1/4000	7076	Incubation 1h à RT dans du lait 3%

**Tableau 5. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences de western blot.**

### • Stripping

La membrane a été immergée entre 30 et 45 minutes 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). Cette boîte a été placée dans un bain-marie à 60°C sous agitation. Ensuite, la membrane a été lavée à l'eau pendant plusieurs minutes. A partir de là, les mêmes étapes de saturation, d'incubation et lavages ont été répétées avec les nouveaux anticorps voulus.

## 4.8. Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Pour les expériences de FACS, des cellules ARPE-19 non infectées ont été trypsinisées et mélangées ou non avec des cellules ARPE-19 infectées par le VZV-WT avant d'être ensemencées dans des plaques 6 puits. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec le poly(I:C) pendant 24h. Après 48h d'infection, les traitements de choc thermique et d'arsénite ont été appliqués aux cellules pendant 45 et

30 min, respectivement. Tous les traitements ont été arrêtés en même temps et chaque puits a été rincé au PBS avant d'être trypsinisé. Après ajout de DMEM-F12 complétement dans chaque puits, les cellules ont été récoltées dans un *eppendorf* avant d'être centrifugées 5 minutes à 500 rcf à 4°C et lavées avec 1,5 mL de FACS *buffer* (1% de BSA + PBS). Après centrifugation 5 minutes à 300 rcf, 100 µL de solution zombie NIR (dilution 1/1000) (ZombieNIR Fixable Viability Kit, Sony Biotechnology) ont été ajoutés à chaque échantillon et incubés 20 minutes à l'abri de la lumière à RT. Les tubes ont été lavés avec 1 mL de FACS *buffer* et centrifugés 5 minutes à 300 rcf.

Les étapes de fixation/perméabilisation des cellules ont été effectuées à l'aide du kit Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer set (#88-8824-00, eBioscience™). Les cellules ont été resuspendues dans 100 µL de FACS *buffer* auxquels 100 µL de IC Fixation buffer ont été ajoutés. Après 20 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à RT, 1 mL de 1X *Permeabilization buffer* a été ajouté. Les cellules ont été centrifugées 4 minutes à 500 rcf et le culot cellulaire a été resuspendu avec 1 mL de *Permeabilization buffer*. Après une nouvelle étape de centrifugation de 4 minutes à 500 rcf, le culot cellulaire a été resuspendu avec 100 µL de *Permeabilization buffer* et 0,5 µL d'anticorps primaire anti-phospho-eIF2α a été ajouté (ref. 3597, Cell Signaling). Après 45 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à RT, les cellules ont été lavées avec 1 mL de *Permeabilization buffer* et centrifugées 4 minutes à 500 rcf. Les cellules ont été resuspendues dans 100 µL de *Permeabilization buffer* auxquels 0,5 µL d'anticorps secondaire (F(ab')<sub>2</sub>-Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, PE, eBioscience™) a été ajouté. Après 15 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à RT, les cellules ont été lavées avec 1 mL de FACS *buffer*, centrifugées 4 minutes à 500 rcf et resuspendues dans 250 µL de FACS *buffer*. Les échantillons ont ensuite été passés au cytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, USA) et les résultats ont été analysés grâce au logiciel FlowJO (V10).

## 5. Résultats

---

La formation de GS permet aux cellules eucaryotes de s'adapter lors de la détection de divers stress intracellulaires et environnementaux. Les GS ont été proposées comme actrices de la réponse antivirale et leur formation est inhibée par plusieurs virus dont le VZV lorsque celles-ci sont induites par l'arsenite. Nous avons donc testé cette capacité d'inhibition avec d'autres stress dont le choc thermique et l'infection virale, mimée par le poly(I:C), traitements qui activent respectivement la kinase HRI et la kinase PKR. Tout d'abord, il a fallu s'assurer qu'une infection par VZV seul n'engendre pas la formation de GS par l'activation de PKR. Par IF, aucun condensat de G3BP1 cytoplasmique n'a été détecté dans des cellules infectées par VZV-WT (figure S2).

## 5.1. Traitement par choc thermique

---

Le choc thermique cible principalement l'activation de la kinase HRI [49]. Celle-ci va dimériser, s'autophosphoryler et phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ , le rendant ainsi inactif.

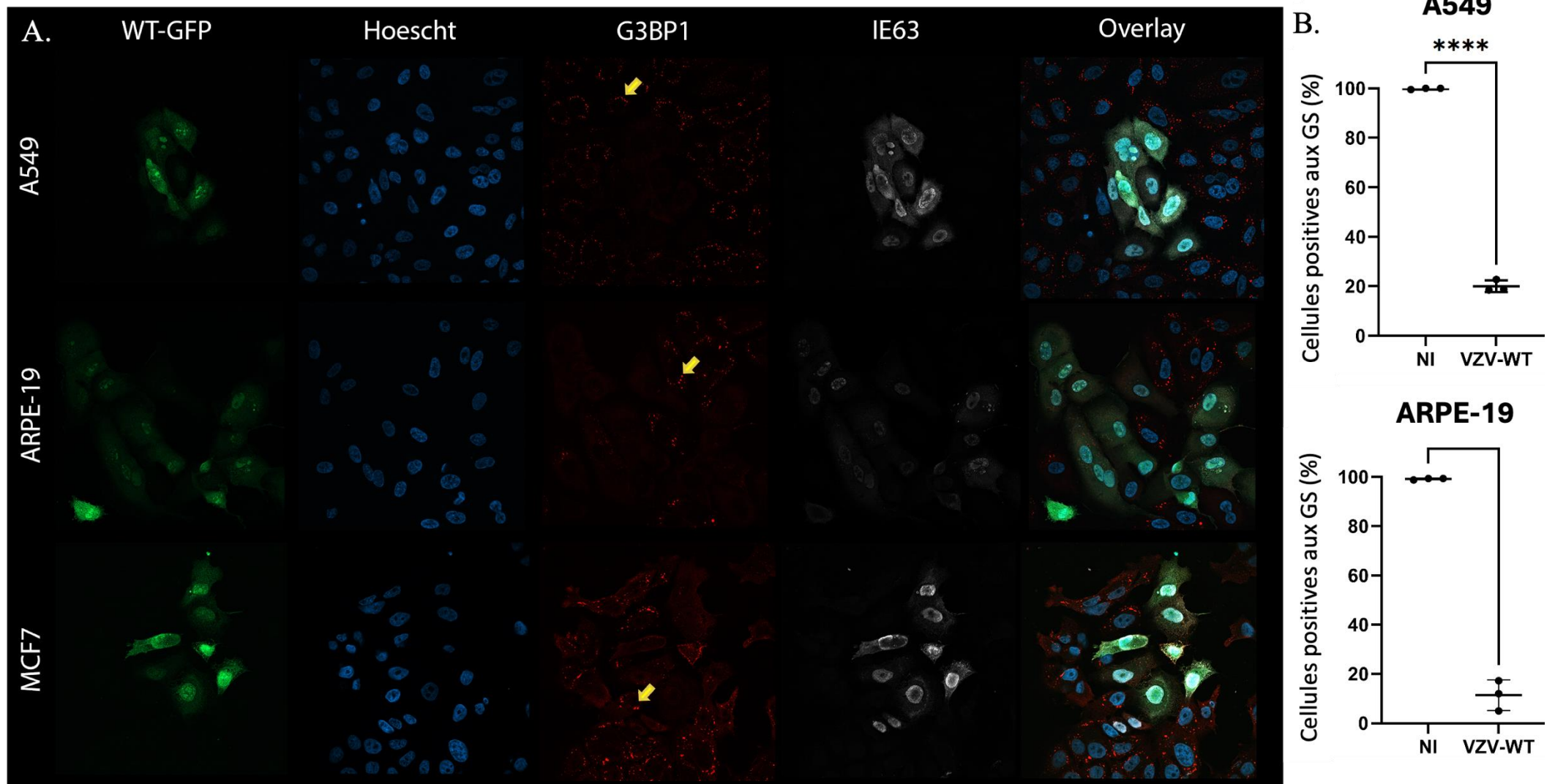
### 5.1.1. Induction des granules de stress et inhibition par le virus VZV

---

Afin de visualiser la possible formation de granules de stress et leur inhibition par le VZV au sein des cellules, une protéine typique des GS, le nucléateur G3BP1, ainsi qu'une protéine virale IE63 ont été visualisées par immunofluorescence (IF). Après un premier essai à 42 degrés et un second à 44 degrés pendant 40 ou 50 minutes, c'est finalement la condition de traitement à 44 degrés pendant 45 minutes qui a montré les résultats les plus concluants. En effet, une différence notable s'observe entre des cellules non traitées et des cellules traitées. Pour les cellules qui n'ont subi aucun traitement, le signal G3BP1 est diffus dans le cytoplasme cellulaire. Après le choc thermique, le signal G3BP1 se concentre au sein des GS cytoplasmiques (flèches jaunes, figure 8A). Ces GS sont observées dans les trois lignées cellulaires utilisées à savoir les lignées ARPE-19, MCF7 et A549.

Lorsque les cellules sont infectées par VZV, une inhibition de la formation des GS s'observe dans les trois types cellulaires. Par IF, celle-ci se caractérise par l'absence de condensats de G3BP1 dans le cytoplasme des cellules infectées. Ces dernières s'identifient grâce au signal GFP du BAC VZV-WT ou à celui de la protéine virale IE63. Cependant, pour les MCF7, il est difficile d'exploiter les résultats d'IF et donc d'évaluer par comptage s'il y a une réelle inhibition des GS par le virus. Malgré une forte induction des GS dans ces cellules, l'infection en MCF7 est très compliquée à obtenir et à maintenir en culture. La photo de la figure montre les seules cellules infectées des lames infectées traitées. Parmi les complications rencontrées, il y a la faible propagation de l'infection malgré un taux d'infection de départ élevé. Très peu de cellules s'infectent et dès qu'elles le sont, elles forment souvent des *syncytia* ce qui complique le comptage des GS dans des cellules individualisées.

Pour les lignées ARPE-19 et A549, en absence d'infection, le pourcentage de cellules présentant des condensats de G3BP1 et donc considérées comme positives aux GS est constant entre les réplicats expérimentaux et atteint respectivement 99.2% et 99.8% (figure 8B). Nous considérons une cellule positive aux GS si celle-ci présente au moins cinq granules dans son cytoplasme. Les comptages effectués dans les cellules infectées par VZV montrent une diminution significative du pourcentage des cellules positives aux GS. En effet, ce pourcentage atteint en moyenne 11% pour la lignée ARPE-19 infectée et 20% pour la lignée A549 infectée soit une réduction de 89% et 80%, respectivement. Parmi les cellules infectées présentant des GS, une réduction du nombre de GS est néanmoins constatée dans le cytoplasme de ces cellules. Enfin, nous avons remarqué que le pourcentage de cellules positives aux GS dans les cellules voisines aux cellules infectées était inférieur à celui des cellules traitées.



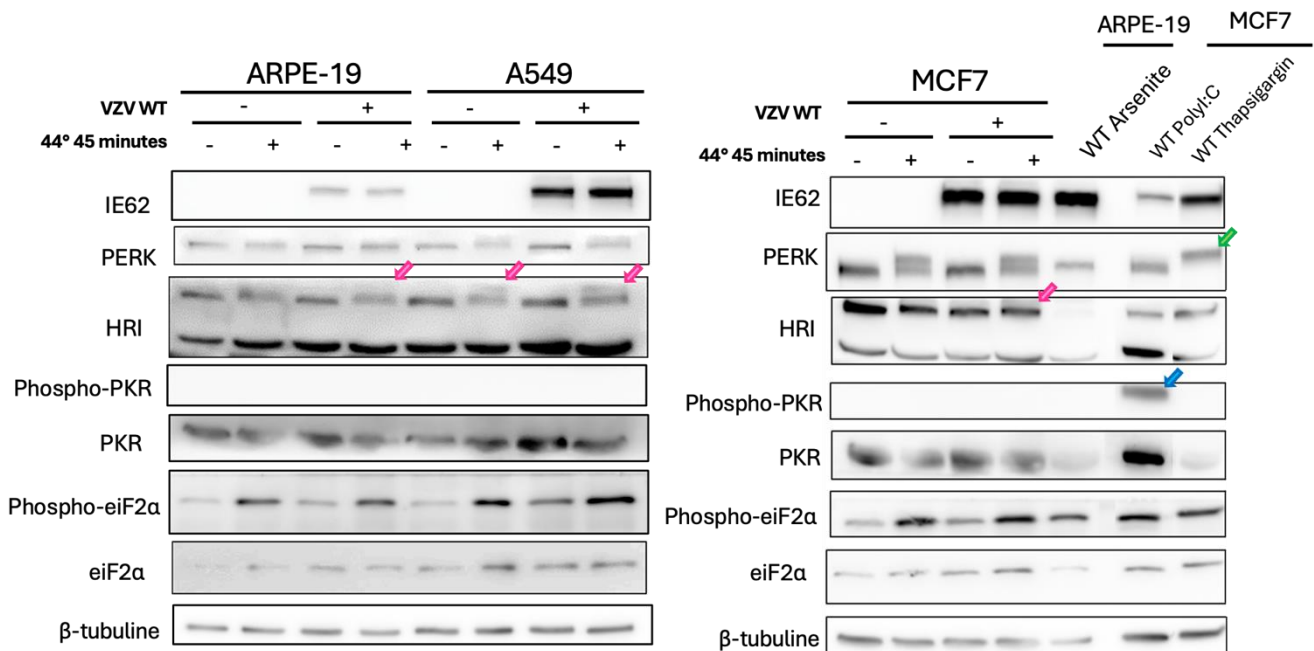
**Figure 8. Inhibition des GS induites par choc thermique dans les cellules infectées par VZV-WT.** Des cellules A549, ARPE-19 et MCF7 ensemencées sur des lamelles de verre ont été infectées ou non par le VZV-WT avant d'être traitées par un choc thermique de 44°C pendant 45 minutes. Le virus WT exprime la GFP, ce qui permet d'identifier les cellules infectées. Une IF a été réalisée avec des anticorps primaires reconnaissant la protéine virale IE63 (en blanc) et la protéine cellulaire G3BP1 (en rouge) et les lames prises en photo au moyen d'un microscope confocal avec un objectif 40x à immersion. A. Photos représentatives pour chacune des trois lignées. Le stress thermique provoque l'apparition de GS (flèches jaunes) pour les 3 lignées cellulaires (A549, ARPE-19 et MCF7). Comme le montre l'overlay, le signal G3BP1 est concentré dans les GS dans les cellules non infectées et se retrouve cytoplasmique lorsque les cellules sont infectées. B. Pourcentage de cellules positives aux GS pour les conditions cellules non infectées (NI) et cellules infectées par le virus VZV-WT. Pour les deux types cellulaires, un comptage a été réalisé sur un minimum de 150 cellules infectées et 150 cellules non infectées et le pourcentage de cellules présentant des GS a été calculé. L'expérience a été réalisée 3 fois et les pourcentages moyens analysés grâce à un t-test non apparié. \*\*\*\*p<0.0001

### 5.1.2. Kinases eIF2 $\alpha$ activées par le traitement

Des expériences de WB ont ensuite été effectuées afin de vérifier l'état d'activation des kinases d'eIF2 $\alpha$  lors du traitement par choc thermique. Les cellules ARPE-19, A549 et MCF7 ont été infectées ou non pendant 48h par le VZV-WT puis soumises ou non à un choc thermique, à 44°C pendant 45 minutes. Une lyse rapide au bleu de chargement a été utilisée pour conserver au mieux les groupements phosphates et les extraits totaux ont été analysés par WB.

Un traitement au poly(I:C) et à la thapsigargin ont été réalisés dans les cellules MCF7 afin de servir de contrôle, à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  d'une part et à l'activation de PKR et PERK d'autre part. L'analyse du WB montre que les traitements à la thapsigargin et au poly(I:C) sont spécifiques et engendrent respectivement la phosphorylation de PKR et PERK. En effet, phospho-PKR est uniquement présent dans le puits contrôle poly(I:C) (flèche bleue figure 9) et la bande PERK est très intense dans ce puits. Dans le contrôle thapsigargin, la bande PERK s'observe à un poids moléculaire plus élevé témoignant de son activation par phosphorylation (flèche verte, figure 9).

Le traitement par choc thermique induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les trois lignées comme en témoignent les bandes plus intenses présentes dans les puits correspondants. Les bandes phospho-eIF2 $\alpha$  des puits traités au choc thermique sont aussi intenses que celles observées dans les trois contrôles positifs. Par contre, il ne semble pas y avoir de réduction entre les puits infectés en comparaison des puits non infectés. Il semblerait même que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  soit plus intense dans les cellules infectées, qu'elles subissent ou non un choc thermique (figure 9).



**Figure 9. Activation des kinases eIF2 $\alpha$  lors d'un traitement par choc thermique.** Des cellules ARPE-19, A549 et MCF7 non infectées ou infectées pendant 24h ou 48h par le virus VZV-WT (WT) et n'ayant subi aucun traitement (NT), une incubation durant 45 minutes à 44°, un traitement à l'arsenite 1 mM pendant 30 minutes, un traitement au poly(I:C) 1,6 $\mu$ g/10<sup>6</sup> cellules pendant 24 heures et un traitement thapsigargin 0,5 $\mu$ M pendant 2 heures ont été lysées. Les extraits totaux ont été analysés par WB. La  $\beta$ -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. Les trois derniers traitements servent de contrôles positifs pour HRI, PKR et PERK.

Pour l'activation d'HRI, la kinase principalement ciblée par ce traitement, les résultats sont moins clairs. En effet, des bandes de faible intensité à un poids moléculaire supérieur semblent présentes pour les échantillons ARPE-19 et A549 traités mais auraient été coupées lors de l'incubation des différents anticorps (flèches roses, figure 9). De plus, dans le contrôle d'activation d'HRI par l'arsenite, une bande située à un poids moléculaire plus important semble également présente. Ces bandes semblent absentes des échantillons contrôle traités au poly(I:C) et à la thapsigargin.

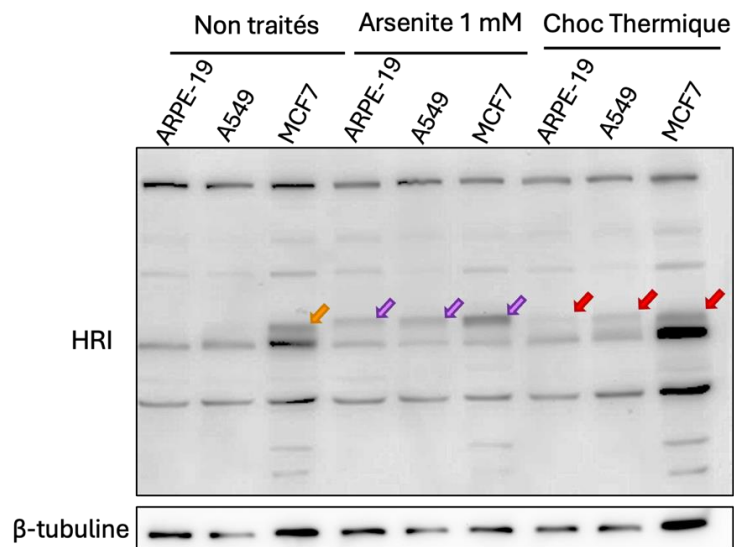
Pour toutes les lignées cellulaires testées, le traitement par choc thermique n'induit pas l'activation de la kinase PKR, résultat qui était attendu. En effet, aucune bande phospho-PKR n'est observée dans les puits traités à 45° pendant 44 minutes.

Lors du traitement par le choc thermique des lignées ARPE-19 et A549, une bande PERK apparait à un poids moléculaire légèrement plus élevé par rapport aux échantillons non traités. Pour les MCF7, le déplacement de la bande PERK est plus marqué et celle-ci se présente sous la forme d'un motif plus étalé.

Afin d'essayer de comprendre les résultats inattendus obtenus avec l'anticorps dirigé contre la kinase HRI lors d'un stress thermique, des cellules ARPE-19, A549 et MCF7 ont été traitées pendant 30 minutes avec de l'arsenite, ou incubées à 44°C pendant 45 minutes ou laissées non traitées. Des extraits totaux ont été réalisés et analysés par WB (figure 10). Pour observer l'activation et la phosphorylation de la kinase HRI lors de ces deux traitements et pour éviter de couper dans les bandes d'intérêt, un gel 7% et une incubation d'HRI sur toute la membrane sont réalisés.

Sur ce gel, des bandes d'un plus haut poids moléculaire apparaissent clairement dans les puits traités à l'arsenite pour les trois lignées cellulaires, la bande la plus intense étant celle du haut et représente la forme phosphorylée de la kinase (flèches mauves, figure 10). Pour le choc thermique, des bandes correspondant à la forme phosphorylée d'HRI apparaissent également mais la bande du bas reste la plus intense (flèches rouges, figure 10). L'activation d'HRI par le choc thermique est donc moins importante qu'après traitement à l'arsenite.

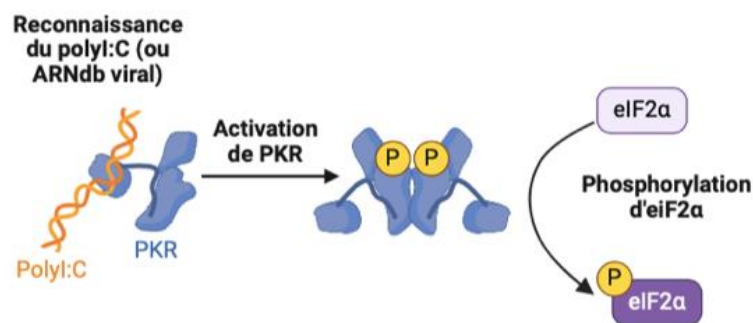
À noter que la lignée MCF7 présente un profil de migration d'HRI différent de celui des autres lignées ainsi qu'un niveau basal de phospho-HRI (flèche orange, figure 10).



**Figure 10. Activation de la kinase HRI par le choc thermique et par le traitement à l'arsenite.** Des cellules ARPE-19, A549 et MCF7 traitées à l'arsenite 1 mM pendant 30 minutes, incubées à 44° C pendant 45 minutes ou non traitées ont été lysées dans du bleu de chargement et les extraits analysés par un WB avec un anticorps anti-HRI. Un contrôle de charge a été effectué avec un anti-β-tubuline, après stripping de la membrane.

## 5.2. Traitement par le poly(I:C)

Le deuxième stress testé est celui engendré par une transfection au poly(I:C), un analogue synthétique de l'ARN double brin (ARNdb) mimant ainsi une infection virale et activant la kinase PKR. Comme le montre la figure 11, le traitement par poly(I:C) cible principalement l'activation de la kinase PKR qui va reconnaître l'ARNdb, dimériser, s'autophosphoryler et phosphoryler le facteur d'initiation de la traduction eIF2α, le rendant ainsi inactif [45].



**Figure 11. Schéma résumant l'activation de la kinase PKR et la phosphorylation d'eIF2α réalisé sur Biorender.**

### 5.2.1. Induction des granules de stress et incapacité d'inhibition par le virus VZV WT

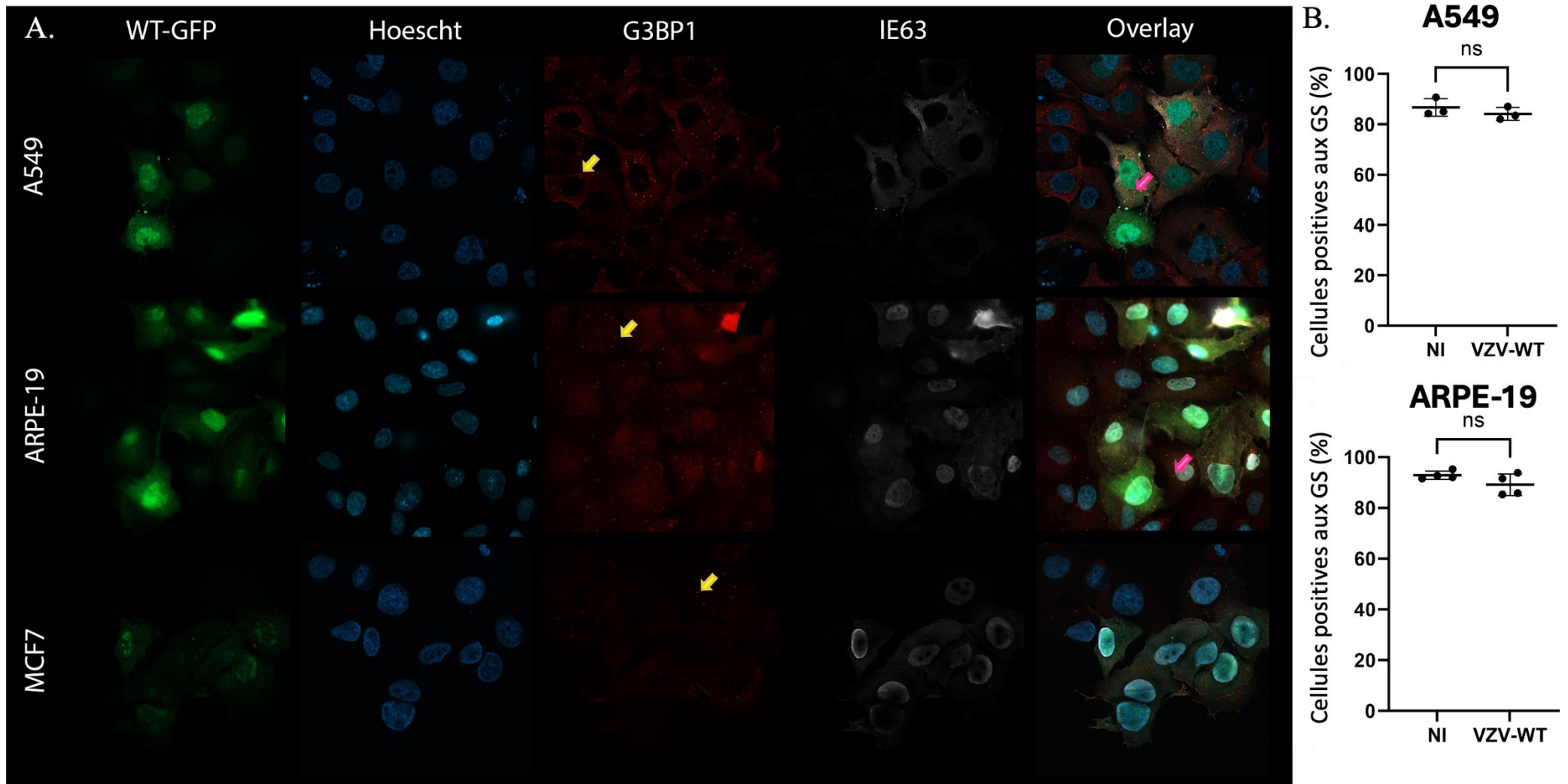
---

Plusieurs concentrations en poly(I:C) et différents paramètres d'ensemencement ont été testés afin d'acquérir la plus forte induction de GS possible. Les conditions optimales pour le marquage par l'IF sont une transfection de  $8,1 \mu\text{g}/10^6$  cellules de poly(I:C) sur des cellules adhérentes infectées ou non par le VZV-WT et présentant une confluence d'environ 70%. Le traitement est laissé pendant 24 heures.

Pour les cellules qui n'ont subi aucun traitement, le signal G3BP1 est diffus dans le cytoplasme des cellules. Après traitement au poly(I:C), le signal de la protéine G3BP1, nucléateur clé de la formation des GS, se concentre au sein des condensats cytoplasmiques (flèches jaunes, figure 12A). Ces GS sont observées dans les lignées ARPE-19, MCF7 et A549. Les GS engendrées par le traitement poly(I:C) présentent un aspect différent de celles obtenues par choc thermique. Elles sont en effet beaucoup plus petites et doivent notamment être observées à l'objectif 63x pour les A549 (flèches jaunes, figure 12A). De plus, le poly(I:C) engendre une induction des GS qui est moins importante que celle observée par le choc thermique. En effet, pour le traitement poly(I:C), le taux de cellules non infectées positives aux GS est compris entre 86 et 92% (figure 12B) pour les lignées A549 et ARPE-19 contre plus de 99 % après traitement au choc thermique.

En plus des difficultés à obtenir un taux d'infection correct en MCF7, l'induction des GS par le poly(I:C) dans cette lignée est très faible, insuffisante pour tirer des conclusions sur une possible inhibition par VZV. Après le comptage des GS dans les deux autres lignées, une très légère réduction du pourcentage de cellules positives aux GS a été mesurée dans les cellules infectées mais aucune inhibition franche n'est observée (figure 12B). Comme le montrent les expériences d'IF, les cellules infectées, identifiables grâce au signal GFP du BAC VZV-WT ou à celui de la protéine virale IE63 marquée, montrent un signal G3BP1 concentré à l'intérieur de condensats cytoplasmiques (flèches roses, figure 12A). En revanche, le nombre de GS au sein des cellules infectées et des cellules voisines semble réduit en comparaison au nombre de GS dans les cellules non infectées transfectées. Le virus VZV-WT n'a donc pas la même capacité d'inhiber la formation des GS lorsque celles-ci sont induites par un analogue d'ARNdb que lors d'un autre traitement (flèches roses, figure 12A).





**Figure 12. Formation des GS induites par le poly(I:C) dans les cellules infectées par VZV-WT.** Des cellules A549, ARPE-19 et MCF7 ensemencées sur des lamelles de verre ont été infectées ou non par le VZV-WT avant d'être traitées au poly(I:C) ( $8,1 \mu\text{g}/10^6$  cellules) pendant 24 heures. Une IF a été réalisée avec des anticorps primaires reconnaissant la protéine virale IE63 (en blanc) et la protéine cellulaire G3BP1 (en rouge) et les lames prises en photo au moyen d'un microscope confocal avec un objectif 40x ou 63x à immersion. A. Photos représentatives pour chacune des trois lignées. Le poly(I:C) provoque l'apparition de GS (flèches jaunes) pour les 3 lignées cellulaires (A549, ARPE-19 et MCF7). Comme le montre l'overlay, le signal G3BP1 est concentré dans les GS chez les cellules non infectées et chez les cellules infectées. B. Pourcentage de cellules positives aux GS pour les conditions cellules non infectées (NI) et cellules infectées par le virus VZV-WT. Pour les deux types cellulaires, un comptage a été réalisé sur un minimum de 150 cellules infectées et 150 cellules non infectées et le pourcentage de cellules présentant des GS a été calculé. L'expérience a été réalisée 3 fois et les pourcentages moyens analysés grâce à un t-test non paillé. ns pour les deux lignées

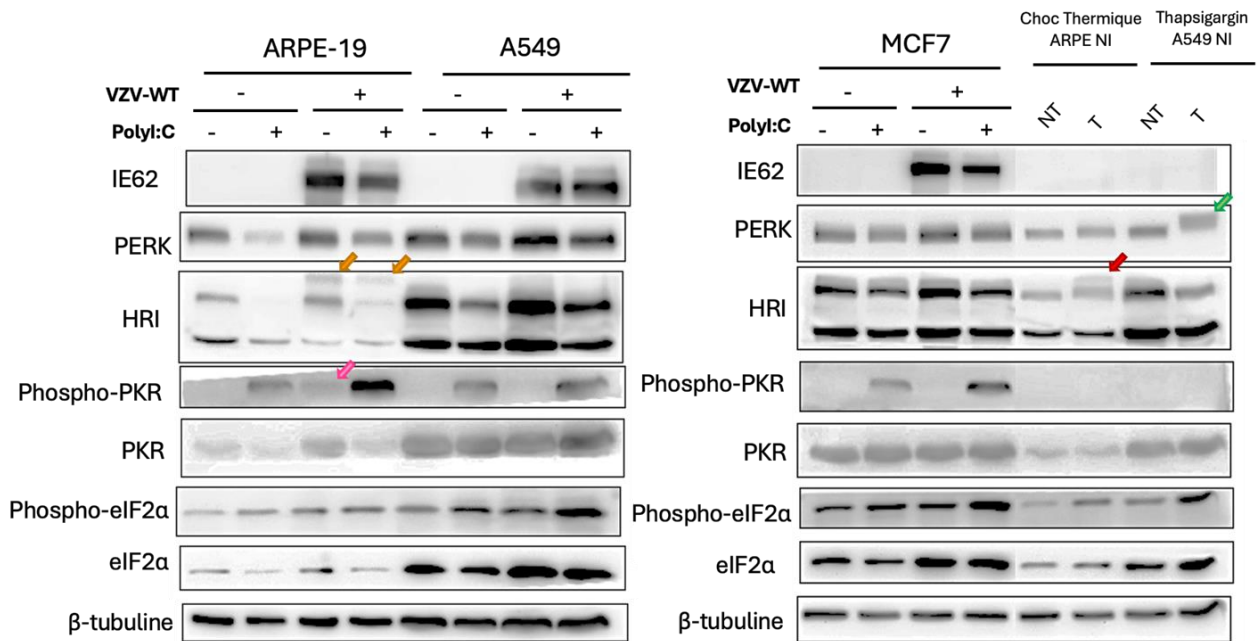
### 5.2.2. Kinases eIF2 $\alpha$ activées par le traitement

Comme pour le traitement par le choc thermique, l'activation des kinases eIF2 $\alpha$  lors d'un traitement par poly(I:C) a été vérifiée par WB. Les cellules ARPE-19, A549 et MCF7 ont été infectées ou non par le VZV-WT puis soumises ou non à une transfection de poly(I:C) de 1,6 $\mu$ g/10<sup>6</sup> cellules pendant 24h. Une lyse rapide au bleu a été effectuée et les extraits totaux ont été analysés par WB.

Pour les contrôles d'activation d'HRI et de PERK ainsi que pour la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , un traitement au choc thermique et à la thapsigargin ont été réalisés dans les cellules ARPE-19 et A549 respectivement. Dans le puits traité au choc thermique, une bande de poids moléculaire plus élevée s'observe et témoigne de l'activation d'HRI (flèche rouge, figure 13). Le traitement à la thapsigargin est également spécifique comme le témoigne la bande PERK présente à un poids moléculaire plus important (flèche verte, figure 13). Aucune bande phospho-PKR n'est présente dans ces puits contrôles. Tous les puits traités induisent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  comme en témoignent les bandes plus intenses présentes dans les puits correspondants. La bande phospho-eIF2 $\alpha$  est plus intense dans les échantillons traités à la thapsigargin.

Tous les puits traités au poly(I:C) présentent bien une bande phospho-PKR, témoignant de l'activation de la kinase PKR. Une bande phospho-eIF2 $\alpha$  est également présente dans chaque puits ayant subi le traitement par poly(I:C). Néanmoins, l'intensité de celle-ci n'augmente avec le traitement poly(I:C) que dans les lignées A549 et MCF7. Cela est moins flagrant pour la lignée ARPE-19 où aucune différence majeure n'apparaît entre les puits non infectés traité et infecté traité (figure 13). De plus, une faible bande phospho-PKR est également présente dans le puits de cellules ARPE-19 infectées par le VZV-WT mais non traitées, insinuant que l'infection seule engendre la phosphorylation de PKR (flèche rose, figure 13). Et, de façon inattendue, une phosphorylation basale de la kinase HRI est présente dans les cellules ARPE-19 infectées, comme le témoigne l'apparition d'une bande de plus haut poids moléculaire (flèches orange, figure 13).

Comme attendu, le traitement au poly(I:C) n'induit ni la phosphorylation de PERK ni celle d'HRI dans aucune des trois lignées cellulaires testées. Cependant, il a été observé que le traitement par le poly(I:C) engendrait une diminution de la quantité totale de PERK, d'HRI mais aussi de PKR dans la lignée ARPE-19 et dans une moindre mesure dans lignée A549.

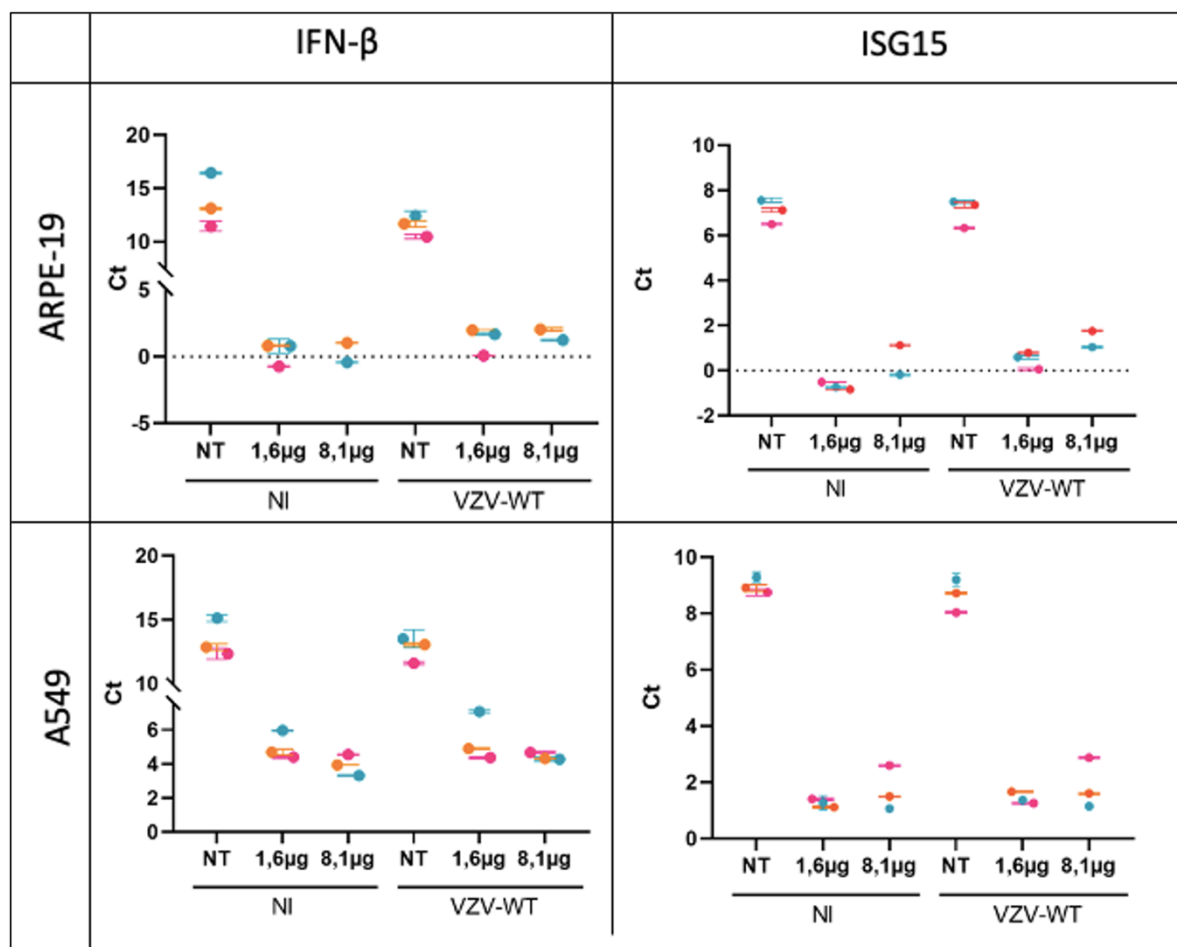


**Figure 13. Activation des kinases eIF2α lors d'un traitement par poly(I:C).** Des cellules ARPE-19, A549 et MCF7 non infectées ou infectées pendant 24h ou 48h par le virus VZV WT (WT) et n'ayant subi aucun traitement (NT), un traitement poly(I:C) pendant 24 heures, un choc thermique à 44° pendant 45 minutes (T), ou un traitement thapsigargin 1 μM pendant 2 heures ont été lysées. Les extraits totaux ont été analysés par western-blot. Les deux derniers traitements servent de contrôles positifs pour l'activation de HRI et PERK.

### 5.2.3. Influence sur la réponse immunitaire innée

Étant donné que le VZV ne semble pas capable d'inhiber complètement la formation des GS induites par un traitement au poly(I:C), nous nous sommes intéressés aux potentielles conséquences de ce traitement sur la réponse immunitaire innée. En effet, le poly(I:C) induit également la voie de détection de RIG-I/MDA5 en plus de celle de l'ISR. Pour cela, nous avons effectué des expériences de RT-qPCR en analysant l'expression des gènes IFN-β et ISG15 induits lors de l'activation de la voie RIG-I/MDA5. Ces analyses permettent d'obtenir des informations quant à l'influence de l'infection par VZV- WT sur la réponse immunitaire cellulaire suite au stress provoquée par la transfection du poly(I:C)

Les cellules ARPE-19 et A549 ont été infectées ou non par le VZV-WT pendant 24h puis soumises ou non à un traitement poly(I:C) de 1,6μg/10<sup>6</sup> cellules ou de 8,1μg/10<sup>6</sup> cellules pendant 24 heures. La moyenne des Ct corrigées a été calculée pour chaque réplicat expérimental et portée en graphique.



**Figure 14. Résultats de l'analyse qPCR pour l'induction des gènes ISG15 et IFN- $\beta$ .** Des cellules ARPE-19 et A549 infectées (VZV-WT) ou non (NI) par le VZV-WT depuis 24h ont subi soit aucun traitement (NT), un traitement avec une concentration en polyI:C de  $1,6\mu\text{g}/10^6$  cellules ou  $8,1\mu\text{g}/10^6$  cellules pendant 24h. Ces expériences ont été effectuées en duplicats ou triplicats selon la lignée cellulaire. Les moyennes des Ct corrigées par rapport au gène rapporteur Ub-C de chaque gène testé en fonction des conditions expérimentales ont été portées en graphique sur GraphPad. Chaque couleur représente un réplicat indépendant de l'expérience, les points représentent la moyenne des 3 Ct corrigées pour chaque gène et chaque condition et les barres indiquent les écart-types de ces moyennes.

L'expression d'ISG15 est similaire dans les cellules non infectées non traitées par rapport aux cellules infectées non traitées pour les deux lignées (figure 14, tableau 6). Ainsi, l'infection par VZV-WT n'engendre aucune différence majeure d'expression génique d'ISG15. Cependant, l'expression de l'IFN- $\beta$  est plus importante dans les cellules infectées que dans les cellules non infectées. Cet effet est visible pour les deux types cellulaires, bien qu'il soit plus important dans la lignée ARPE-19.

Lorsque les cellules sont traitées au poly(I:C), une induction considérable des gènes ISG15 et IFN- $\beta$  est observée. En effet, lors du traitement, les Ct de chaque gène sont grandement diminuées ce qui implique une expression génique plus importante dans ces conditions. Une fois que les cellules infectées par VZV-WT sont traitées, une légère augmentation des valeurs de Ct et donc une plus faible induction de l'expression génique s'observe (flèches vertes et turquoises, tableau 6). Ce phénomène est

plus visible dans la lignée ARPE-19 où pour la plus haute concentration en poly(I:C), les moyennes des Ct des réplicats de l'expérience passent de 0,47 à 1,4 pour le gène ISG15 et de 0,3 à 1,63 pour le gène IFN- $\beta$  une fois les cellules infectées (flèches vertes et turquoises, tableau 6). La présence du virus influence donc la réponse immunitaire innée des cellules et engendre une diminution d'expression géniques d'ISG15 et IFN- $\beta$ .

	IFN $\beta$											
Lignées cellulaires	ARPE-19						A549					
Conditions	NI			VZV-WT			NI			VZV-WT		
Traitement polyI:C	NT	1,6 $\mu$ g	8,1 $\mu$ g	NT	1,6 $\mu$ g	8,1 $\mu$ g	NT	1,6 $\mu$ g	8,1 $\mu$ g	NT	1,6 $\mu$ g	8,1 $\mu$ g
Moyennes des Ct des 3 reproductions	13,67	0,29	0,3	11,52	1,25	1,63	13,44	5,02	3,94	12,72	5,45	4,42
Moyennes des écart-types	0,22	0,2	0,035	0,32	0,03	0,09	0,31	0,08	0,02	0,32	0,05	0,06

	ISG15											
Lignées cellulaires	ARPE-19						A549					
Conditions	NI			VZV-WT			NI			VZV-WT		
Traitement polyI:C	NT	1,6 $\mu$ g	8,1 $\mu$ g	NT	1,6 $\mu$ g	8,1 $\mu$ g	NT	1,6 $\mu$ g	8,1 $\mu$ g	NT	1,6 $\mu$ g	8,1 $\mu$ g
Moyennes des Ct des 3 reproductions	7,06	-0,7	0,47	7,05	0,48	1,4	8,98	1,27	1,72	8,66	1,43	1,88
Moyennes des écart-types	0,08	0,01	0,03	0,07	0,04	0,03	0,13	0,1	0,01	0,09	0,04	0,17

**Tableau 6. Tableau reprenant les moyennes des Ct corrigées et les moyennes des écart-types obtenues lors de la qPCR pour l'induction des gènes ISG15 et IFN $\beta$  chez les lignées A549 et ARPE-19.** Des cellules ARPE-19 et A549 infectées (VZV-WT) ou non (NI) par le VZV-WT depuis 24h ont subi soit aucun traitement (NT), un traitement avec une concentration en polyI:C de 1,6 $\mu$ g/10<sup>6</sup> cellules ou 8,1 $\mu$ g/10<sup>6</sup> cellules pendant 24h. Les moyennes des Ct corrigées par rapport au gène rapporteur Ub-C de chaque gène testé en fonction des conditions expérimentales ont été indiqué dans ce tableau.

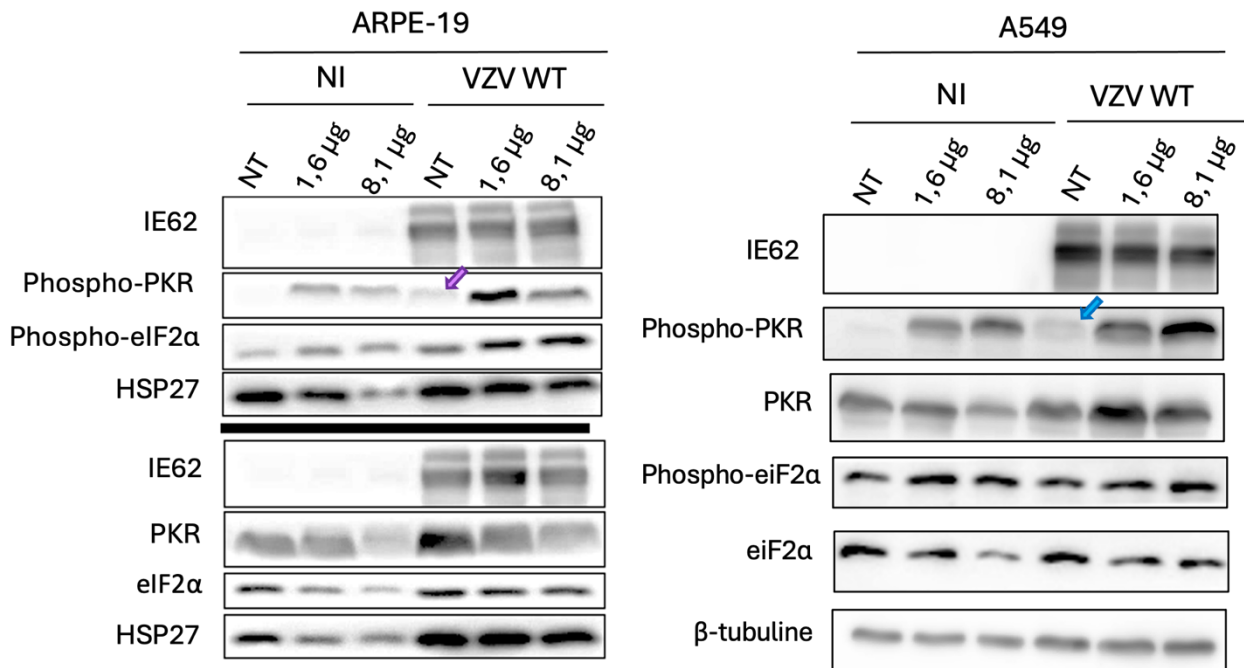
Des extraits protéiques totaux ont été réalisés en parallèle des extraits d'ARN, dans les mêmes conditions expérimentales, afin d'évaluer l'activation de PKR.

Les deux quantités de poly(I:C) transfectées phosphorylent bien la kinase PKR. La plus haute concentration en poly(I:C) semble être mieux tolérée et active davantage la kinase PKR dans la lignée A549 tandis que les ARPE-19 y sont plus sensibles. En effet, pour la lignée ARPE-19, la bande phospho-PKR la plus intense s'observe dans le puits infecté traité avec 1,6 $\mu$ g/10<sup>6</sup> cellules de poly(I:C) (figure 15) tandis que dans les cellules A549, la bande phospho-PKR la plus importante est dans le puits infecté avec la plus haute concentration en poly(I:C). L'intensité de cette bande augmente en fonction de la quantité de poly(I:C) transfectée tant dans les puits non infectés que dans les puits infectés (figure 15). A l'inverse, une légère diminution de PKR et eIF2 $\alpha$  est visible dans les extraits de cellules non infectées lorsque la quantité de poly(I:C) transfectée augmente. Notons que la quantité de  $\beta$ -tubuline est, elle, relativement stable et que cette diminution n'est pas observée dans les cellules infectées.

Comme précédemment observé à la figure 13, dans la lignée ARPE-19, l'intensité de la bande PKR diminue lors du traitement au poly(I:C) et cette diminution est proportionnelle à la quantité de

poly(I:C) transfectée (figure 15) à la fois pour les puits non infectés et infectés. Cette même diminution d'intensité s'observe pour les bandes eIF2 $\alpha$  et HSP27 des puits non infectés.

Que ce soit pour les ARPE-19 ou les A549, le traitement au poly(I:C) induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . De plus, dans les deux lignées, une faible bande phospho-PKR est présente dans la condition non traitée infectée par le VZV-WT (flèche mauve et flèche bleue, figure 15).



**Figure 15. Activation de la kinase PKR et de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par la transfection de poly(I:C) avec deux concentrations différentes en poly(I:C).** Des cellules ARPE-19 et A549 infectées (VZV-WT) ou non (NI) par le VZV-WT depuis 24h ont subi soit aucun traitement (NT), un traitement avec une concentration en polyI:C de 1,6 $\mu$ g/10<sup>6</sup> cellules ou 8,1 $\mu$ g/10<sup>6</sup> cellules pendant 24h avant d'être lysées au bleu. Les extraits totaux ont été analysés par WB. La protéine HSP27 et la  $\beta$ -tubuline ont été utilisées comme contrôle de charge.

### 5.3. Phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ parmi les différentes populations de cellules exposées à plusieurs stress

N'observant pas de réduction de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par WB malgré une inhibition des GS visible par IF dans les cellules infectées, des expériences de FACS ont été mises au point. En effet, ces expériences permettent de comparer les niveaux de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  entre populations de cellules infectées et non infectées différenciées sur base du marqueur GFP exprimée par les cellules infectées. Des cellules ARPE-19 infectées ou non par VZV-WT ont été traitées ou non par choc thermique, arsenite ou poly(I:C). Après trypsinisation, les cellules ont été resuspendues dans un tampon adéquat afin de permettre à l'anticorps anti-phospho-eIF2 $\alpha$  de pénétrer dans les cellules. Après une incubation avec l'anticorps secondaire, les cellules ont été analysées au FACS et l'intensité médiane de

fluorescence (MFI) entre les différentes sous-populations a été calculée. Pour chaque traitement, la MFI de l'échantillon non infecté non traité (NI NT) a été soustrait à la MFI des échantillons et les résultats exprimés en MFI relative.

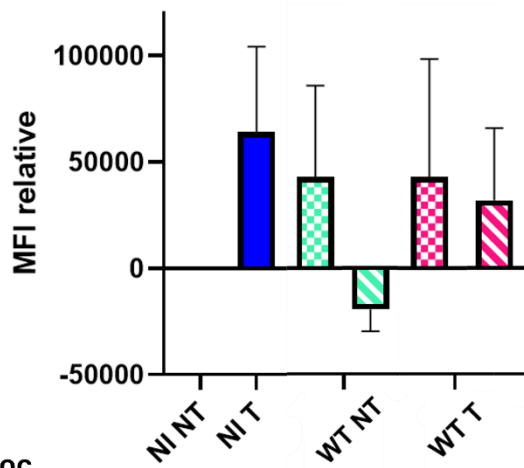
Pour chaque stress testé, la comparaison entre les cellules non infectées non traitées (NI NT) et non infectées traitées (NI T) montre une nette augmentation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  avec le traitement (figure 16). Lorsque les cellules sont infectées (vert), la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est augmentée par rapport aux cellules non infectées (noir). A l'inverse, lorsque les cellules infectées sont traitées (rose), la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est inférieure aux cellules non infectées traitées (bleu). Ces résultats suggèrent que VZV-WT induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  mais qu'il est capable de réduire le niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  en présence d'un traitement.

De façon inattendue, lorsque nous nous intéressons à la sous-population de cellules GFP négatives c'est-à-dire les cellules non infectées du puits infecté (hachuré), elle présente elle aussi une inhibition de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (hachuré rose vs. bleu). Ce phénomène est également visible dans la population de cellules GFP négatives en absence de traitement (hachuré vert vs. noir). Ces résultats suggèrent que les cellules infectées sécrètent un facteur soluble capable de réduire le niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les cellules voisines.

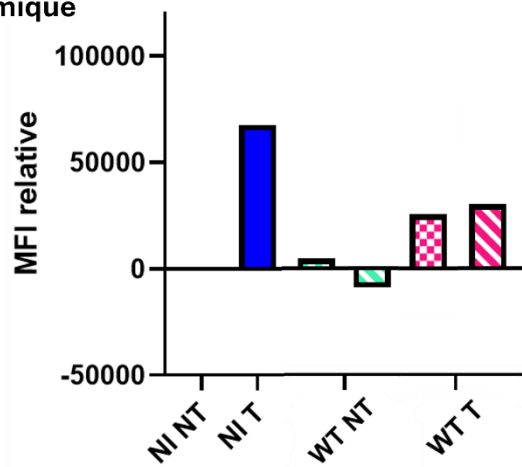
Par ailleurs, nous observons une différence de tendance entre les traitements à l'arsenite et au choc thermique et la transfection au poly(I:C) pour les cellules GFP négatives (hachuré rose, panel A, B et C). Tandis que les cellules GFP négatives traitées à l'arsenite ou au choc thermique ont un signal supérieur aux cellules NI NT – à noter que ce signal reste inférieur aux cellules GFP positives traitées – les cellules GFP négatives transfectées au poly(I:C) ont un signal bien inférieur aux cellules NI NT.

Ces résultats sont à considérer avec beaucoup de recul car nous savons que la transfection au poly(I:C) n'atteint pas 100 % des cellules d'un puits traité, ce qui se traduit par la présence de deux populations de cellules dans la condition NI T (figure S4). La première se compose de cellules avec un signal phospho-eIF2 $\alpha$  semblable à celui obtenu dans les cellules NI NT (figure S4, histogramme mauve) et la deuxième se compose de cellules dont le signal est plus élevé (figure S4). Cette problématique s'applique également aux cellules WT T (figure 16, panel C) et complique davantage l'interprétation des résultats pour ce traitement.

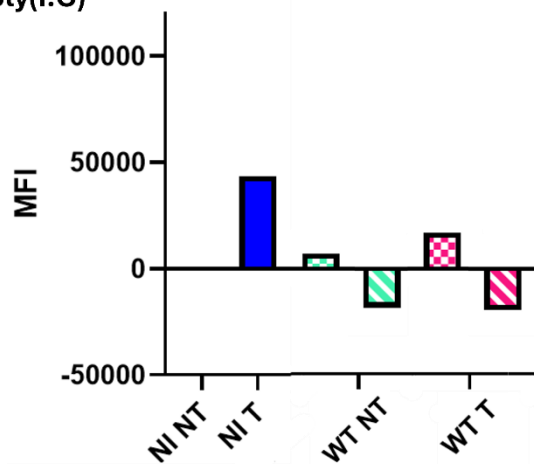
**A. Arsenite**



**B. Choc thermique**



**C. Poly(I:C)**



**Figure 16. Intensité du signal phospho-eIF2 $\alpha$  pour chacun des traitements (arsenite, choc thermique et polyI:C) sur des cellules ARPE-19.** Les graphiques représentent l'intensité de fluorescence médiane (MFI) pour chaque condition testée et selon les populations cellulaires reprises dans la légende à droite. Pour chaque traitement, la MFI est normalisée sur la valeur du puits non infecté non traité (NI NT). L'expérience réalisée avec l'arsenite a été réalisée en triplicat.



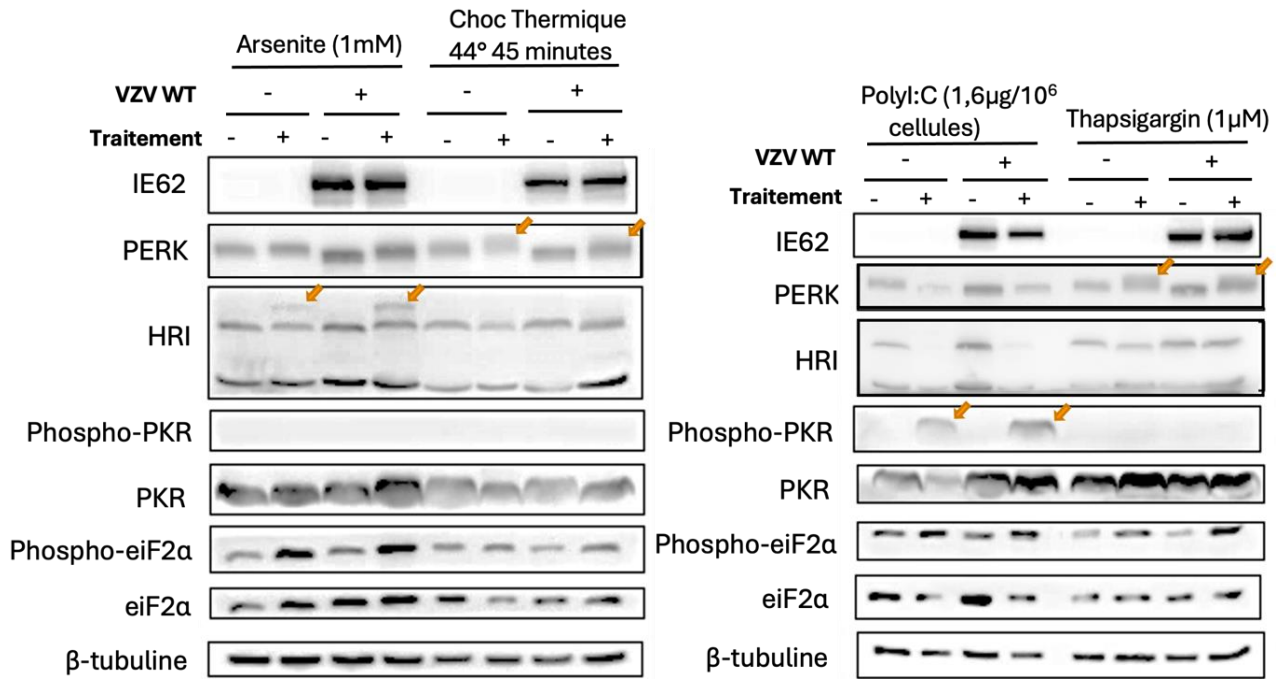
#### 5.4. Induction des granules de stress sur cellules primaires infectées et non infectées

---

Dans le souci d'une approche plus physiologique, les expériences d'induction des différents stress ont été réalisées sur des fibroblastes oraux primaires. Des expériences d'IF et de WB ont été réalisées en parallèle sur ces cellules primaires. Les fibroblastes oraux ont étéensemencés le matin et certains puits ont été infectés le soir même à l'aide des particules virales VZV. Par puit infecté, 200 PFU (*Plaque Forming Unit*) ont été ajoutés pour les expériences d'IF et 660 PFU ont été déposés pour les expériences de WB. Les traitements ont été réalisés 48h après l'infection par le virus libre.

Les résultats d'IF montrent la présence de condensats de G3BP1 dans le cytoplasme des fibroblastes et ce, pour les 4 stress testés (figure S3). Cependant, trop peu de fibroblastes sont présents sur les lames d'IF et l'expérience doit être recommencée. L'influence de l'infection sur la formation des GS cytoplasmiques n'a pas pu être caractérisée à cause de ce manque de cellules sur les lames.

Les résultats de WB montrent que dans les fibroblastes oraux humain, l'arsenite déclenche la phosphorylation d'HRI, comme en témoigne la bande d'un plus haut poids moléculaire observée dans les deux puits traités ; la transfection au poly (I:C) provoque l'apparition de la bande de phospho-PKR et le traitement à la thapsigargin provoque l'apparition d'une bande correspondant à phospho-PERK (figure 17, flèches oranges).



**Figure 17. Activation des kinases eiF2 $\alpha$  par différents traitements effectués sur des fibroblastes oraux.** Des fibroblastes oraux infectées ou non par des particules libres VZV et ayant subi aucun traitement, un traitement arsenite 1mM pendant 30 minutes, un traitement par choc thermique à 44° pendant 45 minutes, un traitement par polyI:C 1,6 $\mu$ g/10<sup>6</sup> cellules pendant 24 heures ou un traitement thapsigargin 1 $\mu$ M pendant 2 heures ont été lysés. Les extraits totaux ont été analysés par WB. La protéine  $\beta$ -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. L'activation des kinases spécifiques au stress induit est représentée par les flèches de orange.

Pour le choc thermique, qui cible normalement l'activation d'HRI tout comme l'arsenite, cela est moins flagrant. Aucune bande nette correspondant à la protéine HRI phosphorylée n'apparaît sur la membrane. Cependant, un léger shift de la protéine PERK s'observe dans les puits traités au choc thermique. Pour les trois premiers stress évoqués, la bande phospho-eiF2 $\alpha$  des puits non infectés et des puits infectés apparaît toujours plus intense dans les puits qui ont subi le traitement par rapport aux puits non traités (figure 17).

De plus, un déplacement de la bande PERK vers le bas est visible dans les puits infecté non traité lorsqu'il est comparé au puits non infecté non traité. La même observation est faite avec les traitements de choc thermique et de thapsigargin. Enfin, dans les puits traités au poly(I:C), on observe une réduction de l'intensité des bandes HRI et PERK par rapport aux puits non traités.

## 6. Discussion

---

Le virus auquel nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce mémoire est le Virus de la Varicelle et du Zona, virus appartenant à l'ordre des *Herpesvirales*, un des plus anciens et important ordre du monde viral [76]. Le VZV cause la varicelle qui touche principalement les enfants en bas âge et n'engendre que très rarement de lourdes complications. Lors de l'infection, le virus atteint les ganglions sensoriels et y établit une latence à vie. Divers stimuli peuvent réactiver le cycle infectieux du virus et causer le Zona, éruption cutanée douloureuse généralement limitée à un seul dermatome.

Lors de stress environnementaux ou intracellulaires, les cellules eucaryotes enclenchent la réponse au stress intégrée (ISR) afin de faire face à ces nouvelles conditions et restaurer l'homéostasie cellulaire. Cette réponse implique plusieurs mécanismes de défense cellulaire qui reposent sur de nombreux capteurs. Parmi ces mécanismes mis en place, nous retrouvons la formation de biocondensats cytoplasmiques dynamiques appelés granules de stress (GS). Les GS participent à l'immunité cellulaire autonome en fournissant aux cellules une voie d'adaptation rapide leur permettant une réorganisation du contenu et des processus cellulaires face au(x) stress détecté(s) [62]. De fait, en concentrant des protéines de signalisation spécifiques, des composants de l'immunité innée ainsi que la machinerie de traduction et des ARNm silencés, les GS se retrouvent au carrefour entre le contrôle de la traduction, la signalisation intracellulaire et la réponse antivirale [3][62]. Afin de contrer leurs fonctions dans la signalisation antivirale et l'arrêt global de la traduction dont ils sont dépendants, de nombreux virus ont développé des stratégies pour inhiber ou exploiter les GS à leurs fins [44].

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont démontré que VZV est capable d'inhiber la formation des GS induites par l'arsenite et cela dans plusieurs types cellulaires. Le but principal de cette recherche est l'identification du ou des mécanismes mis en place par VZV pour inhiber la formation des GS. Pour cela, nous avons investigué si VZV détient la capacité d'inhiber la formation des GS lorsque celles-ci sont induites par d'autres stress chimiques et physiques. Dans un contexte infectieux, l'ISR peut être déclenchée par la kinase PKR qui est-elle-même activée par la détection d'ARNdb. Par exemple, PKR va détecter le génome des virus à ARNdb des rotavirus, les intermédiaires de réplication d'ARNdb des virus à ARNsb positif et négatif et les produits d'ARNdb issus de la transcription des virus à ADN tels que le virus de la vaccine [3]. Bien que les herpèsvirus présentent un génome composé d'ADNdb, il est connu qu'au cours de leur cycle répliatif ces virus, dont HSV-1, peuvent produire des acides nucléiques intermédiaires dont de l'ARNdb détecté par PKR [77]. Au vu de la similarité entre les deux herpèsvirus et donc de la possible présence d'un intermédiaire d'ARNdb capable d'activer PKR, nous nous sommes demandé si l'infection par VZV seule n'engendrait pas la formation de GS. Ainsi, pour chaque type cellulaire testé, nous avons analysé les lames d'IF de cellules non traitées mais infectées par le virus VZV-WT et confirmé l'absence de GS dans ces cellules (figure S2).

Une fois cette hypothèse écartée, nous nous sommes intéressés à la possible inhibition de la formation des GS par VZV lorsque celles-ci sont induites par choc thermique. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence afin d'observer physiquement la formation des GS. Nous avons observé que VZV possède la capacité d'inhiber la formation des GS induites par choc thermique. Par la suite, nous avons vérifié les kinases eIF2 $\alpha$  activées lors d'un traitement par choc thermique dans chacune des lignées cellulaires utilisées par WB. Par la même occasion, nous avons observé la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  lors du traitement. L'activation des kinases eIF2 $\alpha$  et la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les puits infectés traités et infectés non traités ont été comparées.

Par la suite, nous avons testé un second stress et nous avons transfecté les cellules avec du poly(I:C) afin d'activer la kinase PKR. Nous avons évalué si le VZV était capable d'inhiber la formation des GS induites par un traitement au poly(I:C) à l'aide d'expériences d'immunofluorescence. Comme lors du traitement par choc thermique, nous avons regardé l'activation des kinases eIF2 $\alpha$  et la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  par WB. Étant donné que le VZV n'inhibe pas la formation des GS induites par le traitement au poly(I:C), nous nous sommes intéressés à la voie de détection RIG-I/MDA5, également activée par ce traitement. Nous avons effectué des expériences de qPCR afin de voir l'influence du traitement poly(I:C) et de l'infection par VZV sur l'expression de gènes activés par la voie RIG-I/MDA5 à savoir l'IFN- $\beta$  et l'ISG15.

L'inhibition de la formation des GS par VZV observée lors d'un traitement par choc thermique ne semble pas être une conséquence de l'inhibition de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . En effet, une bande intense phospho-eIF2 $\alpha$  en WB s'observe dans les puits infectés traités. Cependant, nous nous sommes demandé si cette bande n'était pas une conséquence de la présence de cellules non infectées au sein du puits infecté traité par choc thermique. Des expériences de FACS capables de différencier les cellules infectées des cellules non infectées sur base du marquage GFP ont alors été réalisées. Nous avons pu observer la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans ces deux populations lorsque des cellules ARPE-19 sont traités par choc thermique, au poly(I:C) et à l'arsenite.

Enfin, dans une approche plus physiologique, nous avons réalisé des expériences d'IF et de WB sur des fibroblastes oraux ayant subi les quatre traitements (choc thermique, poly(I:C), arsenite et thapsigargin).

### 1) Inhibition de la formation des GS médiée par le choc thermique

L'exposition de cellules à un choc thermique (44°C, 45 minutes) a permis la formation de GS visualisées en IF par la concentration du signal G3BP1 dans des condensats cytoplasmiques. Une fois infectées, les cellules ont présenté un signal G3BP1 diffus dans le cytoplasme. Ces résultats ont confirmé la capacité de VZV d'inhiber la formation des GS formée par un choc thermique dans les lignées cellulaires ARPE-19, A549 et MCF7 (figure 8A). Cependant, parmi les cellules infectées, le pourcentage de cellules positives aux GS après choc thermique s'est révélé plus important que celui calculé après traitement à l'arsenite (figure 8B). En effet, le pourcentage de cellules infectées positives aux GS a été

calculé lors d'expériences préliminaires réalisées au laboratoire et vaut 4,9%. Nous avons néanmoins observé une réduction du nombre de GS dans le cytoplasme de ces cellules infectées positives par rapport aux cellules non infectées positives.

Pour vérifier si le traitement activait spécifiquement la kinase HRI, nous avons vérifié par WB l'état d'activation des kinases eIF2 $\alpha$  lorsque les cellules sont traitées par choc thermique. Nous avons remarqué que la kinase PERK est activée dans la lignée MCF7 mais que son profil de migration est différent de celui observé après le traitement à la thapsigargin ciblant spécifiquement PERK (figure 9). Même si nous avons constaté une très légère activation de PERK dans les lignées ARPE-19 et A549, le niveau d'activation de PERK en MCF7 est bien plus marqué (figure 9). Des études ont montré que des conditions de chaleurs excessives conduisaient à une perturbation de l'homéostasie des protéines [78]. Ces perturbations impliquent l'inhibition du repliement des protéines et la dénaturation des protéines existantes, ce qui entraîne leur accumulation et donc induisent un stress du RE perceptible par la kinase PERK [78][79]. Il a été démontré que dans des fibroblastes embryonnaires de souris, PERK et la phosphorylation ultérieure de eIF2 $\alpha$  sont nécessaires à la protection des cellules contre la mort cellulaire induite par le stress thermique [79].

Malgré l'activation de PERK par choc thermique, la kinase HRI est bien phosphorylée par ce traitement. Nous avons réalisé un gel 7% afin de constater l'activation d'HRI par phosphorylation et avons observé que son état de phosphorylation variait en fonction des stress inducteurs (figure 10) [49]. Ces différents niveaux de phosphorylation induits par les deux stress pourraient s'expliquer par des mécanismes d'activation de la kinase distincts. En WB, il a déjà été observé dans des réticulocytes de souris que l'arsenite induisait une hyperphosphorylation de la kinase HRI par rapport à celle induite par le choc thermique [49]. Une étude a montré par spectrométrie de masse, que la protéine HRI de souris surexprimée dans *Escherichia coli* possède 33 sites phosphorylés. Cependant, nous savons également que le mécanisme d'activation d'HRI reste incertain et que la différence d'activation observé entre les deux traitements peut résider dans la production de ROS, impliqués dans l'activation d'HRI par l'arsenite uniquement [49].

Les puits infectés traités par choc thermique montrent une activation de la kinase HRI comme le témoignent la bande de poids moléculaire plus élevé qui apparait dans ces puits (figure 9). De plus, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  semble tout aussi importante voir même plus élevée dans les puits infectés traités par rapport aux puits non infectés traités. Ces résultats suggèrent que VZV est capable d'inhiber la formation des GS indépendamment de l'activation d'HRI et de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .

## 2) Incapacité de VZV à inhiber les GS formées par transfection de poly(I:C)

Le second stress visait la simulation d'une infection virale et l'activation de la kinase PKR à l'aide d'ARNdb synthétique.

La transfection de cellules avec du poly(I:C) a permis la formation de GS, de taille beaucoup plus petite que celles induites par le choc thermique (figure 12A). Il est connu que le type de stress détermine la taille et la composition des granules [80]. Par exemple, lors d'un stress oxydatif, les GS se déplacent de manière dépendante des microtubules et grandissent en taille par fusion [3]. Par ailleurs l'induction des GS par le poly(I:C) était moins efficace, probablement à cause de la transfection qui n'atteignait pas 100%. En effet, l'efficacité de transfection dépend de nombreux facteurs dont la viabilité de la lignée cellulaire, le nombre de passages des cellules ou encore la confluence de celles-ci lors de la transfection. Lors de la transfection de cellules infectées par le virus VZV-WT par du poly(I:C) le signal G3BP1 est resté concentré à l'intérieur de condensats cytoplasmiques. Cependant, nous avons observé une diminution du nombre de GS dans les cellules infectées. Ces résultats suggèrent donc que la capacité de VZV à inhiber des GS formées après transfection de poly(I:C) est fortement limitée.

Par WB, nous avons vérifié l'activation des différentes kinases eIF2 $\alpha$  lorsque les cellules étaient transfectées au poly(I:C) et avons confirmé que ce traitement active bel et bien la kinase PKR dans les trois types cellulaires utilisés (ARPE-19, A549 et MCF7) (figure 13).

Nous avons constaté que l'infection seule suffit à activer PKR dans les lignées ARPE-19 et A549 (figure 13). Nous avons également remarqué que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  était plus importante en présence de VZV-WT et que l'activation de PKR était plus intense dans les puits qui sont à la fois infectés et traités (figure 13 et figure 15). Ces résultats suggèrent la présence d'ARNdb lors du cycle infectieux de VZV mais cette potentielle production d'ARNdb ne serait pas suffisante pour induire des GS dans le cytoplasme de cellules infectées étant donné qu'aucun biocondensat n'est observé sur les lames d'IF. En effet, il se peut que cette faible production ne permette pas d'atteindre le seuil de percolation des GS [53]. Étant donné la faible intensité de la bande phospho-PKR et donc sa légère activation observée dans les échantillons de cellules infectées non traitées, cette hypothèse est envisageable. Une autre hypothèse serait que l'ARNdb produit engendre bel et bien la formation de GS par l'axe phospho-PKR/phospho-eIF2 $\alpha$  mais que ces GS ne soient pas visibles dans nos conditions d'observation. Les paramètres de microscopie confocal utilisés nous permettent de visualiser des « objets » d'une taille d'au moins 500 nm, or les GS présentent une taille allant de 100 à 2000 nm.

Par ailleurs, l'infection par VZV active la kinase HRI uniquement dans la lignée ARPE-19 comme le témoigne l'apparition d'une bande d'un plus haut poids moléculaire sur le WB (figure 13). Les ARPE-19 sont des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) spontanées dérivées des yeux normaux. Cet épithélium monostatif est très sensible aux dommages engendrés par le stress oxydatif causé par la stimulation de facteurs externes (tels que la fumée et les rayons ultraviolets) ou des niveaux élevés de ROS intracellulaires [81]. Il est connu qu'une infection par les coronavirus induit un

déséquilibre entre la production accrue de ROS et la réduction des réponses antioxydantes des cellules hôtes infectées, ce qui entraîne une augmentation du stress redox [82]. Étant donné que l'infection VZV est laissée pendant plus de 24h lors d'un traitement polyI:C, il serait possible que l'infection provoque une augmentation des ROS qui active la kinase HRI dans cette lignée particulièrement sensible au stress oxydatif.

La transfection de poly(I:C) influence également les autres kinases eIF2 $\alpha$ . En effet, nous observons une réduction d'expression des kinases PERK et HRI dans les puits traités des lignées ARPE-19 et A549 mais aussi légèrement pour les MCF7 (figure 13). Cette diminution s'expliquerait par l'inhibition globale de la traduction protéique qui ferait baisser les niveaux d'expression des kinases eIF2 $\alpha$ . Le traitement poly(I:C) agissant pendant 24h, cela laisserait le temps aux cellules de bloquer de façon plus importante la traduction globale des ARNm que lors d'un traitement par choc thermique ou arsenite qui ne durent tous deux que quelques dizaines de minutes.

Lorsque les cellules infectées par VZV sont traitées au poly(I:C), aucune inhibition de la formation des GS n'est constatée (figure 12A). Nous nous sommes donc demandés si la stimulation de PKR induite par le poly(I:C) ne serait pas trop élevée et empêcherait donc l'inhibition par VZV. Pour cela, nous avons testé plusieurs concentrations moins élevées en poly(I:C) mais même dans ces conditions, aucune inhibition n'était observée par le virus.

L'incapacité du virus à inhiber les GS induites par ce traitement pourrait s'expliquer par l'implication de l'immunité innée cellulaire de l'hôte. En effet, le poly(I:C) LMW étant un analogue d'ARNdb dont la taille se situe entre 200 et 1000 paires de base, il active à la fois PKR et les récepteurs cytosoliques RIG-I et MDA5. Afin d'obtenir davantage d'informations, des cellules KO (*knock out*) pour les gènes RIG-I et MDA5 nous permettraient de savoir si la formation des GS induites uniquement par l'ISR peuvent être inhibées par VZV.

La réponse immunitaire innée est indispensable pour contrôler la réplication de VZV. Comme précédemment évoqué, la présence du virus est détectée par plusieurs PRR cellulaires et permet l'induction d'une large gamme d'ISG qui ont des fonctions effectrices antivirales directes. Parmi ceux-ci, nous retrouvons notamment la voie de la PKR et la voie de l'ubiquitine stimulée par l'interféron gène 15 (ISG15) [83]. Les résultats obtenus en qPCR suggèrent que malgré les mécanismes d'échappement de l'immunité innée développés par le virus, l'expression génique de l'IFN- $\beta$  augmente (flèche rouges, tableau 6). Cette observation n'est pas étonnante au vu du nombre de PRR stimulés par VZV dont cGAS, plusieurs TLR et les IFN de type 1 (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) induits à des niveaux élevés [83]. Alors qu'un changement d'expression s'observe pour l'IFN- $\beta$ , aucune différence n'est constatée lorsque nous regardons l'expression génique de l'ISG15 (figure 14). Ce résultat suggère que les mécanismes mis en place par le virus empêchent l'induction de l'ISG15 mais pas celle de l'IFN- $\beta$ . Afin d'obtenir des informations complémentaires et plus générales sur le sujet, il faudrait regarder l'expression d'autres

gènes impliqués dans l'activation de l'immunité innée comme d'autres IFN ou d'autres ISG. Nous pourrions aussi regarder l'expression de gènes activés par l'ISR dont CHOP ou GADD34.

Une fois que les cellules non infectées sont traitées au poly(I:C), la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte est déclenchée, ce qui est marqué par l'induction considérable de l'expression des gènes ISG15 et IFN- $\beta$  (figure 14). La présence de VZV semble engendrer une diminution d'expression des gènes ISG15 et IFN $\beta$  dans les cellules traitées. En effet, dans les deux lignées, une augmentation des Ct s'observe pour les deux gènes lorsque les cellules infectées sont traitées (flèches vertes et flèches turquoise, tableau 6). Ces augmentations sont très légères mais cela suggère une diminution de l'immunité cellulaire de l'hôte à cause par exemple, des mécanismes d'échappement mis en place par le VZV.

Les WB effectués en parallèle des expériences de RT-qPCR ont permis de contrôler l'activation de la kinase PKR dans les conditions utilisées (figure 15). Pour les deux lignées, une bande est présente dans le puits infecté non traité, ce qui suggère de nouveau la présence d'un intermédiaire d'ARNdb lors du cycle VZV.

En A549, nous observons une augmentation de l'expression de phospho-PKR et de phospho-eIF2 $\alpha$  lorsque les concentrations en poly(I:C) sont plus élevées et qui est parallèle à la diminution de l'intensité des bandes PKR et eIF2 $\alpha$ . Cette réduction est bien moins importante une fois les cellules infectées et n'est pas visible dans le contrôle de charge.

La lignée ARPE-19 semble plus sensible au traitement poly(I:C). En effet, le traitement au poly(I:C) affecte l'expression de la protéine HSP27 dont les bandes perdent en intensité avec le traitement. Le même constat est fait pour les bandes eIF2 $\alpha$ , PKR et phospho-PKR pour la plus haute concentration en poly(I:C). HSP27 étant une chaperonne moléculaire, cela n'est pas étonnant que son expression varie lorsqu'un stress est appliqué et le choix de ce contrôle de charge n'était donc pas adéquat. En revanche, on remarque que les bandes phospho-eIF2 $\alpha$  ne perdent pas en intensité.

Une fois les cellules infectées, des résultats tout à fait différents sont obtenus à savoir que la réduction d'intensité des bandes HSP27, eIF2 $\alpha$  et phospho-eIF2 $\alpha$  est nettement moins marquée. Il semblerait donc que l'infection par VZV-WT atténue les effets du traitement délétère aux cellules. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'existence de protéines aux effets anti-apoptiques tels que IE63, ORF66p et ORF12, exprimées par VZV [84].

Les résultats obtenus lors des WB présentent une limitation majeure. En effet, lorsque nous regardons et interprétons les puits infectés, nous observons en réalité un mélange de deux sous-populations : des cellules infectées et des cellules non infectées. Comme nous souhaitons caractériser l'inhibition des GS dans les cellules infectées, il est important de se focaliser uniquement sur cette sous-population. Pour contourner cette limitation, des expériences de FACS ont été réalisées.



Pour chaque stress, nous observons une diminution de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans les conditions infectées non traitées par rapport à la condition NI NT. Cette observation va néanmoins à l'encontre de ce que nous observons en WB pour la lignée ARPE-19. En effet, que ce soit lors des expériences poly(I:C) ou choc thermique, la bande phospho-eIF2 $\alpha$  du puits infecté non traité est toujours plus intense que celle du puits non infecté non traité (figure 9 et figure 15). En analysant les sous-populations du puits infecté par FACS, nous constatons que c'est le niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  des cellules non infectées du puits infecté qui se situe en deçà du contrôle NI NT. Ces résultats suggèrent l'existence d'un facteur soluble sécrété par le virus VZV qui influence l'état de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  des cellules avoisinantes. De plus, cela nous confirme qu'en WB, nous observons la contribution de la sous-population non infectée du puits infecté.

Le traitement à l'arsenite, tout comme le traitement par choc thermique, induit une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , et qui est moins importante dans les conditions infectées. Cela suggère que la présence du virus réduit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  induite par le traitement. De façon intéressante, cette diminution de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est visible dans la sous-population de cellules infectées mais également dans la sous-population de cellules non infectées. Ceci est à nouveau en faveur de l'existence d'un facteur soluble, sécrété par les cellules infectées et susceptible d'inhiber la réponse des cellules non-infectées voisines. Ces résultats corréleront également avec les résultats d'IF où l'inhibition des GS est observée dans les cellules infectées après traitement au choc thermique et à l'arsenite, et, dans une bien moindre mesure, dans les cellules infectées transfectées au poly(I:C) et les cellules voisines des puits infectés traités.

Les résultats de FACS obtenus lors du traitement par le poly(I:C) sont difficilement interprétables. En plus de n'avoir réalisé l'expérience qu'une seule fois, la problématique du taux de transfection s'ajoute. En effet, lorsque nous regardons les puits traités, nous savons qu'ils contiennent des cellules non transfectées qui faussent les valeurs de MFI comme le témoigne le double pic sur l'histogramme de la figure S4. Par ailleurs, la MFI du puits NI T est moins élevée dans le traitement au poly(I:C) par rapport aux deux autres traitements, tout comme le nombre de cellules positives aux GS dans des cellules transfectées. Afin de résoudre ce problème, il faudrait ajouter un marqueur supplémentaire afin de distinguer les cellules transfectées des cellules non transfectées, avec un anticorps anti-ARNdb par exemple.

Afin d'obtenir une approche plus physiologique, nous avons testé les quatre stress (thapsigargin, poly(I:C), arsenite et choc thermique) sur des fibroblastes oraux primaires et avons reproduit les expériences d'IF et de WB. Les IF réalisées pour les 4 traitements montrent bel et bien la formation de GS dans le cytoplasme des fibroblastes comme en témoignent les condensats du signal G3BP1 (figure S3). Nous n'avons pas pu évaluer la possible inhibition de la formation des SG par VZV par manque de fibroblastes sur les lames. Ce faible nombre de fibroblastes présents s'explique par un mauvais

recouvrement des lames d'IF. L'expérience doit être recommencée en recouvrant au préalable les lames avec du collagène afin d'augmenter l'adhérence des fibroblastes sur le verre.

Par WB, nous observons l'activation de la kinase eIF2 $\alpha$  attendue pour les traitements arsenite, poly(I:C) et thapsigargin (figure 10). En effet, les bandes correspondantes à l'activation d'HRI, de PKR et de PERK apparaissent respectivement dans les puits traités. Cependant, pour le choc thermique, nous n'observons pas de bandes d'un poids moléculaire plus élevé pour la kinase HRI mais bien pour la kinase PERK. De plus, nous remarquons que pour les trois autres traitements, la bande phospho-eIF2 $\alpha$  des puits traités est bien plus intense que celle observée dans les puits non traités correspondants. Ce phénomène est moins flagrant lors du traitement par choc thermique témoignant que celui n'a peut-être pas bien fonctionné. Afin d'investiguer l'absence de bande correspondant à la forme activée d'HRI, il serait pertinent de charger ses échantillons sur un gel 7% comme cela a été fait pour les lignées ARPE-19, A549 et MCF7. Enfin, nous constatons la même diminution d'intensité des bandes PERK et HRI lors du traitement au poly(I:C), ce qui corrèle avec les résultats précédemment obtenus. Nous avons ainsi confirmé nos résultats dans des fibroblastes oraux primaires, des cellules plus proches du tropisme cellulaire naturel de VZV.

Finalement, plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'inhibition de la formation de GS observée dans les cellules infectées après traitement à l'arsenite, à la thapsigargin ou au choc thermique mais non au poly(I:C). Sur les WB réalisés, nous constatons l'activation des kinases eIF2 $\alpha$  et la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  souvent plus intenses dans les puits infectés traités. Malgré le mélange de populations de cellules infectées et non infectées dans ces puits, ces résultats suggèrent que l'inhibition se produit en aval de l'activation des kinases par le stress. Nous pouvons ainsi imaginer que le virus exprime une protéine qui agit en aval de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Il a été récemment découvert que les virus faisant partie des antagonistes de classe IV agissaient au niveau de l'eIF2B, permettant ainsi la formation du complexe ternaire et l'initiation de la traduction même à des concentrations extrêmement élevées de phospho-eIF2 $\alpha$ . Par exemple, la protéine AcP10 du Beluga Whale coronavirus SW1 (BW-CoV SW1) entre en compétition avec la forme phosphorylée d'eIF2 $\alpha$  afin de s'associer avec eIF2B permettant ainsi la formation continue du CT [85]. Ce mécanisme ne serait en revanche pas suffisant pour empêcher la formation des GS après transfection de poly(I:C) du fait de l'activation des voies signalétiques de l'immunité innée cellulaire que le virus n'arriverait pas à contourner.

Les résultats obtenus par IF et FACS suggèrent finalement deux mécanismes d'évitement de l'ISR : l'inhibition des GS en présence du virus dans les cellules infectées d'une part et une diminution de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  médiée par un facteur soluble viral d'autre part. Ces mécanismes pourraient être inefficaces après transfection de polyI:C qui ne cible pas uniquement l'ISR mais également d'autres voies signalétiques de la réponse immunitaire innée.

Afin de comprendre les mécanismes d'inhibition développés par VZV, des mutants pour chaque ORF du génome vont être générés. En parallèle, afin d'identifier la classe cinétique d'expression de la ou des protéine(s) inhibitrice(s) virale(s), des expériences avec un inhibiteur de l'ADN polymérase virale permettront de nous aiguiller sur quels ORF seraient les plus intéressants de caractériser.

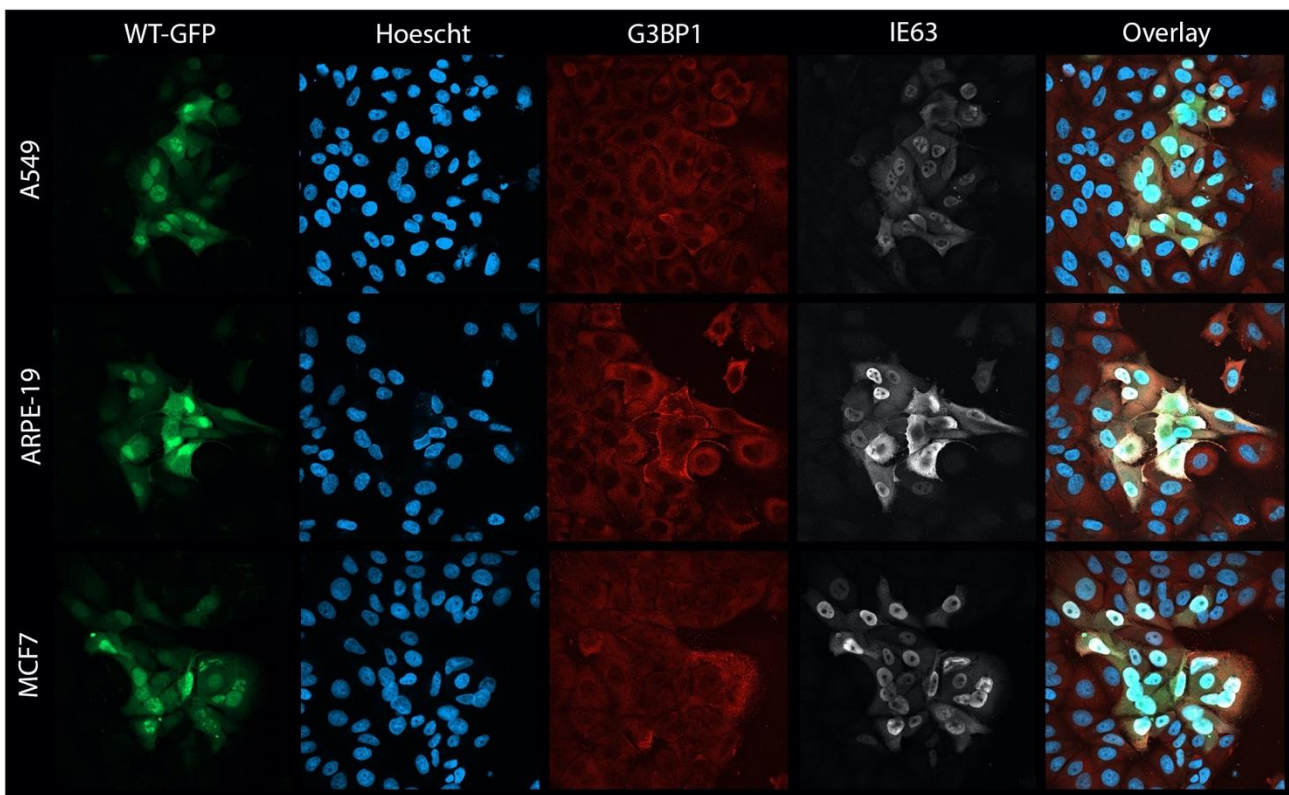
## 7. Annexes

### 7.1. Amorces de qPCR

Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens
<i>IE63</i>	5'-GACGCAGTGCTTACGCGTACT-3'	5'-CGCTATCGTCTTCACCACCATCA-3'
<i>gB</i>	5'-CGCCCGTCTCTATCTCCAAGAATT-3'	5'-GGCACGCAACTCAACTGGCA-3'
<i>RPL32</i>	5'-CATCTCCTTCTCGGCATCA-3'	5'-AACCCCTGTTGTCAATGCCTC-3'
<i>Ub-C</i>	5'-CTGGAAGATGGTCGTACCCTG-3'	5'-GGTCTTGCCAGTGAGTGTCT-3'
<i>IFN-β</i>	5'-AGTAGGCGACACTGTTCGTG-3'	5'-AGCCTCCATTCAATTGCCA-3'
<i>ISG15</i>	5'-CATCTTGCCAGTACAGGAGCT-3'	5'-ACACCTGGAATTCGTTGCC-3'

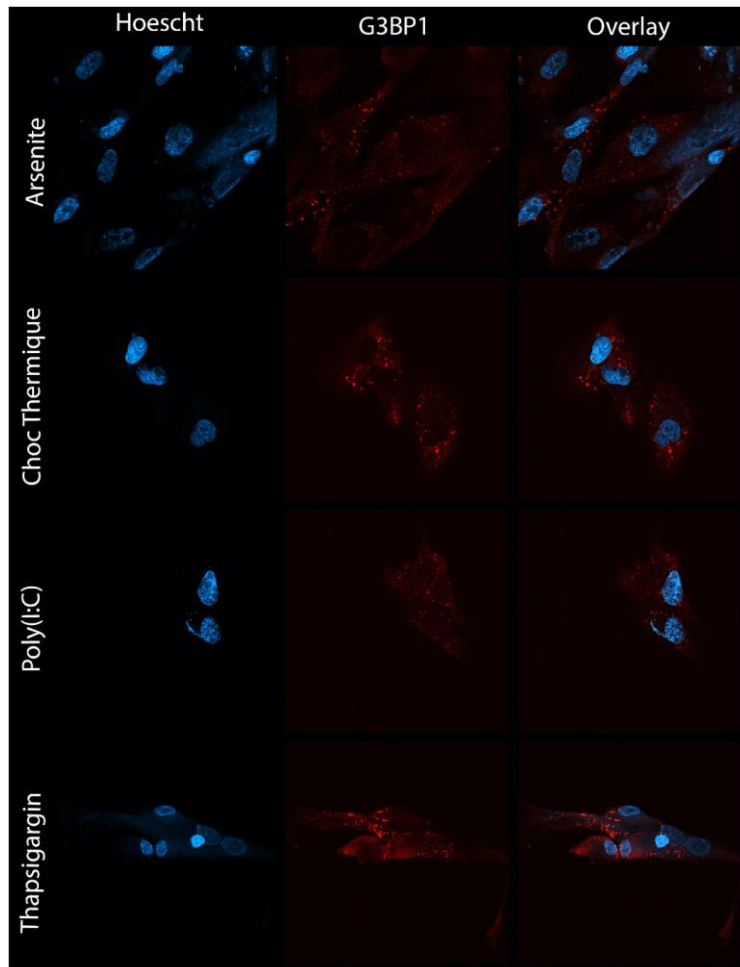
**Tableau S1.** Séquences des amorces sens et anti-sens utilisés lors des expériences de RT-qPCR.

### 7.2. Absence de GS lors d'une infection par VZV -WT



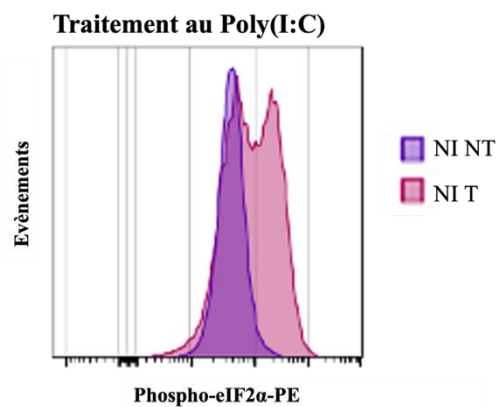
**Figure S2.** Expériences d'immunofluorescence pour les trois lignées cellulaires utilisées (ARPE-19, A549 et MCF7). La présence du VZV-WT, observable par le signal GFP du BAC VZV-WT ou par le signal IE63 (en blanc), n'engendre pas la formation de GS comme le témoigne le signal diffus de la protéine G3BP1 dans le cytoplasme des cellules infectées (en rouge).

### 7.3. Formation des GS dans des fibroblastes oraux



**Figure S3.** Expériences d'immunofluorescence sur des fibroblastes oraux traités avec 4 stress distincts. Le signal G3BP1 est concentré à l'intérieur de biocondensats témoignant de la formation des GS cytoplasmiques induites par les différents traitements.

### 7.4. Sous-populations de cellules du puits traité au poly(I:C)



**Figure S4.** Graphique d'analyse FACS du nombre d'évènements en fonction de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  lorsqu'un puits de cellules ARPE-19 non infectées est traité au poly(I:C).

## Bibliographie

---

- [1] J. Louten, « Virus Structure and Classification », in *Essential Human Virology*, Elsevier, 2016, p. 19-29. doi: 10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8.
- [2] S. Rampersad et P. Tennant, « Replication and Expression Strategies of Viruses », in *Viruses*, Elsevier, 2018, p. 55-82. doi: 10.1016/B978-0-12-811257-1.00003-6.
- [3] N. Eiermann, K. Haneke, Z. Sun, G. Stoecklin, et A. Ruggieri, « Dance with the Devil: Stress Granules and Signaling in Antiviral Responses », *Viruses*, vol. 12, n° 9, p. 984, sept. 2020, doi: 10.3390/v12090984.
- [4] A. Harper *et al.*, « Viral Infections, the Microbiome, and Probiotics », *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 10, p. 596166, févr. 2021, doi: 10.3389/fcimb.2020.596166.
- [5] A. Cann, *Principles of molecular virology*, Sixth edition. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016.
- [6] J. Fierer, D. Looney, M. Kok, et J.-C. Pechère, « Nature and pathogenicity of microorganisms », in *Infectious Diseases*, Elsevier, 2010, p. 3-29. doi: 10.1016/B978-0-323-04579-7.00001-0.
- [7] P. Hidalgo et R. A. González, « DNA virus replication », in *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, 2024, p. 2115-2129. doi: 10.1016/B978-0-12-818619-0.00080-0.
- [8] J. Louten, « Virus Replication », in *Essential Human Virology*, Elsevier, 2016, p. 49-70. doi: 10.1016/B978-0-12-800947-5.00004-1.
- [9] S. L. Oliver, M. Zhou, et A. M. Arvin, « Varicella-zoster virus: molecular controls of cell fusion-dependent pathogenesis », *Biochemical Society Transactions*, vol. 48, n° 6, p. 2415-2435, déc. 2020, doi: 10.1042/BST20190511.
- [10] W.-S. Ryu, « Discovery and Classification », in *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, Elsevier, 2017, p. 3-20. doi: 10.1016/B978-0-12-800838-6.00001-1.
- [11] M. M. Albà, R. Das, C. A. Orengo, et P. Kellam, « Genomewide Function Conservation and Phylogeny in the Herpesviridae », *Genome Res.*, vol. 11, n° 1, p. 43-54, janv. 2001, doi: 10.1101/gr.149801.
- [12] A. J. Davison, « Overview of classification », in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, et K. Yamanishi, Éd., Cambridge: Cambridge University Press, 2007. Consulté le: 21 août 2024. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47406/>
- [13] « C Sadzot-Delvaux, E Di Valentin, S Bontems. Le virus de la varicelle et du zona : un alphaherpesvirus pas vraiment comme les autres... Virologie. 2006;10(3):219-232. ».
- [14] X. Jin *et al.*, « The battle between the innate immune cGAS-STING signaling pathway and human herpesvirus infection », *Front. Immunol.*, vol. 14, p. 1235590, août 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1235590.
- [15] D. Bhowmik et F. Zhu, « Evasion of Intracellular DNA Sensing by Human Herpesviruses », *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 11, p. 647992, mars 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.647992.
- [16] R. Tayyar et D. Ho, « Herpes Simplex Virus and Varicella Zoster Virus Infections in Cancer Patients », *Viruses*, vol. 15, n° 2, p. 439, févr. 2023, doi: 10.3390/v15020439.
- [17] P. R. Kinchington, A. J. S. Leger, J.-M. G. Guedon, et R. L. Hendricks, « Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave », *Herpesviridae*, vol. 3, n° 1, p. 5, déc. 2012, doi: 10.1186/2042-4280-3-5.
- [18] C. Tommasi et J. Breuer, « The Biology of Varicella-Zoster Virus Replication in the Skin », *Viruses*, vol. 14, n° 5, p. 982, mai 2022, doi: 10.3390/v14050982.
- [19] A. A. Gershon *et al.*, « Varicella zoster virus infection », *Nat Rev Dis Primers*, vol. 1, n° 1, p. 15016, juill. 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.16.
- [20] K. J. Laing, W. J. D. Ouwendijk, D. M. Koelle, et G. M. G. M. Verjans, « Immunobiology of Varicella-Zoster Virus Infection », *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 218, n° suppl\_2, p. S68-S74, sept. 2018, doi: 10.1093/infdis/jiy403.
- [21] L. Zerboni, N. Sen, S. L. Oliver, et A. M. Arvin, « Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis », *Nat Rev Microbiol.*, vol. 12, n° 3, p. 197-210, mars 2014, doi: 10.1038/nrmicro3215.

- [22] « B. Rentier, C. Sadzot-Delvaux. Les virus de la varicelle et du zona dans le système nerveux : retraite silencieuse ou guérilla permanente ?. *Virologie*. 2000;4(3):207-16. ».
- [23] P. Vandevenne, C. Sadzot-Delvaux, et J. Piette, « Innate immune response and viral interference strategies developed by Human Herpesviruses », *Biochemical Pharmacology*, vol. 80, n° 12, p. 1955-1972, déc. 2010, doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.001.
- [24] A. Patil, M. Goldust, et U. Wollina, « Herpes zoster: A Review of Clinical Manifestations and Management », *Viruses*, vol. 14, n° 2, p. 192, janv. 2022, doi: 10.3390/v14020192.
- [25] M. Reichelt, J. Brady, et A. M. Arvin, « The Replication Cycle of Varicella-Zoster Virus: Analysis of the Kinetics of Viral Protein Expression, Genome Synthesis, and Virion Assembly at the Single-Cell Level », *J Virol*, vol. 83, n° 8, p. 3904-3918, avr. 2009, doi: 10.1128/JVI.02137-08.
- [26] J. E. Scott et A. J. Davison, « The Complete DNA Sequence of Varicella-Zoster Virus », *Journal of General Virology*, vol. 67, n° 9, p. 1759-1816, sept. 1986, doi: 10.1099/0022-1317-67-9-1759.
- [27] J. J. Chen, Z. Zhu, A. A. Gershon, et M. D. Gershon, « Mannose 6-Phosphate Receptor Dependence of Varicella Zoster Virus Infection In Vitro and in the Epidermis during Varicella and Zoster », *Cell*, vol. 119, n° 7, p. 915-926, déc. 2004, doi: 10.1016/j.cell.2004.11.007.
- [28] T. Suenaga, T. Satoh, P. Somboonthum, Y. Kawaguchi, Y. Mori, et H. Arase, « Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, n° 2, p. 866-871, janv. 2010, doi: 10.1073/pnas.0913351107.
- [29] D. P. Depledge, T. Sadaoka, et W. J. D. Ouwendijk, « Molecular Aspects of Varicella-Zoster Virus Latency », *Viruses*, vol. 10, n° 7, p. 349, juin 2018, doi: 10.3390/v10070349.
- [30] J. I. Cohen, « The Varicella-Zoster Virus Genome », in *Varicella-zoster Virus*, vol. 342, A. Abendroth, A. M. Arvin, et J. F. Moffat, Éd., in Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 342. , Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, p. 1-14. doi: 10.1007/82\_2010\_10.
- [31] H.-S. Lin *et al.*, « The varicella-zoster virus ORF16 protein promotes both the nuclear transport and the protein abundance of the viral DNA polymerase subunit ORF28 », *Virus Research*, vol. 345, p. 199379, juill. 2024, doi: 10.1016/j.virusres.2024.199379.
- [32] J.-M. Anaya, Y. Shoenfeld, A. Rojas-Villarraga, R. A. Levy, et R. Cervera, Éd., *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Bogota (Colombia): El Rosario University Press, 2013. Consulté le: 27 août 2024. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459447/>
- [33] K. Majzoub, F. Wensch, et T. F. Baumert, « The Innate Antiviral Response in Animals: An Evolutionary Perspective from Flagellates to Humans », *Viruses*, vol. 11, n° 8, p. 758, août 2019, doi: 10.3390/v11080758.
- [34] M. Carty, C. Guy, et A. G. Bowie, « Detection of Viral Infections by Innate Immunity », *Biochemical Pharmacology*, vol. 183, p. 114316, janv. 2021, doi: 10.1016/j.bcp.2020.114316.
- [35] J. Rehwinkel et M. U. Gack, « RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing », *Nat Rev Immunol*, vol. 20, n° 9, p. 537-551, sept. 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0288-3.
- [36] M. C. Verweij *et al.*, « Varicella Viruses Inhibit Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling through Multiple Mechanisms », *PLoS Pathog*, vol. 11, n° 5, p. e1004901, mai 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004901.
- [37] J. P. Wang, E. A. Kurt-Jones, O. S. Shin, M. D. Manchak, M. J. Levin, et R. W. Finberg, « Varicella-zoster virus activates inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages via Toll-like receptor 2 », *J Virol*, vol. 79, n° 20, p. 12658-12666, oct. 2005, doi: 10.1128/JVI.79.20.12658-12666.2005.
- [38] C. Gerada *et al.*, « Manipulation of the Innate Immune Response by Varicella Zoster Virus », *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 1, janv. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00001.
- [39] J. Hertzog *et al.*, « Varicella - Zoster virus ORF9 is an antagonist of the DNA sensor cGAS », *The EMBO Journal*, vol. 41, n° 14, p. e109217, juill. 2022, doi: 10.15252/embj.2021109217.
- [40] N. Sen, M. Sommer, X. Che, K. White, W. T. Ruyechan, et A. M. Arvin, « Varicella-Zoster Virus Immediate-Early Protein 62 Blocks Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) Phosphorylation at Key Serine Residues: a Novel Mechanism of IRF3 Inhibition among

- Herpesviruses », *J Virol*, vol. 84, n° 18, p. 9240-9253, sept. 2010, doi: 10.1128/JVI.01147-10.
- [41] P. Vandevenne *et al.*, « The Varicella-Zoster Virus ORF47 Kinase Interferes with Host Innate Immune Response by Inhibiting the Activation of IRF3 », *PLoS ONE*, vol. 6, n° 2, p. e16870, févr. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0016870.
- [42] A. P. N. Ambagala et J. I. Cohen, « Varicella-Zoster Virus IE63, a Major Viral Latency Protein, Is Required To Inhibit the Alpha Interferon-Induced Antiviral Response », *J Virol*, vol. 81, n° 15, p. 7844-7851, août 2007, doi: 10.1128/JVI.00325-07.
- [43] K. Pakos - Zebrucka, I. Koryga, K. Mnich, M. Ljubic, A. Samali, et A. M. Gorman, « The integrated stress response », *EMBO Reports*, vol. 17, n° 10, p. 1374-1395, oct. 2016, doi: 10.15252/embr.201642195.
- [44] M. Costa-Mattioli et P. Walter, « The integrated stress response: From mechanism to disease », *Science*, vol. 368, n° 6489, p. eaat5314, avr. 2020, doi: 10.1126/science.aat5314.
- [45] N. Donnelly, A. M. Gorman, S. Gupta, et A. Samali, « The eIF2 $\alpha$  kinases: their structures and functions », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 70, n° 19, p. 3493-3511, oct. 2013, doi: 10.1007/s00018-012-1252-6.
- [46] D. R. Cavener, S. Gupta, et B. C. McGrath, « PERK in beta cell biology and insulin biogenesis », *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 21, n° 12, p. 714-721, déc. 2010, doi: 10.1016/j.tem.2010.08.005.
- [47] S. Gupta, B. McGrath, et D. R. Cavener, « PERK (EIF2AK3) Regulates Proinsulin Trafficking and Quality Control in the Secretory Pathway », *Diabetes*, vol. 59, n° 8, p. 1937-1947, août 2010, doi: 10.2337/db09-1064.
- [48] G. O. Nwosu, J. A. Powell, et S. M. Pitson, « Targeting the integrated stress response in hematologic malignancies », *Exp Hematol Oncol*, vol. 11, n° 1, p. 94, nov. 2022, doi: 10.1186/s40164-022-00348-0.
- [49] L. Lu, A.-P. Han, et J.-J. Chen, « Translation Initiation Control by Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$  Kinase in Erythroid Cells under Cytoplasmic Stresses », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 21, n° 23, p. 7971-7980, déc. 2001, doi: 10.1128/MCB.21.23.7971-7980.2001.
- [50] P. A. Lemaire, E. Anderson, J. Lary, et J. L. Cole, « Mechanism of PKR Activation by dsRNA », *Journal of Molecular Biology*, vol. 381, n° 2, p. 351-360, août 2008, doi: 10.1016/j.jmb.2008.05.056.
- [51] J. Cole, « Activation of PKR: an open and shut case? », *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 32, n° 2, p. 57-62, févr. 2007, doi: 10.1016/j.tibs.2006.12.003.
- [52] A. Khong, T. Matheny, S. Jain, S. F. Mitchell, J. R. Wheeler, et R. Parker, « The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules », *Molecular Cell*, vol. 68, n° 4, p. 808-820.e5, nov. 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.015.
- [53] S. Hofmann, N. Kedersha, P. Anderson, et P. Ivanov, « Molecular mechanisms of stress granule assembly and disassembly », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1868, n° 1, p. 118876, janv. 2021, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118876.
- [54] P. Anderson et N. Kedersha, « Stress granules: the Tao of RNA triage », *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 33, n° 3, p. 141-150, mars 2008, doi: 10.1016/j.tibs.2007.12.003.
- [55] P. F. Renz, F. Valdivia-Francia, et A. Sendoel, « Some like it translated: small ORFs in the 5' UTR », *Experimental Cell Research*, vol. 396, n° 1, p. 112229, nov. 2020, doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112229.
- [56] A. Marcelo, R. Koppenol, L. P. De Almeida, C. A. Matos, et C. Nóbrega, « Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? », *Cell Death Dis*, vol. 12, n° 6, p. 592, juin 2021, doi: 10.1038/s41419-021-03873-8.
- [57] C. McCormick et D. A. Khapersky, « Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response », *Nat Rev Immunol*, vol. 17, n° 10, p. 647-660, oct. 2017, doi: 10.1038/nri.2017.63.
- [58] E. Connolly, S. Braunstein, S. Formenti, et R. J. Schneider, « Hypoxia Inhibits Protein Synthesis through a 4E-BP1 and Elongation Factor 2 Kinase Pathway Controlled by mTOR and Uncoupled in Breast Cancer Cells », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, n° 10, p. 3955-3965, mai 2006, doi: 10.1128/MCB.26.10.3955-3965.2006.



- [59] P. Anderson et N. Kedersha, « RNA granules », *The Journal of Cell Biology*, vol. 172, n° 6, p. 803-808, mars 2006, doi: 10.1083/jcb.200512082.
- [60] N. Kedersha et P. Anderson, « Chapter 4 Regulation of Translation by Stress Granules and Processing Bodies », in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 90, Elsevier, 2009, p. 155-185. doi: 10.1016/S1877-1173(09)90004-7.
- [61] B. Wang *et al.*, « Liquid–liquid phase separation in human health and diseases », *Sig Transduct Target Ther*, vol. 6, n° 1, p. 290, août 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00678-1.
- [62] M. J. Brownsword et N. Locker, « A little less aggregation a little more replication: Viral manipulation of stress granules », *WIREs RNA*, vol. 14, n° 1, p. e1741, janv. 2023, doi: 10.1002/wrna.1741.
- [63] N. Kedersha, P. Ivanov, et P. Anderson, « Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? », *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 38, n° 10, p. 494-506, oct. 2013, doi: 10.1016/j.tibs.2013.07.004.
- [64] J. L. Martin, S. J. Dawson, et J. E. Gale, « An emerging role for stress granules in neurodegenerative disease and hearing loss », *Hearing Research*, vol. 426, p. 108634, déc. 2022, doi: 10.1016/j.heares.2022.108634.
- [65] H. Mahboubi et U. Stochaj, « Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1863, n° 4, p. 884-895, avr. 2017, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.12.022.
- [66] R. E. Lloyd, « How Do Viruses Interact with Stress-Associated RNA Granules? », *PLoS Pathog*, vol. 8, n° 6, p. e1002741, juin 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002741.
- [67] Y. Guan *et al.*, « Multiple functions of stress granules in viral infection at a glance », *Front. Microbiol.*, vol. 14, p. 1138864, mars 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1138864.
- [68] B. He, « Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses », *Cell Death Differ*, vol. 13, n° 3, p. 393-403, mars 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401833.
- [69] H. H. Rabouw *et al.*, « Inhibition of the integrated stress response by viral proteins that block p-eIF2–eIF2B association », *Nat Microbiol*, vol. 5, n° 11, p. 1361-1373, juill. 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0759-0.
- [70] J. Poppers, M. Mulvey, D. Khoo, et I. Mohr, « Inhibition of PKR Activation by the Proline-Rich RNA Binding Domain of the Herpes Simplex Virus Type 1 Us11 Protein », *J Virol*, vol. 74, n° 23, p. 11215-11221, déc. 2000, doi: 10.1128/JVI.74.23.11215-11221.2000.
- [71] T. He *et al.*, « Host shutoff activity of VHS and SOX-like proteins: role in viral survival and immune evasion », *Virol J*, vol. 17, n° 1, p. 68, mai 2020, doi: 10.1186/s12985-020-01336-8.
- [72] N. R. Sharma, V. Majerciak, M. J. Kruhlak, et Z.-M. Zheng, « KSHV inhibits stress granule formation by viral ORF57 blocking PKR activation », *PLoS Pathog*, vol. 13, n° 10, p. e1006677, oct. 2017, doi: 10.1371/journal.ppat.1006677.
- [73] R. L. Finnen, T. J. M. Hay, B. Dauber, J. R. Smiley, et B. W. Banfield, « The herpes simplex virus 2 virion-associated ribonuclease vhs interferes with stress granule formation », *J Virol*, vol. 88, n° 21, p. 12727-12739, nov. 2014, doi: 10.1128/JVI.01554-14.
- [74] M. A. Hardwicke et R. M. Sandri-Goldin, « The herpes simplex virus regulatory protein ICP27 contributes to the decrease in cellular mRNA levels during infection », *J Virol*, vol. 68, n° 8, p. 4797-4810, août 1994, doi: 10.1128/JVI.68.8.4797-4810.1994.
- [75] B. Ziehr, H. A. Vincent, et N. J. Moorman, « Human Cytomegalovirus pTRS1 and pIRS1 Antagonize Protein Kinase R To Facilitate Virus Replication », *J Virol*, vol. 90, n° 8, p. 3839-3848, avr. 2016, doi: 10.1128/JVI.02714-15.
- [76] A. J. Davison *et al.*, « The order Herpesvirales », *Arch Virol*, vol. 154, n° 1, p. 171-177, janv. 2009, doi: 10.1007/s00705-008-0278-4.
- [77] H. M. Burgess et I. Mohr, « Defining the Role of Stress Granules in Innate Immune Suppression by the Herpes Simplex Virus 1 Endoribonuclease VHS », *J Virol*, vol. 92, n° 15, p. e00829-18, août 2018, doi: 10.1128/JVI.00829-18.
- [78] S. Park *et al.*, « Modulation of Protein Synthesis by eIF2 $\alpha$  Phosphorylation Protects Cell from Heat Stress-Mediated Apoptosis », *Cells*, vol. 7, n° 12, p. 254, déc. 2018, doi: 10.3390/cells7120254.
- [79] M. Z. Chen *et al.*, « A thiol probe for measuring unfolded protein load and proteostasis

- in cells », *Nat Commun*, vol. 8, n° 1, p. 474, sept. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00203-5.
- [80] H. Mahboubi, M. Kodiha, et U. Stochaj, « Automated detection and quantification of granular cell compartments », *Microsc Microanal*, vol. 19, n° 3, p. 617-628, juin 2013, doi: 10.1017/S1431927613000159.
- [81] L. You *et al.*, « Catalpol Protects ARPE-19 Cells against Oxidative Stress via Activation of the Keap1/Nrf2/ARE Pathway », *Cells*, vol. 10, n° 10, p. 2635, oct. 2021, doi: 10.3390/cells10102635.
- [82] C. Gain, S. Song, T. Angtuaco, S. Satta, et T. Kelesidis, « The role of oxidative stress in the pathogenesis of infections with coronaviruses », *Front Microbiol*, vol. 13, p. 1111930, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.1111930.
- [83] M. Boeren *et al.*, « Activation of Interferon-Stimulated Genes following Varicella-Zoster Virus Infection in a Human iPSC-Derived Neuronal In Vitro Model Depends on Exogenous Interferon- $\alpha$  », *Viruses*, vol. 14, n° 11, p. 2517, nov. 2022, doi: 10.3390/v14112517.
- [84] M. Steain, B. Slobedman, et A. Abendroth, « Modulation of Apoptosis and Cell Death Pathways by Varicella-Zoster Virus », in *Varicella-zoster Virus*, vol. 438, A. M. Arvin, J. F. Moffat, A. Abendroth, et S. L. Oliver, Éd., in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 438. , Cham: Springer International Publishing, 2021, p. 59-73. doi: 10.1007/82\_2021\_249.
- [85] C. Aloise, J. G. Schipper, R. J. de Groot, et F. J. van Kuppeveld, « Move and countermove: the integrated stress response in picorna- and coronavirus-infected cells », *Curr Opin Immunol*, vol. 79, p. 102254, déc. 2022, doi: 10.1016/j.coi.2022.102254.