

Mémoire

Auteur : Pitti, Florine

Promoteur(s) : Lebrun, Marielle

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/2268.2/21060>

Avertissement à l'attention des usagers :

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

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



Université de Liège

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Vie

Laboratoire de Virologie & Immunologie (GIGA-Immunobiology)

**Rôle des protéines IE61p et ORF47p du virus de la varicelle et
du zona dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée.**

Rédigé par Florine Pitti

Promoteur : Marielle Lebrun

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie et Biologie
Moléculaire et Cellulaire, à finalité approfondie

Août 2023-2024

Rôle des protéines IE61 et ORF47p du virus de la varicelle et du zona dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée.

RÉSUMÉ

Le virus de la Varicelle et du Zona (VZV) est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des *Herpesviridae*. Son génome encode 72 protéines parmi lesquelles on retrouve la kinase ORF47p, la protéine régulatrice ORF61p et la protéine la plus abondamment exprimée au cours du cycle lytique du virus, l'ORF9p. Différents travaux réalisés précédemment dans notre laboratoire ont démontré que lors d'une infection par VZV, l'ORF47p provoquait une hyper-phosphorylation atypique de l'IRF3 dans les cellules HEK-293-TLR3. Il s'agit d'une phosphorylation non conventionnelle puisqu'elle ne permet pas à l'IRF3 d'homodimériser afin d'activer la transcription des gènes-cibles, dont le gène codant pour l'IFN- β . Cependant, les processus mis en place par ORF47p pour entraîner cette phosphorylation ne sont pas connus. Le laboratoire a également démontré que la protéine ORF9p est, elle aussi, hyper-phosphorylée par la kinase ORF47p et les deux protéines interagissent fortement dans les cellules infectées. Par ailleurs, d'après les données de la littérature, la protéine codée par l'ORF61, lorsqu'elle est exprimée dans des cellules en dehors du contexte de l'infection semble aussi être impliquée dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée. L'objectif de ce mémoire était de continuer le travail réalisé sur l'ORF47p et IRF3, en se demandant (i) si l'activité kinase d'ORF47p est effectivement nécessaire pour l'inhibition de la réponse immunitaire innée et (ii) si l'interaction entre ORF9p et ORF47p est importante pour cette inhibition. Ensuite, le second objectif était d'évaluer le rôle potentiel d'ORF61p dans un phénomène d'inhibition de la réponse innée, dans un contexte infectieux. Afin de répondre à ces objectifs des virus ORF47p-KD (kinase-dead, muté dans le site catalytique de l'enzyme), ORF9 Δ AC (ORF9p portant une délétion dans sa région acide et qui n'est plus capable d'interagir avec ORF47p) et Δ ORF61 précédemment générés au laboratoire ont été utilisés pour infecter différents types cellulaires (MeWo, ARPE-19, A549 et fibroblastes oraux primaires humains). Des expériences de qRT-PCR ont été réalisées afin d'évaluer les transcrits de différents gènes de la réponse immunitaire et des expériences de western-blot ont été effectuées afin d'évaluer l'état d'activation des voies signalétiques impliquées dans cette réponse innée. Premièrement, dans les A549, nous avons montré que l'ORF47 inhibait légèrement l'expression des gènes antiviraux lors d'une infection par le VZV WT mais que son activité kinase n'est pas directement impliquée. Nous avons aussi confirmé que, via son activité kinase, ORF47p était capable d'hyper-phosphoryler IRF3 et qu'il inhibait légèrement sa translocation nucléaire. De plus, nous avons montré qu'ORF47p était impliqués dans l'inhibition de la voie NF- κ B en empêchant sa translocation toujours grâce à son activité kinase. Ensuite, nous avons observé que l'interaction ORF9p/ORF47p n'est pas indispensable ni pour hyper-phosphoryler l'IRF3, ni pour inhiber les gènes antiviraux et NF- κ B. Deuxièmement, nous avons démontré qu'ORF61p est impliqué dans une forte diminution de l'expression des gènes antiviraux lors d'une infection par le VZV WT. Nous démontrons aussi qu'il influence faiblement la translocation nucléaire d'IRF3 et de NF- κ B. ORF61p influencerait aussi la quantité d'IRF7 et d'IRF9 présents dans les cellules lors d'une infection par le virus WT. Pour la lignée des fibroblastes oraux primaires, nous montrons qu'ORF61p et ORF47p empêchent l'expression des gènes antiviraux lors d'une infection par le virus WT et que toutes les deux sont capables d'inhiber la phosphorylation de la protéine TBK-1 par un mécanisme qui reste à caractériser.

Remerciements

La réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'aide de nombreuses personnes à qui je témoigne mes remerciements.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma promotrice, le Dr. Marielle Lebrun, qui m'a guidée et aidée tout au long de mon mémoire. Merci pour ta patience, ta bonne humeur et ton énergie débordante, même s'il est parfois difficile de te suivre partout. Meri encore pour tous les conseils et les enseignements tu m'as apportés au cours de ce mémoire. Grâce à toutes ses connaissances et son savoir-faire, j'ai pu m'améliorer dans mon apprentissage et j'ai appris avoir plus confiance en moi et à être plus indépendante.

Je tiens également à remercier Prof. Catherine Sadzot-Delvaux pour m'avoir accordé sa confiance et me permettre de réaliser mon mémoire dans son Laboratoire de Virologie & Immunologie.

Je remercie aussi toute l'équipe du Laboratoire de Virologie & Immunologie pour leur accueil et leur gentillesse. Leur encadrement et leurs explications lors des diverses manipulations, toujours dans la bienveillance, m'ont beaucoup aidée à la réalisation de ce travail.

Un grand merci aux membres du laboratoire d'immunométabolisme de Sylvie Legrand et au laboratoire PSI de Franck Dequiedt, pour leur gentillesse et leur soutien.

Enfin, j'exprime également ma gratitude à mes parents, ma sœur et tout mon entourage qui m'ont soutenu tout au long de ce travail.

Table des abréviations

AA :	Acides aminés
AC :	Anticorps
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNdb :	ADN double brin
ADNc:	ADN complémentaire
AIM2:	Interferon-inducible protein AIM2
AP-1 :	Activating protein-1
ARN :	Acide ribonucléique
ARNdb :	ARN double brin
ARNsb:	ARN simple brin
BAC :	Bacterial artificial chromosome
CARD :	Domaines d'activation et de recrutement des caspases
C-terminal:	Carboxyl-terminal
CLR:	C-type lectin receptor
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
DMEM:	Dulbecco's modified eagle medium
DTT:	Dithiothréitol
EDTA:	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA:	Ethylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-acide tétraacétique
eIF2 α :	Eukaryotic translation initiation factor 2A
EMEM:	Eagle's minimal essential medium
FADD :	Fas-Associated protein with Death Domain
FW:	Forward
HSPG :	Héparane sulfate
HSV :	Human herpes virus
HVEM :	HerpesVirus Entry Mediator
IF :	Immunofluorescence
IFN- β :	Interferon-bêta
IKK:	I κ B kinase
IL:	Interleukine
IRAK :	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF3:	Interferon Regulatory Factor 3
ISG:	Interferon-stimulated gene
JAK-1:	Janus kinase 1
kDa:	Kilo Dalton

LGP2:	Laboratory of Genetics and Physiology 2
LPS:	Lipopolysaccharide
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MDA-5:	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MEK-2:	Mitogen-activated protein kinase kinase 2
MyD88:	Myeloid differentiation primary response 88
mL:	Millilitre
mM :	Millimolaire
NI :	Non infecté
NEMO :	NF-kB Essential Modulator
NK-κB:	Nuclear factor-kappa B
NLR:	NOD-like receptor
NOD:	Nucleotide-binding oligomerization domain
NT:	Non traité
ORF:	Open reading frame
ORFp:	Protéine encodée par l'ORF
PAMP :	Pathogen-associated molecular pattern
PBS :	Phosphate buffer saline
PEI :	Polyéthylèneimine
PKR:	Protéine kinase R
PMSF :	Phenylmethylsulfonyl fluoride
qRT-PCR :	PCR quantitative en temps réel
Poly(dA/dT):	Acide poly(désoxyadénylique-désoxythymidylique)
Poly(I:C):	Acide polyinosinique-polycytidylique
PRR:	Pattern recognition receptor
PVDF:	Fluorure de polyvinylidène
RIG-I:	Retinoic acid-Inducible Gene I
RIP-1:	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RLR:	RIG-like receptor
RV:	Reverse
SDS-PAGE :	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
siRNA :	Small interfering RNA
STAT:	Signal Transducers and Activators of Transcription
STING:	Stimulator of interferon response cGAMP interactor 1
TAK:	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
TBK-1:	TANK-binding kinase 1
TBS:	Tris-buffered saline

TGN:	<i>Trans</i> -Golgi network
TLR:	Toll-Like receptor
TNF- α :	Facteur de Nécrose Tumorale alpha
TRADD :	TNFR1-associated death domain protein
TRAM :	Translocating chain-associated membrane protein
TRIF:	TIR domain containing adaptor molecule 1
Tris:	Trisaminométhane
TYK-2 :	Non-receptor tyrosine-protein kinase-2
μ g:	microgramme
μ L :	microlitre
μ M :	micromolaire
WT:	Wild type
VZV :	Varicella zoster virus

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Le virus de la Varicelle et du Zona (VZV).....	1
1.1.1. Pathologie.....	1
1.1.1.1. Varicelle.....	1
1.1.1.2. Zona.....	2
1.1.2. Classification, morphologie et génome.....	2
1.1.2.1. Classification.....	2
1.1.2.2. Morphologie.....	3
1.1.2.3. Génome.....	3
1.1.3. Cycle lytique.....	4
1.1.3.1. Entrée du virus.....	5
1.1.3.2. Réplication du génome et expression des gènes viraux.....	6
1.1.3.2.1. Expression génique.....	6
1.1.3.2.2. Réplication du génome viral.....	6
1.1.3.3. Formation et sortie du virus.....	6
1.1.4. Latence.....	7
1.2. La réponse immunitaire.....	8
1.2.1. Détection des virus.....	8
1.2.2. Toll-like receptors, TLR.....	9
1.2.2.1. La voie MyD88.....	10
1.2.2.2. La voie TRIF.....	11
1.2.3. RIG-1-like receptors, RLR.....	12
1.2.4. Lectine-like receptors, CLR.....	15
1.2.5. NOD-like receptors, NLR.....	15
1.2.6. AIM2-like receptors.....	16
1.2.7. c-GAS-STING.....	17
1.2.8. Réponse à l'interféron.....	18
1.3. Stratégies d'échappement au système immunitaire.....	19
1.3.1. Inhibition d'IRF3 par la protéine virale ORF47p.....	20
1.3.2. Autres protéines possiblement impliquée dans l'inhibition de la réponse innée.....	22
1.3.2.1. ORF9.....	22
1.3.2.2. ORF61.....	22
2. Objectifs du travail.....	23
3. Matériels et méthodes.....	24
3.1. Réactifs.....	24

3.2.	Culture cellulaire.....	24
3.3.	Culture des virus	24
3.4.	Infection des cellules par VZV	24
3.4.1.	Co-culture.....	24
3.4.2.	Tri FACS.....	24
3.5.	Transfection des cellules	25
3.6.	Observation de la croissance virale par l'IncuCyte	25
3.7.	Western Blot	25
3.7.1.	Protocole du western blot pour des extraits cellulaires totaux.....	25
3.7.2.	Anticorps	26
3.8.	Extraction cyto-noyau.....	27
3.9.	PCR quantitative en temps réel	28
3.9.1.	Protocole.....	28
3.9.2.	Amorces (Primers)	28
4.	Résultats.....	29
4.1.	Description des mutants du VZV utilisés dans ce travail	29
4.1.1.	Les mutants de l'ORF47 : 47S et 47KD	30
4.1.2.	Les mutants de l'ORF9 : 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc	30
4.1.3.	Les mutants de l'ORF61 : 61del 1, 61del 2 et 61del 3.....	31
4.2.	Analyse de la croissance virale des différents mutants.....	31
4.3.	qRT-PCR	35
4.3.1.	Choix de la lignée cellulaire.....	35
4.3.2.	Résultats dans la lignée A549	36
4.3.3.	Résultats dans la lignée des fibroblastes oraux primaires	39
4.4.	Western blot.....	40
4.4.1.	Résultats dans la lignée cellulaire A549	40
4.4.1.1.	Voie TBK1/IRF3	40
4.4.1.1.1.	Extraits totaux	41
4.4.1.1.2.	Extraits cyto-noyaux	43
4.4.1.2.	Voie NF-κB	44
4.4.1.3.	Voie AP-1	46
4.4.1.4.	Voie de réponse aux IFN de type I et III	46
4.4.1.4.1.	Extraits totaux	46
4.4.1.4.2.	Extraits cyto-noyaux	48
4.4.2.	Résultats dans la lignée des fibroblastes oraux	49

5. <i>Discussion et perspectives</i>	51
6. <i>Bibliographie</i>	
7. <i>Annexes</i>	

1. Introduction

1.1. Le virus de la Varicelle et du Zona (VZV)

1.1.1. Pathologie

VZV est responsable de deux pathologies bien connues : la varicelle et le zona

1.1.1.1. Varicelle

La primo infection du virus VZV donne lieu à la varicelle, une maladie infantile hautement contagieuse mais généralement bénigne. VZV est le plus souvent transmis par inhalation de gouttelettes en suspension dans l'air ou par contact direct avec le liquide vésiculaire à l'intérieur des lésions cutanées d'individus infectés.

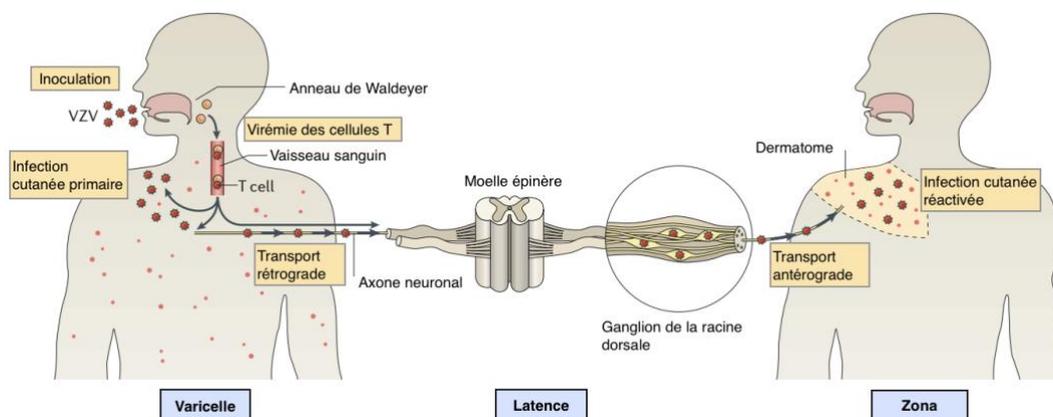


Figure 1: Cycle de réplication du virus varicelle-zona. L'infection par le VZV se produit par les voies respiratoires supérieures. VZV se propage et atteint les amygdales où il infecte les cellules T. Ces cellules T transportent le virus dans l'organisme qui finira par atteindre la peau et les muqueuses. Après la primo-infection, le VZV établit une latence dans les ganglions sensoriels. La réactivation de la latence donne lieu au zona, une seconde infection de la peau qui se limite au dermatome innervé par le ganglion où se produit la réactivation. Figure adaptée de L. Zerboni & al., 2014.

Le virus pénètre dans l'organisme via les voies respiratoires supérieures où il va se répliquer et infecter les cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire ainsi que les lymphocytes T présents dans les amygdales^{4,6, 33} (figure 1). Ce processus donne lieu à une première virémie, environ quatre à six jours après l'infection initiale, durant de laquelle le virus est disséminé, via des lymphocytes T infectés, dans les tissus réticulo-endothéliaux, y compris le foie et la rate, où il se multiplie³³. Une seconde virémie est observée environ 14 jours après l'infection au cours de laquelle le virus gagne par voie sanguine et lymphatique divers organes^{21, 33, 70}. Elle permet aussi au virus d'atteindre les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses provoquant l'apparition d'une éruption cutanée généralisée qui est dans la plupart des cas rapidement contrôlée par le système immunitaire. La varicelle se résout généralement en une à deux semaines mais dans de rares cas, lorsque le système immunitaire est déficient, il peut y avoir des complications sévères comme une pneumonie, des troubles d'ordre neurologique (encéphalites, méningites...) ou encore des complications dû à la surinfection des lésions cutanées³³.

1.1.1.2. Zona

Les réactivations du VZV sont nombreuses mais principalement asymptomatiques. La réplication virale produisant des antigènes permet de stimuler la mémoire immunitaire et atténuent les réactivations.

Cependant, lorsque le système immunitaire est affaibli, chez les personnes âgées (>50 ans) ou immunodéprimées notamment, la réactivation du virus VZV devient symptomatique et provoque le Zona.^{29, 33, 40}

Dix à vingt pourcents des personnes ayant un jour contracté la varicelle sont susceptibles de développer un zona et sa manifestation se caractérise par une éruption cutanée douloureuse et localisée le plus fréquemment au niveau d'un seul dermatome^{21,40}. En effet, la réactivation du VZV se produit généralement dans un seul ganglion sensoriel lui permettant de migrer le long des axones afin d'infecter les cellules épithéliales^{29, 40} (figure 1). Les lésions cutanées disparaissent généralement au bout de deux semaines, mais la douleur associée au zona met 4 à 6 semaines à disparaître⁴⁰. Malheureusement, certains patients peuvent développer une névralgie post-herpétique (NPA), qui est une douleur chronique après la réactivation du VZV^{29, 40}.

1.1.2. Classification, morphologie et génome

1.1.2.1. Classification

Le virus de la varicelle et du zona (VZV) appelé aussi herpesvirus humain de type 3 (HHV-3) est une espèce appartenant à l'ordre des Herpesvirales. Cet ordre comprend la famille des Herpesviridae regroupant près de 120 espèces dont 8 capables d'infecter l'homme^{1, 63} : le virus herpès simplex de type 1, (HSV-1), le virus herpès simplex de type 2 (HSV-2), le VZV, le cytomégalovirus (HCMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV) et les virus HHV-6, HHV-7 et HHV-8, pour *human Herpesvirus 6, 7 et 8*. Cette grande famille est subdivisée en 3 sous-familles les *Alpha-*, les *Bêta-* et les *Gamma-herpesviridae* selon des critères biologiques tels que la taille, la structure du génome, le tropisme, la vitesse de réplication et le type de cellule dans laquelle l'infection latente est établie^{63, 70}.

La sous-famille des :

- Alphaherpesvirinae contient 5 genres dont le Simplex virus comprenant HSV-1 et HSV-2 et le genre Varicellovirus dont fait partie le virus de la varicelle et du zona (VZV). Elle est caractérisée par des virus neurotropes, qui ont pour site latent les ganglions sensoriels, un cycle de répliatif relativement court et fortement lytique^{1, 63}.
- Betaherpesvirinae a un cycle de réplication plus lent que les Alphaherpesvirus et a pour site de latence les lymphocytes principalement les cellules T-helper (CD4 T cells). Les membres de cette sous-famille sont les HHV-6 et HHV-7 responsables de la roséole infantile et le cytomégalovirus (HHV-5)^{1, 63}.

- Gammaherpesvirinae établit sa latence dans les tissus lymphoïdes et les virus infectent spécifiquement les lymphocytes T ou B. On y trouve HHV-8 responsable du sarcome de Kaposi et HHV-4 (virus Epstein-Barr) qui provoque la mononucléose^{1, 63}.

1.1.2.2. Morphologie

Le VZV est un virus sphérique enveloppé d'environ 200 nm et qui est constitué de quatre éléments structuraux fondamentaux : le génome, la capsid, le tégment et l'enveloppe¹⁵ (figure 2).

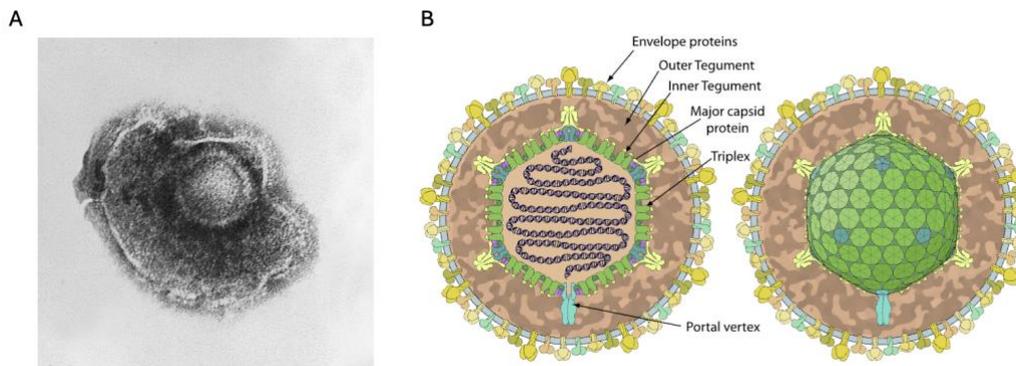


Figure 2: Structure du virus varicelle-zona (VZV). (A) Image du VZV obtenue par microscopie électronique (Public Health Image Library ; CDC/Dr. Erskine Palmer/B.G. Partin). (B) Représentation schématique du virion VZV. (Varicellovirus-ViralZone).

Le génome viral est constitué d'une seule copie d'ADN double-brin encapsulé dans la capsid. Celle-ci a une structure icosaédrique d'environ 125 nm de diamètre⁷⁷. Elle est constituée de 60 unités asymétriques formant au total 162 capsomères, dont 150 sont des hexamères et 12 sont des pentamères⁷⁷. Les pentamères sont composés de cinq copies de la protéine de capsid majeure (PMC), ORF40 et les hexamères possèdent six copies de cette PMC avec en plus la petite protéine de capsid (ORF23)⁷⁷. Un des pentamères correspond au « portal complex » qui permet au génome d'être empaqueté lors de l'assemblage de la capsid ou de le libérer lors la réplication. Les capsomères sont reliés entre eux par des triplexes constitués de deux protéines virales ORF41 et ORF20 dans un rapport 2:1^{15,77}. Ensuite, cette capsid est entourée d'un tégment constitué d'une couche protéique qui contient à la fois des protéines virales et cellulaires. Les protéines identifiées dans le tégment sont importantes pour amorcer le cycle infectieux de VZV, il y a par exemple les protéines précoces immédiates IE4, IE62, IE63, les ORF9p et ORF10p ainsi que les protéines kinases ORF47p et ORF66p. Enfin, une enveloppe lipidique provenant de la cellule hôte dans laquelle des glycoprotéines virales (gB, gC, gE, gH, gI, gK, gL) se sont insérées, entoure les particules virales^{15, 63, 70}.

1.1.2.3. Génome

Davison et Scott sont les premiers, en 1986, à avoir entièrement séquencé et caractérisé le génome de VZV. Il contient 124 884 pb et sa structure se compose de deux segments uniques appelés Unique Long (UL, 104 836 pb) et Unique Short (US, 5 232 pb)^{20,22, 84}.

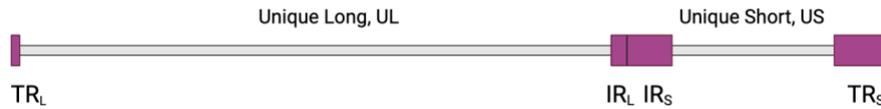


Figure 3: Schéma du génome du VZV. Le génome est constitué d'un long segment unique UL et d'un court segment US délimités par des séquences d'ADN répétées inversées internes IRL / IRS et terminales TRL / TRS

Ils sont tous les deux délimités par des séquences d'ADN répétées inversées internes IRL (88 pb) / IRS (7 319 pb) et terminales TRL (88 pb) / TRS (7 319 pb)^{20, 22, 24} (figure 3). Le génome de VZV comprend 71 cadres de lecture ouverts (ORF) codant pour des protéines. Les ORF 1 à 61 et les ORF 65 à 68 sont présents en simple copie tandis que trois ORF se trouvent dans les régions IRS et TRS et sont par conséquent présents en deux copies : ORF62/71, ORF63/70 et ORF64/69^{20, 51, 69, 75}. Il y a également dans les régions IRS et TRS, les deux origines de réplication (ORIs) de l'ADN du virus^{20, 24}. VZV a également une teneur global en G+C de 46 % et il contient cinq régions de courtes séquences répétées, riches en G+C et dont la taille varie selon les souches: R1 situé dans l'ORF11, R2 dans l'ORF14 (gC), R3 dans l'ORF22, R4 entre l'ORF62 et l'origine de la réplication virale, et R5 entre l'ORF60 et l'ORF61^{20, 22}. Enfin, à l'extrémité 3' de l'UL se trouve un résidu C non apparié et à l'extrémité 3' de l'US un résidu G non apparié, importants pour la circularisation du génome lors de sa réplication²⁰.

1.1.3. Cycle lytique

Le HSV-1 est le virus modèle de la sous-famille des Alphaherpesvirinae, par conséquent beaucoup d'études ont été menées à son sujet dont son cycle de réplication. VZV possédant des protéines, pour la plupart, homologues à HSV-1, son cycle de réplication peut lui être étendu. Il sera alors complété par des précisions sur VZV dès que les données le permettent (figure 4).

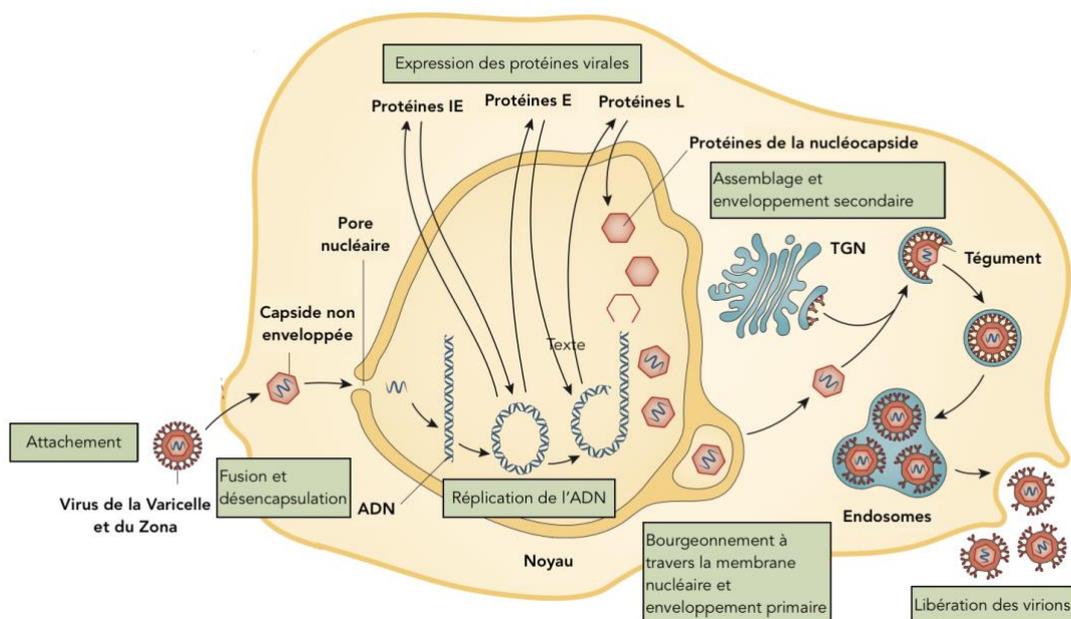


Figure 4: Schéma du cycle lytique du VZV. Les particules virales se fixent à la membrane de la cellule-hôte et fusionnent avec celle-ci libérant les capsides et le tégument dans le cytoplasme. Les capsides sont ensuite transportées vers le noyau dans lequel l'ADN viral est libéré et devient circulaire. La réplication peut alors commencer et les gènes immédiats précoces (IE) sont les premiers à être exprimés, suivis des

gènes précoces (E) et tardifs (L). Puis, les protéines formant la capsidie vont s'assembler et empaqueter l'ADN génomique viral nouvellement synthétisé. Cette nucléocapside sort du noyau et migre vers la partie trans de l'appareil de Golgi (TGN) dans lequel elle acquiert son enveloppe secondaire et les glycoprotéines. Cette enveloppe secondaire peut aussi provenir des endosomes. Pour finir, le virion mature est transporté à la surface de la cellule-hôte.(Figure adaptée de Gershon et al., 2015)

1.1.3.1. Entrée du virus

L'infection des cellules par VZV commence par l'attachement de celui-ci à la cellule-hôte. C'est un processus qui nécessite l'interaction des glycoprotéines virales avec des récepteurs cellulaires spécifiques. Chez HSV-1, cela se fait via les glycoprotéines B (gB) et C (gC) qui reconnaissent les protéoglycanes à base d'héparane sulfate (HSPG)^{35, 49, 90}. Ces interactions permettent de concentrer les particules virales à la surface de la cellule mais elles ne sont pas suffisantes à déclencher leur entrée dans la cellule. C'est la glycoprotéine D (gD), qui va permettre l'entrée du virus en se liant à des récepteurs cellulaires spécifiques, présents à la surface des cellules, à savoir les immunoglobulines nectine-1 et nectine-2, HVEM (HerpesVirus Entry Mediator), un membre de la famille du TNF récepteur et le 3-OS-HS, une forme sulfatée de l'héparane sulfate⁹⁰.

Chez VZV, l'attachement se fait aussi par l'interaction de la gB avec les HSPG. Le récepteur cellulaire Man-6-P pourrait aussi permettre l'attachement du virus à sa cellule-hôte. En effet, sa déplétion peut empêcher l'infection des cellules et quatre glycoprotéines virales (gB, gE, gH et gI) contiennent du mannose-6-phosphate (Man-6-P) ce qui pourraient constituer des ligands pour ce récepteur^{17, 49, 91}. Comme VZV ne possède pas d'homologue de gD, une ou plusieurs autres glycoprotéines et d'autres récepteurs cellulaires sont donc nécessaires pour son entrée dans la cellule-hôte. Stricto sensu, le récepteur d'entrée à VZV n'est toujours pas connu à l'heure actuelle, même si plusieurs interactions entre des glycoprotéines virales et des protéines cellulaires sont connues pour jouer un rôle important dans le processus d'entrée⁴⁹. Le premier exemple est la glycoprotéine gE et son interaction avec l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) induisant un changement de conformation et une modification de la taille de gE qui semble jouer un rôle dans l'entrée de VZV⁵². Le deuxième est la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) qui a été identifiée comme un récepteur potentiel permettant l'entrée du VZV dans les cellules neurales en interagissant avec gB⁷⁶.

Ensuite, une fois la particule virale attachée à la surface de la cellule, l'enveloppe virale doit fusionner avec la membrane plasmique. Cette fusion est réalisée via l'intervention du complexe gB/gH/gL²³. Il a également été démontré pour HSV et VZV que, dans certains types cellulaires (MeWo, HeLa,...), un phénomène d'endocytose est observé après l'attachement du virus à la cellule-hôte. La fusion de l'enveloppe virale se fait alors avec la vésicule d'endocytose et dépend de l'acidification de cette celle-ci³³.

1.1.3.2. Réplication du génome et expression des gènes viraux

1.1.3.2.1. Expression génique

Après le phénomène de fusion, la capsid se retrouve dans le cytoplasme et une grande partie des protéines tégmentaires s'en dissocient. La capsid doit ensuite atteindre le noyau afin qu'elle puisse délivrer le génome viral en vue de sa transcription et de sa réplication. Pour se faire, elle interagit via des protéines du tégment interne (pUL36, pUL37) directement avec les protéines du cytosquelette cellulaire, à savoir la dynéine et la kinésine-1, protéines qui permettent les déplacements le long des microtubules⁹⁰. Une fois arrivée près du noyau, la capsid se fixe au niveau des pores nucléaires pour libérer le génome viral⁹⁰. Dans le noyau, ce dernier va permettre la transcription des gènes viraux qui sont divisés en trois classes suivant la cinétique de leur expression : les gènes précoces immédiats (*immediate early*, IE), précoces (*early*, E) et tardifs (*late*, L)⁹⁰. Les IE sont les premiers à être exprimés et ils codent pour des protéines régulatrices de la transcription des gènes (IE et E). VZV code au moins quatre protéines IE (IE4, IE61, IE62 et IE63)^{22, 90}. IE62 est le transactivateur principal chez VZV⁴⁶ et il peut interagir avec IE4 et IE63 et aussi réguler l'expression de toutes les classes de gènes ainsi que son propre promoteur⁴⁸. Une fois exprimées dans le cytoplasme, les IE vont revenir dans le noyau pour activer et réguler la transcription des gènes précoces^{46, 48}. Ces gènes codent, principalement, pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN^{3,4}. Parmi ces protéines, on peut citer l'ADN polymérase virale composée de deux sous-unités (ORF16p + ORF28p)²², les Ser/Thr kinases ORF47p et ORF66p²², la thymidine kinase virale (ORF36p) et ORF9p (VP22 chez HSV)²². Enfin, une fois que le génome viral est répliqué, les gènes tardifs sont synthétisés. Ils codent pour des protéines de structure comme par exemple la protéine majeure de la capsid (ORF40p) et la plupart des glycoprotéines^{63, 70}.

1.1.3.2.2. Réplication du génome viral

Peu après l'apparition des protéines précoces, la synthèse du génome viral a lieu. La première étape est la circularisation de la molécule d'ADN viral linéaire par l'action de l'ADN ligase IV cellulaire^{4,60, 69}. Puis, la synthèse de l'ADN commence à une origine de réplication (ORI) selon le processus de « rolling circle » et fait intervenir 8 protéines (ORF55p, ORF52p, ORF51p, ORF29p, ORF28p, ORF16p et ORF6p)^{4, 69}. Ce processus génère de nombreuses copies du génome (concatémères) qui sont clivées et emballées dans les capsides au fur et à mesure de leur production^{4, 60, 69, 84}.

1.1.3.3. Formation et sortie du virus

Les protéines structurales de la capsid, synthétisées dans le cytoplasme, sont amenées dans le noyau où elles sont assemblées pour former tout d'abord des pro-capsides puis des capsides dans lesquelles une copie du génome est intégrée.

Les pro-capsides se constituent dans le noyau avec l'aide des protéines ORF33p et ORF33.5p qui composent un échafaudage protéique temporaire^{13,50}. Sur cet échafaudage, repose une enveloppe externe composée de capsomères de la protéine majeur de la capsid, l'ORF40 avec la petite protéine de capsid

ORF23. Ces capsomères sont reliées ensemble par un triplex contenant deux molécules de ORF41 et 1 molécule de ORF20^{50, 58}. L'échafaudage est ensuite dégradé grâce à l'activité protéolytique d'ORF33p et 3 trois types de capsides peuvent être formées : les capsides A, B et C. La capside est dite de forme A, lorsque l'intérieur de celle-ci est dépourvu de génome viral ; la forme B est remplie de ORF33.5 tronqué (reste d'échafaudage non complètement dégradé) et celle de forme C est la nucléocapside complète remplie d'ADN. Seule la capside de forme C peut quitter le noyau et elle est aidée par un complexe de sortie nucléaire (Nuclear egress complex ou NEC) indispensable formé de la protéine ORF24p et la protéine ORF27p (HSV UL34 et 31, respectivement)^{12, 13, 49, 50, 58}.

À sa sortie, la capside se retrouve dans l'espace périnucléaire et elle a acquis une enveloppe primaire provisoire. La fusion de cette enveloppe ainsi acquise avec la membrane nucléaire externe va permettre de délivrer la capside dans le cytoplasme⁶⁸. Elle va alors se diriger vers la partie *trans* de l'appareil de Golgi (TGN) où se déroule l'enveloppement secondaire^{3, 49, 53, 68}. Les glycoprotéines virales, produites dans le RER et glycosylées dans l'appareil de Golgi vont s'accumuler dans des petites vésicules dont l'origine précise n'est toujours pas confirmée (soit des vésicules en provenance du trans-Golgi, soit des endosomes, soit encore des vésicules résultant de la fusion entre des endosomes et des vésicules trans-golgiennes)^{3, 13, 42, 68}. Les queues cytoplasmiques des glycoprotéines pointant vers le cytoplasme vont permettre d'accumuler les protéines tégumentaires nécessaire à l'attachement des capsides à la surface de ces vésicules. Le bourgeonnement de la capside vers l'intérieur de la vésicule va conduire à la formation des particules définitives, entourées de leur enveloppe, elle-même comprise dans une vésicule d'export^{13, 53}. La capside peut alors être libérée dans l'espace extracellulaire par fusion de la vésicule de transport avec la membrane cellulaire^{13, 68}. Cependant, chez VZV, les virons restent majoritairement accrochés à la membrane plasmique, ce qui lui donne un caractère « associé aux cellules » particulièrement prononcé. Pour finir, une caractéristique de l'infection par VZV est l'apparition des cellules géantes plurinucléées formées par la fusion de cellules infectées entre elles (*syncytia*)¹³.

1.1.4. Latence

Au cours de la primo-infection, le VZV établit une latence à vie dans les neurones situés dans les ganglions sensoriels de la racine dorsale (DRG), les ganglions du trijumeau (TG) et les ganglions mésentériques^{32, 40}. Lors de sa latence, l'expression des gènes de VZV est limitée et il n'y a pas de production de particules virales^{40, 69}. Toutefois, le génome viral est capable de se réactiver en présence d'un stimulus approprié, ce qui entraîne une réplication lytique. Chez HSV-1, lors de l'infection latente, une seule région du génome viral, LAT (*latency associated transcripts*), est transcriptionnellement active^{56, 74, 80}. Il s'agit d'un long ARN primaire, partiellement antiparallèle à l'ARN messenger d'icp0 (homologue d'IE61 de VZV) et qui est épissé pour générer 2 introns stables et un exon, lui-même découpé en de multiple miARNs^{56, 74, 80}. L'expression du LAT chez HSV-1 réduit l'expression des gènes IE homologues à IE4, IE61 et IE62 de VZV, ce qui est supposé enclencher le cycle latent. Jusqu'il y a peu, les mécanismes impliqués dans la latence de VZV étaient très peu caractérisés. Cependant,

plusieurs transcrits de gènes (IE4, ORF21, ORF29, IE62 et, surtout, IE63) ont été détectés dans des ganglions sensoriel récupérés post-mortem³³. En 2018, *Depledge & al.* a démontré l'expression d'un ARNm épissé du VZV, antisens au cadre de lecture ouvert 61 (ORF61). Ce gène comprend cinq exons et il est associé à la latence du VZV (VLT)^{24,25}. Il est principalement exprimé dans les neurones et il code pour une protéine à cinétique tardive. Cette découverte permet de relier le VZV aux autres alphaherpesvirus neurotropes et de mieux comprendre sa latence^{10, 11, 24, 25, 62}. (figure 5)

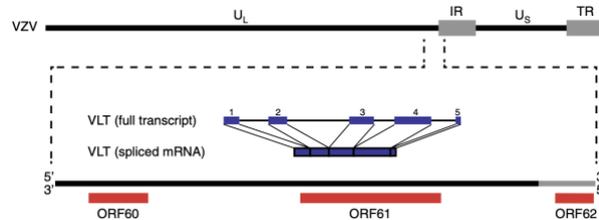


Figure 5: Schéma montrant le locus génomique codant pour VLT. Il possède cinq exons (blocs bleus) et introns (lignes noires) du VLT dans la région génomique 101 000-106. (Depledge, Ouwendijk, et al., 2018)

1.2. La réponse immunitaire

1.2.1. Détection des virus

Lorsque des virus se trouvent dans l'organisme, le système immunitaire est alerté, entre autres, via la détection de leur acides nucléiques, ADN ou ARN. Il met alors en place les mécanismes de la réponse innée qui représente la première ligne de défense puis il active les mécanismes de la réponse adaptative humorale et cellulaire^{82, 88}. Les cellules de l'immunité innée expriment divers récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) qui reconnaissent les PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes) telles que les acides nucléiques viraux et les composants bactériens comme le LPS^{14, 82}. Il existe différentes classes de PRR, à savoir les TLR (Toll-like receptors), les RLR (Retinoic acid-Inducible gene (RIG)-like receptors), les récepteurs NLR (Nucleotide-binding Oligomerization Domain), les CLR (récepteurs de types lectine), les différents récepteurs de l'ADN cytosolique (cGAS/STING, IFI16...) et les récepteurs AIM2 (Absent in Melanoma 2)^{82, 88}. La détection des virus par ces récepteurs va entraîner la production d'interférons (IFN) de type I et de type III ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α ...). Ces cytokines vont recruter et activer les cellules immunitaires tandis que les IFN vont induire l'expression de gènes codant pour des protéines antivirales^{82, 88}. (figure 6)

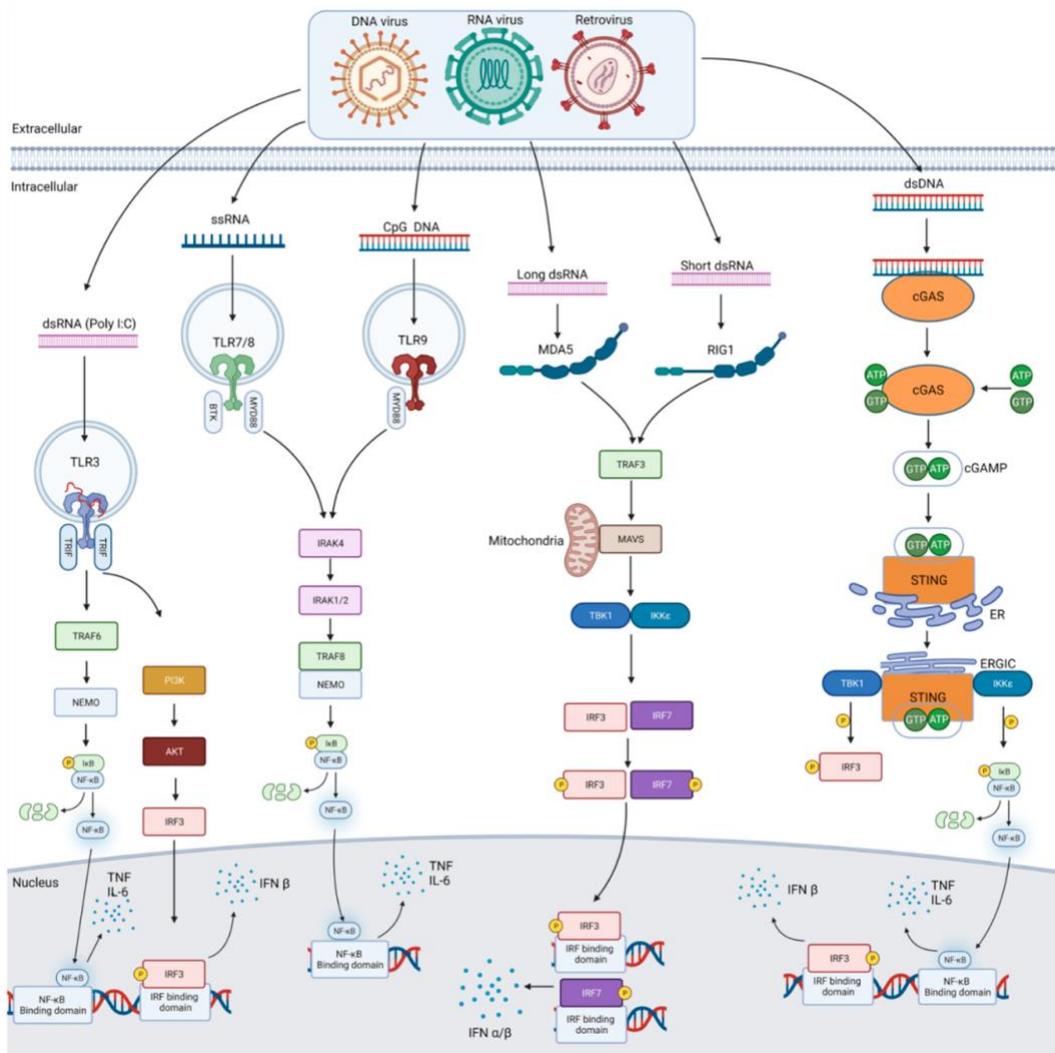


Figure 6: Voies de signalisation de la reconnaissance des schémas antiviraux. (Hennessey & McKernan, 2021)

1.2.2. Toll-like receptors, TLR

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires composés d'un domaine extracellulaire riche en leucine qui permet la détection et l'interaction avec les PAMPs et d'un domaine intracellulaire TIR (Résistance du récepteur Toll/IL-1) qui assure la transduction du signal^{9,14, 82} (figure 7).

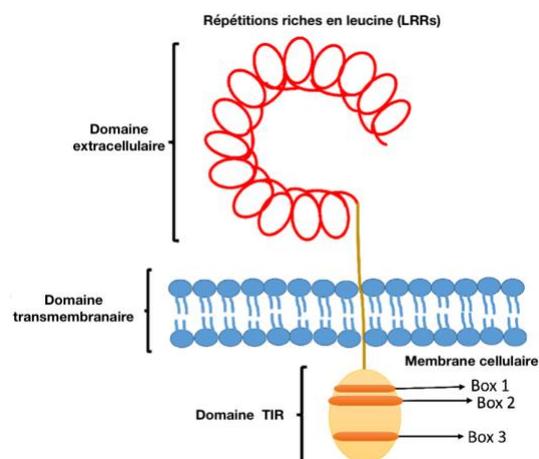


Figure 7: Schéma de la structure des récepteurs Toll-like. Figure adaptée de .Bhardwaj et al., 2023

Ils sont exprimés dans les cellules de l'immunité innée qui rencontrent des pathogènes (monocytes, macrophages, lymphocytes B ...) mais aussi dans divers types de cellules (endothéliales, épithéliales...) ^{14, 28, 82}. Chez l'homme, dix TLR ont été identifiés et peuvent être regroupés en deux catégories : ceux qui sont exposés à la surface des cellules (TLR -1, -2, -4, -5, -6 et -10) et ceux qui sont exprimés dans les endosomes (TLR-3, 7, 8 et 9) ^{28, 82}. Les récepteurs endosomaux sont impliqués dans la réponse antivirale en détectant les acides nucléiques viraux mais les TLR2 et TLR4 sont également inclus dans cette réponse par la reconnaissance des protéines de l'enveloppe virale ^{14, 28, 82}. Lorsque les TLRs sont stimulés par la reconnaissance des PAMPs, ils recrutent des protéines adaptatrices contenant un domaine TIR, notamment MyD88, TIRAP (ou MAL), TRIF (ou TICAM1) et TRAM (ou TICAM2) ^{28, 82}. Celles-ci vont transduire le signal et, en fonction de la protéine adaptatrice recrutée, elles vont activer différents facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1 et IRF3 qui permettent l'expression de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN. En fonction du TLR, deux voies principales peuvent être activées : la voie dépendante de MyD88 et la voie dépendante de TRIF ⁸² (figures 8 et 9).

1.2.2.1. La voie MyD88

Les TLR7 et TLR8 détectent tous deux l'ARN simple brin (ARNsb), tandis que TLR9 détecte l'ADN CpG hypométhylié ^{9, 14, 34}. Ces TLR ainsi que les TLR-1, -2, -4, -5, -6, une fois activés par leur ligand respectif, vont recruter la protéine adaptatrice MyD88 ^{28, 34, 82}. Celle-ci se lie au « death-domain » (DD) de la kinase IRAK4 (kinase associée au récepteur de l'IL1) ce qui va entraîner l'activation des IRAK1 et 2. Une fois phosphorylées, les IRAK1/2 s'associent à TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6) et l'activent par polyubiquitination via la lysine 63. Il va, à son tour, recruter un complexe comprenant TAB2/TAB3/TAK1. La phosphorylation de TAK1 va activer le complexe I κ B kinases (IKK) qui comprend IKK α , IKK β et NEMO. Ce complexe IKK phosphoryle l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α et entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. NF- κ B (composés des sous-unités p50 et p65) est alors activé et migre dans le noyau pour induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires ^{28, 34, 82}. Simultanément, le complexe contenant TAK1 conduit à l'activation des protéines MAPK telles que la kinase JNK ou encore p38, ce qui déclenche l'activation du complexe AP-1 ⁸².

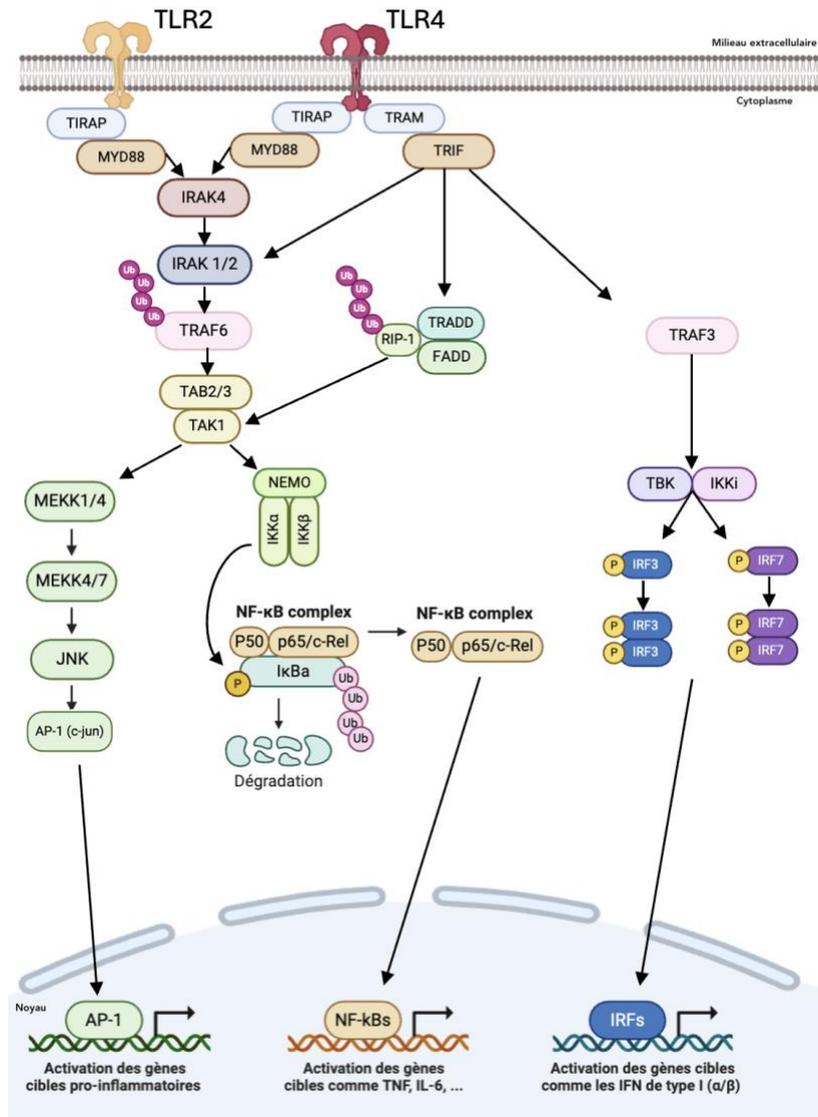


Figure 8 : Voie de signalisation des TLR 2 et 4. Figure réalisée sur BioRender.

1.2.2.2. La voie TRIF

Les TLR3 et 4 recrutent l'adaptateur TRIF. Cette voie conduit à l'activation de NF- κ B et AP-1 mais aussi les facteurs de régulation de l'interféron IRF-3 et -7^{14, 79}. Le TLR3 est un récepteur d'ARN double brin (ARNdb)^{14, 34}. Comme de nombreux virus possèdent un ARNdb dans leur génome ou génèrent de l'ARNdb au cours de leur cycle de vie, ce récepteur peut détecter la présence de virus à ARNsb, à ARNdb et de virus à ADN¹⁴. TLR3 est exprimé dans les neurones, les astrocytes et la microglie, ce qui suggère un rôle majeur dans la défense de l'hôte contre les virus à ADN neurotropes. Ce récepteur reconnaît aussi l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly(I:C)), un analogue synthétique de l'ARN double brin (ARNdb)^{9, 34}.

Une fois activé, le TLR3 recrute l'adaptateur TRIF qui va alors interagir avec le complexe composé de TRAF6/TAB2/ TAB3/TAK1 (figure 9). Cet ensemble recrute et active le complexe IKK conduisant à la phosphorylation, la polyubiquitination et la dégradation d'I κ B α ce qui va permettre la translocation

nucléaire de NF- κ B. TRIF mobilise aussi TRAF3 (TNF Receptor-Associated Factor 3) qui va activer les protéines kinases (IKK) non canoniques TBK-1 (appelés aussi NAK ou T2K) et IKK- ϵ /- ι . Celles-ci vont phosphoryler IRF3 et IRF7 qui vont homodimériser et migrer dans le noyau afin d'induire l'expression des IFN de type I et de type III. Un autre complexe recruté par TRIF est le complexe comprenant de la protéine kinase RIP1, TRADD et FADD. RIP1 va subir une polyubiquitination sur K63 ce qui permet l'activation de TAK1. À son tour, il active le complexe IKK et des MAP kinases, qui vont induire l'activation de NF- κ B et AP-1^{14, 82, 79}.

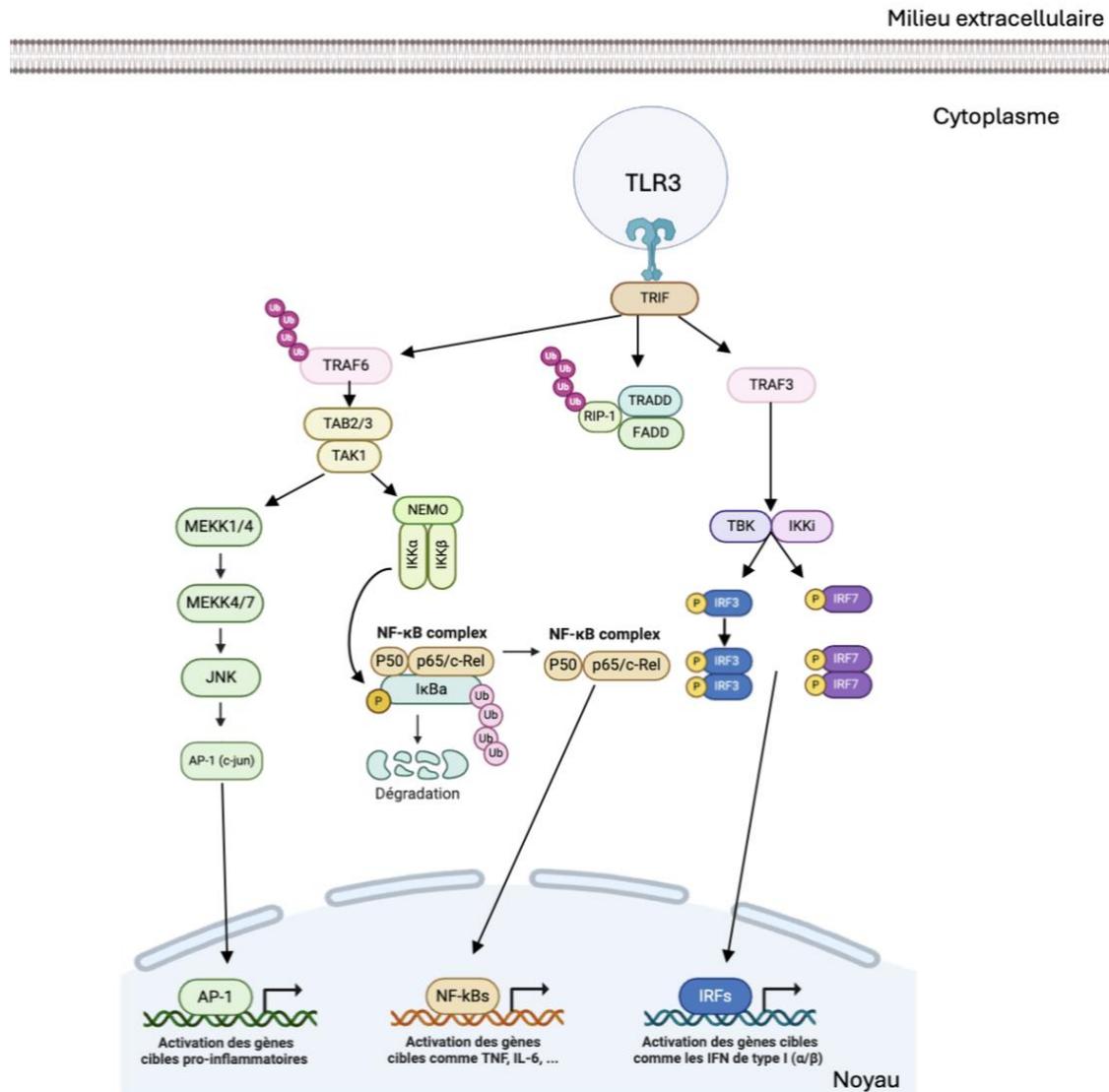


Figure 9: Voie de signalisation du TLR3. Figure réalisée sur BioRender.

1.2.3. RIG-1-like receptors, RLR

Les membres de la famille des « RIG-I-Like Receptors » (RLR) sont cytosoliques, exprimés dans la plupart des types de cellules et ils sont impliqués dans la reconnaissance de l'ARN double brin viral^{14, 39, 82, 88}. Ils se composent de 3 membres : RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene I, ou DDX58), MDA-5

(Melanoma Differentiation-Associated protein 5, ou IFIH1) et LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2)^{8, 14, 82, 88}.

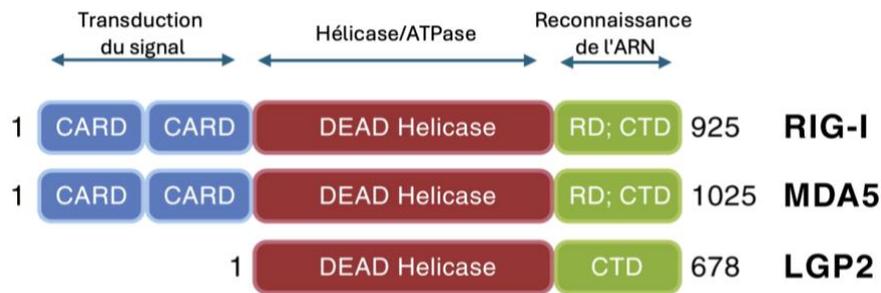


Figure 10: Structure schématique des récepteurs RIG-I-like. Figure adaptée de Y. Loo & M. Gale, Jr, 2011

RIG-I est caractérisé par un domaine hélicase ARN à boîte DExD/H entouré à l'extrémité N-terminale de deux domaines de recrutement des caspases (CARDS) et à l'extrémité C-terminale d'un domaine répresseur (RD). Le domaine hélicase et le RD sont impliqués dans la reconnaissance de l'ARNdb court qui doit être doté d'une extrémité 5' di ou triphosphate sans coiffe tandis que les domaines CARD transmettent le signal^{8,14, 82, 88}. En l'absence d'ARNdb, RIG-I présente une conformation inactive dans laquelle le domaine RD interagit avec le domaine hélicase pour masquer les CARD. Lors de l'interaction avec l'ARN, il va subir des changements de conformation conduisant à l'exposition des CARDS et ainsi permettre la transduction du signal^{7,8, 82, 88}. MDA-5 contient aussi deux domaines CARD et un domaine d'hélicase ARN. Il reconnaît les ARN bicaténaires de grande taille (>300 pb). Par contre, LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2) ne comprend aucun domaine CARD et un de ses rôles est de réguler la signalisation de MDA5 et de RIG-I^{14, 39, 82, 88} (Figure 10).

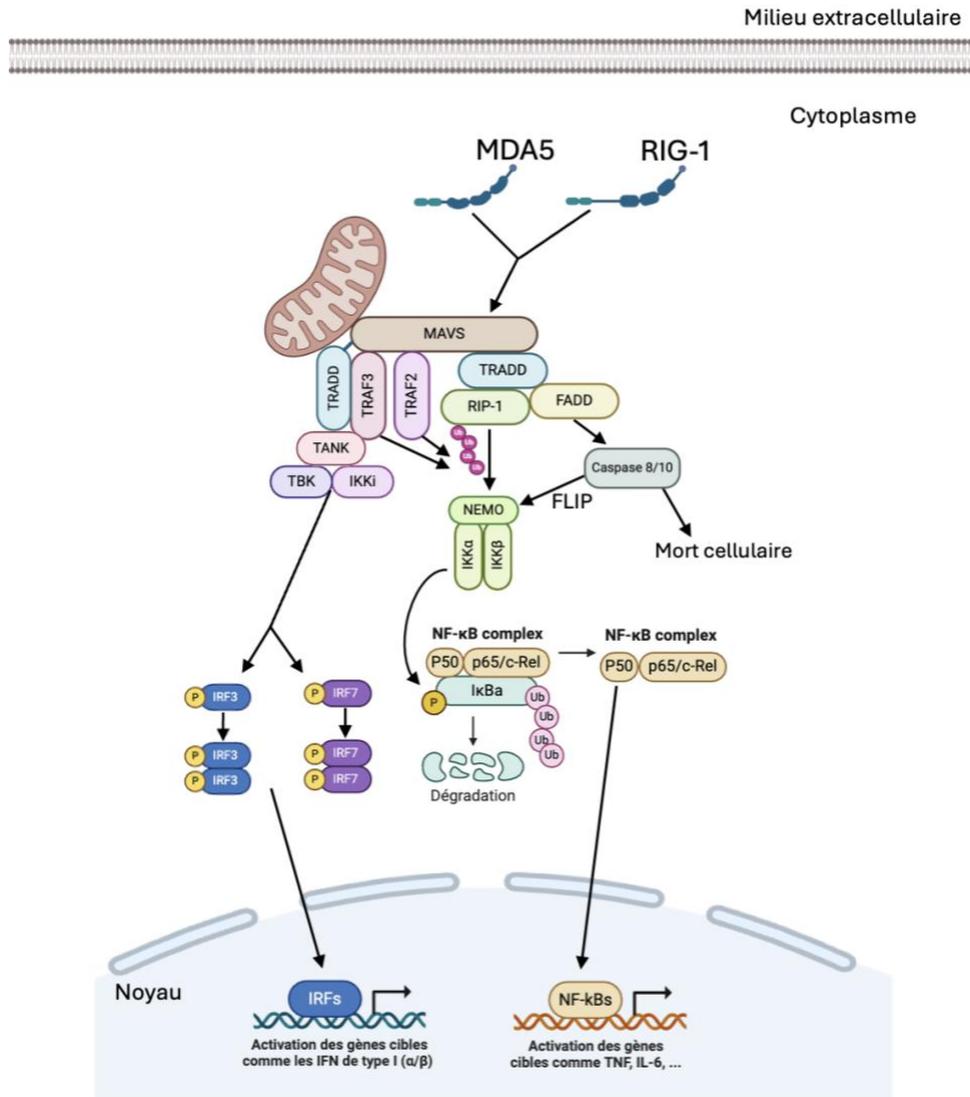


Figure 11 : Voie de signalisation des RIG-1-like receptors (RLR). Figure réalisée sur BioRender.

Une fois activé, RIG-I et MDA5 se lient à la protéine MAVS (Mitochondrial Antiviral Signaling Protein). MAVS est une protéine adaptatrice qui possède un domaine transmembranaire mitochondrial (TM) en C-terminal permettant son ancrage sur la membrane externe des mitochondries. Elle contient également un domaine de type CARD en N-terminal suivi de deux motifs de liaison TRAF (TIM)^{39, 82}. Ceux-ci lui permettent l'interaction avec les protéines TRAF et les CARD de RIG-I/MDA5. L'interaction entre les domaines CARD de RIG-I/MDA5 avec celui de MAVS déclenche la formation de deux grands complexes qui contiennent tous deux la protéine TRADD^{7, 8, 9, 82} (figure 11). Le premier complexe, appelé TRADDosome, comprend les protéines TRADD, FADD et RIP-1. Ce dernier est poly-ubiquitiné par TRAF2 et TRAF3 qui sont également recrutés par MAVS via ses motifs de liaison TRAF. La poly-ubiquitination de RIP-1 va activer les IKK qui vont ensuite activer NF-κB^{7, 8, 9, 82}. La protéine FADD interagit également avec les caspases 8 et 10 qui, en présence de l'inhibiteur FLIP, régule l'activation de NF-κB. Sans ce dernier, la caspase-8 induit la mort cellulaire^{30,82}. Le deuxième complexe formé comprend TRADD, TRAF3 et TANK qui activent TBK1 et/ou IKK(-ε,-i) qui vont, à leur tour,

provoquer la phosphorylation d'IRF3 et IRF7 menant à leur dimérisation et leur translocation nucléaire^{7, 34, 82}. Les facteurs de transcription vont alors provoquer l'expression de l'IFN- β et induire une réponse antivirale^{7, 34, 82} (figure 11).

Outre les virus à ARN, les RLR sont également impliqués dans la reconnaissance des virus à ADN comme par exemple HSV-1. En effet, l'ARN polymérase III (Pol3) cellulaire synthétise l'ADNdb viral cytosolique en ARN portant sur son extrémité 5' les triphosphates susceptible de stimuler RIG-I^{14, 18, 55, 82, 88}. Ces RLR sont donc capable de reconnaître les virus des sept groupes de génomes viraux selon la classification de Baltimore¹⁴.

1.2.4. Lectine-like receptors, CLR

Les CLR sont des récepteurs transmembranaires qui reconnaissent les hydrates de carbone via leur domaine de reconnaissance des hydrates de carbone (CRD)¹⁴. Cette famille est divisée en 17 groupes et sont principalement exprimés par les cellules myéloïdes telles que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques¹⁴. Ils reconnaissent les PAMP présents sur les bactéries, les champignons, les parasites et les virus. Les CLR provoquent l'endocytose des pathogènes reconnus par les cellules myéloïdes, ce qui entraîne une augmentation de l'expression des cytokines et chimiokines inflammatoires, l'activation des inflammasomes et l'accroissement de la présentation d'antigènes aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène¹⁴.

1.2.5. NOD-like receptors, NLR

Les récepteurs à domaine d'oligomérisation nucléotidique (NOD) sont cytoplasmiques et il existe plus de vingt NLR chez l'homme. Ils reconnaissent des produits de dégradation des peptidoglycanes et de l'ARNsb viral⁸².

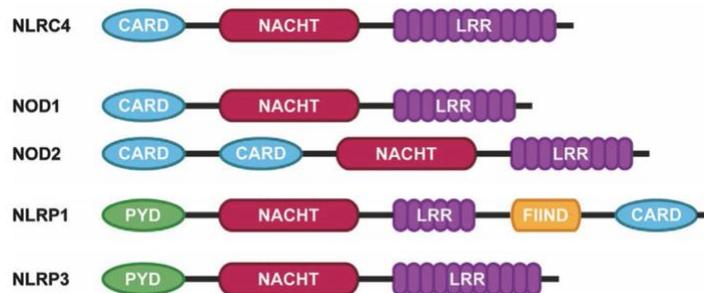


Figure 12: Schéma de la structure des récepteurs NOD-like. Figure adaptée de Platnicha & Muruve, 2019.

Ils sont constitués d'un domaine central de liaison au nucléotide NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) et un domaine C-terminal LRR impliqué dans la reconnaissance des pathogènes (figure 12). Leur domaine N-terminal est variable et permet de les diviser en 3 sous-familles⁸² : (i) La sous-famille NLRC (ou NOD) possède un ou plusieurs domaines CARD comme par exemple NOD1 (ou NLRC1), NOD2 (ou NLRC2) et NLRC4. Elle un rôle dans l'activation des voies NF- κ B et MAP kinase (voie AP-1) (figure 13). (ii) La sous-famille NLRP (ou NALP) comporte un domaine Pyrin (PYD) notamment NLRP1 (ou NALP1) et NLRP3 (ou NALP3). Elle est impliquée dans

l'activation de l'inflammasome. C'est un complexe de l'immunité innée qui recrute la protéine ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) qui va à son tour, recruter la pro-caspase-1 et permettre son activation en caspase 1 inflammatoire. Celle-ci va médier la maturation de l'IL-1 β et d'IL-18, qui une fois sécrétés, vont induire des réponses inflammatoires et la mort cellulaire par pyroptose^{14, 82} (figure 13). (iii) La sous-famille NAIP (non représentée dans les figures 12 et 13) détient un domaine BIR (baciloviral-inhibitor-of-apoptosis-protein repeat-containing domain). Elle permet aussi l'activation de l'inflammasome⁶⁴.

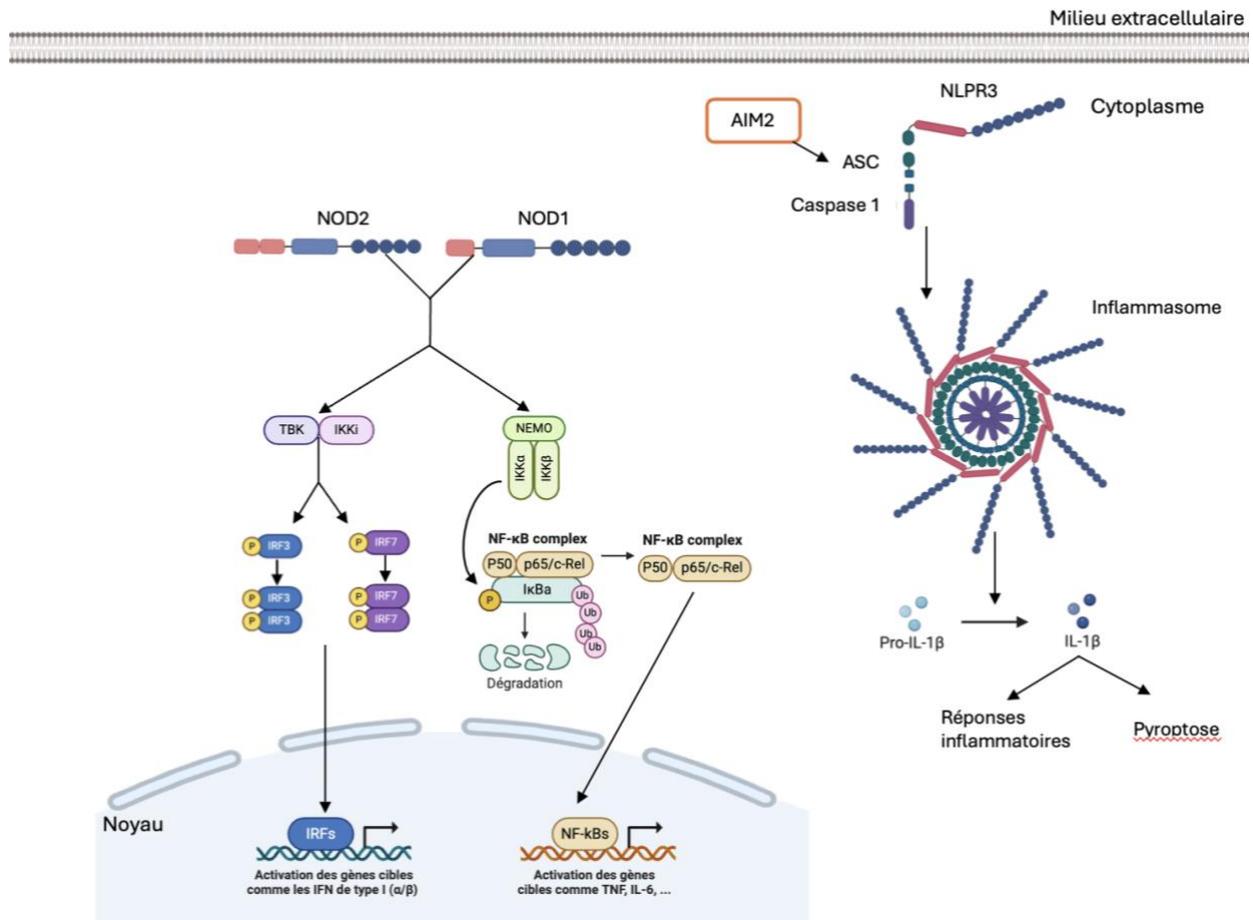


Figure 13: Voie de signalisation des NOD-like receptors, (NLR). Figure réalisée sur BioRender

1.2.6. AIM2-like receptors

Le récepteur d'ADN appelé AIM2 appartient à la famille des interférons inducibles (IFI). AIM2 se lie à l'ADNdb cytosolique par l'intermédiaire de son domaine HIN en C-terminal^{14, 82, 88} (figure 14).



Figure 14: Schéma de la structure du récepteur AIM2. Figure adaptée de Platnicha & Muruve, 2019.

Son domaine PYRIN (ou PYD) en N-terminal, lors de stimulation, interagit avec la protéine ASC. Le domaine CARD de ASC s'associe avec la pro-caspase-1 pour activer la caspase-1 et former

l'inflammasome AIM2. La caspase-1 activée induit le clivage de la pro-IL-1 β et la pro-IL18 en IL-1 β et IL-18^{14, 82, 88} (figure 13).

1.2.7. c-GAS-STING

Cette voie cGAS-STING s'inscrit dans une catégorie de PRR qui est constitué de récepteurs cytosoliques reconnaissant l'ADN db^{14, 55}. Ils peuvent détecter l'ADN exogène issu d'agents infectieux comme les virus mais aussi l'ADN endogène (génomique ou mitochondrial). Ces PRR ont donc un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN ou au stress métabolique^{36, 55}.

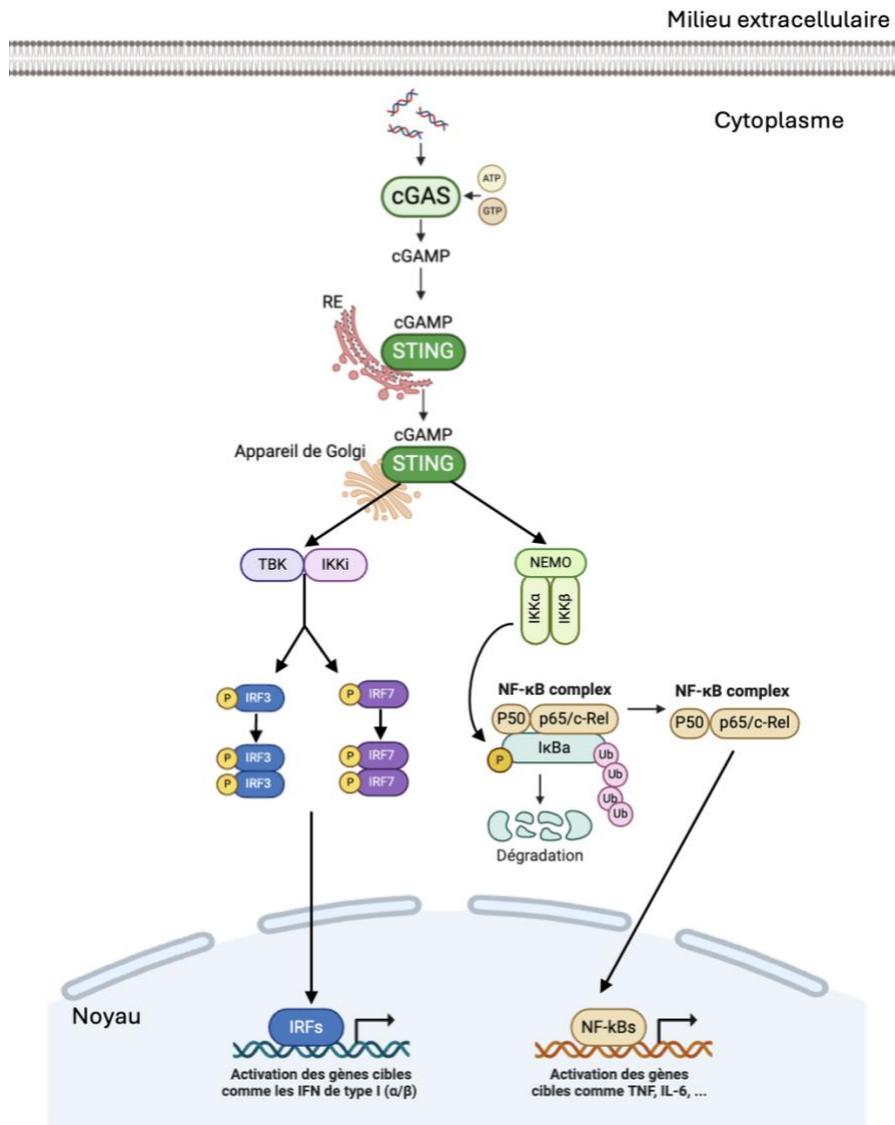


Figure 15: Voie de signalisation cGAS-STING. Figure réalisée sur BioRender.

Parmi ces récepteurs, la protéine cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) est la plus connue et la mieux caractérisée. Il s'agit d'une nucléotidyltransférase capable de synthétiser à partir de GTP et d'ATP un médiateur intracellulaire, le 2'3'-cGAMP. Celui-ci sert de second messenger et va se lier à STING (stimulator of interferon response cGAMP interactor 1) qui un récepteur transmembranaire ancré au réticulum endoplasmique^{7, 14, 36, 37, 88} (figure 15). La liaison entre STING et le 2'3'-cGAMP va provoquer

un changement de conformation de STING et induire sa translocation vers l'appareil de Golgi^{7, 34}. Il va alors recruter TBK1 et le complexe kinase IKK afin d'activer les IRF et NF- κ B ce qui va conduire à la production d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires^{7, 14, 36, 37, 47, 88} (figure 15). Outre l'activation de la réponse aux IFN, la voie cGAS-STING induit également l'autophagie¹⁴. Ce processus confère une protection antivirale par élimination de l'ADN cytoplasmique et des virus à ADN tels que le HSV. En effet, STING déclenche la lipidation de LC3 par l'intermédiaire de WIPI2 et d'ATG5, ce qui représente une étape importante dans la formation des autophagosomes^{14, 88}.

Cette voie permet donc la reconnaissance des virus à ADN comme les herpèsvirus, les adénovirus, le cytomégalovirus, ... mais aussi la reconnaissance des virus à ARN tels que le VIH dû à la formation d'ADN proviral. Enfin, d'autres récepteurs ont été identifiés comme LRRFIP1, DHX9, DHX36, DDX41, IFI16, DNA-PK et MRE11 qui, pour la plupart, utilisent également la voie STING^{14, 78, 87}.

1.2.8. Réponse à l'interféron

Comme décrit précédemment, lorsqu'une cellule est infectée par un virus, elle sécrète des interférons. Ceux-ci vont, via des voies paracrines et autocrines (c'est-à-dire qu'ils agissent à la fois dans la cellule infectée et dans les cellules voisines non infectées), induire un état antiviral des cellules et limiter la propagation du virus^{71, 82}. Il existe 3 types d'IFN^{71, 82} : (i) Les IFN de type I comprennent l'IFN- α et l'IFN- β . Ils sont directement induits en réponse à l'infection virale et ils sont produits par des cellules immunitaires innées mais également dans les fibroblastes. (ii) Les IFN de type II comprennent que l'IFN- γ , produit par les cellules NK et les cellules T activées. (iii) Les IFN de type III comprennent les IFN- λ 1, - λ 2, - λ 3 qui sont directement produits en réponse à une infection virale^{71, 73}.

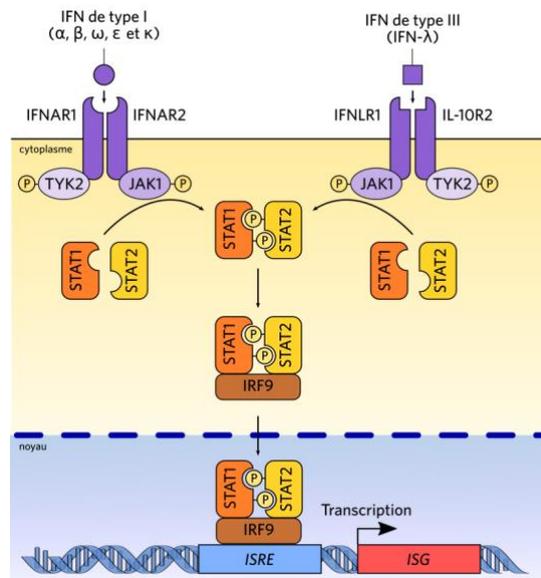


Figure 16: Voie de signalisation en réponse aux interférons I et III. (P.Combemorel, 2018 - Planet-Vie)

Lors de l'expression des IFN de type I, les IFN- α et - β sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et se lient à leurs récepteurs IFNAR1 et l'IFNAR2. La liaison entraîne l'activation de JAK-1 et TYK-2,

kinases associées à ces récepteurs, qui phosphorylent STAT1 et STAT2. Ces protéines vont homodimériser ou hétérodimériser et s'associer à une autre protéine, IRF9 (appelés aussi p48). Ce complexe va transloquer dans le noyau où il peut activer l'expression des IFN-Stimulated-Gene (ISG) qui, en ciblant différents processus cellulaires, inhibent la réplication virale et la propagation du virus^{34, 71, 82} (figure 16). Parmi ces protéines ISG, les mieux caractérisées sont l'isg15, les protéines Mx, la 2', 5'-oligoadénylate synthétase (OAS1) et la protéine kinase R (PKR ou EIF2AK2)^{19, 34, 82}. Cette dernière est une sérine/thréonine kinase antivirale dépendante de l'ARNdb. Une fois activée, la PKR phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α ^{19, 26, 88}. Cette phosphorylation entraîne un arrêt global de la traduction et la formation de granules de stress^{19, 26}. Ainsi, elle bloque la traduction des ARNm cellulaires et viraux et ce qui lui permet d'agir contre les virus à ADN et à ARN^{19, 88}. De plus, PKR favoriserait la signalisation de l'IFN de type I médiée par le RLR via la phosphorylation de l'I κ B et la stabilisation des ARNm des gènes de l'interféron de type I^{19, 26, 88}.

1.3. Stratégies d'échappement au système immunitaire

Les virus sont des agents infectieux dépendant de leur hôte et qui exploitent la machinerie cellulaire à leur profit. Il est donc important qu'ils développent des stratégies pour échapper aux réponses antivirales activées par leur hôte³¹. Les IFN étant les principaux acteurs dans l'activation des réponses antivirales, la plupart des virus ont élaboré des mécanismes moléculaires ciblant ces voies de signalisation afin de réduire leur expression et celle des ISGs^{31, 82}. VZV, co-évoluant avec l'Homme, a mis en place plusieurs stratégies pour échapper au système immunitaire. L'une d'elle est la régulation à la baisse de l'expression des protéines du CMH de classe I et II^{31, 82}. En effet, l'ORF66 du VZV retient les molécules de CMH de classe I dans l'appareil de Golgi des fibroblastes et de cellules MeWo infectés, ce qui entraîne une diminution de leur expression à la surface des cellules. Il réduit aussi le niveau des protéines Jak2 et STAT-1a, inhibant ainsi l'expression des molécules de CMH de classe II^{31, 82}. De plus, la protéine IE62 peut bloquer la sécrétion d'IFN médiée par TBK1 en bloquant la phosphorylation d'IRF3 sur des résidus sérine. Cependant ce blocage est partiel et une partie d'IRF3 peut donc être encore fonctionnelle^{31, 89}. Il a aussi été montré que l'expression d'IE63 (codé par ORF63) en l'absence d'autres protéines virales inhibe la phosphorylation d'eIF2 α ². Ensuite, des résultats obtenus par le laboratoire d'accueil²⁷, montre que VZV cible l'activation de NF- κ B. De fait, VZV est capable d'inhiber l'activation de NF- κ B en induisant une translocation très transitoire des hétérodimères p65/p50 dans le noyau. Ces protéines sont rapidement reséquestrées dans le cytoplasme par I κ B α dont l'expression est alors stabilisée. La stabilisation de I κ B α va empêcher l'accumulation nucléaire des hétérodimères de NF- κ B et *in fine* limiter l'expression de ses gènes cibles (notamment de ICAM-1) et l'activation de la réponse immunitaire innée^{27, 82}.

1.3.1. Inhibition d'IRF3 par la protéine virale ORF47p

Dans les cellules au repos, IRF3 est présent sous deux formes ; la forme I qui est la forme non phosphorylée et la forme II qui correspond à la forme phosphorylée à un niveau bas. Cette phosphorylation basale peut résulter de plusieurs facteurs, notamment la présence de faibles niveaux de LPS ou d'autres agents induisant un stress modéré⁸¹. Lors d'une infection avec un virus, comme le virus Sendai, IRF3 est hyperphosphorylée et cela conduit à l'apparition des formes III et IV⁷² (figure 17).

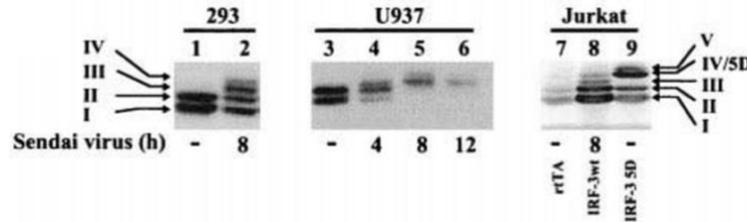


Figure 17 : Formes multiples de la phosphoprotéine IRF3. Phosphorylation de l'IRF3 dans les cellules HEK 293, U937 et rtTA- Jurkat IRF-3wt et rtTA- Jurkat IRF-3(5D). Les cellules Jurkat ont été induites avec du Dox (1 mg/ml) pendant 16 h. Ensuite, les cellules HEK 293, U937 et rtTA-Jurkat IRF3wt ont été infectées par le virus Sendai (80 HAU/ml) pendant 4, 8 ou 12 h ou laissées non infectées (-). La protéine IRF3 endogène a été détectée dans des extraits de cellules entières (55 mg) par Western-Blot à l'aide d'un anticorps anti-IRF3. (Servant et al. 2001)

Cette phosphorylation, médié par TBK-1, se fait dans le domaine C-terminal sur les résidus Ser385 et Ser386 ainsi que sur le cluster sérine/thréonine situé entre les acides aminés 396 et 405. La phosphorylation C-terminale est importante car elle permet l'homodimérisation d'IRF3 et sa translocation nucléaire. Dans des gels SDS-PAGE, les deux premières formes apparaissent sous la forme d'un doublet tandis que les formes III et IV migrent plus lentement et se retrouvent plus haut que des formes I et II (figure 18).

L'ORF47 (homologue de UL13 chez HSV-1 et de la CK2 cellulaire) code pour une phosphoprotéine de 54 kDa présente dans le téguement viral et dans le cytoplasme et le noyau des cellules infectées^{44, 45, 66}. Elle n'est pas nécessaire à la réplication virale en culture cellulaire mais elle est essentielle au tropisme pour les cellules de peau et les cellules T^{45, 57, 66}. Elle participe également à la formation de particules virales complètes^{42, 45, 66}. De plus, cette protéine a la capacité de s'autophosphoryler et de phosphoryler plusieurs protéines virales telles que le transactivateur majeur IE62 du VZV, la glycoprotéine gE, IE63, les protéines codées par l'ORF32 et l'ORF9^{42, 43, 45, 59, 66}.

Notre laboratoire a précédemment démontré que la protéine IRF3 était hyperphosphorylée dans des cellules HEK293 infectées par VZV et ce, dès 8h post-infection⁸¹ (figure 18). L'infection des mêmes cellules par un VZV exprimant une forme tronquée non fonctionnelle de l'ORF47p (VZV ROka47S) a permis de démontrer que la présence de la forme sauvage de la kinase ORF47p était nécessaire pour l'apparition des formes hyperphosphorylées d'IRF3⁸¹ (figure 18A).

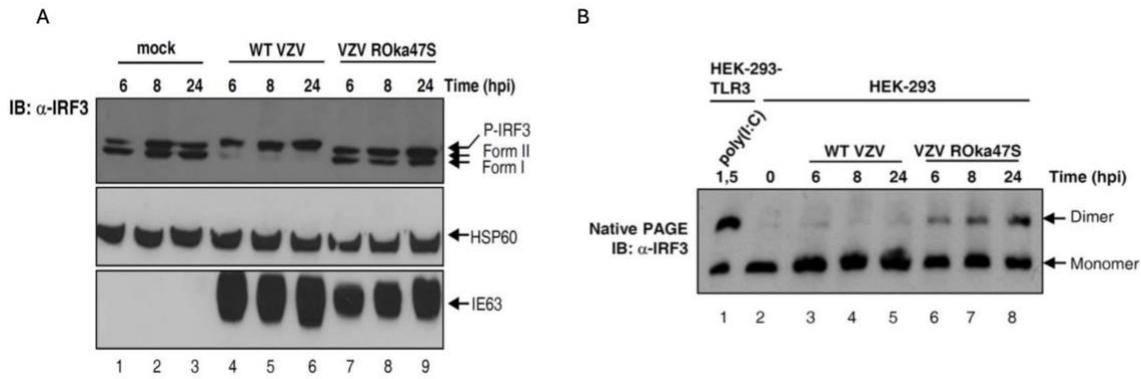


Figure 18: La kinase ORF47p du VZV permet une hyperphosphorylation d'IRF3 non activante. (A) Les cellules HEK-293 ont été infectées par le VZV WT et les deux virus mutants (VZV ROka47S pendant les périodes de temps indiquées. Des extraits cellulaires totaux ont été réalisés et un SDS-PAGE a été réalisé. La membrane a été immunoblotée avec des anticorps spécifiques contre IRF3, HSP60 et IE63. HSP60 et IE63 ont été utilisés comme contrôle pour la charge et l'infektivité, respectivement. (B) Des extraits cellulaires totaux ont été réalisés et l'homodimérisation d'IRF3 a été analysée par électrophorèse sur gel non-dénaturant. La membrane a ensuite été immunoblotée avec un anticorps spécifique contre IRF3 (Vandevenne et al., 2011)

Contrairement à l'hyperphosphorylation provoquée par le virus Sendai, celle provoquée par VZV ne permet pas à IRF3 de s'homodimériser (figure 18B) et de migrer dans le noyau pour déclencher la réponse antivirale. En effet, cette hyperphosphorylation ne se produit pas sur la sérine 396 et donc ne correspond pas aux formes activées hyperphosphorylées III et IV décrites précédemment. Ensuite, par des expériences de co-immunoprécipitation, il a été démontré que ORF47p interagissait directement avec IRF3 (donnée non montrée).

De plus, lors d'analyse par qRT-PCR, il a été observé qu'en l'absence d'une protéine ORF47p fonctionnelle, les cellules infectées expriment plus fortement les gènes cibles dépendant d'IRF3 c'est-à-dire IFN- β et l'ISG15 (figure 19). En conclusion, la kinase virale ORF47p joue un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée anti-VZV via une phosphorylation atypique d'IRF3.

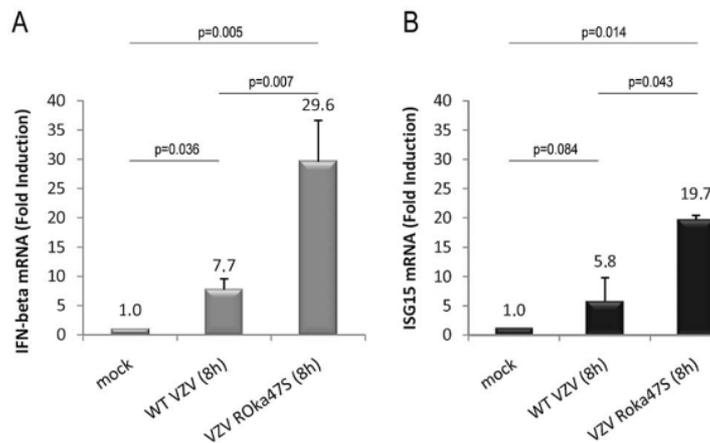


Figure 19: En l'absence d'expression de l'ORF47p, l'expression des gènes dépendant de l'IRF3 est augmentée. Des cellules HEK-293 exprimant de façon stable le TLR3 ont été infectées avec le VZV WT ou le VZV mutant ROka47S pendant 8 heures. L'ARN total a été récolté et son ADNc a été soumis à une PCR quantitative en temps réel en présence de SYBR Green. La RT-PCR a été normalisée en utilisant le niveau d'expression de l'ARN 18S. Les barres d'erreur indiquent la déviation standard de la moyenne. (Vandevenne et al., 2011)

1.3.2. Autres protéines possiblement impliquée dans l'inhibition de la réponse innée

1.3.2.1. ORF9

ORF9p (homologue de VP22 chez HSV-1) est une phosphoprotéine tégumentaire de 302 AA fortement exprimée lors de l'infection lytique du VZV^{66, 67}. Elle est essentielle à la réplication et la croissance virale⁶⁶. Elle comprend dans sa séquence des signaux de localisation nucléaire NLS (Nuclear localization signal) : NLS-1 (aa 16 à 32) et NLS-2 (aa 272 à 275)⁶⁷. Elle possède aussi une région d'export nucléaire, riche en leucine NES (Nuclear export signal ; aa 103 à 117) et une région acide (₈₅EDDFEDIDE₉₃)⁶⁷. ORF9p interagit avec de nombreuses protéines virales comme IE62, ORF11p, les glycoprotéines gE, gN, gH et gI, les protéines de l'enveloppe ORF15p et ORF38p et avec la petite protéine de capsid codée par l'ORF23⁶⁷. Au vu de ses interactions et de sa présence au niveau du TGN, ORF9p semble avoir un rôle important dans le processus de formation des particules virales^{66, 67}. De plus, la sérine/thréonine kinase ORF47p phosphoryle ORF9p dans sa région acide (₈₅EDDFEDIDE₉₃) et cette phosphorylation semblerait indispensable pour l'assemblage des particules virales et le transport des virions vers la surface cellulaire^{12, 16, 66}. La délétion de la région acide d'ORF9p provoque l'accumulation nucléaire d'ORF9p mais également d'ORF47p et conduit à une accumulation de virions dans l'espace péri-nucléaire⁶⁷. Un potentiel rôle de l'interaction entre ORF9p et ORF47p dans l'hyperphosphorylation d'IRF3 n'a pas encore été investigué à ce jour.

1.3.2.2. ORF61

L'ORF61 (homologue de ICP0 chez HSV-1) code pour une phosphoprotéine de 62 à 66 kDa. Elle a un rôle régulateur en trans-activant ou trans-réprimant la transcription d'autres protéines du VZV comme IE4 et IE62 mais aussi son propre promoteur^{83, 85, 89}. Elle possède également un domaine RING finger N-terminal permettant à ORF61p d'avoir un rôle d'ubiquitine ligase, nécessaire à ses fonctions de régulation^{83, 85, 89}. Cette protéine est exprimée très tôt dans le cycle lytique de VZV et elle augmente son infectivité^{85, 89}. En outre, une délétion d'une grande partie de l'ORF61p entrave la réplication du VZV en culture cellulaire. Comme son homologue ICP0, ORF61p serait impliquée dans la prévention de l'activation du système immunitaire inné^{85, 89}. En effet, lorsqu'elle est exprimée indépendamment du contexte infectieux, elle peut interagir avec la protéine IRF3 activée et favoriser son ubiquitination et sa dégradation via le protéasome, empêchant ainsi l'induction de l'expression de l'IFN- β , ainsi que deux ISG en aval de l'IFN- β , ISG54 et ISG56^{31, 89}. De plus, ORF61p empêcherait la phosphorylation et l'ubiquitination d'I κ B α et entraverait donc l'activation de la voie NF- κ B^{31, 85}. Sur la base de toutes ces observations, ORF61p serait une protéine intéressante à mieux caractériser dans le contexte infectieux.

2. Objectifs du travail

Sur base des résultats précédemment obtenus par le laboratoire et de la littérature, le but principal de ce mémoire est de mieux comprendre comment VZV parvient à échapper au système immunitaire inné. Pour se faire, le travail a été divisé en deux objectifs distincts.

Le premier objectif est en corrélation avec la thèse de P. Vandevienne. En effet, elle a démontré que VZV, via sa protéine kinase ORF47p, induit une hyperphosphorylation atypique de l'IRF3. Cependant les procédés mis en place par ORF47 pour entraîner cette phosphorylation ne sont pas connus. Ce premier objectif est donc de mieux comprendre le mécanisme utilisé par ORF47 pour induire l'hyperphosphorylation de IRF3 c'est-à-dire si la protéine de l'ORF47 peut le phosphoryler directement ou si elle se trouve dans un complexe actif. Des mutants VZV -47S, -47KD, -9 Δ AC, et -9 Δ AC-27HA-66myc ont été créés avant mon arrivée au laboratoire de Virologie & Immunologie et ont été utilisés pour répondre à ces questions.

Ensuite, grâce à des recherches dans la littérature, la protéine codée par l'ORF61 semble être impliquée dans l'inhibition de système immunitaire en dégradant IRF3 et en ayant une influence sur la voie de NF- κ B. Cependant, les expériences qui ont permis de démontrer les actions de ORF61 sur la réponse immunitaire se font dans un système artificiel dans lequel ORF61 est transfecté et les voies immunitaires des cellules sont activées par le virus de Sendai (SeV). Le deuxième objectif de ce mémoire est donc de mieux caractériser la protéine de ORF61 et son impact sur la réponse immunitaire innée à l'aide de virus mutants invalidés dans l'expression de cette protéine. Ces mutants ont été générés par le laboratoire juste avant mon arrivée au laboratoire.

3. Matériels et méthodes

3.1. Réactifs

Le LPS (#L4391) provient de Sigma-Aldrich. Le sel de potassium de l'acide polyinosinique-polycytidylique [poly (I:C) LMW] (#tlrl-picw) et le sel de sodium de l'acide poly(désoxyadénylique-désoxythymidylique) [poly(dA :dT)] ont été obtenus auprès d'Invogen et utilisés, tous les deux, à une concentration de 1 mg/ml. Le TNF α (#300-01A) a été obtenu auprès de PeproTech EC (UK) et utilisé à une concentration de 500 U/ml. Le jetPEI a été acheté chez Polyplus et il est utilisé à une concentration de 1mg/ml. La solution de trypsine-EDTA 10X provient de chez Biowest (#X0930) et elle est rendue à une concentration 1X pour son utilisation.

3.2. Culture cellulaire

La lignée cellulaire du mélanome humain (MeWo) et les fibroblastes oraux primaires ont été cultivés dans du milieu EMEM (Eagle's minimal essential medium, #L0430, Biowest, France) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal, 1% de glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine. La lignée cellulaire primaire ARPE-19 et la lignée cellulaire A549 ont été cultivées dans du milieu DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle, Thermo Fisher Scientific, USA) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal et 1% de pénicilline/streptomycine. Toutes les lignées sont incubées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂.

3.3. Culture des virus

La souche de type sauvage du VZV et les différents mutants sont obtenus par transfection au PEI (polyéthylèneimine) de plasmides BAC contenant l'entièreté du génome de VZV sauvage ou muté dans les gènes cibles. Les virus ont été maintenus en culture dans la lignée MeWo, la seule capable de soutenir une croissance efficace des mutants de délétion d'ORF61.

3.4. Infection des cellules par VZV

3.4.1. Co-culture

Les cellules des différentes lignées ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Elles ont ensuite été infectées par co-culture avec des cellules MeWo infectées par le VZV sauvage et les mutants dans un rapport de 1 pour 1, pendant 1 heure à 37°C. L'inoculum a ensuite été lavé par du PBS et du milieu frais a été remis par-dessus. Les cellules ont ensuite été récoltées après 24h d'infection.

3.4.2. Tri FACS

Les cellules MeWo infectées par les différents virus ont été trypsinisées et resuspendues dans un volume de 2 mL avec du milieu EMEM contenant 0,2% de primocin. Elles ont ensuite été passées sur un tamis avec des pores de 70 μ M pour retirer les *syncytia* formés afin d'obtenir des cellules infectées isolées. Les cellules ont été récupérées dans des tubes FACS puis triées au FACS afin de ne récolter que des

cellules infectées. Une fois le tri réalisé, un nombre adéquat de cellules a été déposé sur une monocouche de cellules MeWo ou de fibroblastes oraux primairesensemencés dans des plaques 12 puits.

3.5. Transfection des cellules

Pour les expériences de transfection au poly(I :C) et au poly(dA :dT), les cellules ont été cultivées à 70% de confluence dans des plaques 6 puits. Ensuite, elles ont été transfectées avec un mélange jetPEI / poly(I :C) ou jetPEI / poly(dA :dT) dans un rapport de 1,5 pour 1 c'est-à-dire 3µL et 2µg respectivement pour 1 puit. Les cellules sont ensuite récoltées aux périodes indiquées dans les expériences.

3.6. Observation de la croissance virale par l'IncuCyte

Pour pouvoir observer la croissance des foyers viraux des virus WT, 47S, 47KD et les 61 del dans deux lignées cellulaires, des cellules MeWo et des fibroblastes oraux primaires ont étéensemencés dans une plaque 12 puits (6 puits pour une lignée). Le lendemain, les puits ont été infectés par les différents virus après un tri au FACS. Au vu de la différence de croissance entre le virus WT et les mutants, la quantité de cellules infectées déposées dans les puits a été adaptée. En effet, 75 cellules infectées ont été déposées pour le virus WT, 100 cellules pour les virus 47S et 47KD et 1000 cellules pour les virus 61 del. La plaque a ensuite été placée dans l'incubateur à 37°C contenant une atmosphère de 5% de CO₂ pendant 1h, avant d'être placée dans l'automate de photographie (IncuCyte®, Satorius SX5). Des photos des puits ont été prises avec un objectif X4 toutes les 12h pendant 120h. Les photos ont été traitées avec le logiciel Image J pour générer des images dont la fluorescence est représentée en « fire ». Les images générées sont ensuite alignées les unes derrière les autres pour former un film.

3.7. Western Blot

3.7.1. Protocole du western blot pour des extraits cellulaires totaux

Les cellules ont étéensemencées en plaque 6 puits et infectées, 24h plus tard, par coculture avec des cellules MeWo infectées par le virus sauvage ou les virus mutants. Après 1h de contact, l'inoculum a été retiré et les cellules ont été lavées avec du PBS, puis remises en culture dans du milieu complet pendant 24h. Après aspiration du milieu de culture, les puits ont été lavés par du PBS et le tampon de lyse TR 1X (Tris HCl 60 mM, Glycérol 10%, SDS 2,5%, B-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,001%) additionné de 0,05% de benzonase a été directement ajouté dans les puits. Les cellules ont été grattées, transférées dans des eppendorfs et placées sur glace pendant 1h. Les échantillons ont ensuite été portés à ébullition pendant 2 minutes et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE avec un gel 9% pour la voie IRF3 et 10% pour la voie NF-κB. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF). Après le transfert, la membrane a été bloquée avec du TBS-Tween contenant 3 ou 5% de lait écrémé en poudre. Après découpe, elle a ensuite été incubée avec les anticorps primaires indiqués pendant 2h ou 4h (pour les phosphorylations). Une fois

l'incubation finie, la membrane a été lavée trois fois avec du TBS-Tween puis elle a été incubée avec les anticorps secondaires pendant 1h. De nouveau, elle a été lavée trois fois pendant 5 minutes avec du TBS-Tween. Enfin, la membrane a été révélée à l'aide de la préparation ECL maison (Luminol/Tris 10 mM, Acide hydroxycoumarique, H₂O₂ 30%) et dans certains cas avec le kit commercial de détection Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA).

3.7.2. Anticorps

Le tableau ci-dessous reprend les anticorps qui ont été utilisés dans les western blot et les dilutions respectives.

<i>Nom</i>	<i>Poids moléculaire</i>	<i>Espèce de production</i>	<i>Dilution</i>	<i>Référence</i>	<i>Producteur</i>
Voie IRF3					
TBK1	84 KDa	Rabbit	1 :1000	3504	Cells signaling technology
P-TBK1	84 KDa	Rabbit	1 :1000	5483	Cells signaling technology
IRF3	50-55 KDa	Rabbit	1 :2000	11312-1-AP	ProteinTech
P-IRF3 (S396)	50-55 KDa	Rabbit	1 :1000	29047	Cells signaling technology
P-IRF3 (S396)	50-55 KDa	Rabbit	1 :1000	4947	Cells signaling technology
IRF7	65 KDa	Rabbit	1 :1000	13014	Cells signaling technology
P-IRF7	65 KDa	Rabbit	1 :1000	12390	Cells signaling technology
Voie cGAS-STING					
P-STING	30-40 KDa	Rabbit	1 : 1000	50907	Cells signaling technology
Voie AP-1					
cJun	35-45 KDa	Rabbit	1 :2000		
Voie PKR					
PKR	68 KDa	Rabbit	1 :2000	18244-1-AP	ProteinTech
P-PKR	68 KDa	Rabbit	1 :2000	SAB5701903	Sigma
eIF2a	37 KDa	Mouse	1 :2000	PCRP-EIF2S1-2A10	DSHB
P-eIF2a	37 KDa	Mouse	1 :1000	68023-1-lg	ProteinTech
Voie isg					
STAT1	84-91 KDa	Rabbit	1 :1000	14994	Cells signaling technology
P-STAT1	91 KDa	Rabbit	1 :1000	8826	Cells signaling technology
IRF9	48 KDa	Rabbit	1 :1000	76684	Cells signaling technology

Voie NFkB					
IκBα	37 KDa	Rabbit	1 :1000	9242	Cells signaling technology
IKKα	84 KDa	Mouse	1 :1000	556532	BD Pharmigen
P-IKK	90 KDa	Rabbit	1 :1000	2078	Cells signaling technology
P65	65 KDa	Rabbit	1 :2000	sc-109x	Santa Cruz Biotechnology
P-P65	65 KDa	Rabbit	1 :1000	3031s	Cells signaling technology
P50	50 KDa	Goat	1 :2000	sc-1191x	Santa Cruz Biotechnology
Protéine cellulaire					
GAPDH	36 KDa	Mouse	1 :2000	MA5-15738	Invitrogen
HSP 27	27 KDa	Mouse	1 :1000	CPTC- HSPB1-1-s	DSHB
PCNA	37 KDa	Mouse	1 :1000	sc-56	Santa Cruz Biotechnology
NBS	90 KDa	Mouse	1 :2000	611870	BD Pharmigen
MEK-2	43 KDa	Mouse	1 :1000	sc-136261	Santa Cruz Biotechnology
Protéine virale					
IE62	140 KDa	Rabbit	1 :2000	/	Maison
IE63	30 KDa	Rabbit	1 :1000	/	Maison
ORF9	42-50 KDa	Rabbit	1 :2000	/	Maison

3.8. Extraction cyto-noyau

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 60 cm² et ont été infectées par les différents virus par coculture, comme décrit précédemment. Vingt-quatre heures plus tard, elles ont été rincées avec du PBS et 600 µL de trypsine ont été ajoutés. Une fois trypsinisées, 9,4 mL de milieu EMEM contenant 10% de FBS ont été rajoutés afin de collecter les cellules dans des tubes. Elles ont alors été centrifugées à 350 g pendant 5 minutes à 4°C. Après avoir jeté le surnageant, les cellules ont été lavées avec 10 ml de PBS. De nouveau une centrifugation a été réalisée avec les même paramètres que la première. Puis les cellules ont été resuspendues dans le tampon A (Tris-Cl, pH8 15 mM ; NaCl 15 mM ; KCl 60 mM ; EDTA, pH8 1 mM ; EGTA, pH8 0,5 mM) contenant les inhibiteurs de phosphatases (PI) et transférées dans des Eppendorf de 1,5 mL. La quantité ajoutée du tampon A + PI dépend du culot de cellules et ne dépasse pas 500 µL. Ensuite, le tampon A + 0,06% de NP40 a été ajouté V/V dans les Eppendorf. Les tubes ont été mélangés délicatement et mis sur glace pendant 12 minutes. Par la suite, la fraction cytoplasmique (= surnageant) a été récoltée après une centrifugation à 350g pendant 5 minutes à 4°C. Pour récolter la fraction nucléaire, le culot a d'abord été resuspendu dans 1 mL de tampon NSB (Glycérol 25% ; MgAc₂ 5 mM ; HEPES, pH7,3 5 mM ; EDTA 0,08 mM) contenant les PI et 0,5 mM de DTT. Après une centrifugation à 350 g pendant 5 minutes à 4°C, les noyaux ont été lysés à l'aide du tampon de lyse nucléaire (Glycérol 10% ; HEPES, pH7,5 20 mM ; NaCl 150 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ;

NP40 0,8%) contenant les PI, 0,5 mM de DTT et 0,05% de benzonase. Puis, les tubes ont été placés sur un agitateur rotatif pendant 1h à 4°C. Pour finir, la fraction nucléaire a été récoltée après une centrifugation à 12 000g pendant 5 minutes à 4°C. Les protéines nucléaires et cytoplasmiques ont ensuite été dosées par la méthode de Bradford (BCA, Pierce) puis utilisées pour le Western Blot..

3.9. PCR quantitative en temps réel

3.9.1. Protocole

L'ARN total a été isolé à partir des cellules traitées et/ou infectées, à l'aide du kit NucleoSpin RNA (REF: 740955.250) de Macherey-Nagel (Allemagne) selon les instructions du fabricant. La transcription inverse a été effectuée avec l'aide du kit RevertAid (K1631) de Thermo Scientific. La quantité d'ADNc produite était de 1000ng et les échantillons ont été dilués pour atteindre une concentration en ADN de 2,5 ng/μL. Ensuite, 4 μL d'ADNc ont été soumis à une PCR quantitative avec le Lightcycler 480 II - 384 wells (Roche Diagnostics), en utilisant le mélange SYBR green (Taqyon™ No ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP, Eurogentec). Les expériences ont été réalisées au moins en trois exemplaires. Les différences (n-fold) entre les échantillons ont été calculées en utilisant la méthode du Δ-Ct. Les valeurs P et les graphiques ont été obtenus à l'aide du logiciel Graphpad Prism (version 9.5.0). P-value < 0,05, statistiquement différent ; P-value > 0,05 pas statistiquement différent.

3.9.2. Amorces (Primers)

Les différentes amorces utilisées sont reprises dans le tableau suivant :

Nom de l'amorce	Séquence	Provenance
IFN-β RV	5'-AGCCTCCCATTCAATTGCCA-3'	IDT (Integrated DNA Technologies)
IFN-β FW	5'-AGTAGGCGACACTGTTTCGTG-3'	IDT
ISG 15 RV	5'-ACACCTGGAATTCGTTGCC-3'	IDT
ISG 15 FW	5'-CATCTTTGCCAGTACAGGAGCT-3'	IDT
ISG 54 RV	5'-GGATGAGGCTTCCAGACTCCAA-3'	IDT
ISG 54 FW	5'-GGAGCAGATTCTGAGGCTTTGC-3'	IDT
ISG 56 RV	5'-CCACACTGTATTTGGTGTCTAGG-3'	IDT
ISG 56 FW	5'-TCATCAGGTCAAGGATAGTC-3'	IDT
UBC RV	5'-GGTCTTGCCAGTGAGTGTCT-3'	IDT
UBC FW	5'-CTGGAAGATGGTCGTACCCTG-3'	IDT
IE63RV	5'-CGCTATCGTCTTACCACCATCA-3'	IDT
IE63FW	5'-GACGCACTGCTTACGGCGTACT-3'	IDT
gB RV	5'-GGCACGCAACTCAACTGGCA-3'	IDT
gB FW	5'-CGCCCGTCTCTATCTCCAAGAATT-3'	IDT

4. Résultats

4.1. Description des mutants du VZV utilisés dans ce travail

Avant mon arrivée au laboratoire, des mutants du virus VZV ont été créés avec la technique "en passant". Elle consiste à insérer via un système de recombinaison homologue une mutation ponctuelle, une insertion ou une délétion d'une courte séquence dans une région d'intérêt du BAC-VZV contenant l'entièreté du génome viral. Ensuite, les BAC contenant l'entièreté du génome du VZV sauvage ou porteurs de mutations sont transfectés en cellule MeWo et ces dernières sont passées tous les deux jours, jusqu'à apparition des foyers d'infection caractéristiques.

Le vecteur BAC de départ dans lequel est cloné le génome pOka de VZV exprime une protéine fluorescente verte (l'eGFP) ce qui permet de détecter facilement les cellules transfectées et/ou infectées via un microscope à épifluorescence. Ce vecteur BAC est cloné dans la région intergénique entre les ORF60 et 61 de VZV et est entouré sites loxP permettant de retirer la séquence squelette du BAC via l'intervention de la CRE recombinase. Le vecteur BAC-VZV-wt contient également une cassette d'expression de la luciférase, entre les ORF65 et 66, permettant des analyses de réplication virale en modèles animaux. Tous les mutants de VZV qui ont été générés dans mon laboratoire d'accueil étaient basés sur ce contexte génétique. Depuis la découverte du gène VLT et de l'existence de plusieurs transcrits exprimés dans cette région, il s'avère que le squelette du BAC (environ 9000 bp) est donc localisé au niveau de l'intron 1 du gène VLT. L'impact de la présence du BAC dans cet intron sur l'expression des différents isoformes de VLT n'est pas connu à ce jour. Le travail effectué lors de mon mémoire s'inscrit dans une collaboration avec le laboratoire du professeur Ponsaerts de l'université d'Anvers et qui vise à déterminer l'impact de l'inhibition de la réponse immunitaire innée sur la capacité de VZV à se propager dans des neurones différenciés à partir de cellules souches. Il a donc été décidé de cloner un gène codant pour une protéine fluorescente rouge (TandemdimerTomato, abrégée tdTOM) entre les ORF65 et 66, en lieu et place du gène codant pour la luciférase. Ce BAC-VZV-wt-tdTOM a servi de base génétique pour l'introduction des mutations dans ORF47 et dans ORF61. La transfection des BAC de cette lignée a été réalisée en MeWo-Cre, une lignée de MeWo exprimant stablement la CRE recombinase. Directement après transfection, une fluorescence verte et une fluorescence rouge sont observées dans les cellules, Après quelques passages en culture, la fluorescence verte disparaît, confirmant le retrait de la séquence du BAC. Le tableau ci-dessous reprend un résumé des mutants créés.

Mutant	Background génétique	Gènes mutés	Fluorescence	Backbone du BAC	Source
WT	BAC-VZV-wt-tdTOM	x	rouge	floxé	fait au laboratoire
47S	BAC-VZV-wt-tdTOM	ORF47 (stop après 61 codons)	rouge	floxé	fait au laboratoire
47KD	BAC-VZV-wt-tdTOM	ORF47 (mutation ponctuelle D282N)	rouge	floxé	fait au laboratoire
61del1	BAC-VZV-wt-tdTOM	ORF61 Δ 1-11-frameshift (= délétion partielle intron 4 VLT)	rouge	floxé	fait au laboratoire
61del2	BAC-VZV-wt-tdTOM	ORF61 Δ 1-17-frameshift (= délétion totale intron 4 VLT)	rouge	floxé	fait au laboratoire
61del3	BAC-VZV-wt-tdTOM	ORF61 Δ 71-165-frameshift (délétion partielle intron 3 VLT)	rouge	floxé	fait au laboratoire
9 Δ AC	BAC-VZVwt	ORF9 (délétion de la région acide)	verte	présent	fait au laboratoire
9 Δ AC-27HA-66myc	BAC-VZVwt-2HA-66cMyc	ORF9 (délétion de la région acide)	verte	présent	fait au laboratoire
ROka47S	VZV Oka	ORF47 (stop après 166 codons)	x	x	obtenu de Jeffrey Cohen

4.1.1. Les mutants de l'ORF47 : 47S et 47KD

Deux mutants au niveau de l'ORF47 ont été utilisés. Le mutant 47S obtenu par insertion d'un codon STOP après les 61 premiers acides aminés (aa) dans sa séquence codante. Il est légèrement différent de celui utilisé précédemment au laboratoire. En effet, le ROka47S portait le codon stop sur le 167^{ème} codon et produisait donc une protéine tronquée de taille plus grande. Le mutant 47KD, porte une mutation dans le site actif (D282N). Le remplacement de l'aspartate par une asparagine empêche la liaison de l'ATP au site actif et ne permet donc plus son activité kinase^{5, 65}. Cela permettrait de prouver que l'activité kinase de la protéine 47 est nécessaire pour observer l'hyperphosphorylation d'IRF3. De plus, contrairement au mutant 47S, le mutant 47KD pourraient maintenir les interactions avec une grande partie de ses partenaires.

4.1.2. Les mutants de l'ORF9 : 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc

Les deux mutants obtenus pour l'ORF9 sont des mutants dont la région acide a été totalement délété. Ils sont employés afin de démontrer si la kinase 47 est active dans un complexe qui phosphoryle IRF3. En effet la délétion de la région acide de l'ORF9 ne permet plus son interaction avec 47. La différence entre les deux mutants est que le mutant 9 Δ AC-27HA-66myc possède des tags sur les protéines codées par l'ORF27 et l'ORF66. Ce dernier a d'abord été utilisé car il était disponible dans le laboratoire. Les premiers résultats obtenus étaient prometteurs mais l'ajout des tag sur les protéines des ORF27 et 66 ont peut-être un impact sur ceux-ci. Le mutant 9 Δ AC a alors été créé mais les résultats pour celui-ci sont nettement moins impactant. Dès lors, les deux mutants seront analysés dans le cadre de ce travail.

4.1.3. Les mutants de l'ORF61 : 61del 1, 61del 2 et 61del 3

Les mutants d'ORF61 sont utilisés, dans ce mémoire, pour caractériser la protéine 61 et son rôle possible dans l'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte. Il en existe 3 : le 61del 1, 61del 2 et 61del 3 qui possèdent tous une délétion au niveau de l'ORF61 mais qui est différente selon les mutants (figure 20).

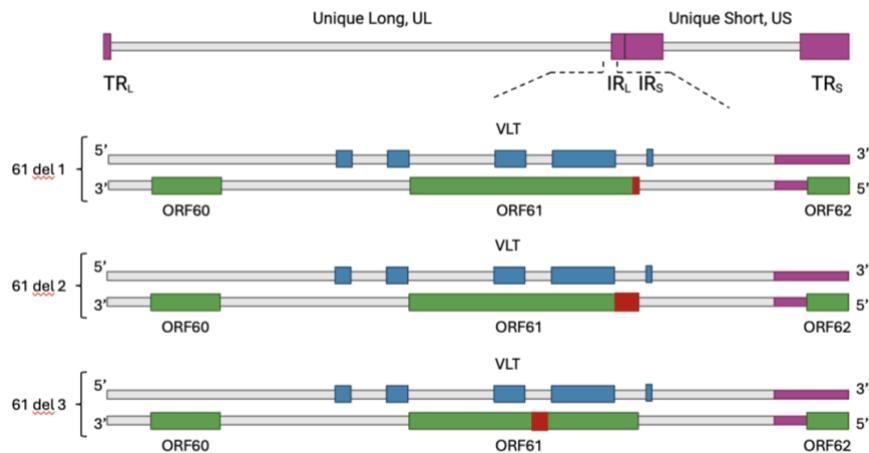


Figure 20: Schéma des délétions introduites dans l'ORF61. (Figure réalisée sur BioRender)

Le mutant 61del 1 a une délétion au niveau du promoteur ainsi que les 11 premiers codons de la séquence de la protéine. Le mutant 61del 2 contient, lui, une délétion de tout l'intron 4 de VLT c'est-à-dire tout le promoteur, le 5'UTR et les 17 premiers acides aminés de IE61. Enfin, le 61del 3 comporte une délétion partielle de l'intron 3 de VLT, correspondant aux acides aminés 71 à 165 d'ORF61p et introduisant un décalage de phase et un arrêt de traduction.

4.2. Analyse de la croissance virale des différents mutants

La croissance du VZV sauvage et des mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2 et 61del 3 a été analysée dans les cellules MeWo et dans des fibroblastes oraux primaires. Pour pouvoir observer la croissance des foyers, les cellules MeWo et les fibroblastes oraux primaires ont étéensemencés dans une plaque 12 puits et infectés par ajout de MeWo infectées, préalablement triées au FACS. La plaque a ensuite été placée dans l'automate de photographie (IncuCyte®, Satorius SX5) qui prend une photo avec l'objectif X4 de chaque puits toutes les 12h pendant 120h. Pour chaque virus, une série de photos d'un foyer caractéristique a été sélectionnée au temps d'infection 24h/48h/72h/96h/120h. Les photos ont été traitées avec le logiciel Image J pour générer des images dont la fluorescence est représentée en « fire » (figure21).

Par rapport au virus sauvage, les mutants VZV 47S, 47KD semblent montrer un léger défaut de croissance. Par contre, pour les mutants VZV 61del 1, 61del 2 et 61del 3, la délétion de l'ORF61 impacte drastiquement la propagation virale (figure 21). En effet, la taille des foyers d'infection est fortement réduite par rapport au VZV sauvage.

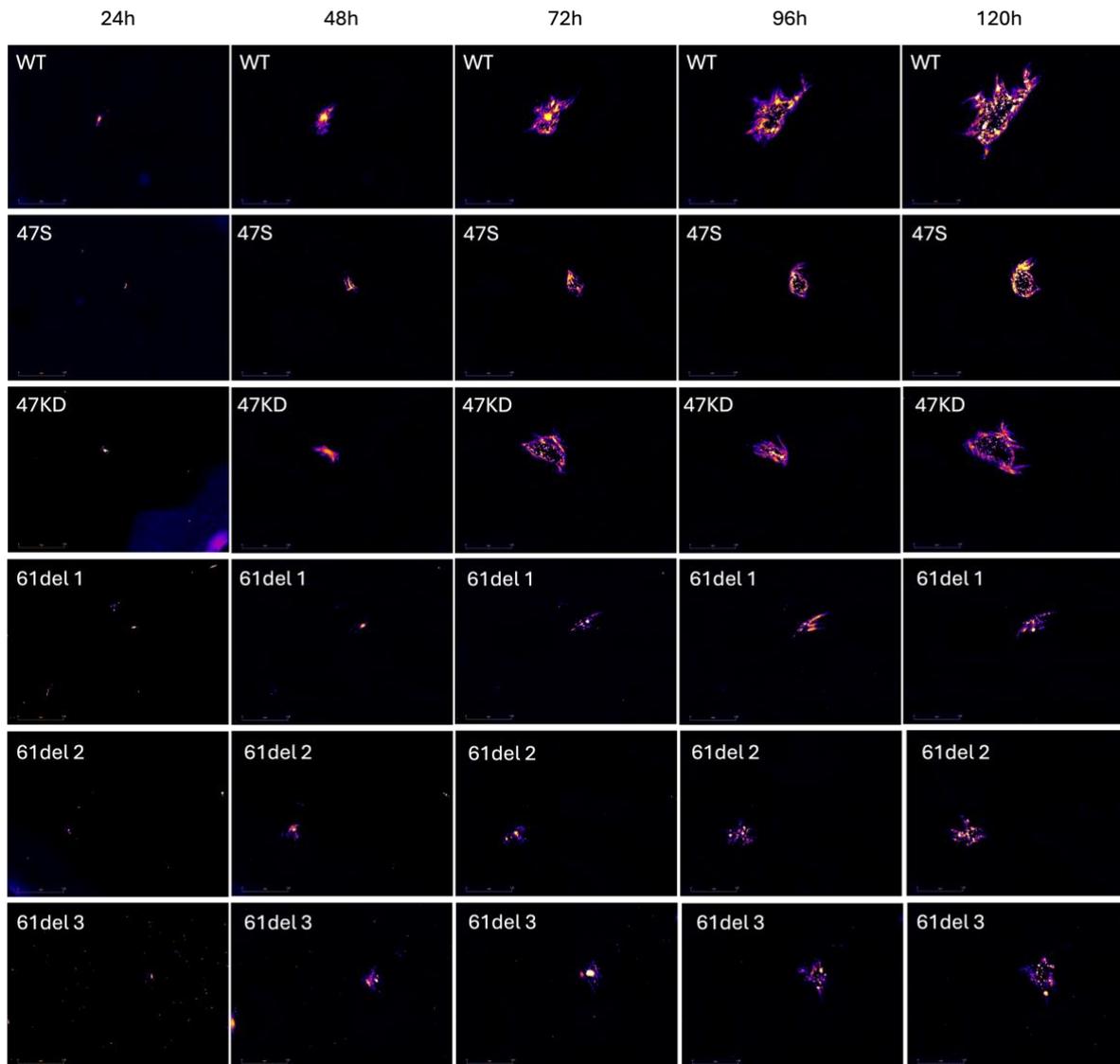


Figure 21 : Croissance virale du virus VZV WT et des mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2 et 61del 3. Les mutants VZV 47S et 47KD présentent un léger défaut de croissance majeurs tandis que les mutants 61del 1, 61del 2 et 61del 3 impacte fortement la propagation virale. Les images ont été obtenues après une infection par les différents virus après un tri FACS de la plaque contenant les cellules MeWo et les fibroblastes primaires oraux. Cette plaque a été placée dans un automate (IncuCyte® Sx5) et des photos de chaque puits ont été prises toutes les 12h pendant 120h d'infection. Une série de photos d'un foyer caractéristique a été sélectionnée au temps d'infection 24h/48h/72h/96h/120h. Les photos sont traitées avec le logiciel Image J pour générer des images dont la fluorescence est représentée en « fire ».

Ensuite, l'évolution de la croissance virale en fonction de l'aire des foyers viraux présents dans les cellules MeWo et les fibroblastes oraux primaires a été analysée. L' Incucyte® Sx5, a automatiquement délimité les foyers ce qui lui a permis de mesurer leurs aires. Les « fold induction » ont été obtenus en divisant l'aire aux temps 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 96h, 108h et 120h par celle à 12h d'infection. Les graphiques de la figure montrent que la délétion de l'ORF61 diminue très fortement l'aire des foyers d'infection par rapport aux autres virus. Cela veut dire que la mutation impacte la croissance virale, voire empêche cette croissance (figure 22B). Au contraire, les mutants 47S et 47KD montre un léger défaut de croissance par rapport au virus sauvage dans les cellules MeWo (figure 22A) tandis que ce défaut de croissance augmente dans les fibroblastes oraux primaires (figure 22B).

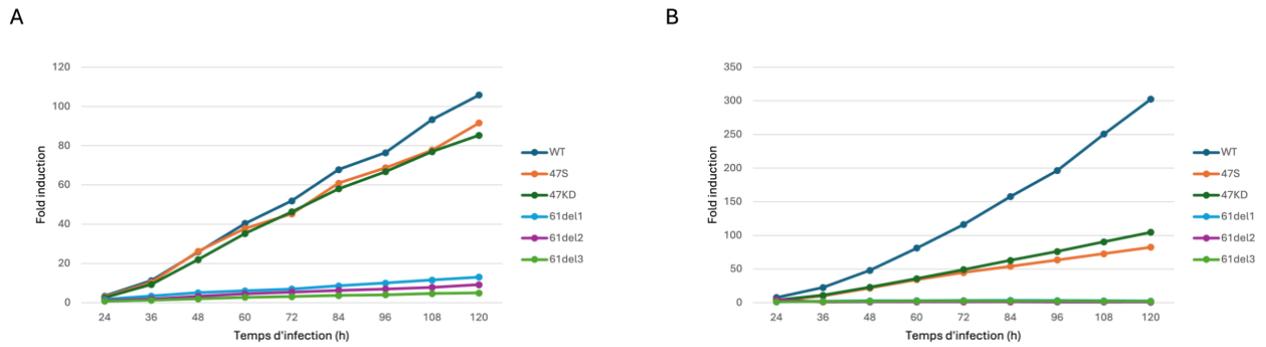


Figure 22 : Évolution de la croissance virale dans les cellules MeWo et les fibroblastes oraux primaires infectés par les différents virus. Des cellules MeWo et des fibroblastes oraux primaires ont été infectées par des cellules infectées par les virus WT, VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2 et 61del 3 et triée au FACS. Des photos ont été prises toutes les 12h pendant 120h en fluorescence rouge via l'automate Incucyte® Sx5. Ce dernier a automatiquement délimité les foyers l'aire totale où la fluorescence rouge était présente a été mesurée. Le fold induction a été obtenu en divisant l'aire aux temps 24h 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 96h, 108h et 120h par celle à 12h d'infection. A) Graphique de l'évolution de la croissance virale en cellules MeWo. B) Graphique de l'évolution de la croissance virale chez fibroblastes oraux primaires.

Enfin, la taille moyenne des foyers a été calculée aux temps 48h et 72h en divisant l'aire fluorescente rouge mesurée automatiquement par l'incuCyte ® Sx5 par le nombre de foyers présents dans les puits pour chaque virus. De nouveau, les graphiques de la figure 23 montrent que la délétion de l'ORF61 diminue la taille des foyers d'infection par rapport au virus VZV WT. Les mutants 47S et 47KD démontre, eux aussi, une diminution de la taille des foyers mais celle-ci est restée malgré tout supérieure à la diminution observée par les mutants 61del (figure 23). Comme le montre la figure C, très peu de foyers sont visibles dans le mutant 61del 2, il n'a donc alors pas été analysé.

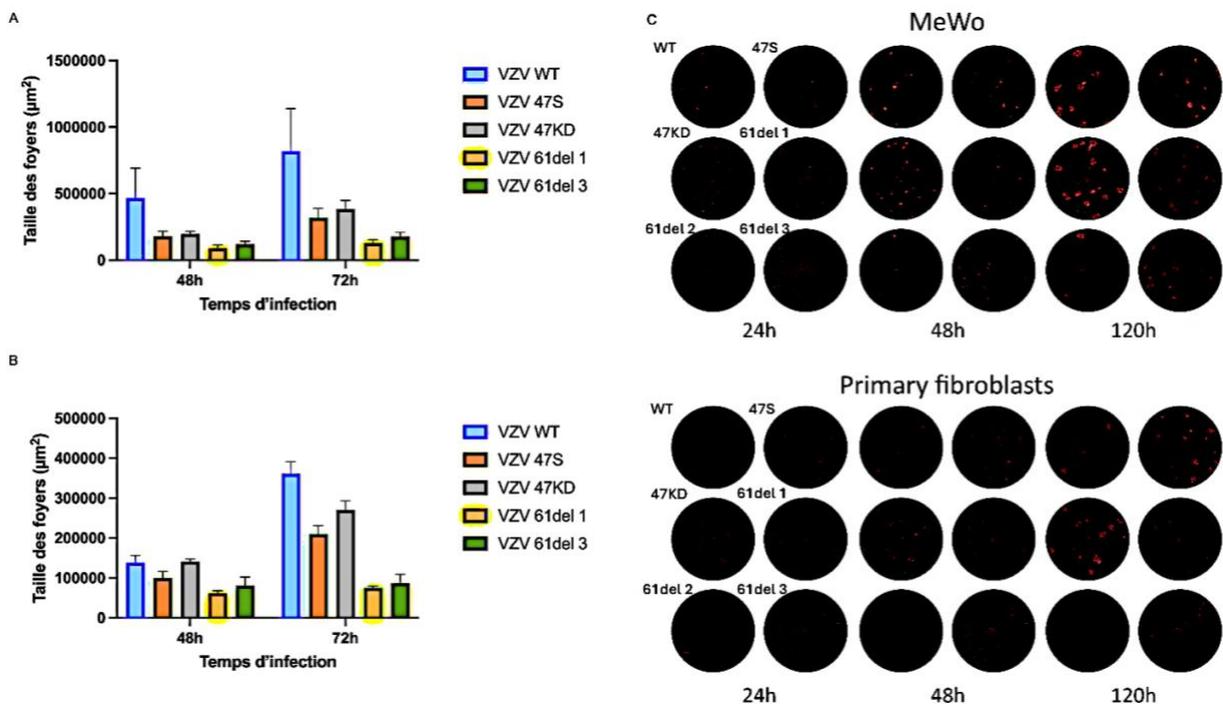


Figure 23: Comparaison de la taille des foyers viraux présents dans les cellules MeWo et les fibroblastes oraux primaires infectés par les différents virus pendant 48h et 72h. La délétion de l'ORF61 diminue fortement la taille des foyers d'infection alors que les mutants VZV 47S

et 47KD présentent une légère diminution. A J0, des cellules MeWo et des fibroblastes oraux primaires ont été ensemencés dans 3 plaques 12 puits. A J1, les cellules ont été infectées par ajout de MeWo infectées par les virus WT, VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2 et 61del 3 préalablement triées au FACS. Une des trois plaques a été placée dans l'automate Incucyte® Sx5l et des photos ont été prises toutes les 12h pendant 120h. Les deux autres plaques ont été maintenues dans un incubateur à CO₂ et prises en photo par l'automate uniquement aux temps 48 et 72h. Les foyers ont été détectés automatiquement par le programme d'analyse de l'IncuCyte et leur aire a été mesurée. Les données ont été calculées en divisant l'aire totale par le nombre de foyers présent dans les puits des différents virus. Les barres d'erreur indiquent la déviation standard de la moyenne des triplicats expérimentaux (n=3). A) Graphique de la taille des foyers en cellules MeWo. B) Graphique de la taille des foyers en fibroblastes oraux primaires. C) Vue de l'ensemble des puits des cellules MeWo et des fibroblastes oraux primaires infectés par les différents virus pendant 24h, 48h et 120h.

L'ensemble de ces données démontrent l'importance de l'ORF61p pour la croissance virale. Celle-ci ne peut être maintenue que dans les cellules MeWo. Par contre, les mutants de l'ORF47 impactent légèrement la croissance virale. Il est important de signaler qu'un phénomène de réversion est apparu spontanément après environ 30 passages du virus 6del 1, c'est-à-dire que le phénotype de croissance avait pratiquement disparu (figure 22). L'ADN génomique total de cellules infectées par ce révertant a été isolé afin d'amplifier par PCR la région génomique recouvrant le promoteur et la séquence codante d'ORF61. Une mutation compensatoire qui réintroduit un codon START, en phase avec la séquence codante d'ORF61, a été identifiée dans une séquence située à environ 200 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction du gène ORF61 sauvage. Ce révertant produit donc une version légèrement différente d'ORF61p (les 13 premiers acides aminés seulement diffèrent) permettant de retrouver un phénotype de croissance similaire au VZV sauvage (figure 24).

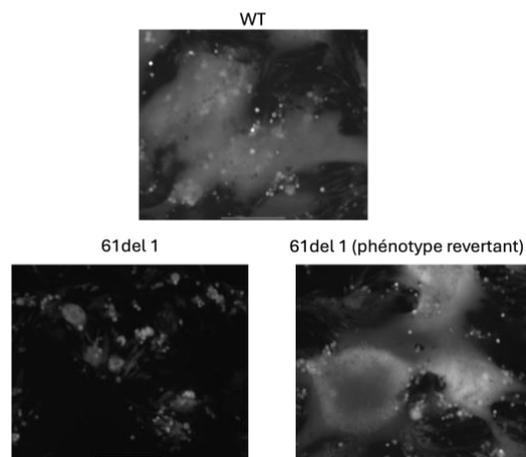


Figure 24: Photographies des virus VZV WT, 61del 1 et 61del 1 réverté dans les cellules MeWo

4.3. qRT-PCR

Pour rappels, les buts définis dans ce travail sont multiples. Nous avons d'abord l'objectif de continuer le travail réalisé sur l'ORF47p et IRF3, en se demandant si l'activité kinase de 47 est effectivement nécessaire pour l'inhibition de la réponse innée et si la présence d'ORF9p dans un complexe contenant 47 est importante pour cette inhibition. Ensuite, le second objectif est d'évaluer le rôle potentiel de l'ORF61p dans un phénomène d'inhibition.

Afin de répondre à ceux-ci, les premières expériences menées avaient pour but d'évaluer par qRT-PCR l'expression de l'interféron bêta et de certains ISGs dans des cellules infectées par le virus sauvage et les différents mutants.

4.3.1. Choix de la lignée cellulaire

Les expériences de qRT-PCR ont d'abord été réalisées dans plusieurs lignées. En effet, le but était de choisir une lignée permissive à VZV, qui répond à ce virus en produisant de l'IFN- β et/ou des ISG et qui a du sens pour l'infection c'est-à-dire des lignées cellulaires provenant d'organes dans lesquelles le virus se réplique lors d'une infection naturelle. Trois lignées répondaient à ces critères ; les MeWo qui sont les cellules classiquement utilisées pour maintenir VZV en culture, les A549 qui proviennent d'un cancer du poumon et enfin les ARPE-19 qui sont une lignée primaire qui présente un phénotype épithélial et qui ne fusionnent pas.

Les cellules ont été infectées par contact d'une heure avec des MeWo infectées par le VZV WT ou les VZV mutants. A 24h post-infection, l'ARN total a ensuite été isolé puis il a subi une réaction de transcription inverse. L'ADNc formé a été soumis à une PCR quantitative en temps réel en présence de SYBR Green. Les cellules non-infectées ont fait office de contrôle négatif tandis que le mutant VZV 47S a servi de contrôle positif. En effet, nous savions que ce mutant permettait normalement d'augmenter l'expression des gènes antiviraux sur base des résultats antérieurs du laboratoire⁸¹. La figure 25 montre les résultats obtenus pour les différentes lignées testées..

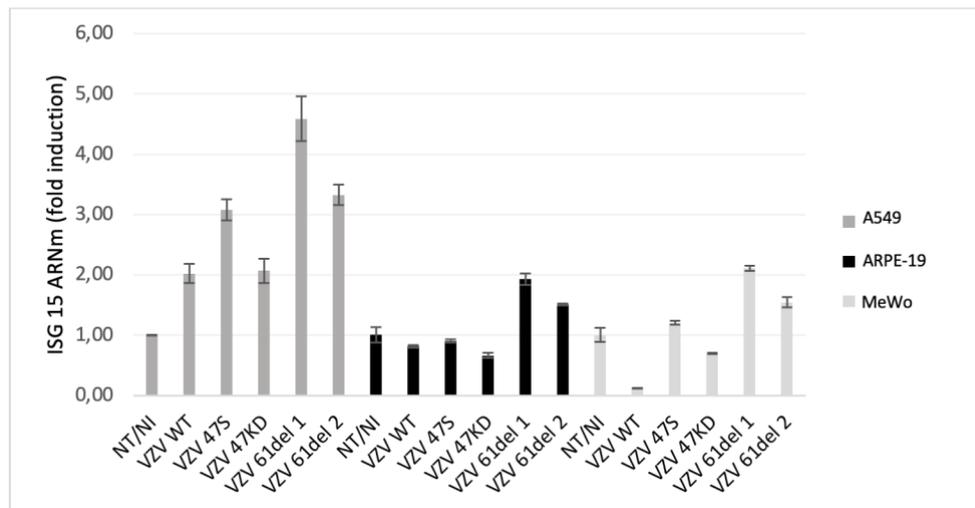


Figure 25: Comparaison de l'expression du gène ISG 15 dans trois lignées cellulaires infectées par le virus sauvage et les différents virus mutants. Les cellules A549, ARPE-19 et MeWo ont été infectées par contact d'une heure avec des MeWo infectées par le VZV WT ou les VZV mutants 47S, 47KD, 61del 1 et 61del 2. L'ARN total a été isolé après 24h d'infection et il a subi une réaction de transcription inverse. L'ADNc a été soumis à une PCR quantitative en temps réel en présence de SYBR Green. La RT-qPCR a été normalisée en utilisant le niveau d'expression de l'ARNm de UBC. Les barres d'erreur indiquent la déviation standard de la moyenne de triplicats expérimentaux (n=1). (NT = non transfecté ; NI = non infecté)

Dans les ARPE-19, l'expression basale d'ISG 15 n'est pas modifiée lorsque les cellules sont infectées par VZV sauvage ou les mutants 47. Celle-ci n'est aussi que très faiblement augmentée avec l'infection par les mutants 61del. Pour les MeWo, l'induction d'ISG 15 est bien plus forte avec le 47S et, dans une moindre mesure avec le 47KD, comparativement au virus sauvage. Une nette uprégulation d'ISG 15 est également observée lorsque l'ORF61 n'est pas exprimé. Cependant, en comparaison au contrôle négatif, des cellules non-infectées et non traitées (NT/NI), seule l'infection par les mutants 61del produit un niveau d'ISG 15 supérieur à ce dernier.

Enfin, au niveau des A549, une faible expression d'ISG 15 est observée lorsque celles-ci sont infectées par le virus VZV sauvage. Par contre, l'absence de la protéine 47 permet d'augmenter le niveau d'ISG15 alors que les cellules infectées par le mutant VZV 47KD présente un niveau d'ISG 15 similaire à celui du virus VZV WT. Pour finir, les niveaux d'ISG 15 sont clairement augmentés avec les deux virus invalidés pour l'expression d'ORF61.

Au vu de ces résultats, c'est la lignée cellulaire A549 qui a été choisie pour réaliser les expériences ultérieures décrites dans ce travail.

4.3.2. Résultats dans la lignée A549

La figure 26 montre les résultats obtenus pour la lignée cellulaire A549 pour les gènes ISG 15, ISG 54 et ISG 56. Nous pouvons observer que pour les trois gènes l'induction des cellules au poly(I :C) a fortement augmenté leur expression (figure 26 A, B, C) ce qui indique que notre contrôle positif a bien fonctionné. L'infection par le VZV WT, VZV 47KD et 9ΔAC augmente légèrement l'expression de l'ISG15 alors que l'infection par les mutants VZV 47S, 61del 1, 61 del 2 et 9ΔAC-27HA-66myc a

conduit à une expression significativement plus élevée de l'ARNm de l'ISG 15 (figure 26D) par rapport aux cellules non transfectées et non infectées (NT/NI).

Pour l'ISG 54, seuls les mutants VZV 61del 1 et 61del 2 ont élevé significativement l'expression de ce gène par rapport par rapport aux cellules NT/NI et au VZV WT (figure 26 E). Néanmoins, nous pouvons constater que les mutants VZV 47S et 9ΔAC-27HA-66myc ont aussi augmenté l'expression l'ARNm de l'ISG 54 tandis que les mutants VZV 47KD et 9ΔAC ne semblent avoir que très peu d'influence sur ce gène.

Au niveau du gène ISG 56, bien que les mutants VZV 61 del2 et 9ΔAC-27HA-66myc semblent induire une augmentation de son expression par rapport aux cellules NT/NI, cela n'est pas significativement différent (figure 26 F).

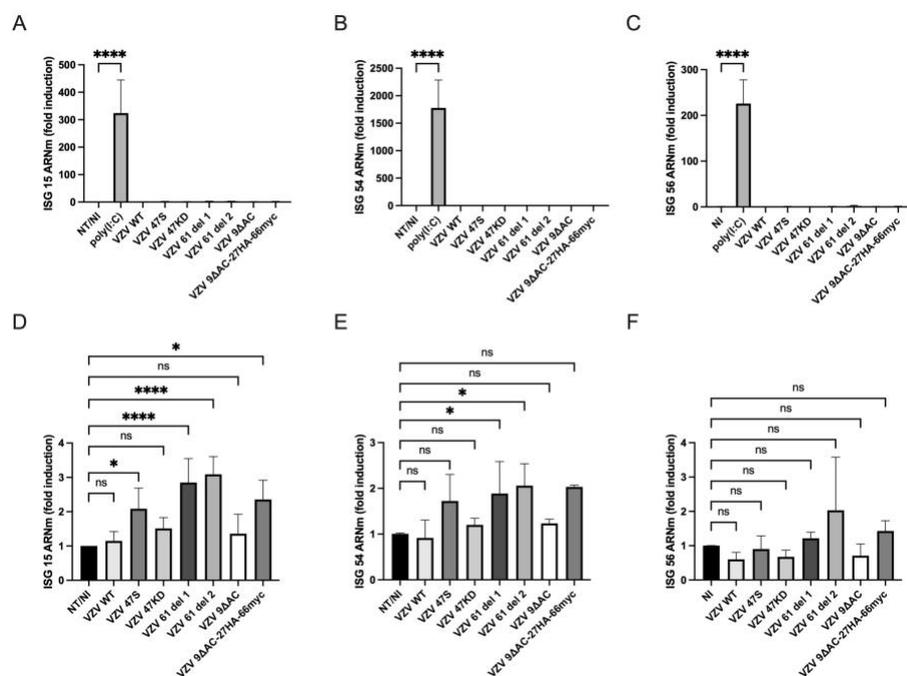


Figure 26: Résultats de RT-qPCR pour l'expression des gènes ISG 15, ISG 54 et ISG 56 dans la lignée cellulaire A549. Les cellules A549 ont été infectées par contact d'une heure avec des MeWo infectée par le VZV WT ou les VZV mutants 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc. Au temps 24h post infection, l'ARN total a été isolé et a subi une réaction de transcription inverse. L'ADNc a été soumis à une PCR quantitative en temps réel en présence de SYBR Green avec des amorces spécifiques pour l'ISG 15 (A, D), l'ISG 54 (B, E) et l'ISG 56 (C, F). La RT-PCR a été normalisée en utilisant le niveau d'expression de l'ARNm de UBC et rapporté au niveau d'expression dans le contrôle non traité/non infecté. (A), (B) et (C) montrent les résultats avec le contrôle positif (des cellules transfectées au poly(I :C) pendant 16h). (D), (E) et (F) montrent les mêmes résultats mais le contrôle positif poly(I :C) a été retiré pour mieux observer les résultats obtenus avec les infections. Un test statistique ANOVA, suivie d'un test de Tukey comparant chaque moyenne à la moyenne de l'échantillon non-infecté a été réalisé. Les graphiques représentent les moyennes et les barres d'erreur indiquent la déviation standard de la moyenne (n=6 pour NT/NI, VZV WT et les mutant VZV 47S, 61del 1, 61del 2 et n=3 pour les mutants VZV 47KD, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc). (NT = non transfecté ; NI = non infecté)

Afin de pouvoir comparer les niveaux d'expression des ISG obtenus dans les cellules infectées par les virus mutants, les niveaux d'expression de deux gènes viraux (IE63, gène « immediate early » et gB, gène « late ») ont été également mesuré par qRT-PCR. Les niveaux d'expression des ISG ont alors été normalisés par rapport à ces deux gènes viraux et rapportés sur les niveaux obtenus avec le virus

sauvage. La figure 27 montre les résultats des qRT-PCR en prenant en compte le taux d'infection des cellules.

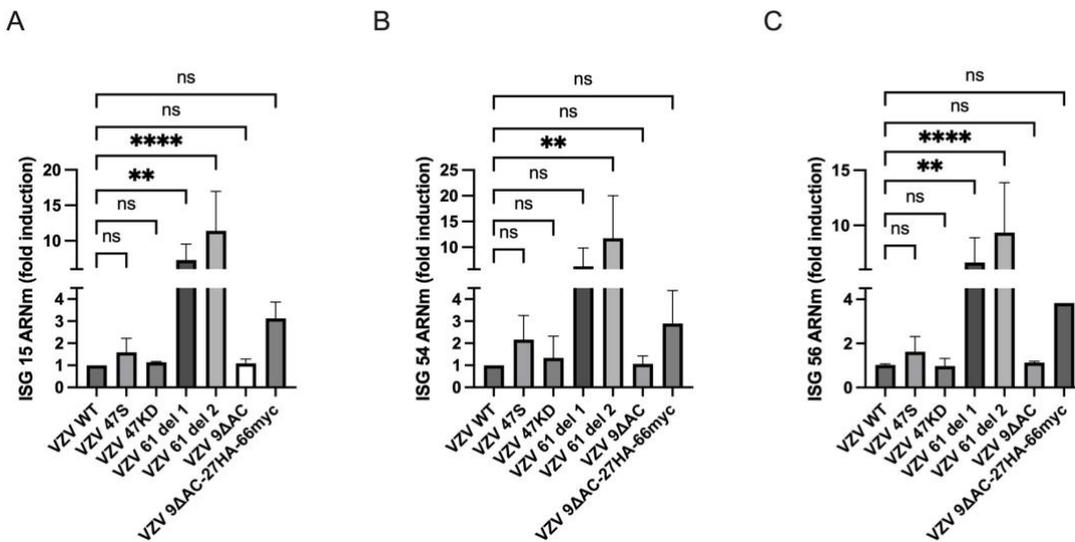


Figure 27: Résultats qRT-PCR pour l'expression des gènes ISG 15, ISG 54 et ISG 56 dans la lignée cellulaire A549 en fonction du taux d'infection. . Les cellules A549 ont été infectées par contact d'une heure avec des MeWo infectée par le VZV WT ou les VZV mutants 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc. Au temps 24h post infection, l'ARN total a été isolé et a subi une réaction de transcription inverse. L'ADNc a été soumis à une PCR quantitative en temps réel en présence de SYBR Green avec des amorces spécifiques pour l'ISG 15 (A, D), l'ISG 54 (B, E) et l'ISG 56 (C, F). La RT-PCR a été normalisée en utilisant le niveau d'expression de l'ARNm de UBC et ceux des gènes viraux IE63 et gB. L'ensemble est rapporté au niveau d'expression dans le VZV WT. Une test statistique ANOVA suivi d'un test de Tukey a été réalisé afin de comparer entre eux les taux d'expression moyens. Les graphiques représentent les moyennes et les barres d'erreur indiquent la déviation standard de la moyenne (n=6 pour NT/NI, VZV WT et VZV 47S, n=4 pour VZV 61del 1 et 61del 2 et n=3 pour les mutants VZV 47KD, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc).

Nous pouvons observer qu'en l'absence d'ORF61, il existe une forte augmentation de l'expression des trois gènes ISG 15, ISG 54 et ISG 56 et cela de manière significative (Figure 27 A, B, C). Nous pouvons aussi constater que le mutant 9ΔAC-27HA-66cMyc, augmente mais dans une moindre mesure leur expression. Il est pertinent de noter que le virus 47S semble légèrement se différencier du virus VZV WT en induisant plus fortement l'expression l'ARNm des trois ISG. Cependant, les mutants VZV 47KD et 9ΔAC ne semblent avoir que très peu d'influence sur ce gène.

Tous ces résultats corrént avec ceux précédemment obtenus et nous pouvons en conclure que le mutant VZV 47S augmente faiblement l'expression des ISG mais ce n'est pas le cas avec le mutant VZV 47KD. Cela semble indiquer que l'ORF47p est impliqué dans l'inhibition des gènes antiviraux mais que son activité kinase n'est pas directement requise. De plus, l'absence d'interaction entre l'ORF47p et l'ORF9p n'a pas d'influence sur la capacité d'ORF47p à inhiber la réponse immune. En outre, d'autres protéines pourraient être impliquées comme le montre les résultats obtenus avec le mutant VZV 9ΔAC-27HA-66cMyc. Enfin, l'ORF61p empêchent clairement l'expression de gènes antiviraux lors d'une infection par le VZV sauvage. Il est néanmoins important de préciser que, malheureusement, les données pour le gène de l'IFN-β ne sont pas exploitables. De fait, dans les conditions testées, il n'y avait pas de niveau basal d'IFN-β et les seuls échantillons montrant des niveaux mesurables du gène étaient ceux

transfectés au poly(I :C). À ce jour, nous n'avons pas d'explications à ce manque d'expression d'IFN- β par les cellules.

4.3.3. Résultats dans la lignée des fibroblastes oraux primaires

Des fibroblastes primaires oraux ont par la suite été sélectionnés et achetés car ils représentent une des portes d'entrée du virus dans l'organisme. De plus, utiliser une lignée primaire permet de conserver des fonctions et phénotypes proches de ceux des tissus *in vivo* ce qui rend nos résultats plus pertinents. Les fibroblastes primaires oraux ont donc été infectés par coculture avec le VZV WT ou les VZV mutants pendant 24 heures. L'ARN total a été récolté et isolé. L'ADNc, formé après une réaction de transcription inverse, a été soumis à une PCR quantitative en temps réel en présence de SYBR Green. Comme le montre la figure 28 A, B, C et D, la transfection des cellules par le poly(I :C), augmente fortement l'expression de l'IFN- β ainsi que celle des ISG.

Nous pouvons observer que les mutants VZV 61del, surtout le 61del 3 et le mutant 9 Δ AC élèvent légèrement le niveau d'ARNm de l'IFN- β par rapport au contrôle négatif (cellules NT/NI) (figure 28 A). Au niveau des ISG, les profils se ressemblent. En effet, les mutants 61del permettent un accroissement important du taux d'ARNm des ISG 15, ISG 54 et ISG 56 par rapport aux autres virus (figure 28 B, C, D). Ni les mutants de 47 (47S et 47 KD), ni les mutants de 9 (Δ AC et Δ AC-27HA-66cMyc) ne semblent influencer l'expression des ISG dans cette lignée par rapport au contrôle négatif.

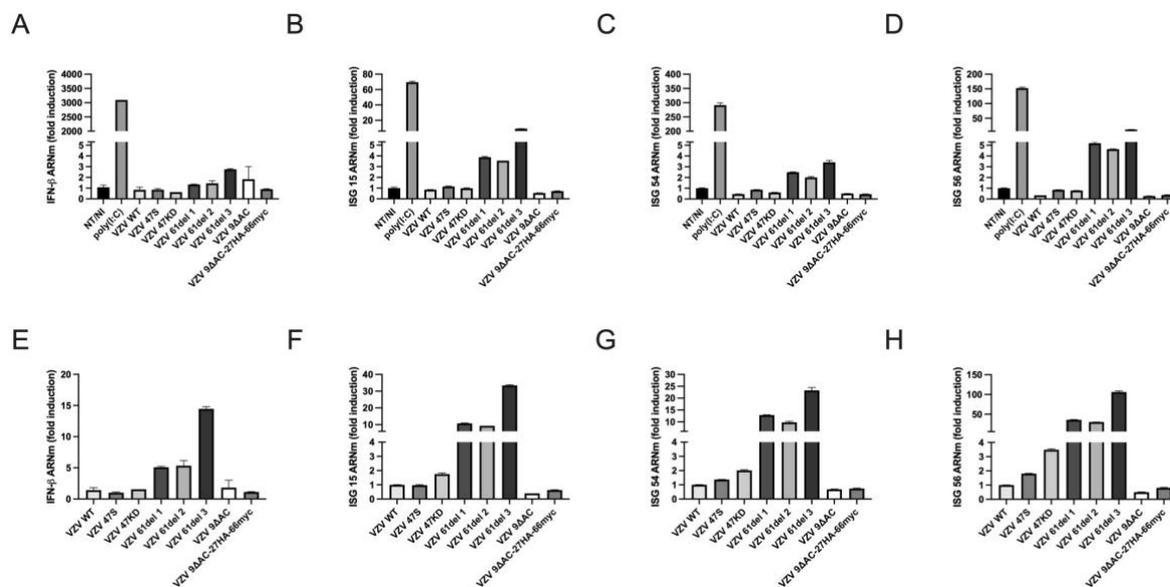


Figure 28: Résultats de RT-qPCR pour l'expression des gènes IFN- β , ISG 15, ISG 54 et ISG 56 dans les fibroblastes oraux primaires. Les cellules ont été infectées avec le VZV WT ou les VZV mutants 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2 61del 3, 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc pendant 24 heures, comme décrit précédemment. L'ARN total a été isolé et a subi une réaction de transcription inverse. L'ADNc a été ensuite soumis à une PCR quantitative en temps réel en présence de SYBR Green avec des amorces spécifiques pour l'IFN- β (A, E), l'ISG 15 (B, F), l'ISG 54 (C, G) et l'ISG 56 (D, H). (A)-(D) La RT-PCR a été normalisée en utilisant le niveau d'expression de l'ARNm de UBC et rapporté au niveau d'expression dans le contrôle non traité/non infecté. Des cellules transfectées au poly(I :C) pendant 16h ont servi de contrôle positif (E)-(H) montrent les résultats en prenant en compte le taux d'infection des cellules ; la RT-PCR a été normalisée en utilisant le niveau d'expression de l'ARNm de UBC et ceux des gènes viraux IE63 et gB. L'ensemble est rapporté au niveau d'expression dans le VZV WT. L'expérience n'ayant

été réalisée qu'une seule fois, les barres d'erreur indiquent la déviation standard de la moyenne de triplicats expérimentaux (n=1) (NT = non transfecté ; NI = non infecté)

Une mesure du taux d'expression des gènes IE63 et gB a permis de comparer le niveau d'expression de l'IFN- β et des ISG dans les cellules infectées par les mutants par rapport au virus sauvage, en prenant en compte le taux d'infection. Comparativement au virus sauvage, les mutants 61 del augmentent fortement l'expression de tous les gènes présentés (Figure 28 E-H). Ces résultats révèlent que l'ORF61p est impliqué dans l'inhibition de l'expression des gènes antiviraux lors d'une infection par le virus WT. De plus, les mutant 47S et 47 KD augmentent faiblement le niveau d'ARNm des ISG par rapport au virus WT (Figure 28 F, G ,H), sans augmentation visible de l'expression de gène de l'IFN- β , comme c'était le cas en A549.

Dans l'ensemble, toutes ces données révèlent que l'ORF61p et l'ORF47p sont impliqués dans la diminution de l'expression des gènes antiviraux lors d'une infection par le VZV WT. De plus, les résultats obtenus pour le mutant 9 Δ AC indique que l'interaction entre ORF9p et ORF47p n'est pas indispensable à son action sur l'expression des gènes. Néanmoins, le mutant 9 Δ AC-27HA-66myc semble avoir une influence dans les A549, indiquant que les tags présent sur les protéines ORF27p et ORF66p perturberaient leur rôle dans l'infection. Enfin, le mutant 47KD n'augmente que légèrement l'expression des gènes antiviraux. Nous pouvons donc supposer que l'activité kinase de ORF47 n'est pas directement impliquée dans ce processus ou cette protéine n'agit pas seule.

4.4. Western blot

Nous avons ensuite essayé d'identifier les mécanismes moléculaires permettant aux les protéines ORF61p et ORF47p d'inhiber l'expression des ISG. Nous savons que l'ORF47p hyperphosphoryle IRF3 mais nous ne savons pas s'il peut agir au niveau d'autres voies signalétiques. Pareillement pour ORF61p, les voies signalétiques qu'il bloque pour empêcher l'expression des ISG ne sont pas connues. Une série de western blot a donc été réalisée dans les cellules A549 et les fibroblastes oraux primaires. Les voies de signalisation et les facteurs de transcription étudiés dans ce travail sont IRF3, NF- κ B, AP-1 ainsi que la voie de réponse aux IFN de type I et III.

4.4.1. Résultats dans la lignée cellulaire A549

4.4.1.1. Voie TBK1/IRF3

La première voie analysée est celle concernant le facteur de transcription IRF3. Pour rappel, IRF3 est un facteur de transcription, qui dans les cellules au repos, est présent sous deux formes : la forme I et la forme II, correspondant respectivement à la forme non phosphorylée et à la forme basalement phosphorylée d'IRF3. Ces deux formes apparaissent sous la forme d'un doublet en SDS-PAGE. Lors d'une infection par le virus VZV sauvage, une hyperphosphorylation d'IRF3 se produit ce qui va conduire à l'apparition de bandes de migration à des poids moléculaires plus élevés que la bande de la

forme II. Des extraits cellulaires totaux et des extraits cyto-noyaux ont été chargé sur SDS-PAGE afin de vérifier si la translocation d'IRF3 est inhibée ou activée en présence des différents virus.

4.4.1.1.1. *Extraits totaux*

Pour réaliser ce blot, des cellules A549 ont été infectées par le VZV WT et les mutants pendant 24h, comme décrit précédemment. Les extraits cellulaires totaux ont ensuite été résolus par SDS-PAGE et des anticorps contre P-TBK1, TBK1, P-IRF3, IRF3, ORF47p et ORF9p ont été utilisés.

Dans le puits correspondant au contrôle négatif (cellules non infectées et non traitées au poly(I:C)), IRF3 apparaît sous la forme d'un doublet correspondant à la forme non phosphorylée (I) (figure 29 A, et 18B, puits 1). Le traitement au poly(I:C) pendant 16h (contrôle positif) permet d'observer une augmentation de la forme hypophosphorylée (II) d'IRF3 (figure 29 A et 29 B, puits 2). Dans les cellules infectées par le VZV WT, une forme d'IRF3 migrant plus lentement apparaît ce qui correspond à l'hyperphosphorylation atypique d'IRF3 (figure 29A puits 3 et 8 et figure 29B, puits 3 et 7). Par contre pour les mutants 47S et 47KD, l'hyperphosphorylation n'est plus présente (figure 29 A, puits 4 et 5 et figure 29 B, puit 4). Les mutants VZV 61del 1 et 2, et le mutant 9ΔAC ne montrent pas de différence avec le VZV WT ce qui veut dire que l'hyperphosphorylation est toujours présente (figure 29 A, puits 6 et 7 et figure 29 B, puit 5). Le pattern de migration d'IRF3 dans le mutant 9ΔAC-27HA-66myc, est intermédiaire. Notons que le taux d'infection de ce virus est clairement plus faible que pour les autres (figure 29 B, blots IE62 et ORF9, puit 6) et que la forme hyperphosphorylée s'accumule au cours du temps.

Comme il a été dit précédemment, lors d'une infection virale, par exemple par le virus Sendai, TBK1 est phosphorylée, ce qui va permettre la phosphorylation en C-terminal de l'IRF3 qui entraîne l'expression de gènes antiviraux. Nous nous sommes donc demandé si TBK1 était activée ou non dans les cellules infectées par le virus VZV WT et s'il existait une différence d'activation entre les virus. Nous nous sommes aussi posé la question de savoir si TBK-1 était impliquée dans une phosphorylation plus importante de l'IRF3 dans les mutants VZV, permettant d'expliquer les résultats obtenus par la qRT-PCR. Pour répondre à ces questions, le taux de phosphorylation de TBK1 et d'IRF3 a été évalué par western blot grâce à des anticorps contre P-TBK1, TBK1 et P-IRF3 (S396). Au niveau de la phosphorylation de IRF3, l'anticorps utilisé n'est pas le plus spécifique. Néanmoins, on peut voir une bande apparaitre au niveau du contrôle positif mais celle-ci n'est pas présente dans les infections VZV et dans le contrôle négatif (figure 29 A et B).

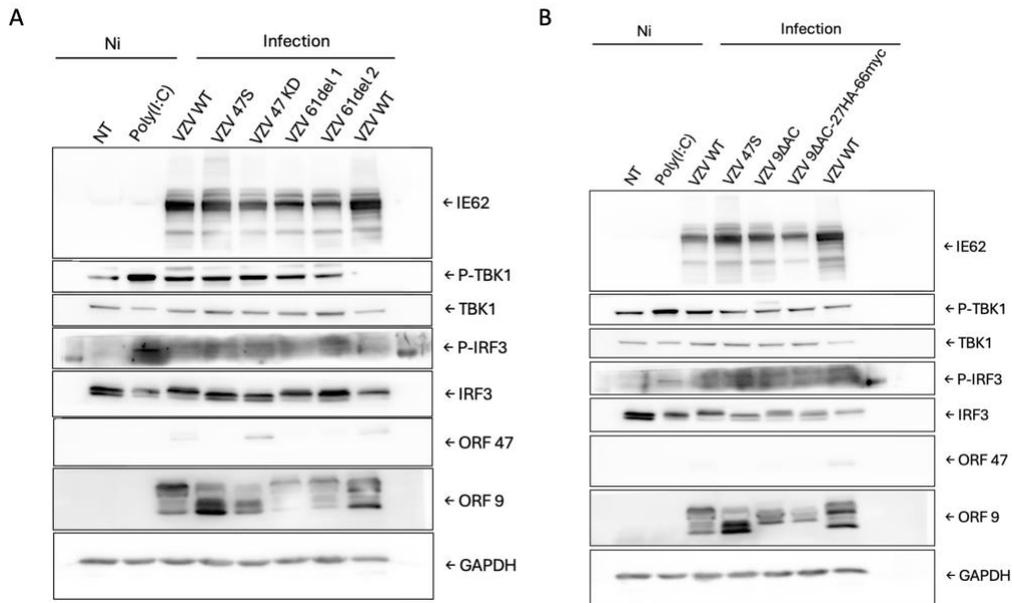


Figure 29 : Résultats des Western Blot pour la voie TBK1/IRF3. Les cellules A549 ont été infectées pendant par le VZV WT et les mutants, à savoir le VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc, dans les conditions décrites précédemment. Le contrôle négatif correspond aux cellules non transfectées au poly(I :C) et non infectées tandis que les cellules transfectées au poly(I :C) pendant 16h constituent le contrôle positif. Des extraits cellulaires totaux ont été réalisés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre TBK1, P-TBK1, IRF3, P-IRF3 sur la sérine 396, ORF47p, ORF9p, GAPDH et IE62. GAPDH et IE62 ont été utilisés respectivement comme contrôle du chargement et du taux d'infection. (A) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2. (B) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc. NT : non traitées/non infectées

De plus, on peut observer pour P-TBK1 que le traitement au poly(I :C) a fonctionné. En effet, une bande plus intense y est présente (figure 29 A et 29 B, puits 2). Dans les cellules infectées par le VZV WT ou les mutants, on peut apercevoir que ces derniers phosphorylent légèrement TBK-1 mais il n'y a pas de différence notable entre eux (figure 29 A et 29 B), si ce n'est une très légère augmentation de phospho-TBK1 pour le virus 47KD.

Un anticorps dirigé contre ORF47p a été utilisé pour vérifier que celle-ci n'est pas présente dans le mutant VZV 47S mais aussi pour contrôler si l'ORF 61, étant une IE, n'influence pas son expression. Dans la figure 29 A et l'annexe 1, malgré une faible intensité des bandes, on constate que seul le mutant VZV 47S n'a pas de bande pour la protéine 47. L'annexe 1 montre qu'effectivement, la protéine 47 est présente dans les mutants VZV 61del 1 et 2 même si leur taux d'infection n'est pas élevé. Au niveau de la figure 29B, seule une bande est détectable au niveau du VZV WT. La faible intensité des bandes ou leur absence peuvent être expliqués par le fait que l'anticorps anti-47 est moins efficace si la protéine est phosphorylée et qu'il s'agissait du troisième stripping sur la membrane.

Au niveau de la protéine ORF9p, dans les cellules infectées par le VZV 47S et le VZV 47KD, celle-ci présente un niveau de phosphorylation réduit (bandes de migrations plus basses dans le gel) par rapport à la multi-phosphorylation caractérisant le VZV WT (figure 29 A, puits 3,4,5 et 8). Les cellules infectées par le VZV 61del 1 et 61del 2 ne montrent pas de différence au niveau du pattern de phosphorylation d'ORF9p par rapport au VZV WT alors que les mutants VZV 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc se caractérisent par une perte partielle des formes phosphorylées. Un Western-Blot contre la protéine

cellulaire GAPDH et la protéine virale IE62 ont été utilisés comme contrôle de charge et contrôle du taux d'infection, respectivement.

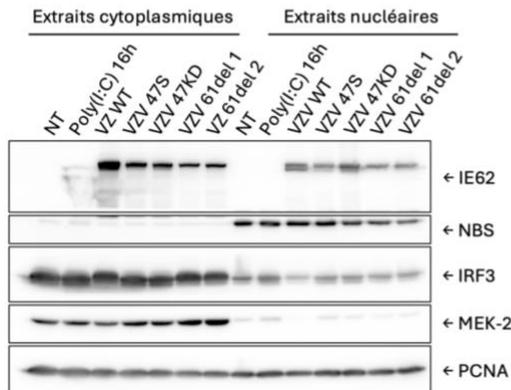
Les résultats obtenus pour ce western blot suggèrent que ce n'est pas via la voie TBK-1/IRF3 que les mutants VZV 61del permettent une augmentation significative de l'expression ISG en qRT-PCR. En effet, aucune différence flagrante n'a été observée en comparaison avec le virus VZV WT pour les différents anticorps utilisés. Les mutants VZV 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc, eux non plus, ne sont pas différents du virus VZV WT au niveau de la voie TBK-1/IRF3. Cela démontre que l'interaction entre ORF9 et ORF47 n'est pas indispensable pour permettre l'hyperphosphorylation d'IRF3. Nous avons aussi confirmé que la kinase ORF47 permet l'hyperphosphorylation atypique d'IRF3 et que cela est possible via son activité kinase. Cependant, dans les mutants VZV 47S et 47KD, malgré la perte de l'hyperphosphorylation, IRF3 n'est pas activé sur sa sérine 396, comme démontré précédemment dans le laboratoire. Cela pourrait justifier, dans le cas du mutant VZV 47KD, l'absence d'expression des ISG. En conclusion, la voie TBK-1/IRF3 n'est pas celle qui permet d'expliquer l'augmentation de l'expression des ISG dans les mutant 61del et 47S dans les A549.

4.4.1.1.2. *Extraits cyto-noyaux*

Afin d'évaluer la translocation nucléaire d'IRF3 les cellules A549 ont été infectées par les virus VZV WT ou les VZV mutants pendant 24h, comme décrit précédemment. Des extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été isolés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre IRF3, IE62, NBS, MEK-2 et PCNA. NBS a été utilisé comme contrôle de charge nucléaire, MEK-2 et PCNA ont été utilisés comme contrôle de charge cytoplasmique et IE62 comme contrôle du taux d'infection des différents virus.

Comme pour les extraits totaux, la bande de l'IRF3 dans les extraits cytoplasmiques est déplacée vers le haut dans les cellules infectées par VZV WT, ce qui correspond à l'hyperphosphorylation décrite d'IRF3 (figure 30 A, puits 3 et figure 30 B, puits 4). Cette bande d'hyperphosphorylation est, comme attendu, absente dans les mutants VZV 47S et 47 KD (figure 30 A, puits 4 et 5). De nouveau, les virus 61del possèdent toujours le déplacement vers le haut de l'IRF3 observé dans le virus VZV WT (figure 30 A, puits 6 et 7). Dans les extraits nucléaires, une bande plus intense est présente au niveau des cellules transfectées au poly(I:C) par rapport aux cellules non traitées et non infectées, démontrant que ce traitement induit une translocation nucléaire d'IRF3 (figure 30 A et 30 B, puits 8 et 9). Nous pouvons aussi constater que pour les virus mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1 et 61del 2, des bandes plus intenses semblent apparaître pour IRF3 en comparaison au VZV WT. La translocation d'IRF3 a donc l'air légèrement plus importante dans ces mutants que dans le virus sauvage. Il est aussi important de noter que les formes d'IRF3 présentes dans le noyau ne présentent pas d'hyperphosphorylation.

A



B

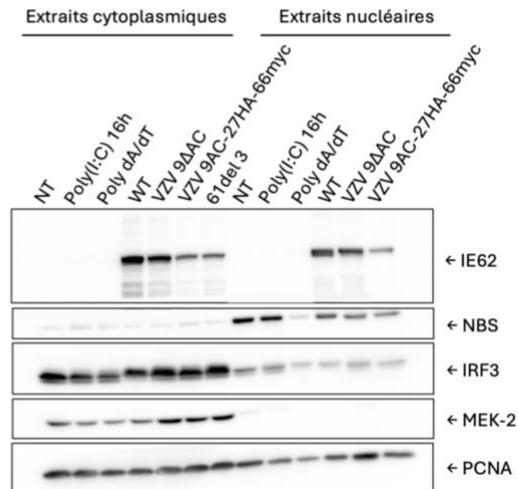


Figure 30 : Résultats des Western Blot pour la translocation d'IRF3. Les cellules A549 ont été infectées pendant 24h par le VZV WT et les mutants, à savoir le VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc. Le contrôle négatif correspond aux cellules non transfectées au poly(I :C) et non infectées tandis que les cellules transfectées au poly(I :C) pendant 16h constituent le contrôle positif. Des extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été isolés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre IRF3, IE62, NBS, MEK-2 et PCNA. NBS a été utilisé comme contrôle de charge nucléaire, MEK-2 et PCNA ont été utilisés comme contrôle de charge cytoplasmique et IE62 comme contrôle du taux d'infection. (A) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2. (B) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc. NT : non traitées/non infectées

Au niveau des mutants 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc, les bandes présentent dans les extraits cytoplasmiques pour IRF3 sont les mêmes que pour celle du VZV WT (figure 30 B, voies 4 à 6). Ce résultat équivaut à celui obtenu pour les extraits totaux. De plus, il n'existe pas de différence de translocation d'IRF3 entre ces mutants et le virus sauvage (figure 30 B, voies 11 à 13).

Nous pouvons conclure de cette expérience qu'ORF61p influence faiblement la translocation nucléaire d'IRF3. De fait, cette translocation est légèrement plus importante dans les mutants 61del 1 et 61del 2 par rapport à VZV WT. Néanmoins, ces données seules ne peuvent pas expliquer l'importante induction de l'expression des ISGs observée dans ces mutants lors des qRT-PCR. ORF47p, lui aussi, inhibe la translocation nucléaire d'IRF3 et son activité kinase est impliquée dans ce processus. Par contre, l'interaction entre ORF9p et ORF47p n'est pas importante pour le blocage partiel de la translocation d'IRF3 dans une infection médiée par le VZV WT.

4.4.1.2. Voie NF-κB

Le second facteur de transcription étudié est le facteur NF-κB. Celui-ci est composé des sous-unité P50/P65/c-Rel et il est constitutivement associé à son inhibiteur IκBα. Lors d'une infection virale, les IKK activées vont phosphoryler ce dernier et permettre sa polyubiquitination médiant ainsi sa dégradation et la libération du complexe NF-κB. Celui-ci va alors pouvoir transloquer dans le noyau et induire des gènes antiviraux. Au vu de ces informations, il nous semblait pertinent de regarder si nos virus mutants influençaient à la hausse sa voie d'activation et sa translocation dans le noyau.

Pour réaliser cette expérience, les cellules A549 ont été infectées dans les conditions décrites précédemment. Des extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été récoltés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre IKK α , P65, P50, I κ B α , NBS, MEK-2 et IE62. NBS, MEK-2 et IE62 ont été respectivement utilisé comme contrôle de charge nucléaire, contrôle de charge cytoplasmique et contrôle du taux d'infection entre les différents virus.

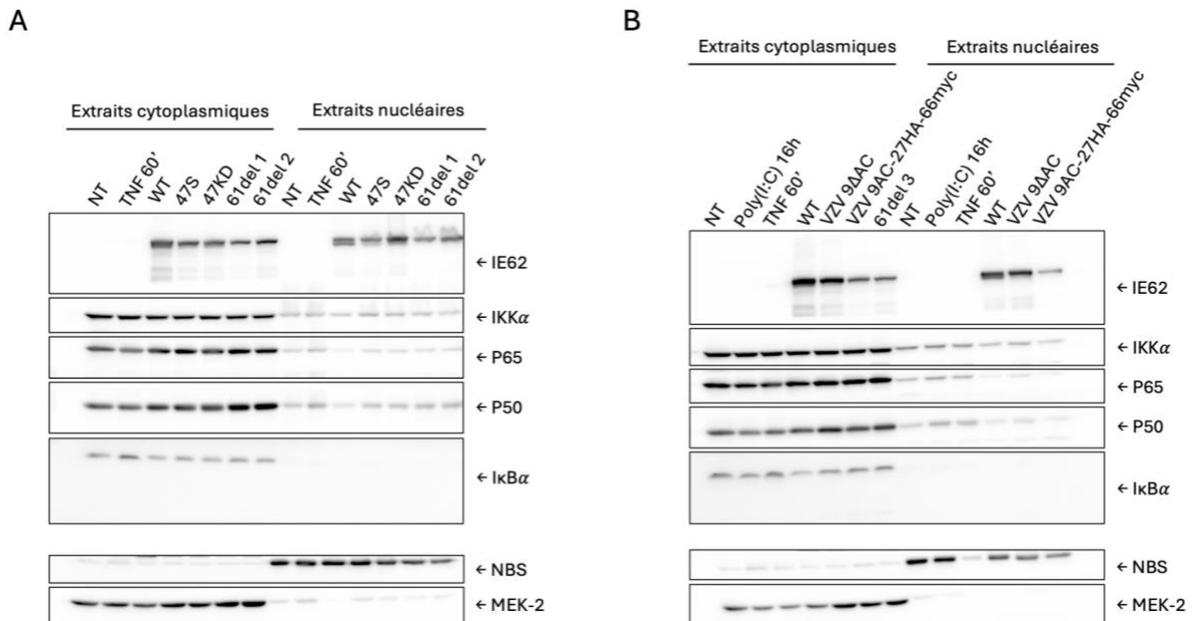


Figure 31: Résultats des Western Blot pour la translocation de NF- κ B. Les cellules A549 ont été infectées pendant 24h avec le VZV WT et les mutants, à savoir le VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc. Le contrôle négatif correspond aux cellules non traitées au TNF α et non infectées tandis que les cellules traitées au TNF α pendant 1h constituent le contrôle positif. Des extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été récoltés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre IKK α , P65, P50, I κ B α , NBS, MEK-2 et IE62. NBS a été utilisé comme contrôle de charge nucléaire, MEK-2 a été utilisé comme contrôle de charge cytoplasmique et IE62 comme contrôle du taux d'infection. (A) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2. (B) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc. NT : non traitées/non infectées

La translocation nucléaire de P65 est faiblement visible dans le contrôle positif (figure 21A puits 9 et 21B puits 9 et 10) et elle est faiblement induite par les mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1 et 61del 2 lors de la comparaison avec le VZV WT (figure 31 A et annexe 2). Le mutant VZV 61del 3 induit lui aussi la translocation nucléaire de P65 (Annexe 2) mais par contre pour les mutants VZV 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc et le VZV WT, aucune translocation n'est visible (figure 31 B et annexe 2).

Au niveau de P50, sa translocation nucléaire est aussi faiblement médiée par les mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1 et 61del 2 lors de la comparaison avec le VZV WT (figure 31 A et annexe 2). Le mutant VZV 61del 3 induit lui aussi la translocation nucléaire de P50 (Annexe 2) mais aucune translocation n'est perçue dans le cas des mutants VZV 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc (figure 31 B et annexe 2). De plus, la dégradation de I κ B α n'est pas réellement observée dans cette expérience (figure 31 A et B). Dans une seconde expérience, la dégradation de I κ B α est perceptible pour le contrôle positif mais aussi faiblement induite par les mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc

(annexe 2). Étonnement, la dégradation de I κ B α pour le mutant VZV 61del 3 n'est pas évidente (annexe 2).

L'ensemble de ces données suggère que l'ORF61p et l'ORF47p sont impliqués dans l'inhibition de la voie de NF- κ B en empêchant sa translocation. Dans le cas de l'ORF47p, son site actif serait impliqué dans ce processus. Cependant, l'interaction entre l'ORF9p et l'ORF47p n'est pas un élément important dans l'inhibition de NF- κ B.

4.4.1.3. Voie AP-1

La voie menant à l'activation du facteur de transcription AP-1 a voulu être investiguée mais seul un anticorps contre cJun était disponible au laboratoire. L'induction aurait dû se témoigner par l'apparition de bandes de cJun phosphorylée, de plus hauts poids moléculaires, migrant plus haut dans le gel. Non seulement le signal détecté est très faible mais en plus ces bandes de phosphorylation ne sont pas visibles dans les contrôles positifs, les résultats ne seront donc pas interprétés.

4.4.1.4. Voie de réponse aux IFN de type I et III

Pour rappel, la voie de réponse aux IFN de type I et III est constituée de STAT1, qui une fois phosphorylé, peut homodimériser ou former avec IRF9 un hétérodimère. Ce complexe peut ensuite migrer dans le noyau où il active l'expression des ISG. Parmi ces protéines ISG, on retrouve la protéine kinase R (PKR) qui, une fois activée, phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . Cette phosphorylation entraîne un arrêt global de la traduction et la formation de stress granule. Nous nous sommes aussi intéressés à l'activation de cette voie car, dans les résultats de qRT-PCR, nous n'avons pas des niveaux d'IFN- β détectable mais l'induction des ISG est bien visible.

Nous avons également voulu investiguer la potentielle translocation d'IRF7 car les résultats précédents pour IRF3 n'expliquent pas, à eux seuls, les résultats observés en RT-qPCR. IRF7 étant lui aussi un facteur de transcription induit lors d'infection virale, il nous semblait approprié de l'analyser.

Des extraits cellulaires totaux et des extraits cyto-noyaux ont alors été réalisés afin de valider si la voie en aval des interférons de type I ou III est plus active dans les mutants.

4.4.1.4.1. Extraits totaux

Des cellules A549 ont été infectées par le VZV WT et les mutants pendant 24h. Des extraits cellulaires totaux ont été réalisés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps contre P-STAT1, P-IRF7, P-eIF2 α , P-PKR, cJun, HSP27 et IE62. HSP27 et IE62 ont été utilisés respectivement comme contrôle du chargement et du taux d'infection.

On peut observer que pour la protéine P-STAT1, le contrôle positif n'a pas fortement induit sa phosphorylation par rapport au contrôle négatif (figure 32 A, puit 2). Ensuite, les cellules en présence des différentes infections présentent une augmentation de phospho-STAT1 et les mutant VZV 47S et 9dAC semblent avoir une bande plus intense que le VZV WT (figure 32 A, puits 3 et 4). Pour les autres

mutants, il n'y a pas de différence visible avec le VZV WT. La protéine P-IRF7 n'a pas été détectée, en ce compris dans l'échantillon correspondant au contrôle positif.

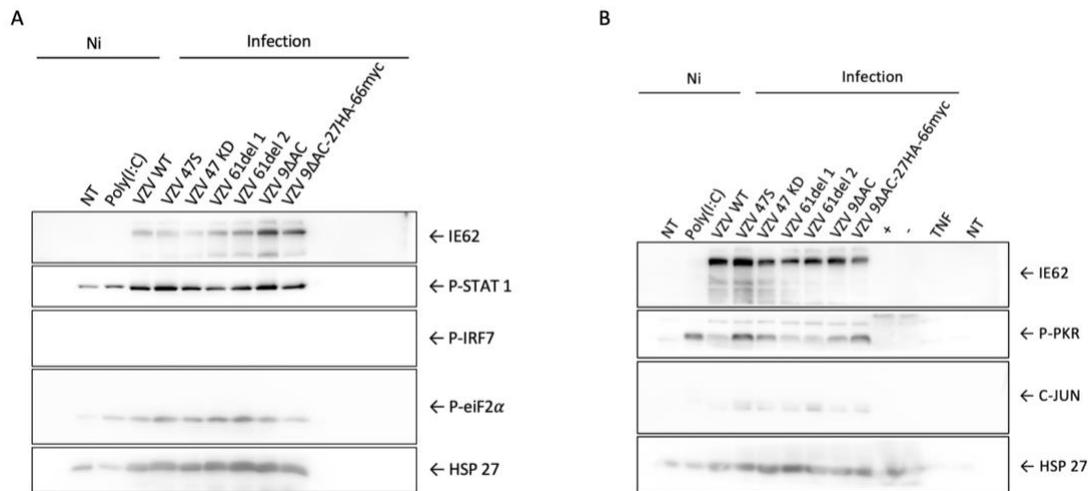


Figure 32 : Résultats des Western Blot pour les voies cJUN et IFN-β.(A) Les cellules A549 ont été infectées pendant 24h par le VZV WT et les mutants, à savoir le VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc. Le contrôle négatif correspond aux cellules non transfectées au poly(I :C) et non infectées tandis que les cellules transfectées au poly(I :C) pendant 16h constituent le contrôle positif. Des extraits cellulaires totaux ont été réalisés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre P-STAT1, P-IRF7, P-eIF2α, HSP27 et IE62. HSP27 et IE62 ont été utilisés respectivement comme contrôle du chargement et du taux d'infection. (B) Les cellules A549 ont été infectées dans les mêmes conditions que (A). Le contrôle négatif pour P-PKR correspond aux cellules non transfectées au poly(I :C) et non infectées tandis que les cellules transfectées au poly(I :C) pendant 16h constituent le contrôle positif. Pour cJun, les contrôles positifs correspondent au traitement des cellules par le TNFα pendant 1h et les contrôles négatifs sont les cellules non traitées et non infectées. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre P-PKR, cJun, HSP27 et IE62. HSP27 et IE62 ont été utilisés respectivement comme contrôle du chargement et du taux d'infection. NT : non traitées/non infectées

Comme attendu, la phosphorylation de PKR est plus importante dans les cellules traitées au poly(I :C) par rapport au contrôle négatif (figure 32 B, puits 1 et 2).

L'infection des cellules par les mutants VZV 47S, 47KD, 9ΔAC et 9ΔAC-27HA-66myc induit une phosphorylation plus importante de PKR par rapport au VZV WT tandis qu'il n'y a pas de différence entre les mutants 61del et le virus WT.

De façon étonnante, les niveaux de phosphorylation de PKR ne se corrèlent pas à ceux de P-eIF2α. Le traitement au poly(I :C) a permis d'induire légèrement la phosphorylation d'eIF2α par rapport au contrôle négatif (figure 32 A, voie 2). Néanmoins, bien que les mutants VZV 47S, 47KD ont l'air de très légèrement augmenter sa phosphorylation par rapport au VZV WT, c'est le cas aussi pour les mutants 61del 1 et 2 et ce n'est pas le cas pour les virus 9ΔAC (figure 32 A, voie 4 à 7). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les raisons de cette discordance.

L'ensemble de ces données révèlent que l'ORF47p aurait possiblement une action sur la protéine PKR. Nous savons que la protéine PKR favoriserait la signalisation de l'IFN de type I ce qui pourrait expliquer les résultats qRT-PCR pour le mutant 47S. Son activité kinase serait peut-être impliquée dans ce processus ainsi que l'interaction ORF9 et ORF47. Par contre, la voie par laquelle l'ORF61 module la réponse immunitaire innée serait, elle, indépendante de PKR.

4.4.1.4.2. Extraits cyto-noyaux

Les extraits cyto-noyaux de cellules A549 infectés par le virus sauvage ou les virus mutants et précédemment décrits pour la voie NFκB ont été chargé sur gel pour réaliser ce SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre STAT1, IRF7, IRF9, NBS et MEK-2. NBS et MEK-2 ont été respectivement utilisé comme contrôle de charge nucléaire et contrôle de charge cytoplasmique. Le contrôle du taux d'infection (IE62) est celui de la figure 31 puisqu'il s'agit des mêmes extraits cellulaires.

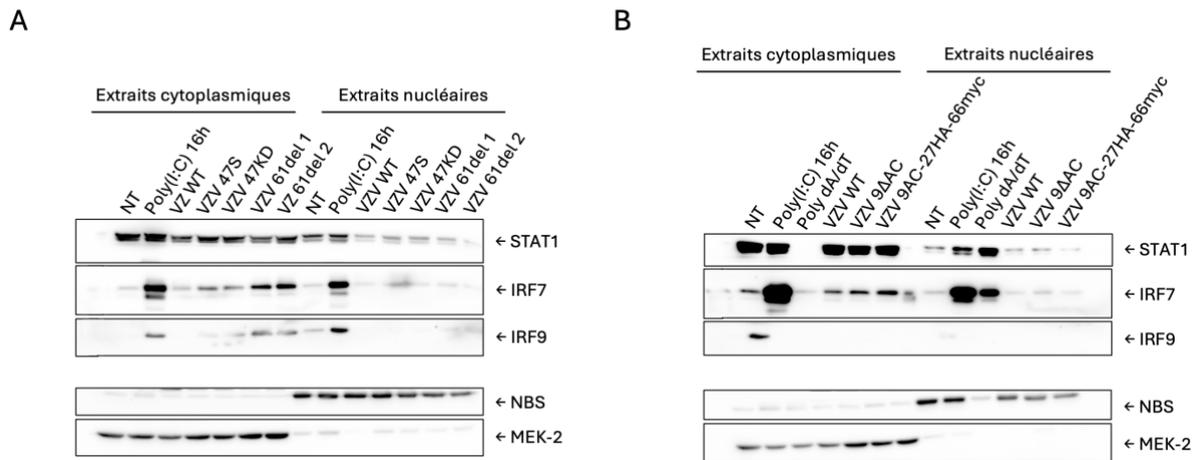


Figure 33 : Résultats des Western Blot pour la translocation de STAT1, IRF7 et IRF9. Les cellules A549 ont été infectées pendant 24h par le VZV WT et les mutants, à savoir le VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9AAC et 9AAC-27HA-66myc. Le contrôle négatif correspond aux cellules non transfectées au poly(I :C) et non infectées tandis que les cellules transfectées au poly(I :C) pendant 16h constituent le contrôle positif. Des extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été isolés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre STAT1, IRF7, IRF9, NBS et MEK-2. NBS a été utilisé comme contrôle de charge nucléaire, MEK-2 a été utilisé comme contrôle de charge cytoplasmique et IE62 comme contrôle du taux d'infection (voir figure 31). (A) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2. (B) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 9AAC et 9AAC-27HA-66myc. NT : non traitées/non infectées.

La translocation nucléaire de STAT1 est fortement induite par la transfection de poly(dA :dT) (figure 33 B, puits 10). Elle est également induite par la transfection de poly (I :C), même si, dans le western-blot de gauche, elle est également visible dans le contrôle négatif (figure 33 A et B, puits 8 et 9). Au niveau des infections, une certaine quantité de STAT1 est visible dans la fraction nucléaire mais, d'une part, moins fortement que dans le contrôle négatif et d'autre part, il n'y a aucune différence entre les mutants et le virus sauvage (figure 33 A et B).

Une très forte uprégulation au niveau cytoplasmique ainsi qu'une forte translocation nucléaire d'IRF7 sont observées dans les cellules traitées au poly (I :C) (figure 33 A et B). Dans les extraits cytoplasmiques des cellules infectées par les virus mutants, la quantité d'IRF7 semble plus importante que dans les extraits de cellules infectées par le virus sauvage. C'est le cas particulièrement pour les mutants 61del 1 et 61del 2 (figure 33 A, puits 6 et 7) et dans une moindre mesure pour les mutants VZV 47S et 47KD (figure 33 A, puits 4 et 5) et 9AAC-27HA-66myc (figure 33 B, puits 4 à 6). Les cellules

infectées par ces mutants induisent donc une expression plus importante d'IRF7 par rapport à celles infectées par le VZV WT. Par contre, à part pour le mutant 47S, aucune translocation nucléaire d'IRF7 ne semble être induite pour les différentes infections (figure 33 A et B). Notons que pour le mutant 47S, la qualité du western-blot ne permet pas d'affirmer avec certitude que la bande observée pour IRF7 dans les extraits nucléaires soit une bande spécifique. Ce résultat doit donc être confirmé.

Au niveau d'IRF9, aucune translocation nucléaire n'est observée excepté pour les contrôles positif (figure 33 A et B). Dans les extraits cytoplasmiques, les cellules infectées par les mutants VZV 61del induisent l'expression d'IRF9 par rapport à celles infectées par le VZV WT et au contrôle négatif (figure 33 A, puits 6 et 7). Les autres mutants VZV, eux n'induisent pas l'expression de ce facteur de transcription.

En conclusion, l'ORF61p diminuerait la quantité d'IRF7 et, dans une moindre mesure, d'IRF9 présent dans les cellules lors d'une infection par le virus WT. L'ORF47P ne semble que très faiblement inhiber IRF7 indiquant qu'il n'agit que très peu sur cette voie immunitaire.

4.4.2. Résultats dans la lignée des fibroblastes oraux

Des expériences ont été réalisées dans les fibroblastes oraux primaires afin d'examiner si les résultats obtenus par les A549 se reproduisaient dans cette lignée. Les mutants 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc ont été abandonnés au vu des résultats qRT-PCR pour les fibroblastes. De fait, il n'y avait pas d'induction de l'expression des ARNm de l'IFN- β et des ISGs.

Pour réaliser ces expériences, les fibroblastes oraux primaires ont été infectées par contact d'une heure avec des MeWo infectées par le VZV WT et les mutants. Après 24h, des extraits cellulaires totaux ont ensuite été réalisés et séparés par SDS-PAGE. Seules les phosphorylations ont été observées afin de voir si les différentes protéines impliquées dans les voies immunitaires d'IRF3 et de NF- κ B étaient plus ou moins activées en fonction des virus.

Au niveau de la phosphorylation de TBK1, une bande intense apparaît au niveau du contrôle positif poly(dA :dT) ainsi qu'une bande beaucoup plus faible dans le contrôle positif poly(I:C), comparativement aux cellules non traitées (figure 34 A, puits 1 à 3). Les cellules infectées par les mutants VZV 47S, 47KD et les 61 del présentent tous une bande au niveau de P-TBK1 plus intense que celle observée par le VZV WT (figure 34 A, puits 4 à 9). Notons également que les extraits des virus mutants de l'ORF61 possèdent un doublet comme c'est le cas dans le contrôle négatif. Le western-blot anti-P-IRF3 est difficilement interprétable mais ne semble présenter de signal positif qu'au niveau des puits correspondant aux contrôles positifs.

P-STING a été analysé afin de voir si la voie cGAS-STING était activée par le virus sauvage et les mutants. Malheureusement, seul le contrôle positif au poly(dA :dT) présente une bande correspondant à P-STING (figure 34 A, puit 3).

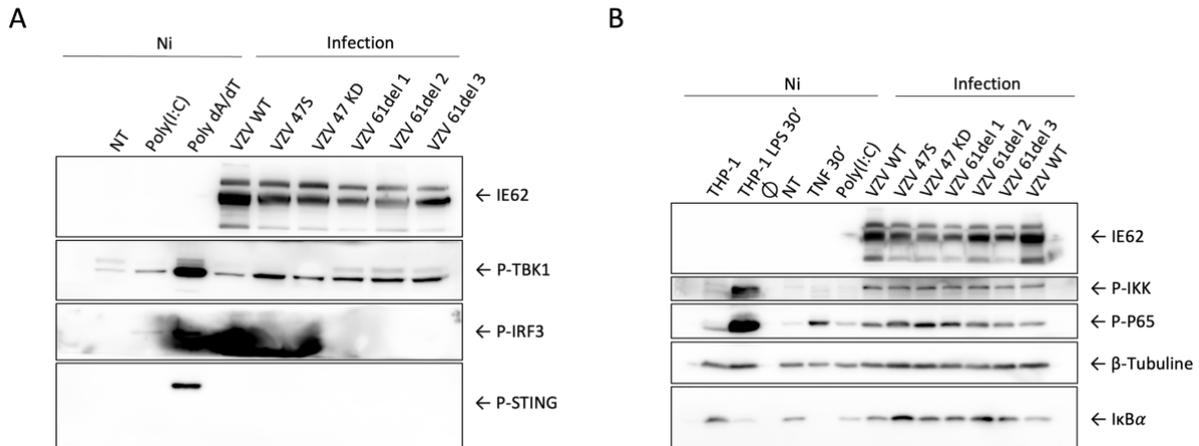


Figure 34: Résultats des Western Blot pour les voies TBK1/IRF3 et NF-κB en fibroblastes primaires. Les fibroblastes oraux primaires ont été infectées par contact d'1h avec des MeWo infectées par le VZV WT et les mutants, à savoir le VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2 et 61del 3. Des extraits cellulaires totaux ont été réalisés après 24h d'infection et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre P-TBK1, P-IRF3 (S396), P-STING, P-IKK, P-P65, IκBα, β-Tubuline et IE62. β-Tubuline et IE62 ont été utilisés respectivement comme contrôle du chargement et du taux d'infection. (A) Western Blot de la voie TBK1/IRF3 avec pour contrôle négatif des cellules non traitées et non infectées et pour contrôle positif des cellules transfectées au poly(I:C) pendant 16h et au poly(dA:dT) pendant 6h. (B) Western Blot de la voie NF-κB avec pour contrôles négatifs des THP-1 NT/NI et des fibroblastes primaires NT/NI. Les contrôles positifs sont des THP-1 traitées au LPS pendant 30 minutes ou des fibroblastes primaires traités au TNFα pendant 30 minutes ou transfectés au poly(I:C) pendant 16h. NT : non traitées/non infectées

Au niveau de la voie de la NF-κB, la phosphorylation des IKK est induite par le contrôle positif des THP-1 traités au LPS (figure 34 B, puits 2). Des bandes apparaissent aussi au niveau des infections mais aucune différence entre elles n'est perceptible (figure 34 B).

La phosphorylation de P65 est bien visible au niveau des contrôles positifs (figure 34 B, puits 2 et 4). Les cellules infectées par les mutants VZV 47S, 47KD et 61 del 1 présentent une bande au niveau de P-P65 plus intenses que celle perçue par le VZV WT (figure 34 B, puits 8 à 10, comparativement au puits 7). Par contre, les deux autres mutants 61 del ne semblent pas différents du virus sauvage (figure 34 B, puits 11 et 12).

Au niveau de la dégradation de IκBα, il est pertinent de remarquer que celle-ci est complète pour les contrôles positifs (figure 34 B, puits 2 et 5). Cependant, il n'y a pas de dégradation d'IκBα dans les cellules infectées par VZV (figure 34 B) et les bandes semblent même plus intenses pour les mutants VZV 47S et 61del 2. Notons qu'IκBα est un gène qui est régulé positivement lorsque la voie NF-κB est activée. Il n'est donc pas toujours évident de savoir dans quelle fenêtre de temps il faut être pour observer sa dégradation. En conclusion, dans les fibroblastes oraux primaires, ORF61p et ORF47p semblerait inhiber TBK-1 par un mécanisme qui reste à caractériser. L'activité kinase d'ORF47p paraît être un élément nécessaire à ce processus. Au niveau de NF-κB, d'autres expériences doivent être menées pour pouvoir conclure si ces deux protéines virales inhibent cette voie.

5. Discussion et perspectives

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense et joue un rôle important dans la détection et la limitation de la propagation des virus. Cette réponse immunitaire se caractérise notamment par l'activation de facteurs de transcription comme IRF3, IRF7, NF- κ B ou AP-1 qui jouent un rôle central dans l'expression de gènes pro-inflammatoires et d'interférons (IFN). Ces IFN vont, à leur tour, induire l'expression des gènes stimulés par l'interféron (ISG) codant pour des protéines comme PKR, jouant un rôle important dans la mise en place d'une réponse antivirale. Les virus étant considérés comme des parasites obligatoires, utilisent la machinerie de l'hôte pour se répliquer. Ils doivent donc développer des mécanismes visant à empêcher l'activation des réponses immunitaires de l'hôte afin de permettre leur propagation virale. Les herpèsvirus, dont fait partie VZV, se caractérisent par l'établissement d'une latence à vie chez l'hôte après la primo-infection. Ils ont donc développé diverses stratégies pour éviter et contourner les réponses immunitaires innées de l'hôte. Ils doivent coder des protéines qui interfèrent avec les réponses immunitaires innées de l'hôte. Par exemple, une étude menée dans le laboratoire d'accueil a montré que la kinase de l'ORF47p de VZV hyperphosphoryle IRF3 et le désactive. Elle va aussi inhiber l'expression des gènes cibles dépendant d'IRF3 c'est-à-dire IFN- β et l'ISG15. Malheureusement les mécanismes associés à ces observations ne sont pas connus. D'autres études ont montré, que lorsque l'ORF61 est exprimée indépendamment du contexte infectieux, elle permet l'inhibition de système immunitaire en dégradant IRF3 et elle entraverait donc l'activation de la voie NF- κ B.

Dans ce travail, nous avons tenté de continuer le travail réalisé sur l'ORF47p et IRF3, en se demandant (i) si l'activité kinase d'ORF47p est effectivement nécessaire pour l'inhibition de la réponse immunitaire innée et (ii) si l'interaction entre ORF9p et ORF47p est importante pour cette inhibition. Ensuite, nous avons voulu évaluer le rôle potentiel d'ORF61p dans un phénomène d'inhibition de la réponse innée, dans un contexte infectieux. Afin de répondre à ces objectifs des virus ORF 47KD (kinase-dead, muté dans le site catalytique de l'enzyme), ORF 47S (Virus VZV délété de sa protéine ORF47p), ORF9 Δ AC (ORF9p portant une délétion dans sa région acide et qui n'est plus capable d'interagir avec ORF47p), ORF9 Δ AC-27HA-66cmyc (ORF9p portant une délétion dans sa région acide et des tags se trouvent les ORF27 et ORF66) et Δ ORF61 précédemment générés au laboratoire ont été utilisé pour infecter différents types cellulaires comme les MeWo, ARPE-19, A549 et fibroblastes oraux primaires humains. Des expériences de qRT-PCR ont été réalisées afin d'évaluer les transcrits de différents gènes de la réponse immunitaire et des expériences de western-blot ont été effectuées afin d'évaluer l'état d'activation des voies signalétiques impliquées dans cette réponse innée.

Tout d'abord, la croissance des mutants VZV 47S, 47KD et les 61del générés par le laboratoire a été analysée. Cela permettait de montrer que les mutants 61del, par rapport aux autres virus, sont difficiles à maintenir en culture et à manipuler dans les expériences. Cette étape consistait à infecter des cellules

MeWo et les fibroblastes avec les cellules infectées par les différents virus et triée auFACS. L'automate (IncuCyte® Sx5) a alors pris des photos toutes les 12h pendant 120 heures. Les données récoltées ont permis de réaliser un film de photos montrant l'évolution d'un foyer par virus et des graphiques mettant en évidence l'évolution de l'aire et la taille des foyers infections au cours du temps. Cette expérience nous a permis d'observer que les mutants 47S et 47KD possédaient un léger défaut de croissance par rapport au virus WT. Elle nous a aussi permis de prouver que la délétion de l'ORF61 diminuait fortement la croissance du virus. De plus, son absence donne lieu à une forme de pression de sélection favorisant l'apparition de mutations compensatoires comme l'atteste le mutant 61del 1 où le phénotype sauvage est réapparu. Un phénomène de « réversion » partielle est aussi apparu pour le 61del 2. De fait, après 30 passages, nous avons constaté que sa croissance semblait plus rapide, sans pour autant atteindre celle du virus sauvage. Nous avons alors séquencé la région de 61 mais aucune mutation n'a été trouvée permettant de supposer qu'ORF61 était à nouveau exprimé dans ce révertant partiel. Nous l'avons donc congelé à -80°C afin de réaliser un séquençage à haut débit. Le but étant de mettre en évidence des mutations compensatoires pour la croissance qui se trouveraient ailleurs sur le génome de VZV.

Nous savons que la protéine de l'ORF61 a un rôle régulateur en trans-activant ou trans-réprimant la transcription d'autres gènes du VZV^{83, 85, 89}. Ce virus possède 72 protéines mais seulement une partie de celles-ci sont caractérisées. ORF61p pourrait alors réguler l'expression de certaines protéines importantes pour la réplication virale, ce qui expliquerait le défaut de croissance observé dans les mutants délétés de l'ORF 61. Il serait intéressant de réaliser un RNA SEQ afin de vérifier les gènes viraux qui sont modifiés ou non par l'absence de l'ORF61.

De par leur défaut de croissance, les mutants 61del générés ne se maintiennent que dans les cellules MeWo. En effet, les résultats de la croissance dans les fibroblastes oraux primaires indiquent que les mutants VZV 61del se propagent très lentement voire pas du tout. D'autres lignées cellulaires ont été testées pour maintenir l'infection comme les ARPE-19 et les A549 en déposant par-dessus des cellules MeWo infectées. Cependant, après quelques passages en culture, lorsque la population de MeWo était évincée, l'infection ne se propageait plus. Il a été suggéré que dans les mélanocytes et par extensions les mélanomes, VZV détourne leur système de transport vésiculaire pour sa propre propagation⁴¹. En effet, dans les mélanocytes, où les mélanosomes sont naturellement transportés le long des dendrites, le VZV pourrait potentiellement utiliser ces mêmes voies pour déplacer ses particules virales ou pour faciliter leur exportation vers les cellules environnantes, y compris les kératinocytes⁴¹. Cela pourrait faciliter la dissémination du virus au sein de l'épiderme. Les MeWo sont donc une lignée qui soutient très fortement l'infection en général et les mutants aurait donc moins de difficultés à se propager dans cette lignée.

Ensuite, des expériences en RT-qPCR ont été réalisées afin d'évaluer si les transcrits de différents gènes de la réponse immunitaire étaient induits et si des différences entre les virus pouvaient être perçues. Ces expériences ont été menées dans plusieurs lignées (MeWo, ARPE-19 et A549). Ces sont toutes des lignées permissives à VZV et qui ont du sens pour l'infection c'est-à-dire des lignées cellulaires

provenant d'organes dans lesquelles le virus se réplique lors d'une infection naturelle. Les cellules ont été infectées par contact avec des MeWo infectées par le VZV WT ou les VZV mutants pendant 24 heures. En effet, comme dit précédemment, il n'est pas possible de maintenir les mutants de l'ORF61 dans d'autres lignées cellulaires que les MeWo. Cette expérience a permis de choisir les A549 comme lignée cellulaire de travail.

Premièrement, pour les A549, dans les expériences de RT-qPCR, nous avons pu observer qu'en l'absence de 47, une plus forte expression des gènes ISG 15, ISG 54 et ISG 56 était induite, confirmant que cette kinase est impliquée dans un mécanisme d'inhibition. Cette induction est, par contre, plus faible que celle observée dans l'article de *P. Vandevenne et al. 2011*. Cela est peut-être dû au fait que notre mutant VZV 47S n'est pas tout à fait le même que le VZV ROka47S 47S précédemment décrit dans la littérature⁸¹. Ensuite, pour le mutant VZV 47KD, étrangement, il n'y a pas d'uprégulation des ISG par rapport au WT indiquant que son activité kinase n'est pas directement impliquée le phénomène d'inhibition. Une hypothèse qui pourrait expliquer ce résultat serait qu'ORF47p pourrait, en plus de phosphoryler IRF3, le « séquestrer » en interagissant peut-être avec d'autres protéines et ainsi empêcher soit sa translocation nucléaire, soit sa fixation sur les promoteurs dont il régule la transcription. Au niveau l'interaction entre ORF47p et ORF9p, les résultats du mutant VZV 9ΔAC montrent qu'elle n'a pas d'influence sur la capacité d'ORF47 à inhiber la réponse immunitaire. Cela va à l'encontre de ce que nous pensions et des résultats de la première expérience prometteuse dans laquelle nous observions une uprégulation importante de l'ISG15 avec le mutant VZV 9ΔAC-27HA-66cmyc. Par contre, les résultats obtenus avec ce mutant VZV 9ΔAC-27HA-66cMyc laissent à penser que d'autres protéines pourraient être impliquées dans l'inhibition des ISGs. En effet, dans la thèse de P. Vandevenne, elle a montré que l'ORF66p inhibait aussi l'expression des gènes de l'IFN-β et d'ISG 15 mais qu'il ne phosphorylait pas IRF3. La présence du tag sur l'ORF66p pourrait donc légèrement perturber son activité et ainsi augmenter l'expression des ISGs pour le mutant VZV 9ΔAC-27HA-66cMyc. Enfin, l'ORF61 empêchent clairement l'expression de gènes des ISGs lors d'une infection par le VZV sauvage mais ne savons pas par quel mécanisme.

Il est néanmoins important de préciser que, malheureusement, les données pour le gène de l'IFN-β ne sont pas exploitables. De fait, dans les conditions testées, il n'y avait pas de niveau basal d'IFN-β et les seuls échantillons positifs pour le gène étaient le contrôle positif (Cellules transfectés au poly(I:C)). Pourtant, nous avons conçu et testés plusieurs amorces (6 sets distincts) pour l'IFN-β mais sans succès. À ce jour, nous n'avons toujours pas d'explications plausibles à ce manque d'expression d'IFN-β par les cellules A549 dans les qRT-PCR. Nous pourrions alors vérifier par ELISA la présence ou l'absence d'IFN-β.

Puisque les ISG sont, en théorie, des gènes qui sont régulés par la présence d'IFNs, nous avons donc pensé que d'autres interférons que l'IFN-β étaient responsables de l'induction des ISGs observée. Des amorces pour les IFN-α et IFN-λ1 ont donc été générées mais aucun résultat positif n'est sorti de ces

tests ni pour les infections, ni pour nos contrôles positifs (cellules traitées au poly(I :C) et THP1 traitées au LPS). Effectivement, les amorces, pourtant identiques à des amorces déjà décrites dans la littérature, ont généré des produits d'amplification multiples impossible à interpréter. Aucune des conditions expérimentales testées n'a uprégulé l'expression des gènes et ils sont très peu exprimés au niveau basal. D'autres expériences avec un autre set d'amorce devront être réalisées. Au niveau des graphiques du taux d'infection, pour faciliter les calculs de fold induction ou pour ne pas en avoir en recours, nous aurions pu mesurer les PFU des différents virus et déposer sur les cellules la même dose d'infection.

Deuxièmement, des Western-Blot ont été réalisés afin d'évaluer l'état d'activation des voies signalétiques impliquées la réponse innée médié par les différents virus et s'ils existaient des différences entre eux. De nouveau, les cellules ont été infectées par le VZV WT et les mutants pendant 24h. Des extraits cellulaires totaux et des extraits cyto-noyaux ont ensuite été résolus par SDS-PAGE.

Ces expériences nous ont permis de confirmer que, via son activité kinase, ORF47p était capable d'hyperphosphoryler IRF3 et qu'il inhibait légèrement sa translocation nucléaire. D'après ces western-blot, ce ne serait donc pas en maintenant IRF3 dans le cytoplasme que la protéine du mutant ORF 47KD est toujours capable d'inhiber l'expression des ISGs. Il serait peut-être intéressant de vérifier, par co-immunoprécipitation, la capacité d'ORF47p-KD d'interagir avec IRF3. Des expériences en immunofluorescence (IF) auraient peut-être pu permettre de mieux voir la translocation d'IRF3 et son état de phosphorylation dans les différentes conditions. De plus, des expériences par PLA (proximity ligation assay) auraient permis de vérifier où se fait l'interaction 47/IRF3 (dans le cyto, dans le noyau, les deux) et si celle-ci est la même pour le VZV sauvage et VZV 47KD. Nous aurions pu aussi analyser la dimérisation d'IRF3 en gel non dénaturant pour confirmer si le mutant VZV 47KD interagissait toujours avec IRF3 et montrer que c'est à cause de cela que l'inhibition de la réponse des ISG est toujours observée. En effet, la protéine 47, même en version mutée, si elle interagit encore avec IRF3, empêchera peut-être toujours sa dimérisation. En dernier lieu, nous pouvons aller voir par CHIP, si IRF3 est capable ou pas de lier les promoteurs en présence de la protéine 47KD avec, bien entendu, pour contrôle positif le mutant VZV 47S où IRF3 est censé se lier sur les gènes-cibles et comme contrôle négatif le VZV WT où IRF3 n'est pas capable de lier les gènes-cibles.

De plus, nous avons montré qu'ORF47p était aussi impliqué dans l'inhibition de la voie NF- κ B en empêchant sa translocation toujours grâce à son activité kinase. De nouveau, nous aurions pu aussi confirmer les résultats de translocation par IF ainsi que des expériences de co-immunoprécipitation, PLA et CHIP. Il est pertinent de préciser que les résultats obtenus, pour la translocation d'IRF3 et NF- κ B, ne sont pas irréfutables. Il n'est pas toujours évident d'obtenir des échantillons cyto-noyau propres, en particulier dans les cellules infectées. Des mises au point plus longues de cette extraction auraient pu être tentée pour obtenir de meilleurs résultats.

Nous avons aussi mis en évidence que l'interaction ORF9p/ORF47p n'est pas indispensable ni pour hyper-phosphoryler l'IRF3, ni pour inhiber les gènes antiviraux et NF- κ B. Ensuite, nous avons démontré

qu'ORF61p influence faiblement la translocation nucléaire d'IRF3 et de NF- κ B et il n'hyperphosphoryle pas IRF3 comme la protéine 47.

Par le fait que nous détectons pas d'IFN- β et que les résultats jusqu'ici pour l'ORF47 et ORF61, ne permettent à eux seuls d'expliquer les observations faites en qRT-PCR. Les voies activées par les IFN de type I et III ont alors été investiguées. Nous avons montré que l'ORF47, de par son activité kinase, inhibe la protéine PKR. Nous savons que cette protéine favoriserait la signalisation de l'IFN de type I médiée par le RLR via la phosphorylation de l'I κ B et la stabilisation des ARNm des gènes de l'interféron de type I. C'est donc peut-être via ce mécanisme que le mutant VZV47S présente une plus forte production d'ISG. La kinase de l'ORF66p serait aussi peut-être concernée dans un processus d'inhibition de PKR au vu des résultats observés par le mutant VZV 9 Δ AC-27HA-66cMyc. Cependant, au vu de la qualité du blot HSP27, il aurait, idéalement, fallu stripper la membrane et pour la révéler avec l'anticorps contre PKR total. Un autre blot précédemment réalisé, se trouve dans l'annexe 3, et il montre le taux de P-PKR et PKR dans les cellules A549. Malgré l'augmentation de la phosphorylation de PKR, la phosphorylation d'eIF2 α n'est que très faiblement induite par les mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1 et 2 mais ce n'est pas le cas pour les virus 9 Δ AC. L'article de *Ambagala APN et al., 2007* indique qu'IE63 de VZV inhibe la phosphorylation d'eIF2 α , ce qui pourrait expliquer une partie de nos résultats pour cette protéine.

Les résultats obtenus sur l'ORF61 dans un contexte infectieux confirment ce qui se trouve dans la littérature c'est-à-dire qu'il entraverait l'activation de la voie NF- κ B et la dégradation des IRFs^{31, 85, 89}. En outre, il influencerait la quantité d'IRF7 et d'IRF9 présente dans les cellules lors d'une infection par le virus WT. Par contre, la voie par laquelle l'ORF61 module la réponse immunitaire innée serait indépendante de PKR. Cependant, contrairement à ce que nous nous attendions, les résultats diffèrent entre les trois mutants 61del. En effet, puisque pour les trois mutants la protéine d'ORF61 n'est plus exprimée, les résultats auraient dû être semblables. Une hypothèse pour expliquer les divergences seraient que les délétions introduites influencent le gène VLT. Il faudrait alors comparer le niveau d'expression des gènes viraux entre les différents 61del, en particulier celui du gène VLT et VLT-IE63 mais aussi ceux possiblement régulés par l'ORF61. Un RNAseq serait alors une expérience à faire pour analyser les gènes viraux et les gènes cellulaires impactés par l'absence d'ORF61. Il serait aussi intéressant de savoir si le défaut de croissance observé pour les mutants 61del est, en partie, lié au défaut d'inhibition de la réponse immunitaire innée. Les résultats du RNAseq devraient mettre en évidence les gènes qui sont uprégulés dans les mutants 61del par rapport au VZV WT. Parmi ceux-ci, nous pourrions peut-être voir ceux des ISGs qui sont uprégulés en l'absence d'ORF61. En empêchant leur expression, soit par si/shRNA, soit par la création d'une lignée KO par Crisp/CAS9, nous pourrions observer le retour, en partant d'une répllication virale.

Afin de confirmer nos résultats dans un système plus physiologique, nous sommes passé dans une lignées primaires de fibroblastes oraux humains. Cependant, nous savons que les infections se font par un système de coculture et que cela amène un biais dans les interprétations, notamment par la présence de nombreuses MeWo non infectées dans l'inoculum. C'est pourquoi, lors des expériences avec les fibroblastes, nous voulions utiliser d'autres techniques d'infection afin d'éviter la coculture. La première technique a été l'infection des cellules via des particules virales libres. Malheureusement, lors de la production des particules dans les mutants n'a pas fonctionné, seules les particules produites par VZV WT étaient exploitables. Une deuxième technique a alors été testée. Elle consistait à infecter les fibroblastes après un tri au FACS des cellules MeWo infectées par les différents virus. Le tri permettait de ne garder que les cellules infectées et de normaliser l'infection en mettant un nombre de cellules connu dans les puits de fibroblastes. Malheureusement, même en ajoutant jusqu'à 10 fois plus de cellules infectées pour les mutants VZV 61del, le taux d'infection obtenu après 24h ou même 48h était toujours trop faible, et, par manque de temps elle n'a pas pu être optimisée d'avantage.

Nous avons donc une seule expérience en fibroblastes oraux primaires pour les qRT-PCR et les Western-Blot dans laquelle l'infection se fait par contact d'1h avec des MeWo infectées (dans un rapport 1 :1). Comme pour les A549, nous avons montré dans la lignée des fibroblastes oraux primaires qu'ORF61p et ORF47p empêchent l'expression des gènes antiviraux lors d'une infection par le virus WT. De plus, les résultats obtenus pour le mutant 9ΔAC indique que l'interaction entre ORF9 et ORF47 n'est pas indispensable pour l'activation de l'expression des gènes. Enfin, le mutant 47KD n'augmente que légèrement l'expression des gènes antiviraux. Nous pouvons donc supposer que l'activité kinase de ORF47 n'est pas directement impliquée dans ce processus ou que cette protéine n'agit pas seule.

Dans les western-blot, au niveau de la voie IRF3, ORF47p et ORF61p sont capables d'inhiber la phosphorylation de la protéine TBK-1 mais le mécanisme reste à être caractériser. Au niveau de la voie NF-κB, d'autres expériences doivent être menée pour pouvoir conclure si ces deux protéines virales inhibent cette voie. Les données obtenues pour les fibroblastes sont légèrement différentes de celles pour les A549. Cela peut s'expliquer peut-être par le fait que les voies inhibées pourraient être différentes en fonction du type cellulaire ou que le comportement des différents mutants pourrait aussi être différent dans différentes lignées de cellules. Néanmoins, avant de conclure cela, il est important de mentionner que l'expérience n'a été faite qu'une seule fois dans les fibroblastes et que d'autres manipulations dans cette lignée doivent avoir lieu afin de confirmer ce que nous observons dans ce travail.

En conclusion, l'ORF47 empêche la réponse innée de se mettre en place en hyperphosphorylant IRF3 et en inhibant la protéine PKR. De plus, son activité kinase semble nécessaire pour l'inhibition de la translocation des facteurs de transcription IRF3 et NF-κB. Ces actions vont, *in fine*, diminuer l'induction des IFN et des ISG antiviraux. La présence d'ORF9p dans un complexe contenant 47, n'est par contre pas importante pour l'inhibition des voies immunitaires.

Ensuite, l'ORF61p a rôle à jouer dans l'inhibition des voies immunitaires lors d'une infection des cellules par le VZV sauvage. Ils auraient une influence sur le taux d'expression des IRF et sur la translocation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B. Mais les voies immunitaires exactes et le mécanisme précis par lesquels ORF61 portent une action restent à déterminer.

6. Bibliographie

1-91

1. Albà MM, Das R, Orengo CA, Kellam P. Genomewide Function Conservation and Phylogeny in the Herpesviridae. *Genome Res.* 2001;11(1):43-54. doi:10.1101/gr.149801
2. Ambagala APN, Cohen JI. Varicella-Zoster Virus IE63, a Major Viral Latency Protein, Is Required To Inhibit the Alpha Interferon-Induced Antiviral Response. *J Virol.* 2007;81(15):7844-7851. doi:10.1128/JVI.00325-07
3. Arvin A. Varicella-zoster virus: molecular virology and virus-host interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2001;4(4):442-449. doi:10.1016/S1369-5274(00)00233-2
4. Arvin AM, Moffat JF, Abendroth A, Oliver SL, eds. *Varicella-Zoster Virus: Genetics, Pathogenesis and Immunity*. Vol 438. Springer International Publishing; 2023. doi:10.1007/978-3-031-15305-1
5. Azevedo RA, Lancien M, Lea PJ. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids.* 2006;30(2):143-162. doi:10.1007/s00726-005-0245-2
6. Boeren M, Meysman P, Laukens K, Ponsaerts P, Ogunjimi B, Delputte P. T cell immunity in HSV-1- and VZV-infected neural ganglia. *Trends Microbiol.* 2023;31(1):51-61. doi:10.1016/j.tim.2022.07.008
7. Bonhomme D, Poirier EZ. Early signaling pathways in virus-infected cells. *Curr Opin Virol.* 2024;66:101411. doi:10.1016/j.coviro.2024.101411
8. Bowie AG. Self-RNA sentinels signal viral invasion. *Nat Immunol.* 2018;19(1):4-5. doi:10.1038/s41590-017-0010-1
9. Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):911-922. doi:10.1038/nri2436
10. Braspenning SE, Lebbink RJ, Depledge DP, et al. Mutagenesis of the Varicella-Zoster Virus Genome Demonstrates That VLT and VLT-ORF63 Proteins Are Dispensable for Lytic Infection. *Viruses.* 2021;13(11):2289. doi:10.3390/v13112289
11. Braspenning SE, Sadaoka T, Breuer J, Verjans GMGM, Ouwendijk WJD, Depledge DP. Decoding the Architecture of the Varicella-Zoster Virus Transcriptome. Shenk T, ed. *mBio.* 2020;11(5):e01568-20. doi:10.1128/mBio.01568-20
12. Cai M, Wang S, Xing J, Zheng C. Characterization of the nuclear import and export signals, and subcellular transport mechanism of varicella-zoster virus ORF9. *J Gen Virol.* 2011;92(3):621-626. doi:10.1099/vir.0.027029-0
13. Cardone G, Heymann JB, Cheng N, Trus BL, Steven AC. Procapsid Assembly, Maturation, Nuclear Exit: Dynamic Steps in the Production of Infectious Herpesvirions. In: Rossmann MG, Rao VB, eds. *Viral Molecular Machines*. Vol 726. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US; 2012:423-439. doi:10.1007/978-1-4614-0980-9_19
14. Carty M, Guy C, Bowie AG. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem Pharmacol.* 2021;183:114316. doi:10.1016/j.bcp.2020.114316
15. Chaudhuri V, Sommer M, Rajamani J, Zerboni L, Arvin AM. Functions of Varicella-Zoster Virus ORF23 Capsid Protein in Viral Replication and the Pathogenesis of Skin Infection. *J Virol.* 2008;82(20):10231-10246. doi:10.1128/JVI.01890-07

16. Che X, Reichelt M, Sommer MH, Rajamani J, Zerboni L, Arvin AM. Functions of the ORF9-to-ORF12 Gene Cluster in Varicella-Zoster Virus Replication and in the Pathogenesis of Skin Infection. *J Virol.* 2008;82(12):5825-5834. doi:10.1128/JVI.00303-08
17. Chen JJ, Zhu Z, Gershon AA, Gershon MD. Mannose 6-Phosphate Receptor Dependence of Varicella Zoster Virus Infection In Vitro and in the Epidermis during Varicella and Zoster. *Cell.* 2004;119(7):915-926. doi:10.1016/j.cell.2004.11.007
18. Chiu YH, MacMillan JB, Chen ZJ. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell.* 2009;138(3):576-591. doi:10.1016/j.cell.2009.06.015
19. Chukwurah E, Farabaugh KT, Guan B, Ramakrishnan P, Hatzoglou M. A tale of two proteins: PACT and PKR and their roles in inflammation. *FEBS J.* 2021;288(22):6365-6391. doi:10.1111/febs.15691
20. Cohen JJ. Genomic Structure and Organization of Varicella-Zoster Virus. In: Schmidt A, Wolff MH, Schenemann S, eds. *Contributions to Microbiology.* Vol 3. KARGER; 1999:10-20. doi:10.1159/000060313
21. Cohen JJ. Varicella-Zoster Virus: General Features. In: *Encyclopedia of Virology.* Elsevier; 2008:250-256. doi:10.1016/B978-012374410-4.00526-4
22. Cohen JJ. The Varicella-Zoster Virus Genome. In: Abendroth A, Arvin AM, Moffat JF, eds. *Varicella-Zoster Virus.* Vol 342. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg; 2010:1-14. doi:10.1007/82_2010_10
23. Cole NL, Grose C. Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella-zoster virus. *Rev Med Virol.* 2003;13(4):207-222. doi:10.1002/rmv.377
24. Depledge DP, Ouwendijk WJD, Sadaoka T, et al. A spliced latency-associated VZV transcript maps antisense to the viral transactivator gene 61. *Nat Commun.* 2018;9(1):1167. doi:10.1038/s41467-018-03569-2
25. Depledge DP, Sadaoka T, Ouwendijk WJD. Molecular Aspects of Varicella-Zoster Virus Latency. *Viruses.* 2018;10(7):349. doi:10.3390/v10070349
26. Eiermann N, Haneke K, Sun Z, Stoecklin G, Ruggieri A. Dance with the Devil: Stress Granules and Signaling in Antiviral Responses. *Viruses.* 2020;12(9):984. doi:10.3390/v12090984
27. El Mjiyad N, Bontems S, Gloire G, et al. Varicella-Zoster Virus Modulates NF- κ B Recruitment on Selected Cellular Promoters. *J Virol.* 2007;81(23):13092-13104. doi:10.1128/JVI.01378-07
28. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell.* 2020;180(6):1044-1066. doi:10.1016/j.cell.2020.02.041
29. Freer G, Pistello M. Varicella-zoster virus infection: natural history, clinical manifestations, immunity and current and future vaccination strategies.
30. Füllsack S, Rosenthal A, Wajant H, Siegmund D. Redundant and receptor-specific activities of TRADD, RIPK1 and FADD in death receptor signaling. *Cell Death Dis.* 2019;10(2):122. doi:10.1038/s41419-019-1396-5
31. Gerada C, Campbell TM, Kennedy JJ, et al. Manipulation of the Innate Immune Response by Varicella Zoster Virus. *Front Immunol.* 2020;11:1. doi:10.3389/fimmu.2020.00001

32. Gershon AA, Davis L, Krinsky C, Cowles R, Reichard R, Gershon M. LATENCY OF VARICELLA ZOSTER VIRUS IN DORSAL ROOT, CRANIAL, AND ENTERIC GANGLIA IN VACCINATED CHILDREN.
33. Gershon AA, Breuer J, Cohen JI, et al. Varicella zoster virus infection. *Nat Rev Dis Primer*. 2015;1(1):15016. doi:10.1038/nrdp.2015.16
34. Hennessy C, McKernan DP. Anti-Viral Pattern Recognition Receptors as Therapeutic Targets. *Cells*. 2021;10(9):2258. doi:10.3390/cells10092258
35. Herold BC, WuDunn D, Soltys N, Spear PG. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J Virol*. 1991;65(3):1090-1098. doi:10.1128/jvi.65.3.1090-1098.1991
36. Hertzog J, Zhou W, Fowler G, et al. Varicella-Zoster virus ORF9 is an antagonist of the DNA sensor cGAS. *EMBO J*. 2022;41(14):e109217. doi:10.15252/embj.2021109217
37. Hristova DB, Oliveira M, Wagner E, et al. DNA-PKcs is required for cGAS/STING-dependent viral DNA sensing in human cells. *iScience*. 2024;27(1):108760. doi:10.1016/j.isci.2023.108760
38. Jassin M. Etude du rôle de la protéine ORF9p du virus de la varicelle et du zona dans la fusion cellulaire.
39. Jiang X. Mechanism of Ubiquitin Induced Activation of Rig-I Like Receptors in Antiviral Innate Immunity.
40. Kennedy PGE, Gershon AA. Clinical Features of Varicella-Zoster Virus Infection. *Viruses*. 2018;10(11):609. doi:10.3390/v10110609
41. Jones M, Dry IR, Frampton D, Singh M, Kanda RK, et al. (2014) RNA-seq Analysis of Host and Viral Gene Expression Highlights Interaction between Varicella Zoster Virus and Keratinocyte Differentiation. *PLOS Pathogens* 10(1): e1003896. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003896>
42. Kenyon TK, Cohen JI, Grose C. Phosphorylation by the Varicella-Zoster Virus ORF47 Protein Serine Kinase Determines whether Endocytosed Viral gE Traffics to the *trans*- Golgi Network or Recycles to the Cell Membrane. *J Virol*. 2002;76(21):10980-10993. doi:10.1128/JVI.76.21.10980-10993.2002
43. Kenyon TK, Lynch J, Hay J, Ruyechan W, Grose C. Varicella-Zoster Virus ORF47 Protein Serine Kinase: Characterization of a Cloned, Biologically Active Phosphotransferase and Two Viral Substrates, ORF62 and ORF63. *J Virol*. 2001;75(18):8854-8858. doi:10.1128/JVI.75.18.8854-8858.2001
44. Kenyon TK, Homan E, Storlie J, Ikoma M, Grose C. Comparison of varicella-zoster virus ORF47 protein kinase and casein kinase II and their substrates. *J Med Virol*. 2003;70(S1):S95-S102. doi:10.1002/jmv.10329
45. Kenyon TK, Grose C. VZV ORF47 Serine Protein Kinase and Its Viral Substrates. In: Abendroth A, Arvin AM, Moffat JF, eds. *Varicella-Zoster Virus*. Vol 342. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg; 2010:99-111. doi:10.1007/82_2009_5
46. Khalil MI, Ruyechan WT, Hay J, Arvin A. Differential effects of Sp cellular transcription factors on viral promoter activation by varicella-zoster virus (VZV) IE62 protein. *Virology*. 2015;485:47-57. doi:10.1016/j.virol.2015.06.031
47. Kim JA, Park SK, Seo SW, Lee CH, Shin OS. STING Is Involved in Antiviral Immune Response

- against VZV Infection via the Induction of Type I and III IFN Pathways. *J Invest Dermatol*. 2017;137(10):2101-2109. doi:10.1016/j.jid.2017.03.041
48. Kinchington PR, Hougland JK, Arvin AM, Ruyechan WT, Hay J. The varicella-zoster virus immediate-early protein IE62 is a major component of virus particles. *J Virol*. 1992;66(1):359-366. doi:10.1128/jvi.66.1.359-366.1992
 49. Lambert J. *Varicella-Zoster Virus ORF9p: Role in Viral Envelopment and Cell-Cell Fusion*.
 50. Lebrun M, Thelen N, Thiry M, et al. Varicella-zoster virus induces the formation of dynamic nuclear capsid aggregates. *Virology*. 2014;454-455:311-327. doi:10.1016/j.virol.2014.02.023
 51. Lenac Roviš T, Bailer SM, Pothineni VR, et al. Comprehensive Analysis of Varicella-Zoster Virus Proteins Using a New Monoclonal Antibody Collection. *J Virol*. 2013;87(12):6943-6954. doi:10.1128/JVI.00407-13
 52. Li Q, Ali MA, Wang K, et al. Insulin Degrading Enzyme Induces a Conformational Change in Varicella-Zoster Virus gE, and Enhances Virus Infectivity and Stability. Efstathiou S, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(6):e11327. doi:10.1371/journal.pone.0011327
 53. Lin HS, Li CH, Chen LW, 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 Res*. 2024;345:199379. doi:10.1016/j.virusres.2024.199379
 54. Loo YM, Gale M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity*. 2011;34(5):680-692. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.003
 55. Ma Y, He B. Recognition of Herpes Simplex Viruses: Toll-Like Receptors and Beyond. *J Mol Biol*. 2014;426(6):1133-1147. doi:10.1016/j.jmb.2013.11.012
 56. Mador N, Goldenberg D, Cohen O, Panet A, Steiner I. Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcripts Suppress Viral Replication and Reduce Immediate-Early Gene mRNA Levels in a Neuronal Cell Line. *J Virol*. 1998;72(6):5067-5075. doi:10.1128/JVI.72.6.5067-5075.1998
 57. Moffat JF, Zerboni L, Sommer MH, et al. The ORF47 and ORF66 putative protein kinases of varicella-zoster virus determine tropism for human T cells and skin in the SCID-hu mouse. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(20):11969-11974. doi:10.1073/pnas.95.20.11969
 58. Newcomb WW, Homa FL, Thomsen DR, et al. Assembly of the Herpes Simplex Virus Capsid: Characterization of Intermediates Observed During Cell-free Capsid Formation. *J Mol Biol*. 1996;263(3):432-446. doi:10.1006/jmbi.1996.0587
 59. Ng TI, Keenan L, Kinchington PR, Grose C. Phosphorylation of varicella-zoster virus open reading frame (ORF) 62 regulatory product by viral ORF 47-associated protein kinase. *J Virol*. 1994;68(3):1350-1359. doi:10.1128/jvi.68.3.1350-1359.1994
 60. Osterrieder K, ed. *Cell Biology of Herpes Viruses*. Vol 223. Springer International Publishing; 2017. doi:10.1007/978-3-319-53168-7
 61. Ote I, Lebrun M, Vandevenne P, et al. Varicella-Zoster Virus IE4 Protein Interacts with SR Proteins and Exports mRNAs through the TAP/NXF1 Pathway. Valcarcel J, ed. *PLoS ONE*. 2009;4(11):e7882. doi:10.1371/journal.pone.0007882
 62. Ouwendijk WJD, Depledge DP, Rajbhandari L, et al. Varicella-zoster virus VLT-ORF63 fusion transcript induces broad viral gene expression during reactivation from neuronal latency. *Nat*

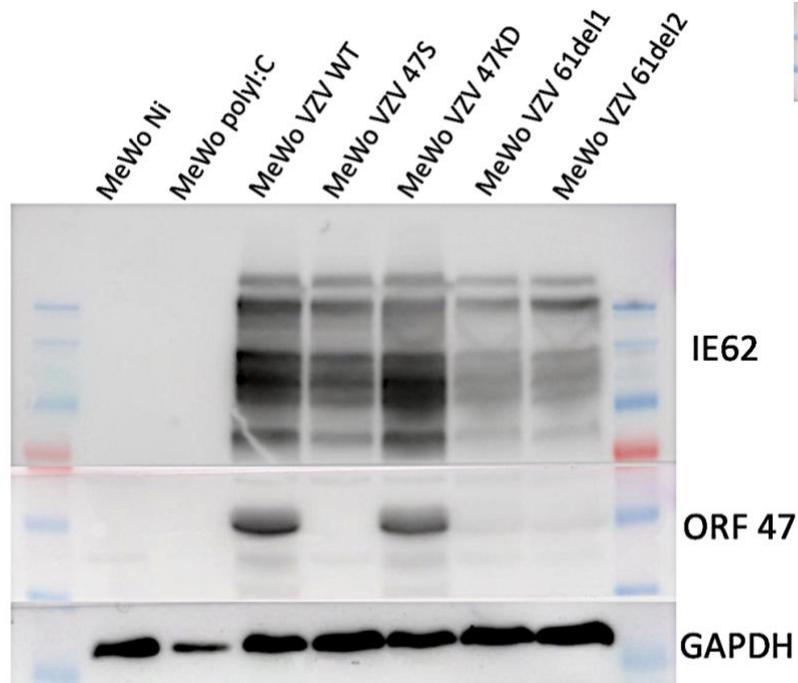
Commun. 2020;11(1):6324. doi:10.1038/s41467-020-20031-4

63. Piette J, Defechereux-Thibaut De Maisières P, Baudoux-Tebache L, Sadzot-Delvaux C, Rentier B. La régulation des cycles infectieux du virus de la varicelle et du zona. *médecine/sciences.* 1998;14(5):556. doi:10.4267/10608/1093
64. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch Biochem Biophys.* 2019;670:4-14. doi:10.1016/j.abb.2019.02.008
65. Riaz A, Kaleem A, Abdullah R, Iqtedar M, Hoessli DC, Aftab M. In silico approaches to study the human asparagine synthetase: An insight of the interaction between the enzyme active sites and its substrates. Rajalakshmi M, ed. *PLOS ONE.* 2024;19(8):e0307448. doi:10.1371/journal.pone.0307448
66. Riva L, Thiry M, Bontems S, et al. ORF9p Phosphorylation by ORF47p Is Crucial for the Formation and Egress of Varicella-Zoster Virus Viral Particles. *J Virol.* 2013;87(5):2868-2881. doi:10.1128/JVI.02757-12
67. Riva L, Thiry M, Lebrun M, L'homme L, Piette J, Sadzot-Delvaux C. Deletion of the ORF9p Acidic Cluster Impairs the Nuclear Egress of Varicella-Zoster Virus Capsids. Hutt-Fletcher LM, ed. *J Virol.* 2015;89(4):2436-2441. doi:10.1128/JVI.03215-14
68. Rossmann MG, Rao VB, eds. *Viral Molecular Machines.* Vol 726. Springer US; 2012. doi:10.1007/978-1-4614-0980-9
69. Ruyechan WT, Hay J. Varicella-Zoster Virus: Molecular Biology. In: *Encyclopedia of Virology.* Elsevier; 2008:256-263. doi:10.1016/B978-012374410-4.00527-6
70. Sadzot-Delvaux C, Valentin ED, Bontems S. Le virus de la varicelle et du zona : un alphaherpesvirus pas vraiment comme les autres... 2006;10.
71. Sen N, Sung P, Panda A, Arvin AM. Distinctive Roles for Type I and Type II Interferons and Interferon Regulatory Factors in the Host Cell Defense against Varicella-Zoster Virus. Dermody TS, ed. *J Virol.* 2018;92(21):e01151-18. doi:10.1128/JVI.01151-18
72. Servant MJ, Ten Oever B, LePage C, et al. Identification of Distinct Signaling Pathways Leading to the Phosphorylation of Interferon Regulatory Factor 3. *J Biol Chem.* 2001;276(1):355-363. doi:10.1074/jbc.M007790200
73. Shakya AK, O'Callaghan DJ, Kim SK. Interferon Gamma Inhibits Varicella-Zoster Virus Replication in a Cell Line-Dependent Manner. Longnecker RM, ed. *J Virol.* 2019;93(12):e00257-19. doi:10.1128/JVI.00257-19
74. Shen W, Sa E Silva M, Jaber T, et al. Two Small RNAs Encoded within the First 1.5 Kilobases of the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript Can Inhibit Productive Infection and Cooperate To Inhibit Apoptosis. *J Virol.* 2009;83(18):9131-9139. doi:10.1128/JVI.00871-09
75. Stellberger T, Häuser R, Baiker A, Pothineni VR, Haas J, Uetz P. Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusions proteins: the Varicella Zoster Virus interactome. *Proteome Sci.* 2010;8(1):8. doi:10.1186/1477-5956-8-8
76. Suenaga T, Satoh T, Somboonthum P, Kawaguchi Y, Mori Y, Arase H. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(2):866-871. doi:10.1073/pnas.0913351107

77. Sun J, Liu C, Peng R, et al. Cryo-EM structure of the varicella-zoster virus A-capsid. *Nat Commun.* 2020;11(1):4795. doi:10.1038/s41467-020-18537-y
78. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses.* 2011;3(6):920-940. doi:10.3390/v3060920
79. Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, Kellie S, Kobe B. TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *J Leukoc Biol.* 2016;100(1):27-45. doi:10.1189/jlb.2RI1115-531R
80. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature.* 2008;454(7205):780-783. doi:10.1038/nature07103
81. Vandevenne P, Lebrun M, El Mjijad N, et al. The Varicella-Zoster Virus ORF47 Kinase Interferes with Host Innate Immune Response by Inhibiting the Activation of IRF3. Aguilar P, ed. *PLoS ONE.* 2011;6(2):e16870. doi:10.1371/journal.pone.0016870
82. Vandevenne P, Sadzot-Delvaux C, Piette J. Innate immune response and viral interference strategies developed by Human Herpesviruses. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(12):1955-1972. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.001
83. Wang L, Sommer M, Rajamani J, Arvin AM. Regulation of the ORF61 Promoter and ORF61 Functions in Varicella-Zoster Virus Replication and Pathogenesis. *J Virol.* 2009;83(15):7560-7572. doi:10.1128/JVI.00118-09
84. Weinberg ED. Current topics in microbiology and immunology. Volume 72. *Microchem J.* 1977;22(4):590. doi:10.1016/0026-265X(77)90137-0
85. Whitmer T, Malouli D, Uebelhoer LS, DeFilippis VR, Früh K, Verweij MC. The ORF61 Protein Encoded by Simian Varicella Virus and Varicella-Zoster Virus Inhibits NF- κ B Signaling by Interfering with I κ B α Degradation. Hutt-Fletcher L, ed. *J Virol.* 2015;89(17):8687-8700. doi:10.1128/JVI.01149-15
86. Zerboni L, Sen N, Oliver SL, Arvin AM. Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(3):197-210. doi:10.1038/nrmicro3215
87. Zhang D, Su C, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 Serine Protease VP24 Blocks the DNA-Sensing Signal Pathway by Abrogating Activation of Interferon Regulatory Factor 3. Sandri-Goldin RM, ed. *J Virol.* 2016;90(12):5824-5829. doi:10.1128/JVI.00186-16
88. Zhao J, Qin C, Liu Y, Rao Y, Feng P. Herpes Simplex Virus and Pattern Recognition Receptors: An Arms Race. *Front Immunol.* 2021;11:613799. doi:10.3389/fimmu.2020.613799
89. Zhu H, Zheng C, Xing J, et al. Varicella-Zoster Virus Immediate-Early Protein ORF61 Abrogates the IRF3-Mediated Innate Immune Response through Degradation of Activated IRF3. *J Virol.* 2011;85(21):11079-11089. doi:10.1128/JVI.05098-11
90. Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence.* 2021;12(1):2670-2702. doi:10.1080/21505594.2021.1982373
91. Zhu Z, Gershon MD, Ambron R, Gabel C, Gershon AA. Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(8):3546-3550. doi:10.1073/pnas.92.8.3546

7. Annexes

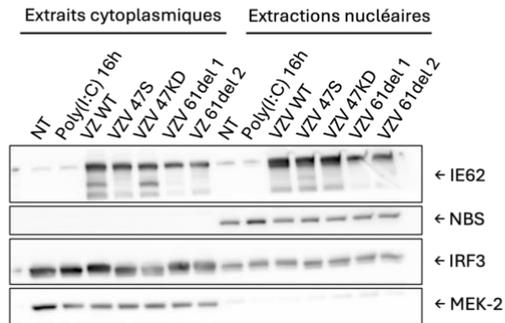
Annexe 1 : Western blot de l'ORF47



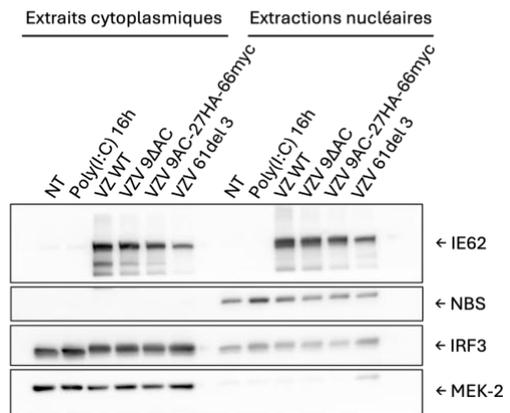
Les MeWo ont été infectées par coculture avec le VZV WT et les mutants, à savoir le VZV 47S, 47KD, 61del 1 et 61del 2 pendant 24h. Des extraits cellulaires totaux ont été réalisés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre ORF47, GAPDH et IE62. GAPDH et IE62 ont été utilisés respectivement comme contrôle du chargement et du taux d'infection. NT : non traitées/non infectées.

Annexe 2 : Western blot de la voie NF- κ B

A

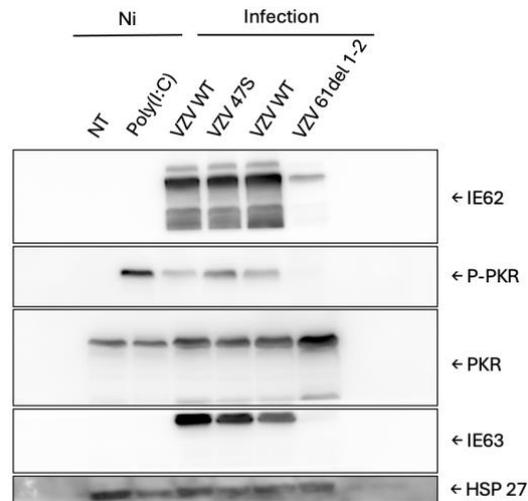


B



Les cellules A549 ont été infectées par coculture avec le VZV WT et les mutants, à savoir le VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc pendant 24h. Le contrôle négatif correspond aux cellules non traitées au TNF α et non infectées tandis que les cellules traitées au TNF α pendant 1h constituent le contrôle positif. Des extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été récoltés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre IKK α , P65, P50, I κ B α , NBS, MEK-2 et IE62. NBS a été utilisé comme contrôle de charge nucléaire, MEK-2 a été utilisé comme contrôle de charge cytoplasmique et IE62 comme contrôle du taux d'infection. (A) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2. (B) Western Blot pour les mutants VZV 47S, 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc. NT : non traitées/non infectées

Annexe 3 : Western blot de PKR total et P-PKR



Les cellules A549 ont été infectées par coculture avec le VZV WT et les mutants, à savoir le VZV 47S, 47KD, 61del 1, 61del 2, 9 Δ AC et 9 Δ AC-27HA-66myc pendant 24h. Le contrôle négatif correspond aux cellules non traitées poly(I :C) et non infectées tandis que les cellules traitées au poly(I :C) pendant 16h constituent le contrôle positif. Des extraits totaux ont été récoltés et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. La membrane a été immunoblottée avec des anticorps spécifiques contre PKR, P-PKR, IE63, HSP27 et IE62. HSP27 a été utilisé comme contrôle de charge cellulaire et IE62 comme contrôle du taux d'infection. NT : non traitées/non infectées